



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences
Fakultät Life Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Bachelorthesis

Entwicklung von Methoden zur gezielten Rezeptor-spezifischen Einschleusung von Antigenen in antigen-präsentierende Zellen für die Funktionsdiagnostik humaner T-Lymphozyten *in-vitro*

Im Studiengang
B. Sc. Biotechnologie

Vorgelegt von
Fahten Margot Habib



Hamburg
13. Juni 2019

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Wacker, Claus-Dieter (Life Sciences, HAW Hamburg)
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Haag, Friedrich (Institut für Immunologie, UKE)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor des Institutes für Immunologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis.....	8
Zusammenfassung	9
Abstract	10
Zielsetzung der Arbeit.....	11
1 Einleitung.....	13
1.1 Grundlagen des Immunsystems.....	13
1.2 Professionelle Antigenpräsentierende Zellen	14
1.3 B- Lymphozyten als Antigenpräsentierende Zellen	15
1.4 Die T-Zell-Aktivierung durch Antigenpräsentation	16
1.5 Antikörper.....	17
1.6 Rekombinante Antikörperfragmente	19
1.6.1 Einzeldomänenantikörper: „Nanobodies“	19
1.6.2 Vergleich von Antikörper und Nanobody	20
1.6.3 scFv-Fragmente	21
1.7 Antigene.....	22
1.7.1 CMV Cytomegalovirus pp65	22
1.7.2 Influenza A Virus	23
2 Materialien	25
2.1 Geräte.....	25
2.2 Verbrauchsmaterial.....	25
2.3 Chemikalien und Reagenzien	25
2.4 Sequenzen.....	26
2.5 Antikörper.....	26
2.6 Antibiotika	27
2.7 Farbstoffe.....	27
2.8 Enzyme	27
2.9 Primer	27
2.10 Puffer und Lösungen	27
2.11 Nährmedien	28
2.12 Bakterienstämme	29
2.13 Zellen	29
2.14 Plasmide.....	29

2.15	Kits.....	29
2.16	Protein-DNA-Marker.....	30
3	Methoden	31
3.1	Gentechnische und molekularbiologische Methoden.....	31
3.1.1	Restriktionsverdau von Insert & Vektoren.....	31
3.1.2	Dephosphorylierung der Vektoren	33
3.1.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
3.1.4	Plasmidisolierung nach QIAprep™-Spin.....	34
3.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten	35
3.1.6	Transformation von Plasmid-DNA in XL-1 blue <i>E.coli</i>	36
3.1.7	Screening nach positiven Kolonien.....	37
3.1.8	Minipräparation von Plasmiden mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“	38
3.1.9	DNA-Sequenzierung	39
3.2	Mikrobiologische Methoden.....	39
3.2.1	Herstellung von kompetenten Zellen XL-1 blue <i>E.coli</i>	39
3.2.2	Herstellung von 2YT-Carb-Agarplatten als Nährboden	40
3.3	Methoden zur Zellkultur	41
3.3.1	Stabile Transfektion von HEK-293 6E Zellen	41
3.4	Biochemische Methoden.....	42
3.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
3.4.2	Immunpräzipitation von Proteinen.....	43
3.4.3	Proteinaufreinigung durch Säulenchromatographie.....	44
3.5	Methoden zur Zelltechnik.....	47
3.5.1	Isolierung von PBMCs aus humanem Leukozytenkonzentrat	47
3.5.2	Manuelle Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	47
3.5.3	Direkte Isolierung der PBMCs aus humanem Vollblut	48
3.5.4	Aufreinigung von B-Zellen mit CD19+ PluriBeads	49
3.5.5	Zellmarkierung mit eFluor 670 für die Langzeitstimulation.....	49
3.5.6	Oberflächenfärbung von Zellen.....	50
3.6	Methoden zur Detektion	51
3.6.1	Durchflusszytometrie	51
3.6.2	Konzentrationsbestimmung an NanoDrop	51
4	Ergebnisse	53
4.1	Herstellung von anti-Kappa und anti-IgG1 Nanobodies mit Antigen-Tag (aCMV, aInfAnuc, HSA und scFv) in HEK-293 6E- Zellen.....	53
4.1.1	Klonierung und Identifikation	53

4.1.2	Proteinexpression der klonierten Vektoren in HEK-293 6E-Zellen	55
4.1.3	Aufreinigung klonierter Fusionsproteine über eine ProteinA-Säule mit anschließender Konzentrationsbestimmung	58
4.1.4	BCA-Test	59
4.2	Bindefähigkeit von Sphero™-Beads gekoppelte TP 1170-scFv Proteine.....	60
4.3	Antigenpräsentation von aktivierten T-Lymphozyten durch isolierte B-Lymphozyten aus PBMCs	61
4.4	Stimulation von T-Zellen rezeptorvermitteltes Einschleusen von TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA in verschiedene antigenpräsentierende Zellen aus Vollblut	63
4.4.1	Proliferation aktivierter T-Lymphozyten nach Langzeitstimulation.....	65
4.4.2	Expression der Aktivierungsmarker CD136 und CD154 in aktivierten T-Lymphozyten nach Kurzzeitstimulation	69
5	Diskussion.....	72
5.1	Bindefähigkeit von Sphero™-Beads gekoppelte TP 1170-scFv Proteine.....	72
5.2	Antigenpräsentation von aktivierten T-Lymphozyten durch isolierte B-Lymphozyten aus PBMCs	73
5.3	Stimulation von antigenpräsentierenden Zellen aus Vollblut durch rezeptorvermitteltes Einschleusen von Influenza mittels Fusionsproteine (TP1170, -InfAnuc und -HSA).....	74
5.3.1	Langzeitstimulation	74
5.3.2	Kurzzeitstimulation	75
6	Ausblick	76
7	Danksagung.....	77
8	Literaturverzeichnis	78
9	Anhang	82
9.1	DNA-Sequenzen	82
9.2	Klonierte DNA-Konstrukte	83

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AK	Antikörper
APC	Antigenpresenting cells (Antigen-präsentierende-Zellen)
Bp	Basenpaare
ca	circa
Carb	Carben
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Zytomegalievirus (HHV 5) engl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DZ	Dentritisch Zellen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
h	hour (Stunde)
H ₂ O	Wasser
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HF®	High Fidelity
HLA	humanes Leukozyten-Antigen (Human Leucocyte Antigen)
IgG	Immunglobulin G
InfAnuc	Nucleoprotein Influenza A
kb	kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
ml	Milliliter
OD	Optische Dichte
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PerCPCy7	Peridininchlorophyll-Cyanine 5.5
pp65	Phosphoprotein 65
PRRs	Pattern Recognition Receptors (Mustererkennungsrezeptoren)
rhCD40L	rekombinanter CD40 Ligand
RPMI	Roswell Park Memorial Institute -Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
scFv	single chain Fv
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TAP	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCR	transporter associated with antigen processing
TCR	T-cell-receptor (T-Zellrezeptor)
V	Volt
V _H	variable Domäne der schweren Kette eines IgG-Antikörpers
V _{HH}	variable Domäne eines cameliden Antikörpers
V _L	variable Domäne der leichten Kette eines IgG-Antikörpers
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der klonierten Fusionsproteine	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Kreuzpräsentation	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Antigenpräsentation	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung von T-Zell-Aktivierung durch Antigenpräsentation der B-Zelle.....	16
Abbildung 5: Aufbau eines Antikörpers des Typs IgG und dessen rekombinante Fragmente	18
Abbildung 6: Charakterisierung von anti-IgG Nanobody „toolbox“	21
Abbildung 7: Eine Carbenicillin-haltige Agarplatte. Ausplattiert einer <i>E. Coli</i> - Kultur.....	37
Abbildung 8: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte für die Durchführung einer Minipräparation.	38
Abbildung 9: Darstellung einer laufenden SDS-PAGE- Gelelektrophorese mit einem 10%-igen Agarosegel. Betrieb bei 200 V für 37 min	43
Abbildung 10: Schematische Darstellung zur Gerinnung von PBMCs.....	48
Abbildung 11: Auftrennung der geschnittenen Vektoren.....	54
Abbildung 12: Darstellung der HEK-293 6E Zellen.....	55
Abbildung 13: Proteinexpression der klonierten DNA-Konstrukte in HEK-Zellen einer Testtransfektion.	56
Abbildung 14: Proteinexpression der klonierten DNA-Konstrukte in HEK-Zellen einer Produktransfektion.	57
Abbildung 15: Proteinaufreinigung von TP1170-InfAnuc über eine ProteinA-Sepharose-Säule.....	58
Abbildung 16: Standardgeraden der Verdünnungsreihe.	59
Abbildung 17: Auswertung der Bindefähigkeit von TP1170-scFv.	60
Abbildung 18: Ergebnis zur Bestimmung der Bindefähigkeit von TP1170-scFv in einem Histogramm.	60
Abbildung 19: Auswertung der isolierten B-Lymphozyten aus PBMCs.	61
Abbildung 20: Ergebnis der aktivierten CD4+- T-Helferzellen und CD8+- Zytotoxische T-Zellen.	62
Abbildung 21: Auswertung der isolierten PBMCs aus humanem Vollblut.	64
Abbildung 22: Darstellung des Ergebnisses von aktivierten CD3+-B- Zellen in Dot-Plot-Diagramme.	66
Abbildung 23: Ergebnis der aktivierten CD4+- T-Helferzellen durch verschiedene rezeptorbindende AK.	67
Abbildung 24: Ergebnis der aktivierten CD8+- Zytotoxischen Zellen durch verschiedene rezeptorbindende AK.	67
Abbildung 25: Ergebnis von CD4+- und CD8+ aktivierten T-Zellen nach einer Langzeitstimulation von 5 Tagen.....	68
Abbildung 26: Auswertung der isolierten PBMCs aus humanem Vollblut einer Kurzzeitstimulation.	69

Abbildung 27: Ergebnis von aktivierten T-Lymphozyten der CD136+/CD154+ Expression nach einer Kurzzeitstimulation.	70
--	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakterisierung des Nucleoproteins A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	24
Tabelle 2: Übersicht der Restriktionsenzymen NcoI-HF, NotI-HF und XbaI.....	31
Tabelle 3: Übersicht der Ansetzung von DNA- und PEI-Mix für eine Testtransfektion und eine Produkttransfektion	41
Tabelle 4: Übersicht der Schritte für eine Affinitätschromatographie an der ProteinA-Säule. Verwendung von HEK-Zellüberständen einer Testtransfektion und Produkttransfektion.....	45
Tabelle 5: Übersicht für das Durchführen eines Umpufferwechsels von aufgereinigten Proteinen. Anwendung mittels der PD10-Entsalzungssäule von HEK-Zellüberständen einer Testtransfektion und Produkttransfektion	46
Tabelle 6: Verdünnungsreihe vom Farbstoff eFluor 670. Durchführbar in vier getrennten Schritten. .	50
Tabelle 7: Verdünnungsreihe, Konzentrationswerte mit und ohne Blank.....	59
Tabelle 8: Das Ergebnis der Bestimmung der Konzentration von Fusionsproteinen.....	59
Tabelle 9: Langzeitstimulation aus Vollblut aus vier Probanden.....	65

Zusammenfassung

Professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) besitzen eine wichtige Rolle bei zellulären Immunreaktionen. Dabei nehmen APCs als B-Lymphozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen durch Zelloberflächenexpression Antigene auf. Die Antigenpräsentation erfolgt mit Hilfe von Oberflächenproteinen der MHC-Moleküle. Dadurch wird das internalisierte Antigen an naiven T-Zellen präsentiert. Hierbei wird die Antigenprozessierung über MHC-I an CD8⁺- Zytotoxische T-Zellen und über MHC-II an CD4⁺- T-Helferzellen unterschieden. Im Vergleich zu B-Zellen haben die Dendritische Zellen die Fähigkeit eine zytotoxische Immunantwort zu initiieren. Die Antigenaufnahme und Präsentation über dem MHC-I-Komplex an CD8⁺- Lymphozyten wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. Nach der Aktivierung der B-Zelle mittels der Bindung von CD4⁺-T-Zellen wird die Zellproliferation zu Gedächtnis- und Plasmazellen eingeleitet. Dies führt zu einer Antikörperproduktion gegen ein bestimmtes Antigen der Plasmazellen aus. Antikörper sind für die humorale Immunantwort verantwortlich. Sie binden nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und mit einer hohen Affinität an Antigene. Als Werkzeuge zeigen sich rekombinante Antikörper, wie z.B. aus Alpaka gewonnenen Einzelkörperdomänen (Nanobody), als vielversprechende Systeme. Aufgrund der Antigenpräsentierenden Stelle und der geringen Molekülmasse besitzen Nanobodies wesentliche Vorteile in der Biotechnologie und für medizinische Anwendungen als konventionelle monoklonale Antikörper.

In der vorliegenden Arbeit werden die Antigene Influenza und Cytomegalie (CMV) als Virusmodelle verwendet. Nach Schätzungen der WHO (World Health Organization) verursachen Influenza-Viren bis zu 15 % der Weltbevölkerung zur jährlichen Infektion mit gefährlichen Symptomen. Auch der Cytomegalievirus, auch als Humanes Herpesvirus 5 (HHV 5) bekannt, gehört mit ca. 70% infizierten Menschen in der Weltbevölkerung zu den weltbreitesten viralen Infektionen. Hingegen zum Influenzavirus verursacht Cytomegalie die lebenslange Latenz im Menschen.

Mit Hilfe von gentechnischen Methoden ermöglicht die Klonierung das Zusammenfügen von verschiedenen DNA-Sequenzen in einem Vektor. Mit einer anschließenden Stimulation der rekombinanten Fusionsproteine an APCs wird der Nachweis der T-Zellaktivität im Durchflusszytometer bestimmt.

Abstract

Professional antigen presenting cells (APC) play an important role in cellular immune responses. In this case, APCs as B lymphocytes, dendritic cells and macrophages acquire antigens by cell surface expression. Antigen presentation is performed using surface proteins of the MHC molecules. This presents the internalized antigen to naive T cells. Antigen processing is differentiated by MHC-I to CD8 + - cytotoxic T cells and by MHC-II to CD4 + T helper cells. Compared to B cells, the dendritic cells have the ability to initiate a cytotoxic immune response. Antigen uptake and presentation on the MHC-I complex of CD8 + lymphocytes are referred to as cross-presentation. After activation of the B cell by the binding of CD4 + T cells, cell proliferation is induced to memory and plasma cells. This leads to antibody production against a particular antigen of the plasma cells. Antibodies are responsible for the humoral immune response. They bind to the key-lock principle and with a high affinity for antigens. As tools, recombinant antibodies, e.g. from alpaca derived single-body domains (nanobody), as promising systems. Because of the antigen presenting site and the low molecular weight, nanobodies have significant advantages in biotechnology and medical applications than conventional monoclonal antibodies.

In the present study, the antigens influenza and cytomegalovirus (CMV) are used as virus models. According to estimates by the WHO (World Health Organization), influenza viruses cause up to 15% of the world's population to become infected with dangerous symptoms every year. Cytomegalovirus, also known as Human Herpesvirus 5 (HHV 5), is one of the world's largest viral infections, with approximately 70% of infected people in the world's population. In contrast to the influenza virus, cytomegalovirus causes lifelong latency in humans.

With the help of genetic engineering methods, cloning allows the assembly of different DNA sequences in one vector. Subsequent stimulation of the recombinant fusion proteins to APCs determines the detection of T cell activity in the flow cytometer.

Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, durch Fusion von Virusantigenen (Influenza A Nucleoprotein, CMV pp65) mit Nanobodies eine Methode zu entwickeln, um die Virusantigene gezielt in APCs einzuschleusen. Dafür wird eine Methode zur Erkennung und Charakterisierung von antigen-spezifischen T-Zellen entwickelt. Abhängig der Stimulation von APC, können bestimmte Rezeptor gezielt auf gewünschten antigenpräsentierenden Zellen gerichtet werden.

Die in der Arbeit verwendeten rekombinanten Antikörper (Nanobody und scFv-Fragment) und Proteine gegen ein bestimmtes Antigen (CMV-pp65, Influenza A Nukleoproteine und Grippeimpfstoff Vaxigrip Tetra) werden zu einem vollständigen Komplex fusioniert (siehe Abbildung 1). Als Werkzeuge geben Nanobodies viele Möglichkeiten für die Herstellung von rekombinanten Fusionsproteine, da sie leicht an Fc-Domänen oder an Peptid-Tags durch gentechnologische Methoden binden können. (MCMAHON, 2018)

In Rahmen dieser Arbeit werden Konstrukte aus zwei verschiedenen Nbs mit jeweils einem Protein gegen ein bestimmtes Antigen und einem chain variable fragment- scFv in einem Expressionsvektor kloniert. Hierbei gelten die Fusionsproteine mit HSA (Human serum Albumin) als Negativkontrolle. Dadurch soll die Antigenprozessierung und die Aktivierung von APCs nicht eingeleitet werden. Die Konstrukte mit dem scFv-Fragment soll die Erkennung mit gekoppelten FITC-Antikörpern auf Vaxigrip erzielen.

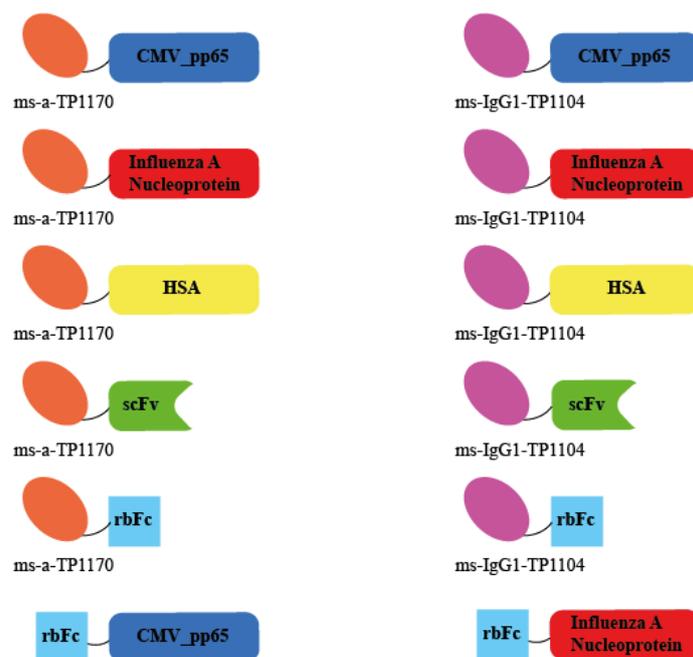


Abbildung 1: Darstellung der klonierten Fusionsproteine aus Virusantigenen (Influenza A Nucleoprotein, CMV pp65) mit Nanobodies (TP1170 und TP1104)

Die Fusionsproteine dienen als eine gentechnische hergestellte Brücke zwischen dem Antigen und der antigenpräsentierenden Zelle (siehe Abbildung 2). Anschließend wird die Antigenprozessierung und -präsentation eingeleitet. Für die Stimulation der Fusionsproteine werden hierfür mononukleäre Zellen aus peripherem Vollblut oder Leukozytenkonzentrate aus der Blutbank am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Im diagnostischen Bereich werden APCs für die Messung von antigen-spezifischen T-Zell-Antworten verwendet.

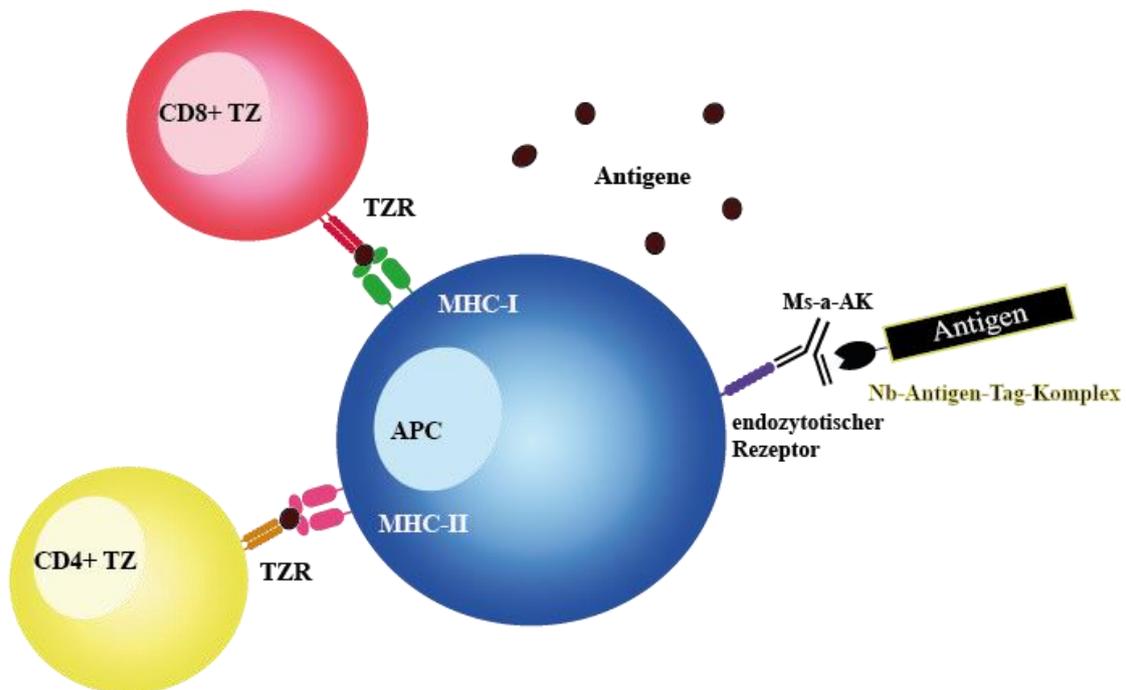


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Kreuzpräsentation durch ein Antikörper-Nanobody-Antigen-Tag-Komplex an T-Helferzellen (CD4+) und Zytotoxische T-Zellen (CD8+).

1 Einleitung

1.1 Grundlagen des Immunsystems

Unser Körper ist täglich im Kampf zur Abwehr von schädlichen Krankheitserregern. Das Immunsystem hat sich im Laufe der Evolution zu einem hochdifferenzierten anpassungsfähigen System entwickelt mit einem fortlaufenden Schutzmechanismus. Der Schutz vor u.a. Mikroorganismen, Pathogenen, Toxinen und malignen Zellen im Organismus werden durch eine Vielzahl von Immunzellen gewährleistet (Pezzutto et al., 2007). Das Immunsystem besitzt die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen „selbst“ und „fremd“ Molekülen zu erkennen. Dadurch können körperfremde mikrobielle Eindringlinge aufgespürt und eliminiert werden. Zudem werden körpereigene gefährliche Zellen (z.B. die Entstehung von Tumoren oder Autoimmunerkrankungen), die aufgrund von Mutationen ihre ursprünglichen genetischen Eigenschaften verändert haben, als „fremd“ registriert und beseitigt (Roitt et al., 1995). Diese vielseitigen Schutzmechanismen werden durch das angeborene (auch unspezifische) Immunsystem als auch das erworbene (adaptive) Immunsystem ermöglicht. (Pezzutto et al, 2007).

Das unspezifische Immunsystem ist seit der Geburt eines Lebewesens vorhanden und besteht als erste Immunantwort aus zellulären und biochemischen Abwehrmechanismen. Dabei wird das Eindringen von Pathogenen erstmals von einer physikalischen und chemischen Barriere, z.B der Haut, erschwert. (Rink et al., 2015) Bei einer Infektion greifen Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) im Zusammenspiel mit Phagozyten (Makrophagen, Granulozyten) mittels ihrer speziellen Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs) schnell und antigenunabhängig den Erreger an (Pezzutto et al, 2007).

Hingegen wurde das adaptive Immunsystem in einer Zeitspanne von 350 bis 400 Millionen Jahren entwickelt und weist herausragende und hochspezifische Fähigkeiten auf (Schütt und Bröker, 2011). Wichtiger Vertreter bei einer humoralen Abwehr bilden die B- und T-Lymphozyten. Fremdstoffe solcher Zellsysteme werden als Antigene bezeichnet, dazu gehören Bakterien, Viren oder pathogene Mikroorganismen. Die Auslösung einer adaptiven Immunantwort erfolgt durch den Kontakt von B- oder T-Lymphozyten mittels ihrer komplexen Antigenrezeptoren, B-Zell-Rezeptor (BZR) und T-Zell-Rezeptor (TZR), mit einem Antigen. Dadurch werden Lymphozyten aktiviert und die Proliferation wird eingeleitet, bis sie zu Effektorzellen differenziert werden (Holländer , 2006). Gleichzeitig hat das erworbene Immunsystem die Fähigkeit bei erneuter Infektion Gedächtniszellen zu bilden, sodass die

Antigen-spezifische Abwehrreaktion innerhalb von wenigen Stunden eingeleitet wird. (Pezzutto et al, 2007). In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk auf dem adaptiven Immunsystem.

1.2 Professionelle Antigenpräsentierende Zellen

Die professionellen antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APC) umfassen Makrophagen, aktivierte B-Lymphozyten und dendritische Zellen (DCs). Diese Zellen haben eine wichtige Stellung bei der Stimulation von antigenspezifischen T-Zellen. Die APCs sind darauf spezialisiert, vorhandene Antigene im Zuge von Infektionen zu erkennen und aufzunehmen (Kambayashi und Laufer, 2014). Dabei werden bindende Peptide an MHC-Molekülen an T-Zellen mittels des T-Zell Rezeptors präsentiert. (Kaufmann, 2014). Bei den Peptidfragmenten kann es sich um abgestorbene körpereigene Zellen, Bakterien, Viren, Gifte, aber auch um Antigene von Helminthen oder Tumorzellen handeln (Rink et al., 2015). Nur professionelle antigenpräsentierende Zellen sind in der Lage naive T-Zellen zu aktivieren, welche eine hohe Wichtigkeit für die Steuerung und Kontrolle einer adaptiven Immunantwort darstellen (Kambayashi und Laufer, 2014).

Die Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche verläuft über den Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC). Diese Moleküle gehören zur Immunglobulinsuperfamilie. Bei der Antigenpräsentation handelt es sich um die Verarbeitung von Proteinen bestimmter Antigene durch APCs. Die Hauptfunktion von MHC-Molekülen liegt in der Präsentation von Antigen-Peptiden an T-Zellen (Rink et al., 2015). Aufgrund ihrer unterschiedlichen immunologischen Identität in Struktur und Funktion werden sie in zwei Klassen unterteilt: der MHC-I- und MHC-II-Komplex. MHC-Klasse-I-Moleküle sind vor allem auf kernhaltigen Körperzellen lokalisiert und präsentieren endogene Peptide an cytotoxische T-Lymphozyten (cytotoxic T lymphocytes, CTL) (Pezzutto et al., 2007). Die Antigenpräsentation verläuft innerhalb der Zelle im Zytosol ab, indem zytosolische Proteine mittels des Proteasoms in kurze Peptidfragmente (~ 15 Aminosäuren) gespalten werden. Anschließend wird das resultierende Peptidgemisch gezielt durch den Transport des TAP-Rezeptors (transporter associated with antigen processing) in das endoplasmatische Retikulum (ER) befördert. Sobald eines der Peptide am MHC-I-Molekül bindet, wird es in Form eines Vesikels über den Golgi-Apparat transportiert und an die Zelloberfläche gebracht. (Purcell et al., 2016). Demnach erfolgt über MHC-I die Präsentation von Antigen-Peptiden an CD8+ T-Zellen (Zytotoxische T-Zellen). Die MHC-Klasse-II-Moleküle werden nur auf

antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und präsentieren Peptide aus exogenen Antigenen, welche extrazellulär aufgenommen werden. (Pezzutto et al., 2007)

Der Präsentierungsprozess durch MHC-I- und MHC-II-Molekülen ermöglicht dem Immunsystem Erreger, sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre zu erkennen. (Neumann, 2008). Beim Menschen werden die MHC-Moleküle als HLA (Humanes Leukocytenantigen) bezeichnet. Der HLA-Genkomplex der Klasse-I kodiert die HLA-Antigene A, B und C. und zur Klasse-II gehören die HLA-Merkmale DR, DQ und DP. (Klein, 2000)

Die Dendritischen Zellen (DZ) stellen eine bedeutsame Schnittstelle zwischen der angeborenen Immunantwort und dem adaptiven Immunsystem dar (Murphy und Weaver, 2018). Die Besonderheit von DZs als APC ist die Aufnahme und Prozessierung von exogenen Antigenen über MHC-I zu präsentieren. Dieser zellbiologische Vorgang wird auch als Kreuzpräsentation bezeichnet. Vor allem wird durch die Kreuzpräsentation eine CD8+ T-Zellantwort initiiert. Die Aktivierung von CD8+ T-Zellen durch DZ ermöglicht es, Virus-infizierte Zellen oder Tumore zu bekämpfen. (Chasan, 2009). Neben anderen APC besitzt die B-Zelle nicht die Fähigkeit über Kreuzpräsentation CD8+ T-Zellen zu aktivieren und eine anschließende Phagozytose einzuleiten. (Rink et al., 2015)

1.3 B- Lymphozyten als Antigenpräsentierende Zellen

Im adaptiven Immunsystem sind die B-Zellen die Aufgabe zum einen für die zielgerichtete Antikörperproduktion gegen Antigene verantwortlich, zum anderen haben sie die Fähigkeit Antigene auf der Zelloberfläche zu präsentieren. (Rink et al., 2015) Freie vorliegende Antigene stimulieren die Antigenrezeptoren der B-Zellen. Um eine vollständige Antikörperreaktion auszulösen, benötigen sie die Zusammenarbeit mit aktivierten T-Helferzellen (Murphy und Weaver, 2018). Die Antigenpräsentation wird in diesem Abschnitt anhand der B-Zelle als APC dargestellt und erklärt.

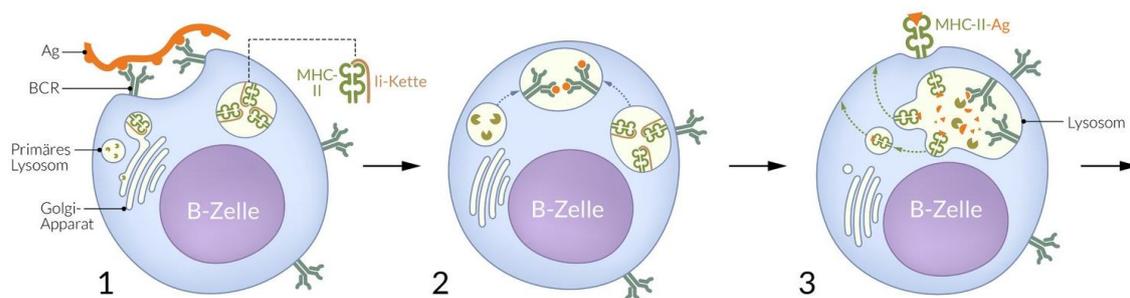


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Antigenpräsentation über den MHC-II-Komplex von B-Zellen. Entnommen aus https://www.amboss.com/de/wissen/Spezifisches_Immunsystem

Die Antigenerkennung einer reifen B-Zelle erfolgt über den membranständigen B-Zell-Rezeptor (b cell receptor, BCR). Die Antigenrezeptoren der B-Zellen bestehen aus den Immunglobulinen IgM und IgG, welche auf der Oberfläche exprimiert werden. Jede B-Zelle besitzt durch ihren BCR eine einzige Antispezifität (Murphy und Weaver, 2018). Der BCR-Ag-Komplex wird in einem endocytotischen Prozess internalisiert und gelangt in die B-Zelle. (siehe Abbildung 3 Bild 1). Parallel dazu wird das Transmembranprotein MHC-II über das ER und den Golgi-Apparat in Vesikel weitergeleitet. Zu diesem Zeitpunkt besitzt das MHC-II-Molekül eine zusätzliche γ -Kette, auch bekannt als invariante li-Kette, die seine Bindungstasche blockiert, sodass die vorzeitige Bindung von endogen synthetisierten Peptiden gehindert wird. (siehe Abbildung 3 Bild 2). Im sauren Milieu erfolgt die proteolytische Spaltung der li-Kette und hinterlässt ein Proteinfragment in der Antigenbindungsstelle, welches als Class-II-associated invariant-chain-peptide-Fragment (CLIP) bezeichnet wird. Folgend werden mittels HLA-DM und HLA-DO das CLIP-Fragment freigesetzt, sodass das Antigenpeptid in der Antigenbindungsstelle binden kann. (Holländer, 2006). Das fertig beladene MHC-II-Molekül wird anschließend mittels eines Vesikels an die Zelloberfläche befördert und stellt die Präsentation vom Antigenpeptid an T-Zellen dar (siehe Abbildung 3 Bild 3) (Stern und Santambrogio, 2016).

1.4 Die T-Zell-Aktivierung durch Antigenpräsentation

APCs nehmen durch Phagozytose in der Körperperipherie Antigene auf. Darauf wandern sie in sekundäre lymphatische Organe, wo die Antigenpräsentation naiver T- Lymphozyten durch MHC -Moleküle stattfindet. Die T- Zellen besitzen nicht die Fähigkeit Pathogene direkt zu identifizieren, sondern sind auf die Antigenpräsentation von APCs angewiesen. Die Aktivierung naiver T-Zellen erfolgt nach dem heutigen gültigen „Zwei-Signal“-Modell von Bretscher und Cohn. (Neumann, 2008). Über die α - und β -Ketten des T-Zell-Rezeptors (TZR) erfolgt die Erkennung des Antigen-MHC-Komplex auf APCs (siehe Abbildung 4 Bild 1).

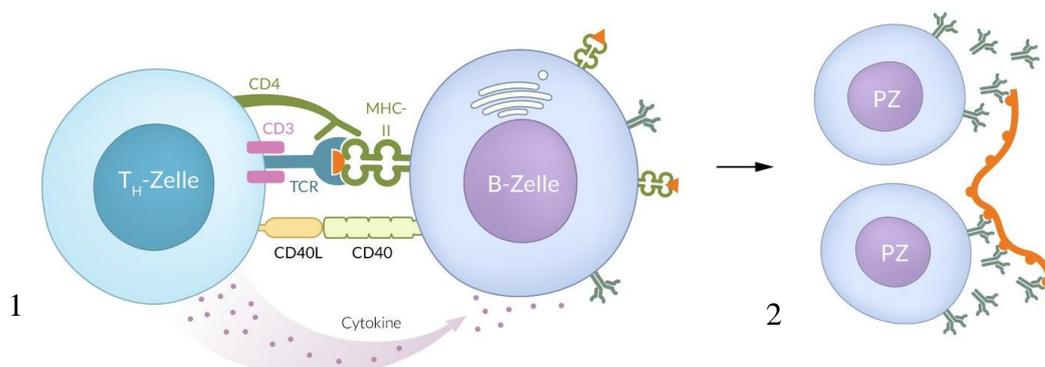


Abbildung 4: Schematische Darstellung von T-Zell-Aktivierung durch Antigenpräsentation der B-Zelle. . Entnommen aus https://www.amboss.com/de/wissen/Spezifisches_Immunsystem

Das Signal wird je nach Zelltyp naiver T-Zellen durch die Co-Rezeptoren CD4 (T-Helferzellen) und CD8 (Zytotoxischen T-Lymphozyten) verstärkt. Die zytotoxischen T-Lymphozyten interagieren mit MHC-I-Rezeptoren auf APCs, wogegen T-Helferzellen an MHC-II-Rezeptoren binden (Deininger, 2015).

Die CD4+ T-Helferzellen bilden ca. 65% der T-Lymphozyten und exprimieren CD4 auf der Oberfläche (Deininger, 2015). Die CD8+ zytotoxische T Zellen (oder T-Killerzellen) besitzen suppressorische Eigenschaften und sind zur Zerstörung von bestimmten Zielzellen gerichtet. Sie bilden etwa 35 % der gesamten T-Lymphozyten (Deininger, 2015).

Eine zusätzliche Wechselwirkung dient zur Verstärkung der Aktivierung und Proliferation von naiven T-Zellen durch die Kostimulation. Das T-Zelloberflächenprotein CD28 auf naiven T-Zellen interagiert mit den Membranproteinen CD80 und CD86 von APCs. (Schütt und Bröker, 2011). Durch diese Verbindung wird die Ausschüttung von Zytokinen wie z.B. IL-6, TNF- α oder IFN- γ eingeleitet. Sobald Zytokine an aktivierte B-Zellen binden, wird die Proliferation (Schütt und Bröker, 2011) und Differenzierung zu Plasmazellen für die Produktion von Antikörpern AUSGELÖST (IMD Labor Berlin) (siehe Abbildung 4 Bild 2).

1.5 Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind hochspezifische Bindemoleküle der erworbenen humoralen Immunantwort. Diese werden von Plasmazellen (ausdifferenzierte B-Lymphozyten) in der primären Immunantwort gebildet. In diesem Vorgang werden bis zu 3.000 Antikörper pro Sekunde produziert. Die Zellen mit der höchsten Spezifität und Affinität überleben und etablieren sich zu Gedächtniszellen und lösen beim Zweitkontakt mit dem Antigen eine stärkere Immunantwort aus. (Heilmann et al., 2012).

Antikörper bestehen aus fünf Hauptklassen, welche sich in ihrer Struktur und ihren Eigenschaften in der konstanten Region der Immunglobulinkette unterscheiden: Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin A (IgA), Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin D (IgD), und Immunglobulin E (IgE). Alle Immunglobuline weisen den gleichen strukturellen Aufbau aus paarigen schweren und leichten Ketten auf (Murphy und Weaver, 2018). Antikörper des Typs IgG sind große Moleküle mit einer Molekularmasse von 155 kDa (siehe Abbildung 5). In dem Y-abgeleiteten Model bestehen IgG jeweils aus zwei identischen leichten Ketten (*light-chain*) mit einer Molekularmasse von 25 kDa und zwei identischen schweren Ketten (*heavy-chain*) mit einer Molekularmasse von 50 kDa. Die beiden schweren Ig-Ketten und

jeweils eine leichte mit einer schweren Ig-Kette werden von Disulfidbrücken kovalent gebunden. Außerdem weist die leichte Kette zwei verschiedene Formen auf, entweder κ oder λ L-Kette (Kaufmann, 2014). Am Ende der Y-Struktur tragen sie hochspezifische variable Antigenbindungsstellen (Rink et al., 2015). Durch die Behandlungen mit den Proteasen Pepsin und Papain werden Immunglobuline in Antikörperfragmente gespalten. Die Carboxypeptidase Pepsin spaltet oberhalb der Disulfidbrücken zwischen dem Fc- und Fab-Fragment, sodass ein $F(ab')_2$ -Fragment, bei dem zwei antigenbindene Regionen miteinander verbunden sind, entsteht. Hingegen spaltet die Thiolprotease Papain unterhalb der Disulfidbrücken, wodurch das Immunglobulinmolekül in drei Teile zerfällt: zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment (Neumann, 2008).

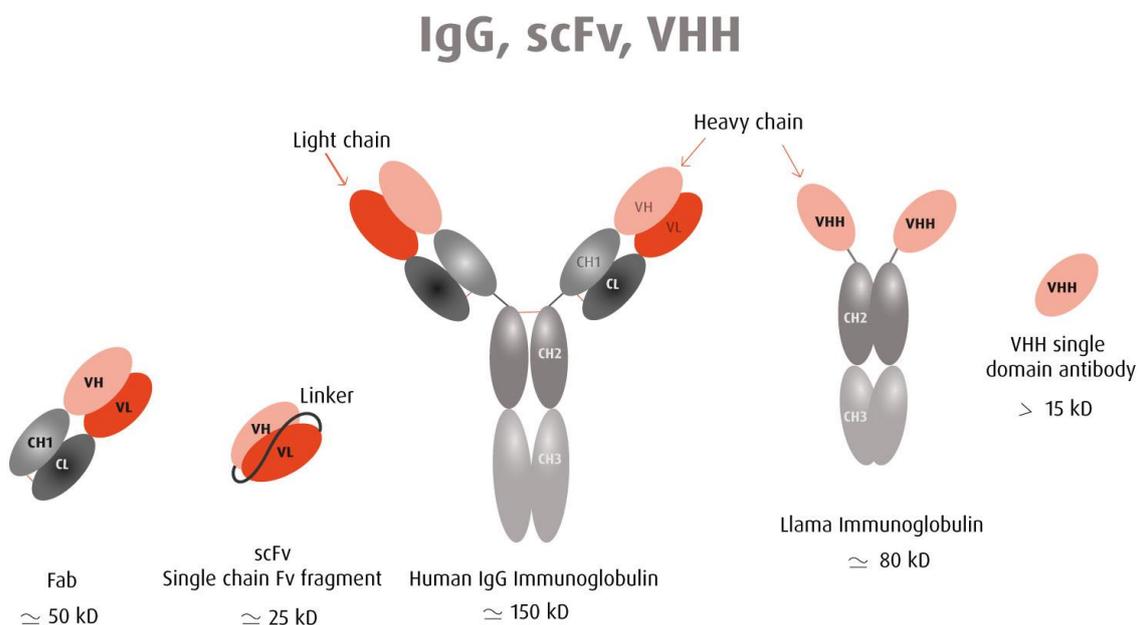


Abbildung 5: Aufbau eines Antikörpers des Typs IgG und dessen rekombinante Fragmente. Mit der Struktur eines Heterotetramers besteht es aus je zwei symmetrischen leichten Ketten und zwei schweren Ketten. Die schwere Kette (H, heavy chain) und die leichte Kette (L, light chain) sind durch eine kovalente Verknüpfung, den Disulfidbrücken verbunden. Domänen der leichten Kette vom κ - oder λ -Typ bestehen aus ca. 220 Aminosäuren: die 110 Aminosäuren sind für die verschiedenen Spezifitäten einer hohen Variabilität verantwortlich und wird als variable Region bezeichnet, kurz V_L bzw. V_κ und V_λ . Die weiteren 107 Aminosäuren sind bis auf zu geringen Unterschieden gleich und werden als konstante Region, kurz CL C_κ und C_λ , bezeichnet (Kaufmann, 2014). Domänen der schweren Ketten besitzen drei konstante Regionen (CH1–CH3, constant heavy). Die untere Gelenkregion ist das Fc-Fragment und der obere Gelenkarm wird als Fab-Fragment bezeichnet. Um ein variables Fragment (Fv) therapeutisch einsetzbar zu machen, werden die variablen Fragmente mittels einem Linker miteinander verbunden, daraus resultiert der scFv-Antikörper (Luttmann et al., 2014). Entnommen aus <https://www.hybridbody.com/news/launch-of-hybridbody>

Antikörper derselben Klasse besitzen einen konstanten Antikörper-Stamm, welches als Fc-Fragment (*fragment crystallizable* oder *constant fragment*) bezeichnet wird (Kaufmann, 2014). Jede Antikörperklasse wird durch unterschiedliche Fc-Rezeptoren erkannt, kurz FcR, die je nach Rezeptortyp verschiedene biologische Prozesse einleiten (Neumann, 2008). Im Gegensatz

zum Fc-Fragment zeigt der Fab-Bereich (*fragment antigen binding*) diversere Spezifitäten der Antigenbindung eines Antikörpers (Kaufmann, 2014).

Die Immunglobuline des Typs IgG überwiegen im Verhältnis zu den anderen Antikörperklassen im Serum vom Menschen. Hier unterscheidet man vier Unterklassen: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 (Neumann, 2008).

1.6 Rekombinante Antikörperfragmente

Vollständige Antikörper haben sich in vielen klinischen Therapien etabliert, jedoch zeigen sie Grenzen in ihrer Größe und räumlichen Struktur und sind deshalb für einige therapeutische Zwecke ungeeignet. Mittlerweile wurden verschiedene rekombinante Antikörperfragmente als mögliche Alternativen zu den klassischen poly- und monoklonalen Antikörpern entwickelt. (Holliger und Husdon, 2005) Rekombinante Antikörper, wie z.B. Einzeldomänenantikörper und variable Einzelkettenfragmente (scFv) sind mittels gentechnologischer Methoden hergestellte Antikörper (siehe Abbildung 5) (Luttmann et al., 2014). Die Modifizierung ermöglicht Antikörpermoleküle theoretisch gegen jedes beliebige Antigen darzustellen, ohne dafür eine Immunisierung in Tieren durchzuführen (Pleiner, 2017).

1.6.1 Einzeldomänenantikörper: „Nanobodies“

Antikörper weisen in bestimmten Organismen wie Ammenhaien und Kamelen eine modifizierte Form von herkömmlichen Antikörperstrukturen auf. Diese besondere Art wird als Schwere-Ketten-Antikörper (heavy chain antibody, hcAb) bezeichnet (Heilmann et al., 2012). HcAb bestehen ausschließlich aus zwei identischen schweren Ketten mit jeweils einer variablen Domäne V_{HH} (variable domains of the heavy chain of heavy chain antibodies) (Hamers-Casterman et al., 1993). Zusätzlich fehlt ihnen die C_{H1} -Domäne. Die Sequenz dieser Domäne ist zwar im Genom vorhanden, wird jedoch durch Spleißen während der mRNA-Prozessierung entfernt. Dies begründet auch das Fehlen der leichten Kette in HcAbs, weil die C_{H1} -Domäne die Verknüpfung zur konstanten Domäne der leichten Kette darstellt (Deffar, 2009).

Die Schwere-Ketten-Antikörper cameliden Ursprungs z.B. aus Alpakas sind funktionsfähige Antikörper (Hamers-Casterman et al., 1993). Das Monomer der variablen Domäne V_{HH} von Schwere-Ketten-Antikörpern wird als Einzeldomänenantikörper (single domain antibody, sdAb) bezeichnet. Daneben sind sie aufgrund ihrer geringen Molekülgröße von etwa 12 bis 15

kDa als Nanobody (Nb) bekannt. Die Antigenbindungsstelle von Nbs wird nur durch die variable Region der schweren Kette repräsentiert (Muyldermans, 2013)

1.6.2 Vergleich von Antikörper und Nanobody

Konventionelle Antikörper weisen vielfältige und wichtige Vorteile auf, wie z.B. besitzen sie eine hohe Affinität und Selektivität für ein Zielantigen, und zeigen eine geringe inhärente Toxizität. (Deffar, 2009) Ein Problem von herkömmlichen Antikörpern stellt die grenzwertige Stabilität im Temperatur- und pH-Bereich dar (Pleiner et al., 2017). Aufgrund ihrer großen Molekülmasse von 150 kDa besitzen sie nicht die Fähigkeit am aktiven Zentrum eines Proteins zu binden und durch das Gewebe durchzudringen.

Nanobodies zeigen in ihrer Funktionalität und ihrer besonderen Struktur viele Vorteile. Sie sind in der Regel einfach biotechnologisch herzustellen, und bieten dadurch im Vergleich zu konventionellen Antikörpern einen Kosten-Vorteil und eine höhere Ausbeute (Pleiner et al., 2017). Mit nur einer Domäne und ohne posttranslationale Modifikationen lassen sich V_HH mit geringem Aufwand einfach in Vektoren klonieren und rekombinant im großen Maßstab produzieren (Rahbarizadeh,). Sie sind mit etwa 15 kDa die kleinsten Antikörperfragmente mit Antigenbindung (siehe Abbildung 5) und besitzen die Fähigkeit, wie auch konventionelle Antikörper, Antigene zu erkennen und zu binden (Deffar, 2009). Außerdem können sie aufgrund ihrer geringen Größe an schwer ankommende Epitope binden. In Vergleich sind herkömmliche Antikörper mit ihrer räumlichen Anordnung teilweise ungeeignet, um schwer zugängliche Epitope zu erkennen. Des Weiteren stellen Nanobodies eine hohe Homologie von etwa 90% mit humanen V_H-Domänen auf, wodurch sie ideal für therapeutische Anwendungen geeignet sind (Deffar, 2009).

1.6.2.1 Nanobodies TP1170 und TP1104

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sequenzen von Nanobodies aus dem Paper „A toolbox of anti–mouse and anti–rabbit IgG secondary nanobodies“ (Pleiner, 2017) als DNA-Fragmente bei der Firma Twist Bioscience bestellt. Die Forschungsgruppe des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie in Göttingen hat in einem veröffentlichten Paper (2017) eine umfangreiche „Toolbox“ aus Nanobodies gerichtet gegen Maus und Kaninchen konstruiert. Beim ersten Versuch der Immunisierung mit polyklonalem Maus-IgG Antikörper im Alpaka, ergaben die ersten resultierenden Nanobodies schwache und nicht erkennbare Signale bei Immunfluoreszenz und im Western Blot. Nach einjähriger Pause wurden die Tiere erneut immunisiert, dabei verwendeten Sie Antikörper gebundene multivalente partikuläre Antigene.

Anschließend erfolgten *In-vitro*-Affinitätsreifungen von zufälligen Mutagenesen und weitere Ansätze von Phagen-Display. Mit diesem Verfahren haben sie eine umfangreiche Bibliothek von unterschiedlichen anti- Maus-IgG- und anti-Kaninchen-IgG- Nanobodies erhalten. In Abbildung 6 wurden die erhaltenen Nanobodies nach ihrer Subklassen-Spezifität, Lage ihres Epitops auf Fc oder Fab- Fragmenten und die Kreuzreaktivität von IgGs mit anderen Spezies dargestellt. Dabei ergaben zielgerichtete anti-Maus Nanobodies der Subklasse IgG1, wie unter anderem TP1104, die höchste Häufigkeit gegenüber anderen Subtypen, u.a. IgG2. Da 99% der monoklonalen Antikörper die κ -Leichtkette besitzen, selektierten die Wissenschaftler des Max-Planck-Instituts zielgerichtet nach solchen Bindungen. (Pleiner et al., 2017).

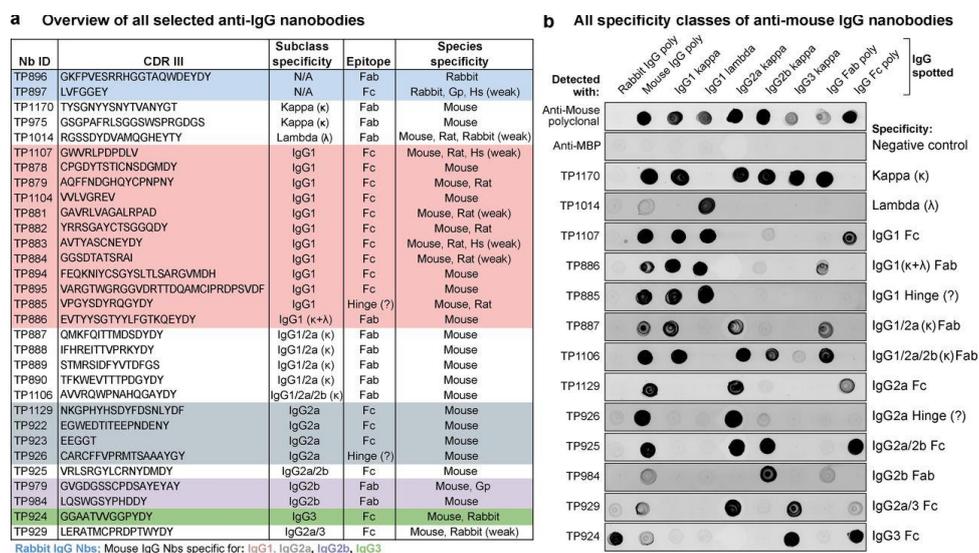


Abbildung 6: Charakterisierung von einer anti-IgG Nanobody „toolbox“.
Entnommen aus Pleiner et al., 2017

1.6.3 scFv-Fragmente

Wie schon bereits erwähnt wurde, zeigen Antikörperfragmente wesentliche Vorteile gegenüber Vollängen-Antikörper. Das Fv (Fragment des variablen Teils) besteht jeweils aus der variablen Domäne der leichten Kette (V_L) und der schweren Kette (V_H). Da die variablen Domänen nicht über Disulfidbrücken verbunden sind, ist das gesamte Fragment instabil und dissoziiert leicht (Holliger und Husdon, 2005). Basierend auf Modifikationen der variablen Domänen ist das rekombinante scFv-Konstrukt (single chain variable fragment) entstanden. (Breitling und Dübel, 1997) Die Stabilisierung des gesamten Komplexes (siehe Abbildung 5) konnte mittels eines flexiblen Linkers aus 14 bis 24 AS zwischen den variablen Domänen erreicht werden. (Viktor). Hierbei wird der Linker am Carboxy-Terminus der V_L -Region mit dem Amino-Terminus der der V_H -Region eingeführt, sodass beliebige V_L - und V_H -Fragmente miteinander sich verbinden lassen (Huston et al., 1991).

1.7 Antigene

1.7.1 CMV Cytomegalovirus pp65

Im Jahre 1881 wurde das humane Cytomegalovirus (HCMV) vom deutschen Pathologen Hugo Ribbert beschrieben. Er stellte in der Niere und in der Ohrspeicheldrüse eines totgeborenen Kindes mit angeborener Syphilis „protozoenhaltige Zellen“ fest (Ribbert, 1904). Dies scheinen die ersten Beschreibungen von typischen cytomegalen Zellen mit intranuklearen Einschlusskörpern gewesen zu sein. Den endgültigen Beweis der Virusätiologie von CMV erbrachten 1956-1957 Weller, Rowe und Smith, indem sie unabhängig CMV-Stämme aus Menschen und Mäusen isolierten und kultivierten (Weller et al., 1957). Das heute bekannte HCMV gehört aufgrund seiner Morphologie zur Familie der Herpesviren (*Herpesviridae*) und der Subfamilie Betaherpesvirinae. In der neueren Literatur wird es auch als humanes Herpesvirus Typ 5 (HHV-5) bezeichnet, welches als Genom eine lineare doppelsträngige DNA besitzt. Das Virus ist ein sehr großer Komplex mit über 200.000 Basenpaaren (Bundesministerium für Gesundheit, 2010). HCMV gilt als weltweit verbreiteter und häufigster virale Erreger einer kongenitalen Infektion. Die Infizierungsrate der menschlichen Weltbevölkerung liegt bei 55-100% und variiert stark von unterschiedlichen geographischen Faktoren (Stack und Stacey). Vor allem in Entwicklungsländern liegt die Rate der mit CMV infizierten Erwachsenen nahe bei 100%. Kongenitale HCMV-Infektionen resultieren in den meisten Fällen aus einer primären Infektion der Mutter während einer Schwangerschaft (Bundesministerium für Gesundheit, 2010). Die Virusübertragung wird über direkten Körperkontakt, Speichel, Organtransplantationen, Muttermilch und die Plazenta verursacht. Nach einer HCMV-Infektion bricht die Krankheit hauptsächlich bei schwacher oder fehlender Immunität aus. Sie zeigt gefährliche Krankheitsverläufe bei Hochrisikogruppen wie Schwangeren, Transplantatempfänger, AIDS-Patienten und Personen mit angeborener Immundefizienz (Stack und Stacey). Bei Erstinfektionen in diesen Hochrisikogruppen können folgende schwere Beschwerden auftreten: Fieber, Muskel- und Gelenkschmerzen, schwere Lungenentzündung (Pneumonie), Leberentzündung (Hepatitis) und Nierenentzündungen (vor allem nach Transplantationen) (Hof und DÖRRIES, 2009). Die Symptome bei der Zytomegalie sind von der Abwehrstärke des körpereigenen Immunsystems abhängig. Die meisten immungesunden Menschen erwerben die Krankheit, ohne jegliche Krankheitszeichen zu entwickeln (Bundesministerium für Gesundheit, 2010).

HCMV verursacht nach einer Infektion eine lebenslange Latenz im Wirtorganismus. Trotz der hohen Wirtsspezifität charakterisieren sich Herpesviren durch einen langsamen Vermehrungszyklus und verbreiten sich in Kultur auch in Anwesenheit von Antikörpern. Bei einer CMV-Infektion wird die spezifische Immunantwort eingeleitet, welche durch dominante CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten, sowie CD4⁺ T-Helfer-Lymphozyten eine langfristige Immunität hervorruft (Bundesministeriums für Gesundheit, 2010). Vor allem dienen IE-Proteine (immediate early, IE), wie das Phosphoprotein 65 (pp65), als dominantes Zielantigen für CD8⁺ T-Zellen. Das Tegumentprotein pp65 verhindert durch die Phosphorylierung von viralen IE-Proteinen deren Präsentation auf MHC-I-Molekülen und blockiert damit die antivirale Immunantwort (Tomtishen III, 2012).

1.7.2 Influenza A Virus

Die „echte“ Grippe, auch Influenza genannt, gehört zur Familie der Orthomyxoviridae. Bekannt sind vier Gattungen: Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltainfluenzavirus. Alle Gattungen haben jeweils nur eine Spezies: Influenza A virus (FLUAV) bis Influenza D Virus (FLUDV). Influenza Viren vom Typ A werden zusätzlich noch in Subtypen unterteilt. (Robert Koch Institut, 2018). Die Unterscheidung und Bildung neuer Varianten von einzelnen Subtypen beruhen auf zwei viralen Oberflächenproteinen, das Hämagglutinin (H oder HA) und die Neuraminidase (N oder NA). Das Genom von Influenza Viren ist segmentiert und besteht aus 8 separaten einzelsträngigen RNA-Molekülen negativer Polarität (Wutzler, 2009). Das Hämagglutinin unterstützt die Infektion durch Bindung an Rezeptoren (sialinsäuretragende Glykoproteine) der Wirtszelle und erleichtert die Endozytose des bindenden Virus in die Zelle (Wiley und Skehel, 1987). Mit Hilfe der Neuraminidase wird die Ausschleusung des Influenza-Virus aus der bereits infizierten Zelle begünstigt, um neue Zellen anzugreifen (Gillian, 2011).

Influenza Viren vom Typ A stellen bisher 18 H-Untertypen und 11 N-Untertypen dar. Bei humanen Infektionen handelt es sich um die variierenden Hämagglutinin-Subtypen H1, H2, H3, H5 und die Neuraminidase-Subtypen N1, N2 und seltener N7. Neue hervorgehende Epidemien (Pandemien) lassen sich auf erneute Auslegungen und Kombinationen des HA-Proteins durch Mehrfachinfektionen der Wirtszellen zurückführen. Sie nehmen klinisch die wichtigste Rolle in der Virologie ein und verursachen häufig Epidemien mit neu mutierenden Subtypen. Man geht davon aus, dass insbesondere aus China ein hohes Potential von neuen verschiedenen Genvariationen hervorgeht (Schlegel, 2007).

Die Influenza A Viren greifen hauptsächlich Zellen des respiratorischen Systems ihres Wirtes an. Die Ansteckung erfolgt meistens über eine Tröpfcheninfektion (Wright 2007). Mit einem breiten Wirtsspektrum besitzen sie zahlreiche Möglichkeiten sich zu verbreiten, wie z.B in Vögeln, verschiedenen Säugetieren wie Schweinen, Pferden und Menschen (Wutzler, 2009) Da Schweine als „Mischformen“ gelten, ist die Ansteckung von einer Spezies auf die andere möglich. Dadurch können neue Subtypen mit neuen Eigenschaften und Krankheitsbildern/symptomen entstehen (Schlegel, 2007).

1.7.2.1 Humanes H1N1 Nukleoprotein

In Rahmen dieser Arbeit wird das Nukleoprotein des Influenza-Virusstamms A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) verwendet. Wie der Name schon vorgibt, besitzt dieser Influenza A Virus H1-Hämagglutinin und N1-Neuraminidase.

A/H1N1 ist der häufigste umlaufende Influenza-Virus vom Typ A. In Jahre 1918 wurden erstmals Infektionen mit Influenza A H1N1 nachgewiesen. Folgend brach eine gefährliche und kontinentübergreifende Pandemie (Spanische Grippe) mit über 10 Millionen Todesfällen aus. (Niall et al., 2012) Seit der Spanischen Epidemie hat sich das Virus A/H1N1 in Menschen und Tieren, vor allem bei Schweinen, stabil etabliert. Diese Influenzalinie des Typs A/H1N1 lässt sich anhand von 8 Genomsegmenten nachweisen. (Wutzler, 2009).

Unter Nukleoproteinen (NP) versteht man Proteine, die an bestimmte DNA- oder RNA-Sequenzen binden. Das Nucleoprotein des Influenzavirus umhüllt die virale RNA des jeweiligen Influenzastamms. (Chenavas et al., 2013)

Das NP gegen A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) besitzt eine Molekülmasse von 56 kDa und 498 Aminosäuren. (Van Rompuy et al., 1981)

Tabelle 1: Charakterisierung des Nucleoproteins A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)

H_Typ	n_type	protein	strain	definition	seq
	N1	NP	A/Puerto Rico/8/1934 [H1N1]	nucleoprotein InfluenzaA virus (A/Puerto Rico /8/1934 [H1N1])	MASQG TKRS...

2 Materialien

2.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Seriennummer/ Modell	Hersteller
Sicherheitswerkbank Klasse 2	40864704/ KS 12	Hera safe
Durchflusszytometer	Canto II	BD Biosciences
Lichtmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss
Wasserbad	Type 1007	Gesellschaft für Labortechnik
CO ₂ Brutschrank	MCO-20AIC	Sanyo
Heizblock		
Rollmixer	Rollmixer SRT6	Stuart
Zentrifuge	Rotana 460 R	Hettich Zentrifugen
Tischzentrifuge	Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific
Spektralphotometer	NanoDrop 2000c	Peqlab biotechnology
Vortexer pluriPlix®		Heidolph

2.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
10% Bis- Tris Gel		
Leere Säule		
PD-10 Desalting Column	17-0851-01	GE Healthcare
Amicon® Ultra Centrifugal Filters		
pluriStrainerS 30µm	43-50030-01	pluriSelect
Connecting Ring	41-50000-01	pluriSelect
Funnel	42-50000-01	pluriSelect
StepMate™-50	8540	StemCell Technologies
StepMate™-15	85415	StemCell Technologies
Cell Strainer 70µm Nylon	3523650	Falcon A Corining Brand
Sericup® and Steritop®150 ml	05/13-13-08250	Millipore Express®
pluriMate® 2ml centrifugation tube	44-00002-10	pluriSelect
FACS- Röhrchen	352054	Falcon

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
DPBS (1x) – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (-)CaCl ₂ (-)MgCl ₂	14190-094	Gibco by life technologies

DPBS (1) – Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline (+)CaCl ₂ (+)MgCl ₂		Gibco by life technologies
RPMI-Medium 1640 (1x)	21875-035	gibco® by life technologies™
FreeStyle F17 Expression Medium (-)L-glutamine	A13835-01	Gibco by life technologies
PBMC Spin Medium	60-00092-12	pluriSelect
Sphero™ Fluorescent Particles Sky Blue	FP-2070-2	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A	23228	Thermo Fisher Scientific
Glutamin	25030-024	Gibco (Thermo Fisher)
Antioxidant	NP0005	Introvgen (Thermo Fisher)
ProteinA Sepharose CL-4B	GE17-0780-01	GE Healthcare (Thermo Fisher)
jetPEI	17054C1M	Polyplus
Gel Dry™ Drying Solution	LC402025-4	invitrogen
RotiSafe- GelStain	3865.1	Carl Roth
Ficoll Paque™ Plus	17-1440-03	GE Heathcare
Aqua	75/12604052/1212	B/Braun

2.4 Sequenzen

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
TP1170 IgKappa	pSHPs 0927B 716639SH	Twist Bioscience
TP1104 mIgG1	pSHPs 0927B 716639SH	Twist Bioscience
CMV_pp65	pSHPs 0927B 716639SH	Twist Bioscience
InfAnuc	pSHPs 0927B 716639SH	Twist Bioscience
HSA	pSHPs 0927B 716639SH	Twist Bioscience
scFv	pSHPs 0927B 716639SH	Twist Bioscience

Die DNA-Sequenzen befinden sich im Anhang.

2.5 Antikörper

Bezeichnung	Fluoreszenz	Spezies	Nummer	Hersteller
CD20	APC-Cy7	human	302314	BioLegend
CD8	BV450-A	human	562428	BD Pharmingen™
CD25	FITC	human	555431	BioLegend
CD14	PE-A	Human	555398	BioLegend
CD21	PE-A	human	354904	BioLegend
CD3	Pe-Cy7	human	344816	BioLegend
CD4	PerCP-Cy5.5	human	300530	BioLegend
CD303	FITC	human	354208	BioLegend
HLA-DR	FITC	human	361705	BioLegend
CD205	APC	human	558156	BioLegend
H-2Dd	PE	maus	553580	BioLegend

P2X1	FITC	human	-	AG Nolte
eFluor 670	APC			Invitrogen by Thermo Fisher
PacO	Pacific Orange BV510		P30253	Invitrogen

2.6 Antibiotika

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
Carbenicillin		

2.7 Farbstoffe

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
InstantBlue TM - Coomassie Trypanblau	-	Expedeon

2.8 Enzyme

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
Antarctic Phosphatase	0351611	BioLabs Inc.
DNase I	0080904	BioLabs Inc.
Not-I-HF	R3189M	BioLabs Inc.
NcoI- HF	R3193M	BioLabs
Xbal	R0145M	BioLabs

2.9 Primer

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
CMVfor	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG	Eurofins Genomics
pCR3.1-BGHrev	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	Eurofins Genomics

2.10 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
T4 DNA Ligase Buffer (5x)	754001	Thermo Fisher Scientific
IgG Elutions Buffer	TF267471	Thermo Fisher Scientific
Tris Buffer (1M, pH 9,0)	786-476	G-Biosciences
PBMC Spin Medium	60-00092-12	pluriSelect
Buffer A- Stabilization Buffer	60-00070-12	pluriSelect
Buffer B- Incubation Buffer	60-00060-12	pluriSelect
Buffer C- Detachment Activation Buffer	60-00045-12	pluriSelect

Buffer D- Detachment Concentration	60-00040-12	pluriSelect
Wash Buffer Stock Solution	70-500010-12	pluriSelect

Bezeichnung	Zusammensetzung
TBE-Puffer (1x)	900 ml ... 100 ml TBE-Puffer (10x)
MES Laufpuffer	20x NuPage MES SDS Running Buffer Milli-Q H ₂ O
Mastermix- Ladepuffer	Für einen Ansatz von 10 µL: 5 µL Loading Dye Solution (4x) 5 µL dH ₂ O 1 µL Reducing Argent (=DTT)
SDS-Puffer	Für einen Ansatz von 10 µL: 5 µL Loading Dye Solution (4x) 3 µL dH ₂ O 2 µL Reducing Argent (=DTT)
Einfriermittel	90 ml 2%ige FCS 10 ml DMSO
1x Waschpuffer (PluriSelect)	10x Wash Buffer Stock Solution Aqua

2.11 Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
F17- Transfektionsmedium	500 ml FreeStyle F17 Expression Medium 10 ml (v/v) L-glutamine (200 mM)
2xYT-Medium	31 g/l in de-ionisiertem Wasser (Milli-Q H ₂ O) 2xYT-Agar 2xYT, 30 g/L Agar
RPMI-Medium 5% AB-Medium-human-komplett	500 ml RBMI-Medium 1640 (1x) AB-Serum human 100 mM Na-Pyruvat Glutamat
LB-Medium	25 g LB-Medium 1 L Milli-Q H ₂ O
SOC-Medium	0.5 % Hefeextrakt 2 % Trypton 20 mM Glukose 10 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 2.5 mM KCl

2.12 Bakterienstämme

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
XL 1 blue E.Coli	CMC0007-20X40UL	Merk

2.13 Zellen

Bezeichnung	Risikogruppe	Zusätzliche Information
PBMCs	1	Lymphozyten-Konzentrat aus der Blutspende am UKE
Vollblut in EDTA-Monovetten	1	

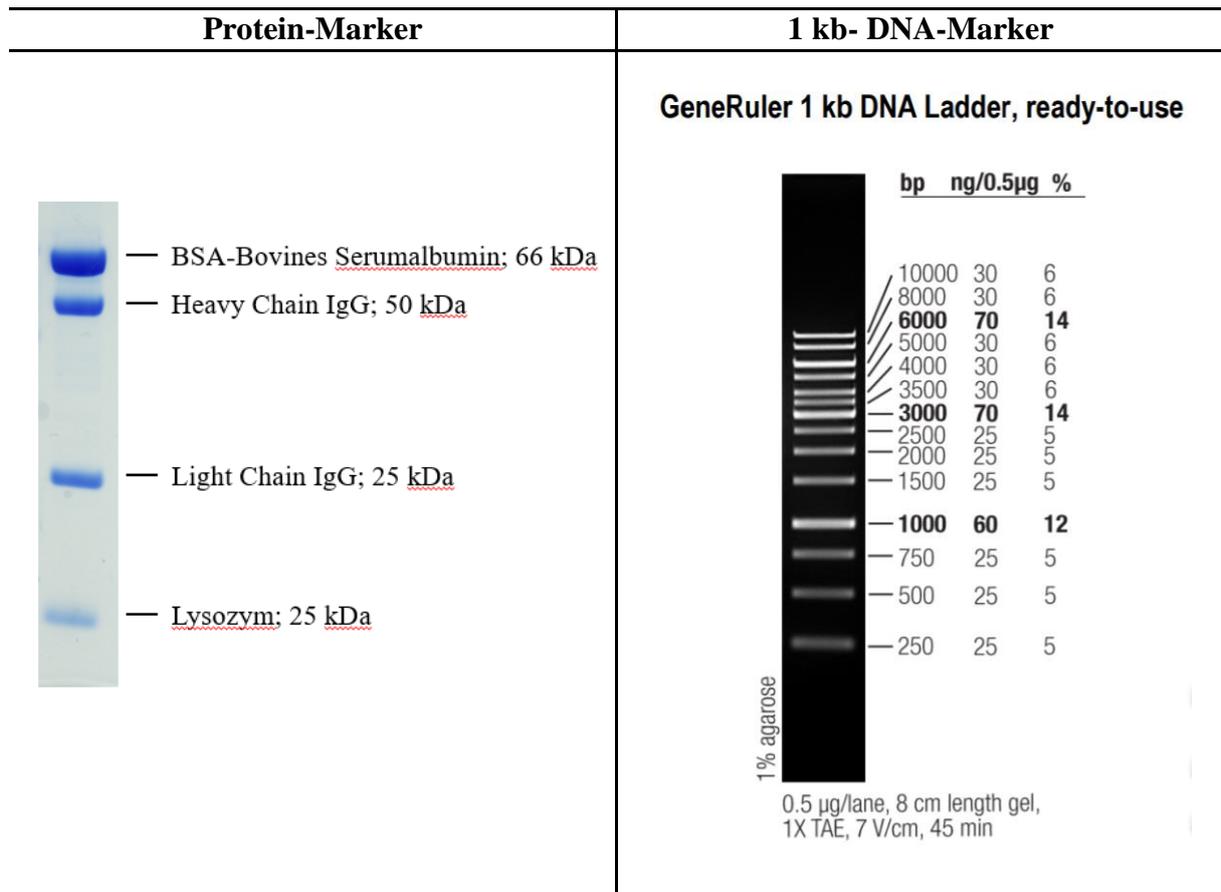
2.14 Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Resistenz	Hersteller
s+16a anti ART2.2	pCSE2.5_rbFc	Carbenicillin, Amp	AG Koch-Nolte*

2.15 Kits

Kit	Nummer	Hersteller
Qiaquick PCR Purification Kit	28104	Qiagen, Hilden,
QIAprep Spin Miniprep Kit	27104	Qiagen
S-pluriBead® Mini Reagenzien-Kit	70-50010-11	pluriSelect

2.16 Protein-DNA-Marker



3 Methoden

3.1 Gentechnische und molekularbiologische Methoden

Die Bildung eines neuen rekombinanten DNA-Moleküls wird durch das Klonieren eines gewünschten Inserts in einen Expressionsvektor ermöglicht. Der Vektor pCSE2.5_rbFc besitzt eine multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS), welche eine Sequenz aus mehreren hintereinander liegenden Restriktionsstellen für Restriktionsenzymen aufweist. Dadurch ist es möglich an einer gewünschten Restriktionsstelle zu schneiden und das Insert über eine „sticky end“-Ligation in den Expressionsvektor einzuklonieren. Zusätzlich besitzt der Expressionsvektor den CMV-Promotor für die Proteinexpression. Mit Hilfe des dazugehörigen Primers kann die DNA-Sequenz auf die Richtigkeit der neu konstruierten Vektoren geprüft werden.

3.1.1 Restriktionsverdau von Insert & Vektoren

Das Verfahren des Restriktionsverdaus dient zur präzisen Einführung eines DNA-Fragments an einer definierten Stelle mit Hilfe von Restriktionsenzymen. Restriktionsenzyme sind hochspezifisch arbeitende Werkzeuge, welche an einer bestimmten Erkennungssequenz der DNA schneiden. Die Restriktionsendonucleasen erkennen spezifische DNA-Abschnitte von 4-8 Nucleotiden und spalten die Phosphodiester-Brücken an den jeweiligen Restriktionsstellen. Durch Hydrolyse an den Phosphorsäurediester-Enden, kommt es zur Ausbildung von „sticky Ends“ (klebrige Enden). Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen an den jeweiligen Enden stellt sicher, dass das Insert in der gewünschten Orientierung in den Vektor eingeführt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden funktionsoptimierte, rekombinante Designer-Enzyme, die HF-Enzyme (High Fidelity, HF®) verwendet. Im Vergleich zu konventionellen Restriktionsenzyme zeigen HF-Enzyme eine höhere Genauigkeit des Verdauprozesses, eine verringerte Star-Aktivität und eine vollständige Aktivität im Cut-Smart-Puffer.

Tabelle 2: Übersicht der Restriktionsenzymen NcoI-HF, NotI-HF und XbaI

Restriktionsenzym	Ursprungsorganismus	Erkennungssequenz	Einzelstrang-Ende
NcoI-HF		5'-C'CATGG-3' 3'-GGTAC'C-5'	sticky ends
NotI-HF		5'-GC'GGCCGC-3' 3'-CGCCGG'CG-5'	sticky ends
XbaI	Xanthomonas badrii	5'-T'CTAGA-3' 3'-AGATC'T-5'	sticky ends

Um optimale Reaktionsbedingungen zu schaffen, werden 4 µg Insert und 2,5 µg Vektor in 0,2 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß verwendet. Zur Herstellung der neuen Konstrukte von Insert und Vektor wurde der Verdau wie gefolgt angesetzt.

Verdauansatz der Inserts:

1) TP1170

CutSmart Puffer	2µl
TP1170	16µl
NotI-HF	1µl
NcoI-HF	1µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

2) TP1104

CutSmart Puffer	2µl
TP1104	16µl
NotI-HF	1µl
NcoI-HF	1µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

3) CMV

CutSmart Puffer	2µl
CMV	16µl
NotI-HF	1µl
XbaI	1µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

4) InfAnuc

CutSmart Puffer	2µl
InfAnuc	16µl
NotI-HF	1µl
XbaI	1µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

5) HSA

CutSmart Puffer	2µl
CMV	16µl
NotI-HF	1µl
XbaI	1µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

6) FITC_E2

CutSmart Puffer	2µl
InfAnuc	16µl
NotI-HF	1µl
XbaI	1µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

Verdauansatz der Vektoren:

1) Vektor pCSE2.5_rbFc

H ₂ O	13,5µl
CutSmart Puffer	2µl
FS#436	2,5µl
NotI-HF	1µl
NcoI-HF	1µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

2) Vektor pCSE2.5_rbFc

H ₂ O	13,5µl
CutSmart Puffer	2µl
FS#436	2,5µl
NotI-HF	1µl
XbaI	1µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

3) Vektor pCSE2.5_rbFc

H ₂ O	13,5µl
CutSmart	2µl
FS#436	2,5µl
NcoI-HF	1µl
XbaI	1µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

Die Verdauansätze werden bei 37°C für 7 Stunden in den Thermozykler inkubiert.

3.1.2 Dephosphorylierung der Vektoren

Nach dem Verdau eines Vektors wird dieser dephosphoryliert. Ohne die Dephosphorylierung der 5'-Enden der Vektor-DNA kommt es mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Religation ohne Insert-DNA.

Die verdauten Vektoren werden in der Minizentrifuge für 10 sec zentrifugiert. Zu jedem Ansatz werden 2 μ l Antarctic Phosphatase Reaction Buffer und 1 μ l Antarctic Phosphatase hinzugegeben. Die PCR-Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße werden für 1 h bei 37°C in den Thermocycckergestellt.

3.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Gelelektrophorese erlaubt es, DNA-Fragmente nach ihrer Größe voneinander zu trennen. Dabei können in einem 1%-igen TAE-Agarosegel Fragmente von ca. 300 bp bis 20 kb getrennt werden. Die negativ geladene DNA wandert in einem horizontalen angelegten elektrischen Feld zum positiven Pol. Nach Färbung mit einem DNA-bindenden Farbstoff ist die Darstellung einzelner DNA-Fragmente nach ihrer Größe und Konzentration möglich. Aufgrund vorhandener Nebenprodukte und Restriktionsenzyme kann der verdauete PCR-Vektor nicht direkt zur Ligation verwendet werden.

Zu Beginn werden 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer für 1,5 min (90sec) in der Mikrowelle erwärmt. In 30-sekündigen Abständen wird die Lösung vorsichtig geschüttelt, sodass die Agarose vollständig gelöst wird. Anschließend wird die Agaroselösung in das vorbereitete Gelbett gegossen. In die Mitte werden 5 μ l RotiSafe Farbstoff mit dem Kamm über die gesamte Fläche verteilt. Zur Bildung der Geltaschen wird der Kamm mit 10 oder 14 Zacken auf die Halterung der Kammer gesetzt. Nach diesem Vorgang wird das Gel für mind. eine Stunde zum auspolymerisieren gesetzt.

Das 1%-ige TAE-Agarosegel wird in der Gelkammer mit vorgelegtem frischem TAE-Puffer eingesetzt. Beim Beladen der dephosphorylierten Vektoren wird der Kamm aus dem Gel vorsichtig entfernt. Zu jedem Verdauansatz wird 20 μ l 6x DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. In die erste Geltasche wird 10 μ l 1kb-DNA-Marker mit 4 μ l 6x DNA-Auftragspuffer aufgetragen. Anschließend werden die Pole am Stromversorgungsgerät angeschlossen und die Gelelektrophorese läuft bei einer konstanten Spannung von 90 V für etwa 45 min. Danach erfolgt die Visualisierung bestimmter DNA-Fragmente im UV-Licht bei einer Wellenlänge (λ) von 320nm. Die gewünschte DNA wird mithilfe eines sterilisiertem

Skalpells geschnitten und in ein 1,5ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß überführt, sodass es für die Plasmidisolierung bereitsteht.

3.1.4 Plasmidisolierung nach QIAprepTM-Spin¹

Diese Isolierungsmethode eignet sich für eine schnelle und erfolgreiche Reinigung von DNA-Fragmenten im Bereich von 70 bp bis 10 kb aus Gelen. Die Elution der DNA aus dem Agarosefragment erfolgt mit einem Gelextraktions-Kit „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen. In dieser Arbeit wurde eine Kombination der beiden Protokolle „Gel extraction“ und „PCR clean up“ angewendet.

Das ausgeschnittene Plasmid-DNA-Fragment aus dem Agarosegel wird bei der Methode „Gel extraction“ in 200 µl NTI-Bindungspuffer aufgenommen. Daraufhin folgt eine Inkubation bei 50°C für 10 min auf dem Thermomixer, bis das Gel vollständig im Bindungspuffer gelöst ist. Die Insert-Proben in der Methode „PCR clean up“ werden in 150 µl NTI-Bindungspuffer und 50 µl dH₂O aufgenommen. Anschließend wird die DNA-Lösung des Inserts und Vektors auf die QIAquick-Spin-Säule aufgetragen und bei 11.000 x g für 60 sec zentrifugiert. Dadurch wird die DNA an die Säule gebunden und aufkonzentriert. Anschließend folgen zwei Waschschrte der Silica-QIAprep-Säule mit jeweils 700 µl NT3-Waschpuffer. Die aufgesetzten Säulen werden bei 11.000 x g für 60 sec zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Ein weiteres Mal wird ohne Zusatz von Puffer trocken zentrifugiert, um vorhandene Restflüssigkeit in der Säule zu entfernen. Die QIAprep-Säule wird in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß überführt und der Behälter verworfen. Um die DNA von der Säule zu eluieren, wird zunächst dH₂O auf 70°C erwärmt. In jeden Ansatz werden 30 µl hinzugegeben und für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wird bei 11.000 x g für 60 sec. zentrifugiert. Die daraus resultierende aufkonzentrierte DNA wird bei 4°C aufbewahrt.

¹ Die genannten Puffer dieser Methode gehören zum QIAprepTM-Spin-Kit der Firma Qiagen.

3.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

In der Ligationsreaktion werden die durch die Restriktionsenzyme gewonnenen Insert- und Vektor-DNA-Fragmente zum neuen Plasmid-Konstrukt verbunden. Dafür wird die DNA-Ligase aus dem Phagen T4 eingesetzt, welche kovalent die DNA-Fragmente verknüpft. Für die Herstellung von rekombinanter DNA bildet die T4-Ligase zwischen benachbarten 5'-Phosphat und 3'-Hydroxygruppen Phosphodiesterbindungen und verbindet *in vitro* „sticky ends“.

In dieser Arbeit wurde die Einfachligation angewendet, bei der nur ein Insert im Expressionsvektor kovalent gebunden wird. Für das Klonieren von zwei unterschiedlichen Inserts in den Expressionsvektor wurde häufig die Dreifachligation eingesetzt. Hier werden Konstrukte von jeweils einem Nanobody (TP1170; TP1104) und einem Antigen (CMV, InfAnuc, scFv und HSA) im Plasmid hergestellt.

Zusätzlich zum Ligationsansatz mit Insert und Vektor wird ein Religationsansatz des Expressionsvektors alleine durchgeführt um die Häufigkeit der Religation des Vektors ohne Aufnahme des Inserts abschätzen zu können. Im Besten Fall sollte die Population auf der Religation kleiner sein als die mit dem legierten Vektoransatz.

Zu jedem Ligationsansatz werden separat 80 ng Insert-DNA und 100 ng Plasmid-DNA in einem 0,2 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß aufgenommen. Dabei ist zu beachten, dass die T4-DNA-Ligase und Ligasepuffer in einem Kühlbehälter aufbewahrt werden und die Zugabe der Ligase als letztes erfolgt. Nach mehrmaligen auf- und abpipettieren von einem Reaktionsvolumen von 20 µl werden die Ansätze für 14 h bei 16°C über Nacht in dem Thermozykler inkubiert. Anschließend werden die fertig gestellten Ligationsansätze in -20°C aufbewahrt.

Nach der Ligation folgt die sofortige Transformation der mit Insert legierten Vektoren in XL-1 blue *E.coli*-Zellen.

Ligationsansatz:

Insert-DNA	80 ng
Vektor/Plasmid-DNA	100 ng
Ligase Puffer	2 μ l
T4-Ligase	1 μ l
<u>H₂O</u>	<u>-- μl</u>
Gesamt	20 μ l

Ligationskontrollansatz der Vektoren:

Vektor	100 ng
Ligase Puffer	2 μ l
T4-Ligase	1 μ l
<u>H₂O</u>	<u>-- μl</u>
Gesamt	20 μ l

3.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in XL-1 blue E.coli

In der Transformation werden mittels der Hitzeschockmethode in der Ligation entstandenen DNA in kompetente Zellen transformiert. Für die Transformation werden kompetente Bakterienstämme, die XL-1 blue *E.coli*-Zellen, verwendet.

Die nachfolgenden Schritte der Transformation in XL-1 blue *E.coli* werden auf Eis durchgeführt. Ein Aliquot von 100 μ l gefrorener kompetenter Bakterien-Zellen werden innerhalb von 5 bis 10 min auf Eis aufgetaut. Zu jedem Ansatz werden vorsichtig 50 μ l Bakterienlösung und 2 μ l DNA (Ligationsreaktion) in einem 1,5 Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Daraufhin folgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis, wodurch die Plasmid-DNA an der Bakterienzellwand anlagert. Anschließend wird die Hitzeschockmethode bei 42 °C für 30 sec im Wasserbad durchgeführt, damit die Zellwand der Bakterien permeabel wird und das Plasmid Eindringen kann. Daraufhin werden die Proben für 2 min auf Eis gelegt, sodass die Bakterienzellwand sich wieder generiert und schließt. Zur Zellsuspension werden 450 μ l vorgewärmtes SOC-Medium addiert und für 60 min bei 37°C und 300 rpm auf dem Thermoschüttler inkubiert.

3.1.7 Screening nach positiven Kolonien

Der Vergleich von Einzelkolonien der Vektorkontrolle und Ligationsreaktionen bietet eine grobe Einschätzung des voraussichtlichen Klonierungserfolgs. Es gilt eine hohe Anzahl von Klonen mit rekombinanter DNA zu erhalten. Die rekombinanten Bakterien weisen einen neuen Phänotyp, eine Antibiotikaresistenz, auf und lassen sich unter bestimmten Wachstumsbedingungen selektieren. Das verwendete Plasmid trägt das Gen für Carbenicillinresistenz. Demnach wachsen auf Carbenicillin-haltigen Agarböden nur die Bakterien, welche den Vektor mit Insert oder den rezyklierten Vektor aufgenommen haben und somit gegen Carbenicillin resistent sind. Zur Kontrolle werden die Bakterien zum Religationsansatz auf einen Carbenicillin-haltigen Agarboden ausplattiert. Idealerweise würden Kolonien ohne aufgenommenes Insert auf diesem Nährboden nicht wachsen. Solche Zellen besitzen keine Antibiotikaresistenz und sterben auf einem Antibiotika-haltigen Nährboden ab.

Zunächst werden 50 µl der transformierten Bakterien in die Mitte der Carb-Agarplatten pipettiert und mit einer sterilen Einmalöse ausplattiert. Anschließend wird die Suspension mit horizontalen Streichen auf der Platte verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag werden die Einzelkolonien vorsichtig mit einer 200 µl Pipettenspitze gepickt und in 5 ml vorgelegtes Carb-2YT-Medium überführt und in 15 ml Falcon-Tubes auf und ab pipettiert. Zuletzt folgt die Bakterienkultivierung der Einzelklone über Nacht bei 37°C mit 300 rpm auf einem Schüttler.

Die Retransformation (siehe Abbildung 7) bereits isolierter richtig sequenzierter Plasmide erfolgte nach dem gleichen Verfahren und dient zur Vermehrung der Plasmid-DNA einer Minipräparation.



Abbildung 7: Eine Carbenicillin-haltige Agarplatte. Ausplattiert einer *E.Coli*- Kultur mit aufgenommenem Plasmid nach einer Retrotransformation.

3.1.8 Minipräparation von Plasmiden mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“²

Die Durchführung der Minipräparation dient der Plasmidisolierung aus transformierten *E.coli* Bakterien bei einer resultierenden Plasmidmenge von 50 µl. Zur Plasmidpräparation wurde das Kit „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Die Methode beruht auf das Prinzip der alkalischen Lyse.

Die Plasmidaufreinigung erfolgt nach einem einfachen „Bind-Wash-Elute“-Verfahren (siehe Abbildung 8). Die 5 ml Übernachtkultur wurde für 10 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die das Pellet enthaltenden 15 ml Falcon-Tubes werden kopfüber auf ein Tissue gelegt, um das restliche Carb-2YT-Medium zu entfernen. Das Zellpellet wird mit 250 µl P1-Puffer resuspendiert und in ein vorbereitetes 1,5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß übergeführt. Anschließend wird zu jedem Ansatz 250 µl P2-Puffer dazugegeben und Kopf über mehrmals geschüttelt, bis die Zellsuspension eine bläuliche Farbe erhält. Es folgt die Zugabe von 350 µl N3-Puffer zur Neutralisation. Nach der 10-minütigen Zentrifugation bei 13000 x g sedimentieren die ausgefallenen Proteine und die Zelltrümmer. Der Überstand wird in eine vorbereitete „QIAprep“-Säule überführt, welches eine Silica-Gelmembran für die Aufnahme von Plasmid-DNA besitzt. Durch eine weitere Zentrifugation bei 13000 x g für 1 min wird die Bindung der DNA an die Säule ermöglicht und der Durchfluss wird verworfen. Anschließend folgt ein Waschschriff mit 500 µl PB-Puffer und eine Zentrifugation

bei 13000 x g für 1 min. Der Durchfluss wird wieder verworfen. 750 µl PE-Puffer wird auf die Säule gegeben und anschließend wird einmal trocken bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die „QIAprep“-Säule wird auf ein 1,5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß übergeführt und zum Eluieren der Plasmid-DNA wurden 50 µl EB-Puffer in die Mitte der Säule gegeben und für 2

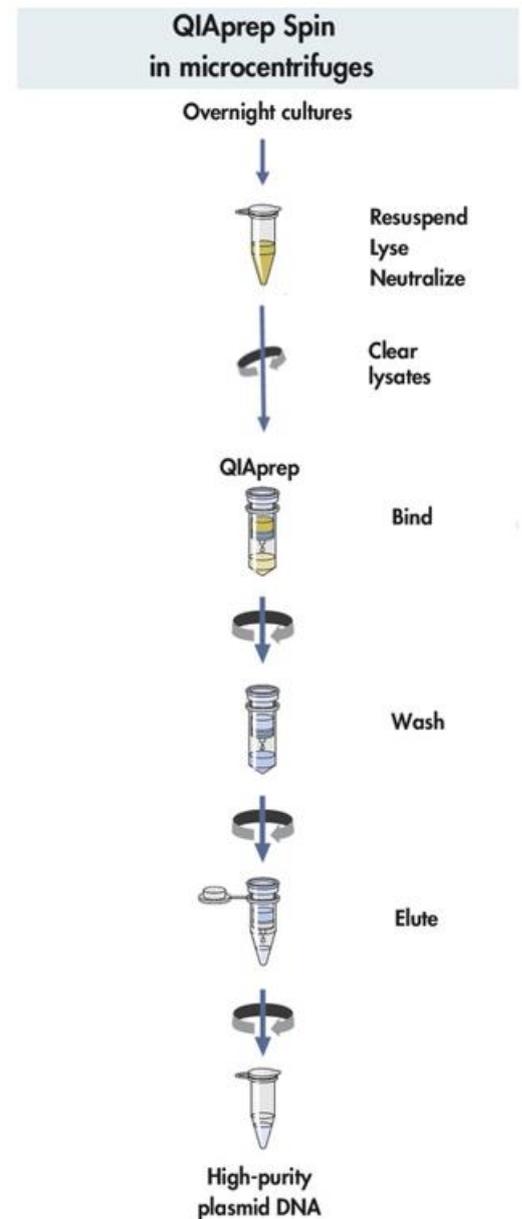


Abbildung 8: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte für die Durchführung einer Minipräparation. Beruht auf das „Bind-Wash-Elute“-Verfahren mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit. Angepasst von <https://www.qiagen.com/us/products/top-sellers/qiaprep-spin-miniprep-kit/#productdetails>

² Alle verwendeten Puffer wurden vom Hersteller mitgeliefert und für die Methode verwendet.

min in RT inkubiert. Nach Zentrifugation erhält man 50 µl aufgereinigte Plasmid-DNA. Die Lagerung der Minipräparationsansätze erfolgt im -20°C Gefrierschrank.

3.1.9 DNA-Sequenzierung

Durch die DNA-Sequenzierung wird die Nukleotidabfolge einer DNA-Sequenz, z.B. eines in einen Vektor inklonierten Inserts, bestimmt. Dazu wird ein Primer benötigt, der sich an die komplementären Einzelstränge der DNA anlagert und dort als Verknüpfungsstelle für die Taq-Polymerase dient. In dieser Arbeit dient der CMVfor Primer für die Vorwärtssequenzierung und der pCR3.1-BGHrev Primer für die Rückwärtssequenzierung.

Zur DNA-Sequenzierung werden 2 µl Primer, 1 µl aufgereinigte Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 50-100 ng/ µl und 14 µl dH₂O in Eurofins-Tubes hinzugegeben. Die vorbereiteten DNA-Proben werden zur Firma Eurofins zugeschickt, damit die DNA sequenziert wird. Anschließend folgt die Auswertung der DNA-Codes mit dem Bearbeitungsprogramm 4Peaks, welche die Richtigkeit der Sequenzabfolge der eingesetzten Proben prüft.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Herstellung von kompetenten Zellen XL-1 blue *E.coli*

Die Herstellung von chemisch kompetenten Zellen wird erzielt, um eine höhere Effizienz der DNA-Aufnahme bei der Transformation zu erlangen. Um kompetente *E.coli*-Zellen zu produzieren wird die Calciumchlorid-Methode angewendet. Die Zellen werden in diesem Verfahren mit 100 mM CaCl₂ behandelt. Hierbei verändern die Calcium-Ionen die Permeabilität der Zellmembran wodurch die Aufnahmefähigkeit von Fremd-DNA in Zellen ermöglicht wird.

Mit einer Pipettenspitze werden die XL-1 blue *E.coli*-Zellen aufgenommen und in 5 ml YT-Medium angeimpft. Die Zellsuspension in einem 15 ml Falcon-Tube wird über Nacht bei 36°C und 300 rpm auf dem Schüttler kultiviert. Die Übernachtskultur wird bei 4600 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit neuangeseztem YT-Medium resuspendiert. In zwei Kolbenflaschen werden jeweils 0,5 ml Vorkultur in 50 ml Medium übergeimpft und bei 37°C und 300 rpm im Schüttler inkubiert bis die optische Dichte einen

Wert von 0,3 erreicht hat. In 30-minütigen Abständen wird der OD-Wert im Photometer gemessen, nach etwa 2h ist der optimale Wert erreicht.

Die anschließenden Schritte werden auf Eis durchgeführt, um zum einen das weitere Wachstum der Zellen zu verhindern und zum anderen die Zellen während des Arbeitsprozesses zu schützen. Es erfolgt die Verteilung der Zellsuspension auf vier vorbereitete, eisgekühlte 50 ml Falcon-Tubes und das Zentrifugieren bei 4600 rpm für 5 min und 4°C. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 5 ml vorgekühltem 100 µL CaCl₂ (ohne Glycerol) mit einer 200 µL Einmalpipette resuspendiert. Die Bakterien werden durch Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 5 min pelletiert und danach in 100 µL CaCl₂ mit 15 % Glycerol resuspendiert. Die Bakterien wurden letztendlich für 1 h auf Eis inkubiert und in Aliquots von 100 µL in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß portioniert. Die chemisch kompetenten Zellen können bis zu vier Monaten bei -80°C gelagert werden.

3.2.2 Herstellung von 2YT-Carb-Agarplatten als Nährboden

Das angesetzte 2YT-Agarmedium wird bei 126°C autoklaviert und für etwa 30 min zum Abkühlen auf 50°C stehen gelassen. Bevor man mit dem Gießen der Agarplatten beginnt, sollte der Arbeitsplatz aufgeräumt sein und mit 70%igem Ethanol gereinigt werden. Anschließend wird der Deckel der Petrischale angehoben. Das im Erlenmeyerkolben enthaltene Nährmedium wird durch leichtes Umschwenken gut vermischt und es werden 1 ml Carbenicillin hinzugegeben. Für jeden Ansatz werden etwa 15 ml 2YT-Agarmedium in die Platten auf einer waagerechten Fläche gegossen, sodass der gesamte Boden vollständig bedeckt ist. Zum Verhindern von tropfendem Kondenswasser auf den Agarmedium wird der Deckel schräg auf die Platte hingelegt. Eventuell entstandene Luftblasen werden mit einer Pipettenspitze entfernt und die Platten werden 30 min zum Abkühlen stehen gelassen, bis der Nährboden fest geworden ist. Anschließend werden die Petrischalen mit Deckel nach unten aufeinandergestellt und bei 4°C aufbewahrt.

3.3 Methoden zur Zellkultur

3.3.1 Stabile Transfektion von HEK-293 6E Zellen

Bei einer stabilen Transfektion handelt es sich um den Erhalt einer langfristigen Expression des Proteins. In diesem Verfahren wurden eukaryotischen Zellen der HEK-293-6E-Zelllinie (human embryonic kidney) eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden für die Expression der klonierten Plasmide Produkt- und Testtransfektionen durchgeführt. Bei der Produkttransfektion werden die Zellen in T225-Zellkulturflaschen mit 30 ml F17-Transfektionsmedium aufgenommen. In der Testtransfektion werden die Zellen in T75-Zellkulturflaschen mit 10 ml F17-Transfektionsmedium kultiviert. Die Vorgehensweise der beiden Transfektionen ist gleich, jedoch unterscheiden sie sich in der Ansetzung der DNA- und PEI-Mixe (siehe Tabelle 3). An Tag 1 werden die adhärenenten HEK-Zellen 1:10 geteilt und in vorgewärmtes F17-Transfektions-Medium aufgenommen. Am Folgetag werden die DNA- und PEI-Mixe jeweils steril in einem 1,5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß angesetzt und für 10 sec gevortext. Der PEI-Mix wird langsam tropfend zum DNA-Mix hinzugeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wird der Transfektionskomplex (DNA/PEI-Mix) langsam und gleichmäßig auf die HEK-293 Zellen gegeben. Die HEK-293-Zellen werden in T225- und T75 Zellkulturflaschen im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. 24 h nach Transfektion werden die Zellen mit F17-Feeding Medium beigesetzt. An Tag 8 wird der Überstand in einem 50 ml Falcon-Tube überführt und die Zellkulturflasche verworfen. Anschließend wird bei 4000 rpm für 10 min und 4°C zentrifugiert und der Überstand in SteriCups steril unter Vakuum filtriert. Für den Nachweis der Expression der produzierten Proteine werden die Überstände nach Methode 3.4.1 behandelt und auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen.

Tabelle 3: Übersicht der Ansetzung von DNA- und PEI-Mix für eine Testtransfektion und eine Produkttransfektion

		Testtransfektion T75-Flasche	Produkttransfektion T225-Flasche
DNA-Mix	Plasmid-DNA	10 µg	20 µg
	H ₂ O	auf 250 µl	auf 750 µl
	300mM NaCl	250 µl	750 µl
PEI-Mix	PEI	124 µl	248 µl
	H ₂ O	126 µl	502 µl
	300mM NaCl	250 µl	750 µl
Feeding-Medium		250 ml	500 ml

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Molekülmasse und der Visualisierung von Proteinen erfolgt eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dabei werden die Proteine im vertikalen und denaturierenden 10%-igen Agarosegel nach ihrer molaren Masse getrennt. Zur Identifizierung des Molekulargewichts der Proteine wurde ein Supermarker (siehe 2.16), ein selbsthergestellter Proteinmarker in 1x und 4x konzentrierter Lösung, verwendet. Bei Zugabe von Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) wird die Eigenladung des Proteins unterdrückt und eine starke negative Ladung erzielt, die zur Molekülgröße proportional ist. Somit wandern die Proteine zuerst durch das Sammelgel und anschließend durch das Trenngel in Richtung Anode.

3.4.1.1 Probenvorbereitung

Es werden 10 µl der zu untersuchenden Proben und Supermarker mit angesetztem 10 µl Mastermix-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 70°C auf einem Heizblock denaturiert. Das Dithiothreitol (Reducing Agent, DTT) im Mastermix dient der Reduzierung und Spaltung von Disulfidbrücken im Protein, sodass das Protein in der nativen Struktur vorliegt.

3.4.1.2 Durchführung der SDS-Gelelektrophorese

Es wird ein 10% Bis-Tris Gel entweder mit 10 oder 12 Taschen verwendet. Der Gelhalter und Spanner werden in die Kammer eingesetzt, wodurch das Gel nach innen im Gelhalter eingespannt und bis zum Boden der Kammer runtergedrückt wird. Im Fall der Verwendung von nur einem Gel muss ein Dummy im Gelhalter eingesetzt werden. Die Innere Kammer wird bis zu den Geltaschen mit MES-Laufpuffer gefüllt und 500 µl Antioxidanz nur in die Innere Kammer pipettiert. Der Kamm des Gels wird vorsichtig entfernt und die äußere Kammer wird zur Markierung (3 cm) mit MES-Laufpuffer befüllt. Anschließend werden 20 µl der denaturierten Probenprobe und Supermarker (1x und 4x) in die Taschen des Gels aufgetragen. Der Deckel mit den richtigen Polaritäten der Klemmen werden am Stromversorgungsgerät verbunden und auf 200 V für 35 min eingestellt (siehe Abbildung 9). Anschließend kann die Elektrophorese gestartet werden.



Abbildung 9: Darstellung einer laufenden SDS-PAGE- Gelelektrophorese mit einem 10%-igen Agarosegel. Betrieb bei 200 V für 37 min

3.4.1.3 Coomassie-Blue-Färbung

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird die Gelkammer geöffnet und die Gelkassette vorsichtig mit einem Spatel aufgebrochen. Die Anfärbung der Proteinbanden auf einem 10% Bis-Tris Gel wird mittels Coomassie-Brillant-Blau, einem Triphenylmethanfarbstoff, ermöglicht. Dabei lagert sich das Coomassie an basischen Seitenketten des Proteins an und führt zu einer permanenten Darstellung der einzelnen Proteine. Das Gel wird in einer Coomassie-Färbelösung über Nacht zum Färben auf dem Schüttler behandelt. Am Folgetag wird zum Entfärben dH₂O eingesetzt und für weitere 24 h inkubiert.

3.4.2 Immunpräzipitation von Proteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Immunpräzipitation von Proteinen nach einer Transfektion in HEK-Zellen durchgeführt. Anhand dieser Methode kann die Produktion des erwünschten Proteins in HEK-Zellen verifiziert werden.

Zu Beginn werden 1 ml Transfektionsüberstand und 40 µl 1:1 verdünnte ProteinA-Sepharose mit PPS +/- in einem 1,5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß gegeben und für 30 min bei RT auf den Schüttler inkubiert. Anschließend wird die ProteinA-Protein-Lösung bei 13300 rpm für

5 min und RT zentrifugiert. Der Überstand wird mittels einer Pipette abgenommen und verworfen. Das Pellet wird in 1 ml PBS -/- resuspendiert und bei 13300 rpm für 5 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird insgesamt zweimal wiederholt. Anschließend werden 20 µl SDS-Puffer zur Matrix hinzugegeben. Die Probe wird für 10 min bei 70°C auf einem Heizblock inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 13300 rpm für 5 min und RT. Nur der Überstand wird auf ein vorbereitetes SDS-PAGE-Gel aufgetragen. (siehe 3.4.1)

3.4.3 Proteinaufreinigung durch Säulenchromatographie

3.4.3.1 Affinitätschromatographie an der ProteinA-Säule

Die Aufreinigung rekombinanter hergestellter Proteine wird mittels Affinitätschromatographie ermöglicht. Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 4 dargestellt. Zu Beginn wird eine leere Säule zur Aufreinigung von Proteinen vorbereitet. Dafür werden 2 ml 1:1 von ProteinA-Sepharose mit PBS-/- auf die Säule gegeben und der Durchfluss wird verworfen. Um nicht gebundenes ProteinA zu entfernen wird die ProteinA-Säule mit 10 ml PBS -/- gewaschen. Anschließend wird die ProteinA-Säule mit dem gesamten Transfektionsüberstand beladen und der Durchfluss wird in einem 50 ml Falcon-Tube aufgesammelt. Die ProteinA-Säule wird mit 10 ml Waschpuffer behandelt. Für spätere Anwendungen werden die Durchflussproben bei 4°C aufbewahrt. Anschließend erfolgt die Elution in drei einzelnen Fraktionen E1-E3, indem drei 15 ml Falcon-Tubes mit vorbereitetem 1x TRIS-Puffer bereitgestellt werden. Daraufhin wird Elutionspuffer auf die Säule gegeben und in den einzelnen vorbereiteten 15 ml Falcon-Tubes aufgenommen, sodass das eluierte Protein in drei Teilen fraktioniert wird. Anschließend wird die Säule vorerst mit 10 ml Elutionspuffer und daraufhin mit 20 ml PBS -/- gewaschen. Für das Regenerieren und Aufheben der Säule wird mit 10 ml PBS/20% Ethanol gearbeitet, sodass bis 2 ml in der Säule bleiben. Der dazugehörige Deckel und der Ablaufverschluss werden an der Säule befestigt und bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 4: Übersicht der Schritte für eine Affinitätschromatographie an der ProteinA-Säule. Verwendung von HEK-Zellüberständen einer Testtransfektion und Produkttransfektion.

Aufreinigung mit ProteinA	Testtransfektion (10 ml Überstand)	Produkttransfektion (30-90 ml Überstand)
Vorbereitung der Säule	- 1 ml ProteinA (2 ml 50:50 ProteinA-Lösung) auf die Säule geben	- 2 ml ProteinA (4 ml 50:50 ProteinA-Lösung) auf die Säule geben
Waschen der Säule	- Säule mit 10 ml PBS -/- waschen	
Beladen der Säule	- gesamter Überstand auf die ProteinA-Säule geben	
Waschen der Säule	- Säule waschen mit 10 ml Wasch-Puffer - Durchfluss in ein Falcon sammeln (Probe Wash)	- Säule waschen mit 20 ml Wasch-Puffer - Durchfluss in ein Falcon sammeln (Probe Wash)
Elution von der Säule (in drei Fraktionen E1-E3)	- Für die Elution: drei 15 ml Falcon vorbereiten → E1: 60 µl 1/10 TRIS-Puffer → E2: 125 µl 1/10 TRIS-Puffer → E3: 125 µl 1/10 TRIS-Puffer - Elutions-Puffer auf die Säule geben und die 15 ml Falcon runterstellen → E1: 0,6 ml Elutions-Puffer → E2: 1,25 ml Elutions-Puffer → E3: 1,25 ml Elutions-Puffer	- Für die Elution: drei 15 ml Falcon vorbereiten → E1: 120 µl 1/10 TRIS-Puffer → E2: 225 µl 1/10 TRIS-Puffer → E3: 225 µl 1/10 TRIS-Puffer - Elutions-Puffer auf die Säule geben und die 15 ml Falcon runterstellen → E1: 1,2 ml Elutions-Puffer → E2: 2,5 ml Elutions-Puffer → E3: 2,5 ml Elutions-Puffer
Regenerieren der Säule (Aufheben der Säule)	- Säule mit 5 ml Elutions-Puffer waschen - Mit 20 ml PBS -/- waschen - Mit 10 ml PBS/20% Ethanol waschen und bis zu 2 ml in der Säule lassen	- Säule mit 10 ml Elutions-Puffer waschen

3.4.3.2 Pufferwechsel eines affinitäts-aufgereinigten Proteins mit Hilfe der PD10-Entsalzungssäule

Die PD-10 Einwegsäule dient zur Reinigung und Pufferaustausch von aufgereinigten Proteinen. Nach dem Prinzip der Gelfiltration werden Moleküle entsprechend ihrer Größe in der Säule voneinander getrennt. Dabei nehmen große Moleküle den kürzeren Weg in der Säule auf und eluieren dementsprechend früher als kleine Moleküle. Die PD10-Säule mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa besteht aus einem fertig gepackten SephadexTM-Säulenmaterial, welches eine quervernetzte Dextran-Struktur aufweist.

Der obere Deckel der PD-10-Säule wird entfernt und die Spitze des unteren Auslassventils abgeschnitten. Anschließend wird die PD-10-Säule mit 25 ml PBS +/+ äquilibriert. Dabei ist

zu beachten, dass der Auftrag des Äquilibriumspuffer in 5 ml Abständen auf die Säule erfolgt. Bei Anwendung von 10 ml produziertem Überstand der HEK-Zellen werden die Fraktionen E2 & E3 (von 3.4.3.1) vereinigt und auf die Säule aufgetragen. Der Durchfluss wird verworfen. Daraufhin wird das Protein mit 3,5 ml PBS +/- eluiert und der Durchfluss in einem 15 ml Falcon-Tube aufbewahrt. Bei Anwendung von 30-90 ml produziertem Überstand der HEK-Zellen wird zunächst 3,5 ml E2 auf die Säule gegeben und der Durchfluss verworfen. Daraufhin wird mit 3,5 ml PBS +/- eluiert und der Durchfluss wird in einem 15 ml Falcon-Tube aufgesammelt. Diese Behandlung wird entsprechend mit E3 durchgeführt. Anschließend erfolgt die Aufkonzentrierung des Proteins in einem 10000M Amicon-Falcon-Tube. Das bei der PD-10 -Säule entstandene Eluat wird in einem Amicon-Falcon-Tube übergeführt und für 8 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Endvolumen von 500 µl wird in einem 1,5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß bei 4°C aufbewahrt.

Die einzelnen Arbeitsschritte einer 10 ml oder 90 ml Transfektionsprobe für die Durchführung einer Umpufferung von Prot.einen sind in Tabelle 5 dargestellt. Mittels weiterer Verfahren der SDS-PAGE Gelelektrophorese und des BSA-Tests kann der Erfolg der Aufkonzentrierung des Proteins festgestellt werden.

Tabelle 5: Übersicht für das Durchführen eines Umpufferwechsels von aufgereinigten Proteinen.
Anwendung mittels der PD10-Entsalzungssäule von HEK-Zellüberständen einer Testtransfektion und Produkttransfektion

	Testtransfektion (10 ml Überstand)	Produktionstransfektion (30-90 ml Überstand)
Umpuffern in PD-10-Säule (nach Elution)	- Äquilibrieren der Säule mit 25 ml PBS +/- -2,5 ml E2+ 2,5 ml E3 auf die Säule geben - Mit 3,5 ml PBS +/- eluiieren	- Äquilibrieren der Säule mit 25 ml PBS +/- -3,5 ml E2 auf die Säule geben - Mit 3,5 ml PBS +/- eluiieren -Wiederholen mit E3
Aufkonzentrieren in Amicon-Tube	- Zentrifugieren für 8 min bei 4000 rpm und 4°C - Endvolumen von 500 µl	

3.5 Methoden zur Zelltechnik

Zum Stimulieren von mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) durch die produzierten Fusionsproteine wurden humane Vollblutproben und Leukozytenkonzentrate aus der Blutspende am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf verwendet.

3.5.1 Isolierung von PBMCs aus humanem Leukozytenkonzentrat

Die Isolierung von PBMCs aus humanem Leukozytenkonzentrat wird mittels Dichtegradientenzentrifugation ermöglicht. Zu Beginn werden 150 ml 2%iges FCS angesetzt und unter Vakuum steril filtriert. Das Leukozytenkonzentrat wird 1:2 mit 2%igem FCS in einem 50 ml Falcon-Tube versetzt. Um eine erfolgreiche Trennung der Bestandteile von Blut erzielen zu können, werden SepMate™-50ml Falcon-Tubes verwendet. Bei jedem Ansatz werden 15 ml Ficoll-Paque™ Dichtegradientenmedium in die zentralgelegene Öffnung des SepMate™-50 ml Falcon-Tubes hinzugegeben. Anschließend werden 20 ml verdünnter Blutprobe vorsichtig auf die Fritte des SepMate Falcon-Tubes dazugegeben. Daraufhin folgt die Dichtegradientenzentrifugation bei 1200 x g für 10 min bei RT (Bremse aus). Die PBMCs im Überstand werden durch schnelles Kippen von den Erythrozyten im Dichtegradientenmedium der unteren Schicht des SepMate Falcon-Tubes getrennt. Daraufhin werden die mononukleären Zellen mit 20 ml 2%igem FCS gewaschen. Gegebenenfalls wird ein weiteres Mal gewaschen, wenn der Überstand eine trübe Färbung aufweist. Die Zellzahl der PBMCs wird mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Die Kryokonservierung der gewonnenen Zellen wird in 1,8 ml Kryo-Falcon-Tube durchgeführt. Zunächst werden 500 µl mononukleäre Zellen in Kryo-Falcon-Tubes auf einem Kühl-Akku aliquotiert. Anschließend werden 500 µl Einfriermittel, 1:10 mit 2%igem FCS + DMSO³, zu den Zellen gegeben. Die aufgereinigten PBMC-Aliquote werden bei -80°C aufbewahrt.

3.5.2 Manuelle Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Die Neubauer-Zählkammer dient zur Bestimmung von Teilchenzahl (hier: von Lymphozyten) pro Volumeneinheit einer Flüssigkeit. Die Kammer und Glasscheibe müssen vor Gebrauch frei von Staub und Schmutz sein. Das Deckglas wird mit leichtem Druck auf die Kammer gesetzt, sodass die Scheibe sich nicht mehr verschieben lässt. Für die Auftragung werden 10 µl Zellsuspension und 90 µl Trypanblau in einem 1,5 Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß gegeben

³ Wichtig ist, dass das Einfriermittel bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt wird.

und für 5 sec gevortext. Anschließend werden 10 µl der Verdünnungsprobe zwischen Kammer und Deckglas pipettieren. Hierbei muss aufgepasst werden, dass keine Luftblasen in der Kammer entstehen. Die Zellzahl wird in einem Bereich von 16 Quadranten unter dem Lichtmikroskop gezählt.

3.5.3 Direkte Isolierung der PBMCs aus humanem Vollblut

Die pluriMate®-centrifugation-Tubes der Firma pluriSelect werden zur optimalen Trennung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes aus Vollblut eingesetzt. Der Schwamm im pluriMate®-centrifugation-Tube dient als poröse Barriere und verhindert das Zusammenführen von Probenmaterial mit dem Trennmedium (siehe Abbildung 10). Nach Aufreinigung ist eine Kontamination von Erythrozyten mit der angereicherten Zellfraktion den PBMCs nicht möglich. Zu Beginn werden 0,75 ml Dichtegradientenmedium (PBMC Spin-Medium) in ein 2 ml pluriMate®-centrifugation-Tube gegeben und bei 1000 x g für 10 sec zentrifugiert. Hierbei wird der Schwamm des pluriMate®-Tubes mit dem Dichtegradientenmedium gefüllt. Anschließend werden 1 ml Vollblut vorsichtig hinzugegeben und bei 800 x g für 15 min bei RT (Bremse aus) zentrifugiert. Nach der Dichtezentrifugation befinden sich die PBMCs in einer trüben viskosen Schicht zwischen den Erythrozyten im Schwamm und dem Plasma. Die PBMCs werden vorsichtig in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1 ml RPMI-Komplett-Medium gewaschen. Daraufhin folgt eine Zentrifugation bei 300 x g für 5 min bei RT. Der Überstand wird mit Hilfe der Pipette verworfen und der Waschschrift wird ein weiteres Mal wiederholt, sodass die aufgereinigten und isolierten PBMCs bis zur weiteren Behandlung auf Eis gekühlt werden.

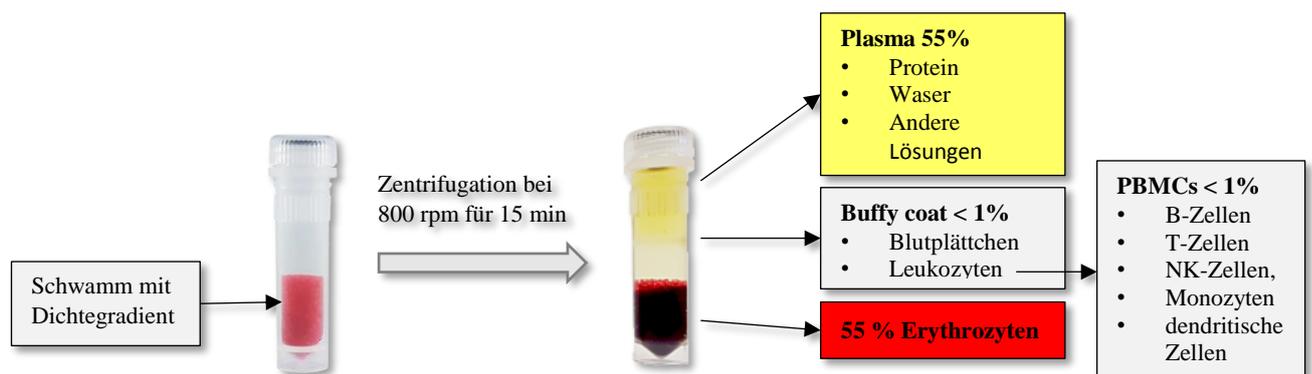


Abbildung 10: Schematische Darstellung zur Gerinnung von PBMCs aus humanem Vollblut. Durchführung mit Hilfe von pluriMate®-centrifugation-Tubes zur Trennung einzelner Zellfraktionen nach einer Dichtegradientenzentrifugation. Entnommen aus https://www.pluriselect.com/de_de/plurimate-2-ml-centrifugation-tube-pre-filled-50.html und angepasst.

3.5.4 Aufreinigung von B-Zellen mit CD19+ PluriBeads⁴

Die Aufreinigung von B-Zellen wird mittels einer Filtertechnik aus dem Ausgangsmaterial wie PBMCs, Vollblut, Leukozytenkonzentrat und primären Zellen ermöglicht. Diese Isolierungsmethode erfolgt mit Hilfe eines „S-pluriBead® Mini Reagent Kit“ der Firma pluriSelect. Das RPMI-Komplett-Medium wird bis zum Einsatz im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Ein Aliquot von 1 ml aufgetauter PBMCs wird mit 4 ml einer 1:1 Mischung aus 1x Waschpuffer und Puffer B in einem 15 ml Falcon-Tube angesetzt. Zur Lösung werden 160 µl S-pluriBead® CD19 hinzugegeben. Anschließend erfolgt für die Kopplung der CD19-Beads an B-Zellen eine 30 minütige Inkubation bei RT auf dem PluriPlix-Roller. Der S-pluriStrainer® mit einer Porengröße von 30 µl wird auf einem 50 ml Falcon-Tube aufgesetzt und mit 1 ml angesetztem 1x Waschpuffer benetzt. Die Beads-Suspension wird mit Hilfe eines Trichters auf den Filter gegeben, sodass die CD19+-gekoppelten B-Zellen gefiltert und aufkonzentriert werden. Anschließend werden 2 ml Medium in 10- Schritten auf den S-pluriStrainer® pipettiert. Der Connecting Ring wird auf ein neues 50 ml Falcon-Tube gesetzt und der rote Verschluss zugedreht, sodass keine Flüssigkeit durch den S-pluriStrainer® in das Falcon-Tube tropfen kann. Für die Entkopplung der CD19+-Beads von den B-Zellen wird eine 1 ml Puffer D mit 200 µl Puffer D- Lösung angesetzt und auf dem S-pluriStrainer® hinzugegeben. In 2-minütigen Abständen wird das Falcon-Tube vorsichtig für 10 min geschwenkt. Daraufhin werden 1 ml 1x Waschpuffer auf die Zellsuspension hinzugegeben und in zehn Schritten mit einer 1000 µl Pipette auf und ab pipettiert. Der Verschluss am Connecting Ring wird aufgedreht, sodass die gesamte Suspension durch den S-pluriStrainer® fließen kann. Anschließend wird der Filter mit 1 ml RPMI-Komplett-Medium 10-mal gewaschen. Der S-pluriStrainer® mit Connecting Ring werden nicht ein weiteres Mal verwendet und werden entsorgt. Die aufgereinigte B-Zell-Suspension wird bei 2600 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen mittels Neubauerkammer (Methodennummer) unter dem Lichtmikroskop gezählt.

3.5.5 Zellmarkierung mit eFluor 670 für die Langzeitstimulation

Das eFluor™ 670 ist ein roter Fluoreszenzfarbstoff und dient zur Bestimmung der Zellproliferation. Der Farbstoff bindet an zelluläre Proteine die primäre Amine enthalten. Durch die Teilung der Zellen wird der Stoff gleichmäßig auf die Tochterzellen übertragen. Dadurch nimmt die Intensität der Fluoreszenz des Farbstoffs bei jeder Zellteilung ab. Aus diesem Grund

⁴ Alle verwendeten Puffer wurden vom Hersteller mitgeliefert und für die Methode verwendet.

wird die Markierung mit eFluor™ 670 bei Versuchen mit Langzeitstimulationen verwendet. Die Zellsuspension wird mit 5 ml PBS -/- gewaschen und bei 2600 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird unter gleichen Bedingungen wiederholt. Die Zellzahl wird mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das eFluor™ 670 wird nach der Tabelle 6 in vier Schritten mit PBS-/- vorverdünnt und als Endvolumen von 1 ml eFluor™ 670 mit einer Endkonzentration von 2 µM auf die Zellsuspension hinzugegeben. Die eingefärbten Zellen werden für 10 sec gevortext. Anschließend folgt eine zehnminütige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Nach der Inkubation werden 5 ml RPMI-komplett Medium hinzugegeben und für 5 min auf Eis gestellt. Daraufhin werden die PBMCs zweimal mit 5 ml RPMI-komplett Medium gewaschen. Die Zellzahl wird ein weiteres Mal bestimmt, um den Verlust der Zellen zu überprüfen. Es hat sich herausgestellt, dass das mehrmalige Waschen keine erheblichen Verluste verursacht. Die markierten Zellen werden je nach Anzahl der Stimulation aufgeteilt.

Tabelle 6: Verdünnungsreihe vom Farbstoff eFluor 670. Durchführbar in vier getrennten Schritten.

Tube	Dilution	eFluor 670		PBS-Puffer [µl]	β _{Endkonzentration} [µl/µM]
		V [µl]	β _{Konzentration}		
1	1:200	0,40	5	79,6	25
2	1:2,5	80,0	25	120,0	10
3	1:2	200,0	10	200,0	5
4	1:2,5	400,0	5	600,0	2

3.5.6 Oberflächenfärbung von Zellen

Die Oberflächenfärbung von PBMCs erfolgt in FACS-Röhrchen. Die Zellsuspension wird mit 2 ml PBS gewaschen und bei 2600 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird durch schnellen Kippen verworfen. Zum Pellet wird das vorbereitete Antikörpergemisch hinzugegeben und für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird mit 2 ml PBS -/- gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Somit sind die Proben für die Messung an der Durchflusszytometrie bereit.

3.6 Methoden zur Detektion

3.6.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Analysemethode zur Charakterisierung von Zellen in Bezug auf morphologische Eigenschaften (Zellgröße und –granularität) und ihrer Ausstattung mit Oberflächenmarkern. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Unterscheidung von mikroskopischen Partikeln hinsichtlich ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulärer Zusammensetzung. In der Immunologie werden Immunzellen oder auch antikörpergekoppelte Mikropartikel (Beads) analysiert und untersucht. Die Zellen werden für die spätere Messung mit Antikörpern, die gegen eine bestimmte zelluläre Struktur gerichtet sind, markiert. Diese Antikörper sind mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, sodass bei der Messung im Durchflusszytometer die markierten Zellen mittels eines Laserstrahls detektiert werden. Es kommt zur Lichtstreuung und Anregung der gekoppelten Farbstoffe, welche daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Für jeden Fluoreszenzfarbstoff wird ein spezifisches Signal erfasst. Vorteil dieser Messmethode ist die sehr schnelle Aufnahme des Probenmaterials. In sehr kurzer Zeit können tausende Zellen separat am Laser nach verschiedenen Kriterien, wie Größe und deren Granularität untersucht werden. (Luttmann et al., 2014)., Die Größe und Granularität der Zellen beeinflussen die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserlichtes, sodass anhand dieser Parameter unterschiedliche Zellpopulationen wie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterschieden (Abbildung 2) und diese entsprechend mittels eines Programms eingegrenzt („gated“) werden können (Schütt und Bröker, 2011).

Die mononukleäre Zellen des peripheren Blutes - PBMCs - umfassen komplexe Populationen von B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und dendritische Zellen. Aufgrund der vielfältigen Zellen der PBMCs repräsentiert die Durchflusszytometrie die beste Analysemethode, um immunologische und funktionelle Eigenschaften der Zellen zu untersuchen(Schütt und Bröker, 2011).

3.6.2 Konzentrationsbestimmung an NanoDrop

Zur Bestimmung der Konzentration doppelsträngiger DNA wurde nach der Plasmidaufreinigung das Spektralphotometer (Nanodrop 2000c) verwendet. Hierbei wurde die Absorption der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zu Beginn wird die Oberfläche am NanoDrop mit 5 µl dH₂O gereinigt, um sicher zu gehen, dass am NanoDrop keine Verunreinigungen vorliegen. Anschließend wird der Messarm des NanoDrop geöffnet

und 1 μl DNA-Probe auf den unteren Messplatz pipettiert. Der Messarm wird wieder geschlossen und im Programm NanoDrop 2000 eine Spektralmessung eingeleitet. Wenn die Messung abgeschlossen ist, wird die Probe vom oberen und unteren Messplatz mit einem trockenen Labortissue gewischt.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit werden in vier Bereiche untergliedert. Im ersten Teil werden Klonierungsversuche zum Prozess hergestellter Konstrukte aus jeweils einem Nanobody und einem Antigen-Tag mit anschließender Proteinexpression dargestellt. Im zweiten Teil wird das klonierte Fusionsprotein TP1170-scFv mit Sphero-Sky-blue-Beads zur Stimulation mit AK eingesetzt. Im dritten Versuchsteil wird die Antigenpräsentation von Influenza Nukleoprotein an aktivierten T-Lymphozyten durch isolierte B-Lymphozyten aus PBMCs untersucht. Hierbei werden die Fusionsproteine TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA mittels eines Antikörpers gegen CD21 gebunden und gezielt den B-Zellen für die T-Zellenaktivierung gegeben. Im vierten Versuchsteil wird das Influenza Nukleoprotein durch Bindung an verschiedene AK zur gezielten Aufnahme durch unterschiedliche APC-Rezeptoren an T-Lymphozyten präsentiert. Neben CD8 und CD4 werden weitere Oberflächenmoleküle, wie z.B. CD154, CD137 und CD25 zur Unterscheidung verschiedener Zelltypen verwendet.

4.1 Herstellung von anti-Kappa und anti-IgG1 Nanobodies mit Antigen-Tag (aCMV, aInfAnuc, HSA und scFv) in HEK-293 6E- Zellen

In diesem Versuchsteil wird die Herstellung von Fusionsproteinen aus verschiedenen Nanobodies und Antigenen beschrieben. Dabei codiert Nanobody TP1170 für anti-Maus kappa Leichtkette und der zweite Nanobody (TP1104) für anti-Maus IgG1. Als Antigen-Tags dienen die Sequenzen des pp65 Proteins aus dem humanen Cytomegalievirus (CMV pp65), das Nukleoprotein aus dem H1N1 Stamm des Influenzavirus (InfAnuc), humanes Serumalbumin (HSA) als Negativkontrolle. Außerdem wurden noch Fusionskonstrukte zwischen den anti-Maus-Immunglobulin Nanobodies und einem scFv-Fragment gegen Fluorescein Isothiocyanat (FITC) hergestellt. Die beschriebenen Sequenzen werden in den Vektor pCSE2.5_rbFc kloniert. Die Expression der Fusionsproteine erfolgt in HEK-293 6E-Zellen, gefolgt von einer Aufkonzentration der rekombinanten Proteine aus Zellüberständen mittels Affinitätschromatographie.

4.1.1 Klonierung und Identifikation

Im folgenden Versuch wird der Vektor pCSE2.5_rbFc und die Nb-Antigen-Tag-Inserts an den Restriktionsschnittstellen NotI-HF, NcoI-HF und XbaI geschnitten (3.1.1). NcoI-HF schneidet innerhalb der Sequenz von 5'-C'CATGG-3', NcoI-HF an 5'-GC'GGCCGC-3' und XbaI an 5'-T'CTAGA-3' an der mit ' markierten Stelle. Jeweils zwei Restriktionsenzyme werden zu der DNA gegeben. Zur Charakterisierung und Identifizierung werden die verdauten Vektoren auf

ein 1%-iges TAE-Agarosegel aufgetragen. (3.1.3). Das Ergebnis der Agarose-Analyse (Abbildung 11) zeigt, dass die drei Restriktionsenzyme an den richtigen Stellen im Vektor gebunden und geschnitten haben. Auf dem Gel stellt jeder Verdauungsansatz zwei DNA-Banden mit der erwarteten Größe dar. Insgesamt weisen die Fragmente ein Größespektrum zwischen --- und --- auf. Der Vektor pCSE2.5_rbFc mit den Restriktionsschnittstellen NotI-HF und NcoI-HF weist eine Größe von 4000 bp. In Abbildung 11 erkennt man, dass für alle Konstrukte starke Plasmidbanden im Gel nachweisbar sind. Daraus erschließt sich, dass die Plasmide eine ausreichende Konzentration für die anschließende Ligation aufweisen. Insgesamt ist der Verdauungsprozess der Plasmide mit den Restriktionsenzymen erfolgreich verlaufen.

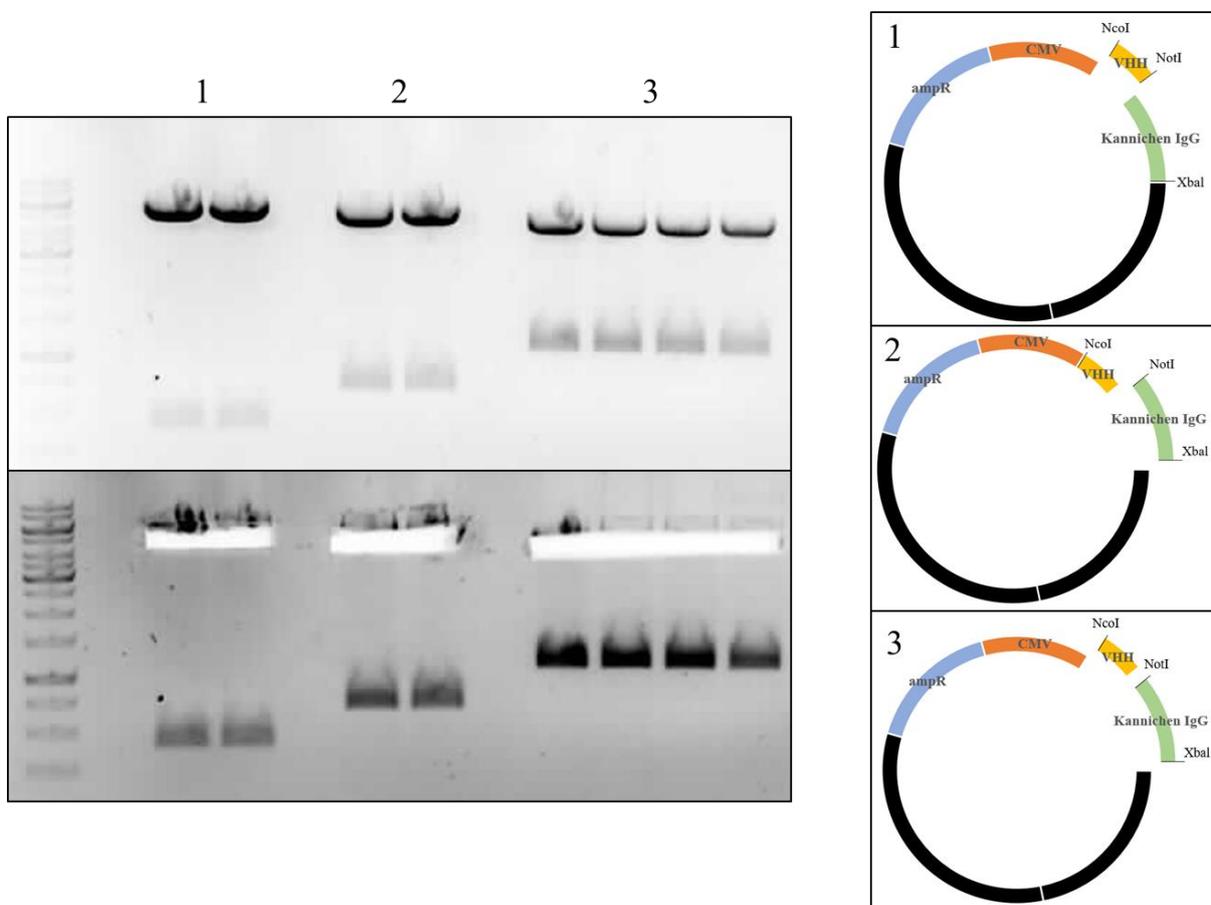


Abbildung 11: Auftrennung der geschnittenen Vektoren. Vektor 1 wurde mit NotI-HF und NcoI-HF geschnitten, Vektor 2: NotI-HF und XbaI, Vektor 3: NcoI-HF und XbaI. Auftragung auf ein auf ein 1%iges Agarosegel mit 5µl Rotisafe für 45 min bei 90 V

Eine weitere Hilfestellung bietet der 1 kb DNA-Marker zur Bestimmung der Größe der entstandenen DNA-Banden.

Anschließend wird das geschnittene DNA-Fragment nach Methode 3.1.3 aufgereinigt, sodass die isolierte Nb-Antigen-Insert-DNA in die jeweilige freie Stelle im pCSE2.5-Vektor ligiert wird. Die Schnittstellen von NotI-HF und NcoI-H im Vektor dienen zur Einfachligation mit jeweils einem der Sequenzen der Nanobodies. In der freien Restriktionsstelle zwischen NcoI-

H und XbaI werden die Antigen-Tag-Sequenzen eingebracht. Alternativ wird in einer Dreifachligation über NotI-HF und XbaI die gleichzeitige Einbringung von Nb und Antigen-Tag ermöglicht.

Nachdem die Einzelkolonien aus dem Carbenicillin -haltigen Medium aufgenommen und die DNA von E.coli isoliert wird, kann die Richtigkeit der Sequenzabfolge beurteilt werden. In der Sequenzanalyse werden die Nukleotidsequenzen direkt mit der Original-DNA-Sequenz verglichen. Das Ergebnis zeigte, dass die Ansätze mit der Einfachligation das Insert aufgenommen haben. Somit liegt die Sequenz jedes Nbs und Antigen-Tags im pCSE2.5-Vektor vor. Hingegen erwiesen sich die Ansätze mit der Dreifach-Ligation als schwierig. Zum Teil waren die Sequenzen nicht lesbar oder nur eines der beiden Inserts wurde in den Vektor ligiert, sodass die gentechnischen Methoden der unvollständigen Plasmide wiederholt wurden, bis das zweite Insert in den Vektor kloniert wurde. Von den 14 geplanten DNA-Konstrukten wurden 11 Vektoren hergestellt. Die Plasmid-Sequenzen befinden sich im Anhang.

4.1.2 Proteinexpression der klonierten Vektoren in HEK-293 6E-Zellen

In diesem Versuchsabschnitt wird die sequenzierte DNA der klonierten pCSE2.5-Vektoren in HEK296 6E- Zellen *in vitro* transfiziert, um die Proteinexpression von den Nb-AntigenTag-Komplexen zu untersuchen. Nach Transfektion erfolgt eine einwöchige Kultivierung der transfizierten HEK293-Zellen bei 37 °C im 5 % CO₂ Brutschrank. Nach siebentätiger Inkubation wird die Ernte durch Zentrifugation der Zellen eingeleitet, um die höchste erhaltene Proteinmenge zu erhalten.

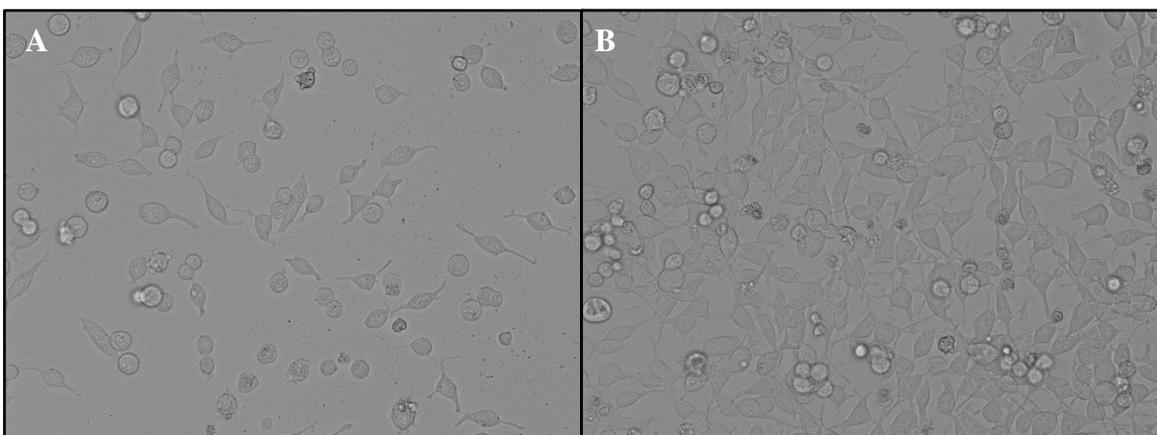


Abbildung 12: Darstellung der HEK-293 6E Zellen. Bild A zeigt die HEK-Zellen an Tag 0 der Transfektion und Bild B stellt die Transfektion an Tag 7. Kultivierung entweder in T255-Zellkulturflaschen oder in T75-Zellkulturflaschen

Durch regelmäßige Untersuchungen der HEK-Zellen im Mikroskop konnte die Zellteilung und das adhärenente Wachstum festgestellt werden. Die Abbildung 12 zeigt, dass die Zellpopulation von der HEK-293 6E- Linie eine wesentliche Steigerung der Zellzahl in einem Zeitraum von sieben Tagen in Kultur aufweist.

Im folgenden Versuch wurde eine Testtransfektion (siehe Abbildung 13) von 10 µg der unterschiedlichen klonierten pCSE2.5-Vektoren durchgeführt. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Das Ergebnis der Transfektion in HEK-293-Zellen ergab, dass auf dem Gel der Konstrukte: s+16-CMV, s+16-InfAnuc, TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA jeweils eine leichte erkennbare Bande darstellt. Auffallend ist bei jedem Transfektionsansatz der hohe Hintergrund aus zusätzlichen Banden im gleichen Größenbereich wie die erwarteten Fusionsproteine, sodass die Banden der Fusionsproteine im 68 bis 80 kDa Bereich mit den Banden vom Hintergrund sich überschneiden. Die Proteinexpression der Proben TP1170-scFv und TP1104-scFv sind als leichte Banden bei etwa 40 kDa auf dem Agarosegel (siehe Abbildung 13 Gel A markierter roter Bereich) sichtbar.

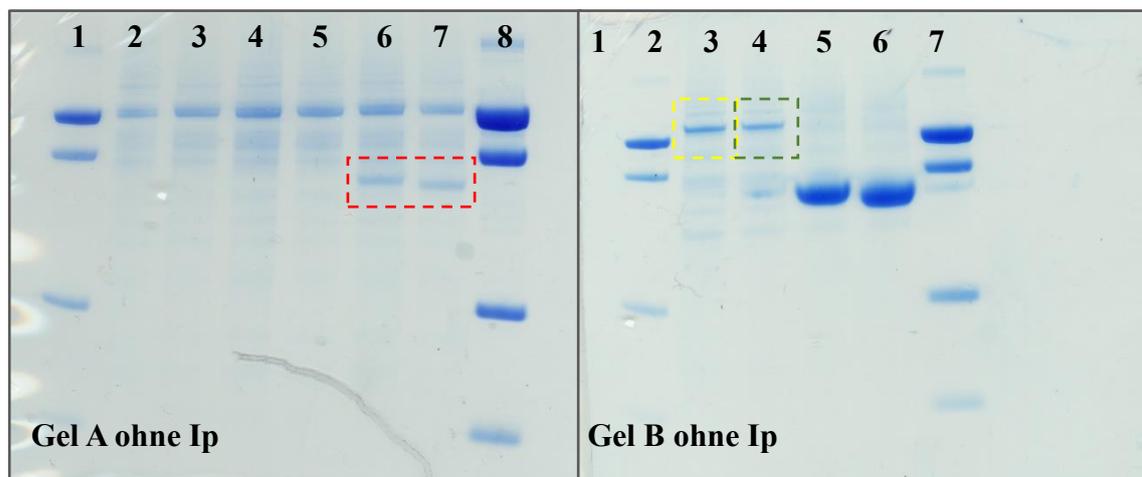


Abbildung 13: Proteinexpression der klonierten DNA-Konstrukte in HEK-Zellen einer Testtransfektion. Auftragung auf ein 10%igen Agarosegel bei 200 V für 36 min. Gel A stellt die Durchführung ohne Ip: 1.Probe: 1x Supermarker, 2.Probe: s+16-CMV, 3.Probe: s+16-InfAnuc, 4.Probe: Tp1170-InfAnuc, 5.Probe: TP1170-HSA, 6.Probe: TP1170-scFv, 7.Probe: TP1104-scFv, 8.Probe: 4x Supermarker. Gel B stellt die Durchführung ohne Ip dar. 1.Probe: 1x Supermarker, 2.Probe: Tp1170-InfAnuc, 3.Probe: TP1170-HSA, 4.Probe: TP1170-scFv, 5.Probe: TP1104-scFv, 6.Probe: 4x Supermarker

Aufgrund des hohen Hintergrunds wurde eine Immunpräzipitation (Ip) mit ProteinA-Sepharose aus einer 1 ml Proteinprobe aus den HEK-Überständen durchgeführt. Dadurch werden Nebenprodukte im Zellüberstand beseitigt und die Reinheit des Zielproteins erhöht. Das SDS-PAGE-Gel mit der durchgeführten Immunpräzipitation zeigt erkennbare Unterschiede. An der

Intensität der Bande, erkennt man, dass die Fusionsproteine TP1170-InfAnuc und TP1170+HSA schwächer exprimiert haben als die Proteine TP1170-scFv und TP1104-scFv. Mit Hilfe der Ip ist die Erkennung und Charakterisierung der Proteine ersichtlich. Das Protein TP1170-InfAnuc liegt auf der erwarteten Größe von 69 kDa (siehe Abbildung 13 Gel B markierter gelber Bereich), sowie TP1170-HSA bei 80 kDa. (siehe Abbildung 13 Gel B markierter grüner Bereich) Die höchste Proteinexpression der HEK-Zellen ergaben die Konstrukte Nb- scFv Konstrukte, die starke Banden bei etwa 40 kDa auf dem Gel zeigen.

Die Proteinexpression des Testtransfektions-Versuches von TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA ergaben keine hohe Ausbeute. Aus diesem Grund wurde der gleiche Ansatz von 20 ng DNA in 30 ml Kulturflaschen einer Produkttransfektion wiederholt. Auch hier zeigt das Gel A (mit Ip) in Abbildung 14 viel Hintergrund von exprimierten Nebenprodukten. In diesem Versuch wurde zur Beurteilung der Produktivität der HEK-Zellen ein Positivkontrollansatz (pCSE2.5) mit durchgeführt. Der pCSE2.5-Vektor ist für die hohe Expression in HEK-Zellen bekannt.

Das Gel mit der Ip (siehe Abbildung 14 Gel B) lässt durch Vergleich der Intensität der Banden von TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA mit der Positivkontroll-Bande auf eine schwache Expression schließen. Obwohl hier die Konstrukte TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA in einem größeren Maßstab transfiziert wurden, ergab die Produktion keine höhere Ausbeute. Die Konstrukte TP1104-InfAnuc, TP1104-CMV und s+16-CMV zeigten auf dem Gel mit Ip keine Banden der erwarteten Größe. Diese Konstrukte konnten nicht von HEK-Zellen exprimiert werden.

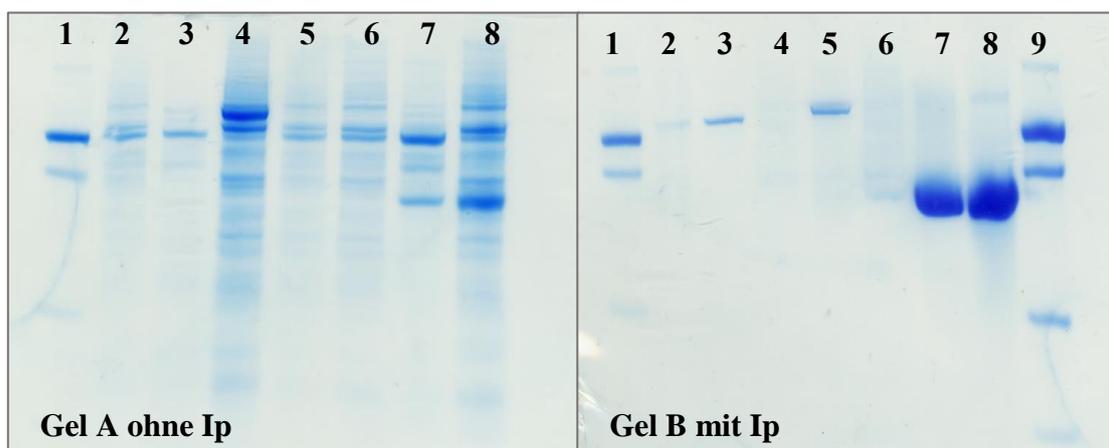


Abbildung 14: Proteinexpression der klonierten DNA-Konstrukte in HEK-Zellen einer Produkttransfektion. Auftragung auf ein 10%igen Agarosegel bei 200 V für 36 min. **Gel A** stellt die Durchführung ohne Ip: 1.Probe: 1x Supermarker, 2.Probe: TP1104-InfAnuc, 3.Probe: TP1170-InfAnuc , 4.Probe: TP1104-CMV, 5.Probe: TP1170-HSA, 6.Probe : s+16-CMV, 7.Probe: s+16 , 8.Probe: TP1104-scFv, 9.Probe: 4x Supermarker. **Gel B** stellt die Durchführung ohne Ip. 1.Probe: 1x Supermarker, 2.Probe: TP1104-InfAnuc, 3.Probe: TP1170-InfAnuc , 4.Probe: TP1104-CMV, 5.Probe: TP1170-HSA, 6.Probe : s+16-CMV, 7.Probe: s+16 , 8.Probe: TP1104-scFv, 9.Probe: 4x Supermarker

Mit diesem Verfahren wurden die klonierten DNA-Konstrukte als Proteine produziert. Von 6 der 11 rekombinanten DNA Konstrukte konnten erfolgreich Fusionsproteine hergestellt werden. Ausgehend von der erfolgreichen Produktion wurde der Fokus auf die Proteinexpression von TP1170-InfAnuc, TP1170-HSA, TP1170-scFc, TP1104-scFc, rbFc-TP1170 und rbFc-TP1104 gelegt.

4.1.3 Aufreinigung klonierter Fusionsproteine über eine ProteinA-Säule mit anschließender Konzentrationsbestimmung

Die Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine aus Zellüberständen erfolgt mittels Affinitätschromatographie über eine ProteinA-Sepharose-Säule. Die einzelnen Elutionsschritte während der Aufreinigung wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. In Abbildung 15 zeigt das Gel (siehe Abbildung 15) die Banden des aufgereinigten Proteins TP1170-InfAnuc und dessen Aufreinigungsschritte aus 180 ml Zellüberstand. Die Bande des konzentrierten TP1170- InfAnuc-Konstrukts zeigt die erwartete Größe von 69 kDa aus. Die Bande des konzentrierten Proteins zeigt eine stärkere Intensität als die Banden der Elutionsschritte EL2 und EL3. Somit geht man davon aus, dass das Protein während der mehrmaligen Waschschrte keine Verluste aufweist. Die Aufkonzentration über die ProteinA-Sepharose-Säule zeigt erfolgreiche Resultate.

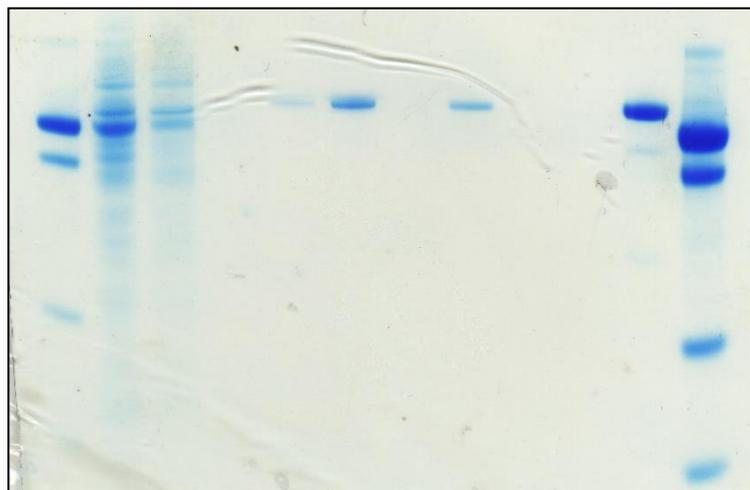


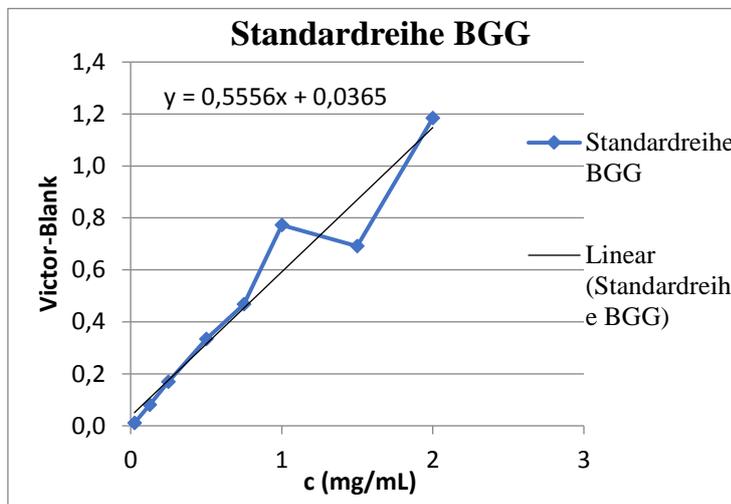
Abbildung 15: Proteinaufreinigung von TP1170-InfAnuc über eine ProteinA-Sepharose-Säule. Auftragung von 180 ml Zellüberstand auf ein 10%iges Agarosegel bei 200 V für 36 min.

Aus zeitlichen Gründen wurden die Fusionsproteine TP1170-InfAnuc, TP1170-HSA, TP1170-scFc, TP1104-scFc aus mindestens 150 ml Zellüberstand aufkonzentriert.

4.1.4 BCA-Test

Um die Konzentration der Fusionsproteine TP1170-InfAnuc, TP1170-HSA, TP1170-scFc TP1104-scFc zu bestimmen, wird quantitativ der BCA-Test verwendet. Wie bei allen kolorimetrischen Verfahren werden die Fusionsproteine bestimmt und unter Berücksichtigung der ausgewählten Verdünnung die Proteinkonzentration ermittelt. Für jeden Ansatz werden Doppelmessungen durchgeführt und der Mittelwert genommen.

Für dieses Verfahren wird eine Kalibriergerade (siehe Abbildung 16) aus einer BSA-Verdünnungsreihe (Tabelle 7) mit bekannten Proteinmengen ermittelt.



Blank: 0,106

Tabelle 7: Verdünnungsreihe, Konzentrationswerte mit und ohne Blank

c, (mg/mL)	Victor	Victor-Blank
2	1,290	1,184
1,5	0,797	0,692
1	0,878	0,773
0,75	0,573	0,468
0,5	0,439	0,333
0,25	0,275	0,169
0,125	0,186	0,080
0,025	0,116	0,011

Abbildung 16: Standardgeraden der Verdünnungsreihe. Aus dem gemessenen Proteinstandard entwickelten Kalibriergeraden zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Ergebnisse der Proteinmessung wird in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Das Ergebnis der Bestimmung der Konzentration von Fusionsproteinen

Proben		Messwerte			x	Wert-Blank	un-verdünnt	c, mg/mL	x
TP1170-HSA	1:10	0,299	0,179	0,239	0,133	1,331	2,331	1,6	
	1:5	0,217	0,195	0,206	0,101	0,503	0,841		
TP1170+ InfAnuc	1:10	0,211	0,114	0,163	0,057	0,568	0,958	0,5	
	1:5	0,108	0,116	0,112	0,007	0,033	-0,005		
TP1170-scFV	1:10	0,274	0,215	0,245	0,139	1,390	2,437	2,4	
	1:5	0,452	0,298	0,375	0,269	1,347	2,359		
TP1104-scFV	1:10	0,381	0,408	0,394	0,289	2,885	5,128	4,8	
	1:5	0,649	0,561	0,605	0,499	2,497	4,428		

4.2 Bindefähigkeit von Sphero™-Beads gekoppelte TP 1170-scFv Proteine

Ziel dieses Versuches ist der Nachweis, dass das Fusionsprotein TP1170-scFv als Brücke zwischen einem Maus-Antikörper und einem FITC-Molekül dienen kann. Dazu wurden Sphero™ Sky-Blue-Beads verwendet. Die blau-fluoreszierenden Beads mit einer Größe von 2 µm können unspezifisch Proteine binden. Die Beads werden mit einem FITC-markierten polyklonalen anti-P2X1 AK aus dem Kaninchen gekoppelt. Daraufhin werden die gekoppelten Beads mit einem PE-markierten Maus-AK (H-2Dd) in drei verschiedenen Varianten behandelt. Ziel ist es, dass der scFv-Teil des Fusionsproteins am FITC-markierten AK P2X1 bindet und am anderen Ende der Nb TP1170 den PE-markierten AK H-2Dd bindet. Mit der Messung am Durchflusszytometrie konnte die Bindung von TP1170-scFv mit Hilfe der AK am Beads untersucht werden.

In Abbildung 17 ist die einfache Gatingstrategie der gekoppelten Beads dargestellt. Im ersten Dot-Plot-Diagramm werden durch die Auftragung von SSC-A und FSC-A die Sphero-Beads

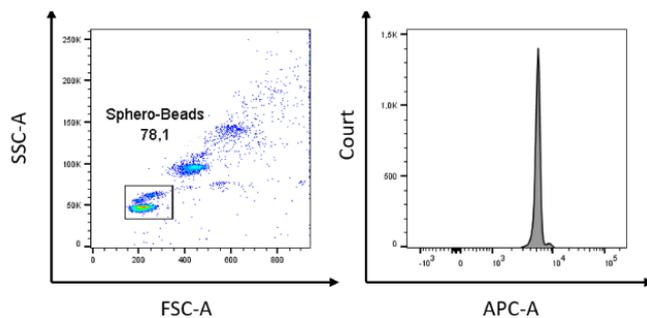


Abbildung 17: Auswertung der Bindefähigkeit von TP1170-scFv. Gatingstrategie aus einem Dot-Plot-Diagramm und einem Histogramm.

bestimmt. Anschließend wird ein Histogramm ermittelt und die vier Ansatzproben werden in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** dargestellt.

Das Ergebnis (siehe Abbildung 18) der Durchflusszytometrie-Analyse ergab, dass die Probe mit P2X1 und TP1170-

scFv gekoppelten Beads keine PE-A Fluoreszenz zeigte (grüne Markierung). Die Probe der mit P2X1+H-2Dd gekoppelten Beads stellte im PE-A-Channel eine Aktivität dar (orange Markierung). Grund hierfür ist vermutlich eine unspezifische Bindung von H-2Dd-PE an die Beads. Die höchste Aktivität stellte der

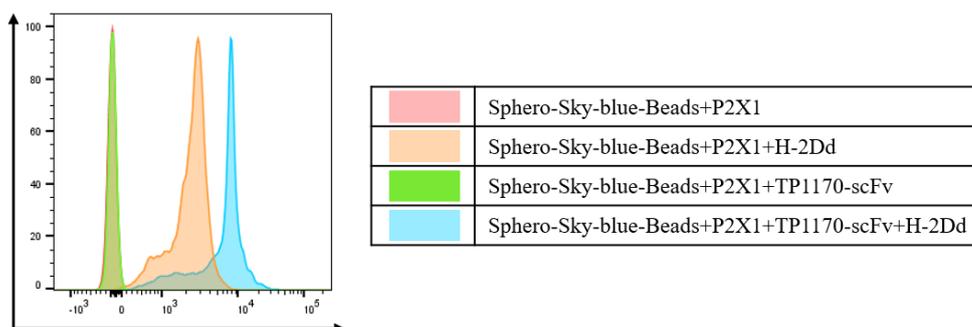


Abbildung 18: Ergebnis zur Bestimmung der Bindefähigkeit von TP1170-scFv in einem Histogramm.

Stimulierungsansatz durch die Zugabe des Fusionsproteins TP1170-scFv dar (blaue Markierung), wodurch gezeigt wurde, dass das Fusionsprotein die Bindung zwischen den beiden Antikörpern herstellen kann.

4.3 Antigenpräsentation von aktivierten T-Lymphozyten durch isolierte B-Lymphozyten aus PBMCs

In diesem Versuchsabschnitt werden die klonierten Fusionsproteine TP1170-InfAnuc und TP1104-HSA mit naiven B-Zellen aus mononukleären Zellen *in vitro* stimuliert. Die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen wurde nach einer sechstägigen Inkubation untersucht.

Naive B-Zellen aus PBMCs werden mittels CD19-tragendenen-sPluriBeads aus dem Isolierungskit der Firma pluriSelect aufgereinigt. Nach der Isolierung wurde die Zellzahl der B-Zellen bestimmt. Daraufhin erfolgt eine Inkubation mit anti-CD21 für 30 min bei 4°C auf dem Roller. Die ungebundenen anti-CD21 AK werden durch ein Wachschrift entfernt. Zu der B-Zellfraktion wurde jeweils 1 µl TP1170-InfAnuc oder 3 µl TP1104-HSA hinzugegeben. Die Zellen aus dem Durchfluss (die restlichen, nicht-B-Zellen aus den PBMCs) wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff eFluor™ 670 nach Methode 3.5.5)markiert. Die beiden Zellfraktionen werden separat voneinander im RPMI-Komplett-Medium für 24 h bei 37 °C im 5 % CO₂ Brutschrank inkubiert.

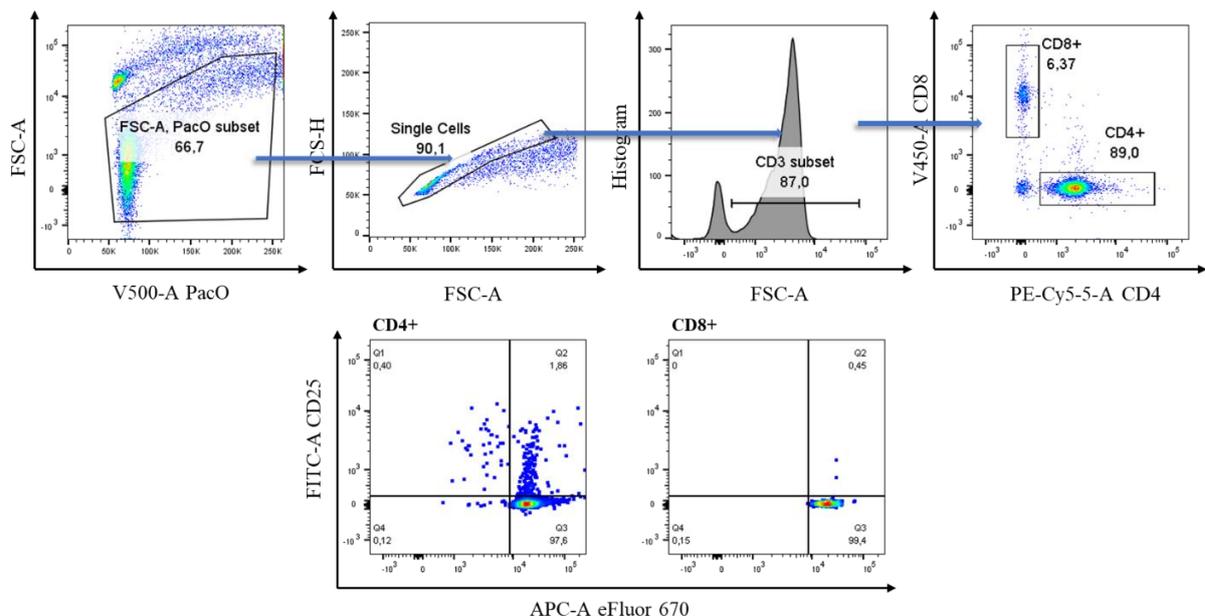


Abbildung 19: Auswertung der isolierten B-Lymphozyten aus PBMCs. Gatingstrategie zur Bestimmung der T-Zellaktivierung durch aufgereinigte B-Zellen bei einem Langzeitversuch von sechs Tagen.

Am Folgetag werden die aufgereinigten mit Fusionsproteinen gebundenen B-Zellen zu den restlichen Zellen vereinigt. Nach der sechstägigen Langzeitstimulation werden die T-Zellen mittels der Oberflächenfärbung (3.5.6) mit anti-CD8, anti- CD4, anti- CD3, anti-CD20 und dem Lebend-Tot-Marker Pacific Orange (PacO) markiert. Anschließend erfolgt die Messung der Zellen im Durchflusszytometer (3.6.1).

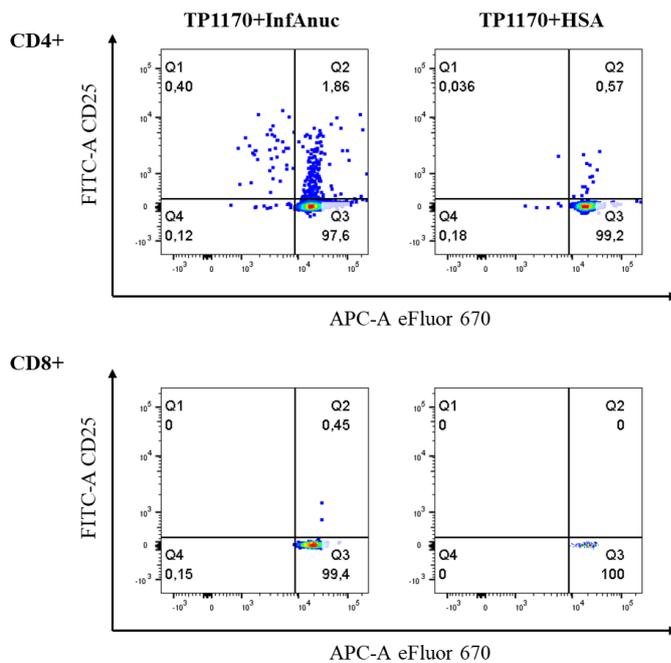


Abbildung 20: Ergebnis der aktivierten CD4+- T-Helferzellen und CD8+-Zytotoxische T-Zellen. Auswertung in Dot-Plot-Diagrammen zur Feststellung der CD25+/eFluor670-Expression

Die **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zeigt die Gatingstrategie zur Aktivierung von T-Lymphozyten durch aufgereinigte B-Zellen bei einem Langzeitversuch nach Tag 6. Als Marker für die Aktivierung wird die Expression von CD25 zusammen mit dem gleichzeitigen Verlust an eFluor670-Farbstoff gewertet. Die Analyse zur CD25+/Efluor670-Expression wird in fünf Dot-Plot-Diagrammen und einem Histogramm gezeigt. Zunächst wird ein Gate von FSC-A gegen einem Lebend-Tot-Marker Pacific Orange aufgetragen, um die lebenden Zellen (living cells) zu bestimmen. Im nächsten folgenden Dot-Plot-Diagramm werden die Einzelzellen (single cells) durch Auftragung von FSC-H gegen FSC-A bestimmt. Anschließend werden alle T-Zellen anhand der CD3-Expression in einem Histogramm markiert. Daraus resultieren zwei Zellpopulationen: die CD8+ und CD4+ T-Zellen. In den letzten beiden Dot-Plot-Diagrammen werden durch Auftragung der Aktivierungsmarker CD25 und Efluor670 die aktivierten T-Zellen in den einzelnen Probenansätzen dargestellt. (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Mit Hilfe des Quadranten im Dot-Plot-Diagramm werden die einzelnen Prozentansätze der jeweiligen Zellpopulation angezeigt.

Das Fusionsprotein TP1170-HSA dient als Negativkontrolle, da humanes Serumalbumin ein körpereigenes Protein ist, und keine T-Zell-Aktivierung auslösen sollte.

Die in der **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** gezeigten Dot-Plot-Diagramme stellen die CD4⁺-T-Helferzellen und CD8⁺-Zytotoxische T-Zellen dar. Die Proliferation von T-Zellen kann an der Abnahme des Farbstoffes eFluor™ 670 gezeigt werden. Der Stimulationsansatz mit TP1170-InfAnuc zeigt 0,4% CD25⁺ und eFluor 670- Expression. Zum Vergleich stellt die Negativkontrolle (NK) eine mit 0,036% CD25⁺ und eFluor 670- niedrigere Aktivität dar. Somit zeigen die beiden Fusionsproteine die gewünschte unterschiedliche Reaktivität des Systems dar. Bei den CD8⁺ Zellen ist bei beiden Stimulationsansätze keine Proliferation zu erkennen (0% CD25⁺/Efluor670- Zellen).

In diesem Versuch stellten die B-Zellen die Antigenpräsentation mit den Fusionsproteinen über den MHC-II-Rezeptor und aktivierten CD4⁺-T-Helferzellen erfolgreiche Ergebnisse dar. In diesem Versuch wurden ausschließlich B-Zellen als APCs eingesetzt. Diese Zellen konnten in diesem Versuch kaum eine Antigenpräsentation über den MHC-I-Rezeptor an CD8⁺-Zellen leisten.

4.4 Stimulation von T-Zellen rezeptorvermitteltes Einschleusen von TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA in verschiedene antigenpräsentierende Zellen aus Vollblut

APCs leiten durch die Präsentation über die beiden Oberflächenproteine MHC-I- und II-Molekülen die T-Zellaktivität von Influenza A des Subtyps H1N1 ein. Mit Hilfe der klonierten Fusionsproteine soll die Antigenpräsentation gezielt mit bestimmten Antigenen in APCs verlaufen und somit direkte bestimmte Zellen stimulieren.

Ziel dieses Versuchsabschnitts ist die Stimulation von T-Zellen durch das Einschleusen der klonierten Fusionsproteine TP1170-InfAnuc und TP1104-HSA über unterschiedliche Rezeptoren in verschiedene APC-Zellen aus humanem Vollblut. Die direkte Isolierung der PBMCs erfolgt in pluriMate®- centrifugation-Tubes der Firma pluriSelect (5.3.3) aus humanem Vollblut. In jedem der nachfolgenden Versuche wurden 5 ml Vollblut verwendet. Daraus resultieren ca. $5 \cdot 10^6$ T-Zellen und ca. $5 \cdot 10^5$ B-Zellen. Die aufgereinigten mononukleären Zellen wurden entweder mit der Methode einer Langzeitstimulation oder einer Kurzzeitstimulation behandelt. Zum zielgerichteten rezeptorvermittelten Einschleusen der Antigene wurden Antikörper gegen vier verschiedene endocytotische Rezeptoren verwendet:

CD21, CD303, HLA-DR und CD205. Der AK CD21 bindet an naive B-Zellen, die beiden AK CD303 und CD205 binden an dendritische Zellen. Der Oberflächenrezeptor HLA-DR (MHC-II) ist auf jeder antigenpräsentierende Zelle vorhanden. Anhand dieser Antikörper ist die Analyse einer kontrollierten Einschleusung/Aufnahme von Influenza mittels dem Fusionsprotein TP1170-Influenza in unterschiedlichen APCs möglich. Dadurch soll eine erhöhte und gezielte Antigenaufnahme erreicht werden.

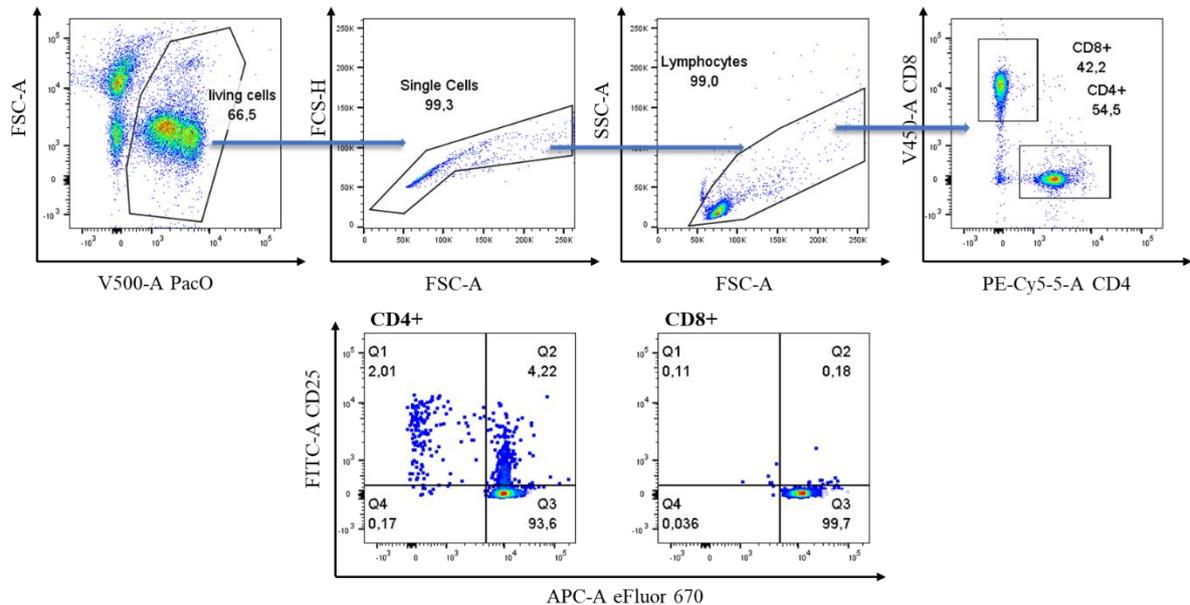


Abbildung 21: Auswertung der isolierten PBMCs aus humanem Vollblut. Gatingstrategie zur Bestimmung der T-Zellaktivierung durch rezeptorvermitteltes Einschleusen von TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA in verschiedene antigenpräsentierende Zellen bei einem Langzeitversuch von fünf Tagen.

In Abbildung 21 wird die Gatingstrategie verschiedener Zellpopulationen zur Aktivierung T-Lymphozyten bei einem Langzeitversuchen nach Tag 5 und Tag 6 gezeigt. Die Analyse zur CD25+/Efluor670- Expression wird in sechs Dot-Plot-Diagrammen dargestellt. Zunächst werden die lebenden Zellen (living cells) bei Auftragung von FSC-A und einem Lebend-Tod-Marker Pacific Orange bestimmt. Im nächsten Dot-Plot-Diagramm werden die Einzelzellen (single cells) durch FSC-H gegen FSC-A aufgetragen. Durch Einrahmen der Population resultieren die Lymphozyten mittels Auftragung von SSC-A und FSC-A. Die Lymphozyten werden in zwei Zellfraktionen in CD8+ und CD4+ aufgeteilt. In den letzten beiden Dot-Plot-Diagrammen werden durch Auftragung der Aktivierungsmarker CD25 und Efluor670 die aktivierten T-Zellen in den einzelnen Probenansätzen dargestellt. Mit Hilfe des gesetzten Gates im Dot-Plot-Diagramm werden die einzelnen Prozentansätze der jeweiligen Zellpopulation angezeigt.

4.4.1 Proliferation aktivierter T-Lymphozyten nach Langzeitstimulation

Im folgenden Versuch werden vier unterschiedliche Vollblutproben (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) von aktivierten T-Zellen in einer Langzeitstimulation in einem Zeitraum von fünf Tagen untersucht. Durch die Anfärbung mittels eFluor670 kann die Proliferation der T-Zellen gezeigt werden.

Die Fusionsproteine TP1170-InfAnuc und TP1104-HSA werden separat mit den Antikörpern CD21, CD303, HLA-DR und CD205 in 50 µl PBS +/- inkubiert. Die Ansätze werden für eine erhöhte Bindungsfähigkeit von Protein und AK für 30 min bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Daraufhin werden zu den isolierten markierten PBMCs die Protein-AK-Komplexe hinzugegeben. Eine weitere Inkubation erfolgt für 30 min bei RT auf dem Roller mit einem anschließenden Waschschrift von 2 ml PBS +/- . Die Stimulation erfolgte für 7 Tage bei 37°C. Für die Tag 0- Messung werden 1/10 der stimulierten Zellansätze entnommen. Die CD3+-T-Zellen werden mittels der Oberflächenfärbung (3.5.6) mit anti- CD3, anti-CD20 und PacO markiert. Zum Auswerten der Zellen von Tag 7 werden die Oberflächenmoleküle anti-CD8, anti- CD4, anti- CD3, anti-CD20 PacO verwendet und im Durchflusszytometer gemessen.

Tabelle 9: Langzeitstimulation aus Vollblut aus vier Probanden

Probanden	P1	P2	P3	P4
Alter	32	26	31	23
Geschlecht	m	w	w	m

In Abbildung 22 wird am Tag 0 die Bindung der unterschiedlichen Antikörper an PBMCs vom Patienten P1 gezeigt. Die Antikörper binden jeweils an eine von den T-Zellen getrennte (CD3-negative) Population. Der anti-HLA-DR AK ist mit APC markiert, welches im gleichen Kanal wie der eFluor670-Farbstoff gemessen wird. Dadurch erklärt sich der hohe Hintergrund in diesem Ansatz.

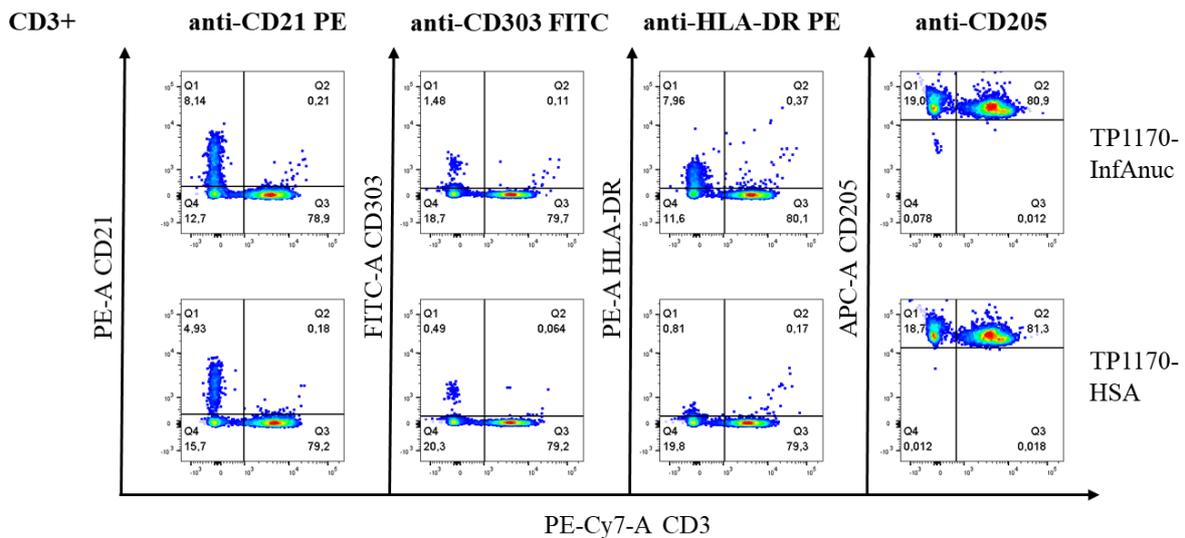


Abbildung 22: Darstellung des Ergebnisses von aktivierten CD3+-B- Zellen in Dot-Plot-Diagramme.

Die Ergebnisse der Tag 5- Messung zeigen die Dot-Plot-Diagramme (Abbildung 23 und Abbildung 24) der CD25+/eFluor670- -Expression von CD4+- und CD8+- T-Zellen. Zunächst stellen die mit TP1170-InfAnuc stimulierten PBMCs eine deutlich höhere T-Zell-Aktivierung der CD4+ und CD8+ T-Zellen als zu der NK (TP1170-HSA). Bereits im Versuch. wurde gezeigt, dass die Antigenprozessierung mit dem Fusionsprotein TP1170-HSA nicht eingeleitet wurde. Dies stellte sich auch in diesem Versuch dar.

Die Probandin 2 stellt die höchste Zellproliferation mit geringerer/sinkender eFluor670- Intensität mit Stimulationsansätzen von TP1170-InfAnuc der CD4+- und CD8+- T-Zellen dar. Die Dendritischen Zellen, welche über den AK-Proteinkomplex (CD303-TP1170-InfAnuc) das Antigen A/H1N1 aufgenommen haben, führten mit 4,42% zur höchsten CD25+/eFluor670- -Expression der CD4+- T-Helferzellen (siehe Abbildung 23). Ebenfalls zeigt die Influenzaaufnahme über den CD205- Rezeptor von DZ mit 3,85 % eine hohe CD25+/eFluor670- -Expression als die NK mit 0,42% CD25+/eFluor- Zellen. Des Weiteren stellen die B-Zellen über ihren Präsentationsweg von 1,96% die geringste CD25+/eFluor670- -Expression dar. Daraus lässt sich zurückführen, dass die Antigenprozessierung über DZs dieser Patienten stärker ausgeprägt ist, als im Vergleich zu B-Zellen als APCs.

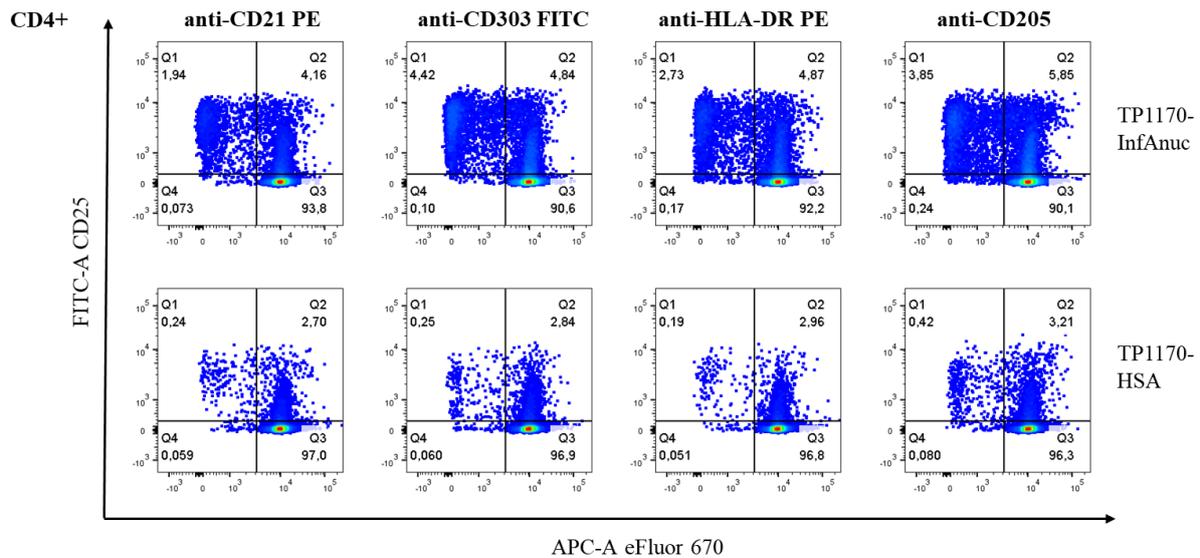


Abbildung 23: Ergebnis der aktivierten CD4+- T-Helferzellen durch verschiedene rezeptorbindende AK. Auswertung in Dot-Plot-Diagrammen zur Feststellung der CD25+/eFluor670- Expression von verschiedenen Stimulationsansätze mit TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA nach 5-tätiger Inkubation.

Bei den aktivierten CD8+-T-Zellen (siehe Abbildung 24) handelt es sich um die Präsentation des Influenza Nukleoprotein-Antigens mittels des MHC-I-Komplexes. Die Probe mit AK HLA-DR zeigte die höchste Proliferation und CD25+ Expression der CD8+-T-Zellen. Hierbei muss das exogene Antigen über den MHC-I-Prozessierungsweg präsentiert werden. Dieser Vorgang wird als Kreuzpräsentation bezeichnet.

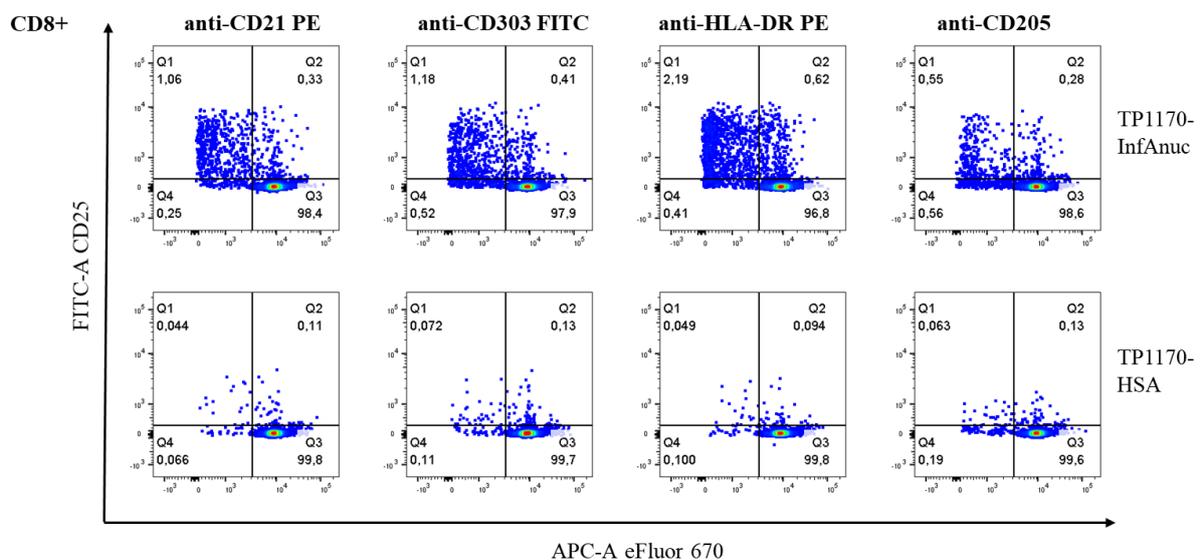


Abbildung 24: Ergebnis der aktivierten CD8+- Zytotoxischen Zellen durch verschiedene rezeptorbindende AK. Auswertung in Dot-Plot-Diagrammen zur Feststellung der CD25+/eFluor670- Expression von verschiedenen Stimulationsansätze mit TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA nach 5-tätiger Inkubation.

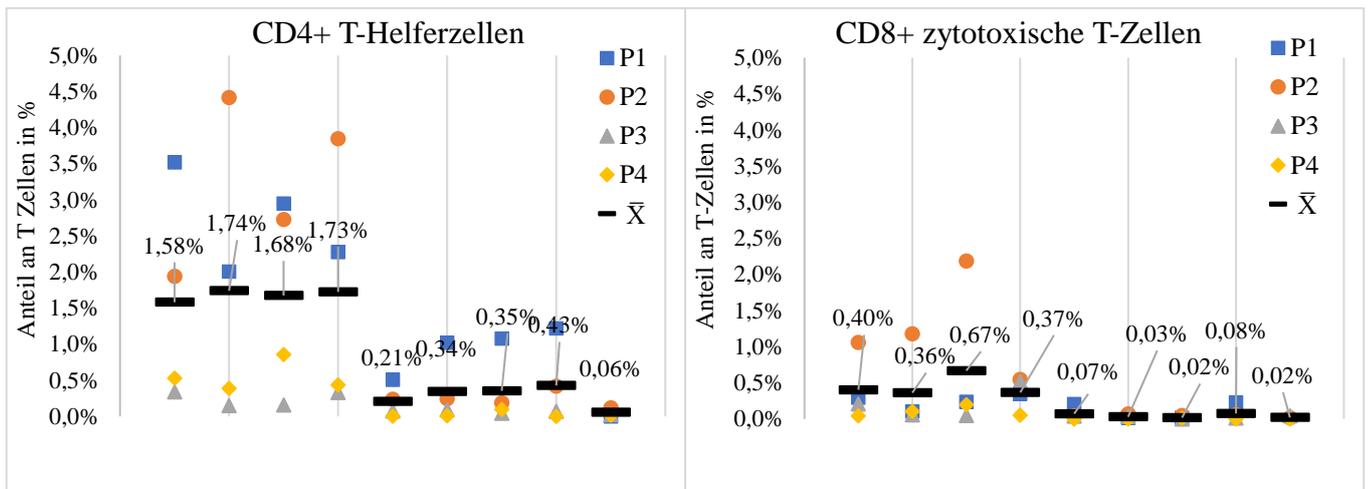


Abbildung 25: Ergebnis von CD4+- und CD8+ aktivierten T-Zellen nach einer Langzeitstimulation von 5 Tagen. Darstellung der Ergebnisse in einem Streudiagramm von Vollblutproben aus vier Probanden mit dem gleichen Stimulationsansatz

Isolierte PBMCs aus humanem Vollblut von 4 unterschiedlichen Probanden wurden für die Messung verwendet und gemeinsam ausgewertet. Zusätzlich wurde zum Stimulationsansatz eine unstimulierte Probe (mit eFluor 670 markierte PBMCs) als weitere Negativkontrolle mitgeführt. In Abbildung 25 werden die Prozentsätze der CD25+/eFluor670- Zellen von CD4+ - und CD8+ T-Zellen in einem Streudiagramm dargestellt. Zu jedem Stimulationsansatz wird der Mittelwert gebildet, um eine durchschnittliche Darstellung der einzelnen Proben zu erhalten. Alle vier Probanden zeigen unterschiedliche hohe Zellaktivitäten der CD4+- und CD8+ -T-Zellen. Abbildung 25 zeigt, dass die CD4+-Zellen durch die Behandlung des klonierten Fusionsproteins TP1170-InfAnuc eine stärkere Expression der Aktivierungsmarker aufweisen als mit dem klonierten Fusionsprotein TP1170-HSA. Dabei zeigen Proband 1 und Proband 2 die höchste CD25+/eFluor670- Expression der CD4+-Zellen auf. Im Gegensatz dazu sind bei Probanden 3 und 4 die CD25+/eFluor670- Expression geringer. Hier erkennt man deutlich, dass jeder Mensch unterschiedlich auf das System durch die Behandlung der Fusionsproteine reagieren.

Mit Hilfe von TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA zeigten die 4 Probanden einen positiven Effekt der Expression und Zellproliferation von CD25 und eFluor 670 als zu der unstimulierten PBMCs-Probe (0,06% der CD4+-Zellen und 0,02 CD8+- Zellen). Hier entstand ohne Zusatz von einleitender Hilfe kaum eine T-Zellaktivität.

4.4.2 Expression der Aktivierungsmarker CD136 und CD154 in aktivierten T-Lymphozyten nach Kurzzeitstimulation

Im letzten Versuchsabschnitt wird die Aktivierung von T-Zellen mit Hilfe von gezielter Aufnahme vom Influenza-Nukleoprotein-Antigen durch HLA-DR-Rezeptor (MHC-II) und den daran gebundenen Fusionsproteinen an APC untersucht. Parallel wird die Stimulationsdauer von 24h und 48h der Expression mit den Aktivierungsmarkern CD136 und CD154 von aktivierten T-Zellen verglichen. Bei der Kurzzeitstimulation werden die isolierten PBMCs mit anti-CD40 und dem kostimulatorischen AK CD28 behandelt. Als Nachweismarker für die T-Zellaktivierung dienen CD154 (CD40L) und CD137 (4-1BB). CD154 wird auf allen konventionellen CD4⁺ T-Zellen exprimiert. CD137 bindet an aktivierte T-Zellen, jedoch zeigen auf CD8⁺-Zellen weitgehend eine höhere CD137-Expression als auf CD4⁺-Zellen.

Die isolierten PBMCs vom Probanden 1 werden mit anti-CD40 und anti-CD28 AK stimuliert. Parallel werden die Fusionsproteine TP1170-InfAnuc und TP1104-HSA jeweils zum Antikörper HLA-DR gegeben und für 30 min bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Anschließend werden die HLA-DR -Protein-Komplexen zu den PBMCs hinzugegeben und in 50 µl RPMI-Komplett-Medium aufgenommen. Die Inkubation der Stimulationsansätze erfolgt für 24h und 48h bei 37°C im 5% CO₂ Brutschrank. Für die Analyse der CD154⁺/CD137⁺ Expression der aktivierten T-Zellen wird mittels einer Oberflächenfärbung von anti-CD27, anti-CD45RA, anti-CD154, anti-CD4, anti-CD137, anti-CD8 und anti-CD2 verwendet. Die Messung erfolgt am Durchflusszytometer.

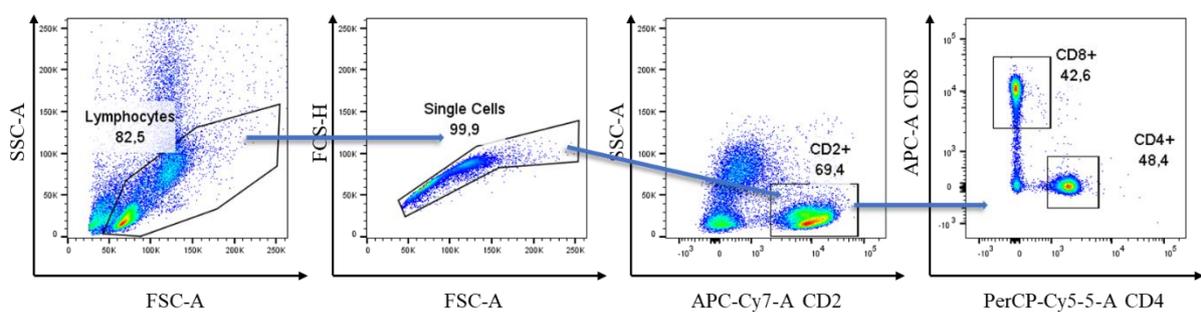


Abbildung 26: Auswertung der isolierten PBMCs aus humanem Vollblut einer Kurzzeitstimulation. Gatingstrategie zur Bestimmung der T-Zellaktivierung durch rezeptorvermitteltes Einschleusen von TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA in verschiedene antigenpräsentierende Zellen

Die Abbildung 26 zeigt die Charakterisierung und Auftragung von verschiedenen Zellarten bei der Auswertung von der T-Lymphozyten bei Kurzzeitversuchen nach 24h und 48h. Die Analyse zur CD154/CD137 -Expression wird in fünf Dot-Plot-Diagrammen gezeigt. Zunächst werden die Lymphozyten bei Auftragung von SSC-A gegen FSC-A bestimmt. Im nächsten Dot-Plot-

Diagramm werden die Einzelzellen (single cells) durch FSC-H gegen FSC-A aufgetragen. Daraus resultieren die CD2+- T-Zellen durch Auftragung von SSC-A und CD2. Die aktivierten T-Zellen werden in zwei Zellfraktionen: CD8+ und CD4+ aufgeteilt. Im letzten Dot-Plot-Diagramm werden durch Auftragung der Aktivierungsmarker CD136 und CD154 die Expressionen der einzelnen Probenansätze dargestellt (Abbildung 26). Mit Hilfe des gesetzten Kreuzes im Dot-Plot-Diagramm werden die einzelnen Prozentansätze der jeweiligen Zellpopulation angezeigt.

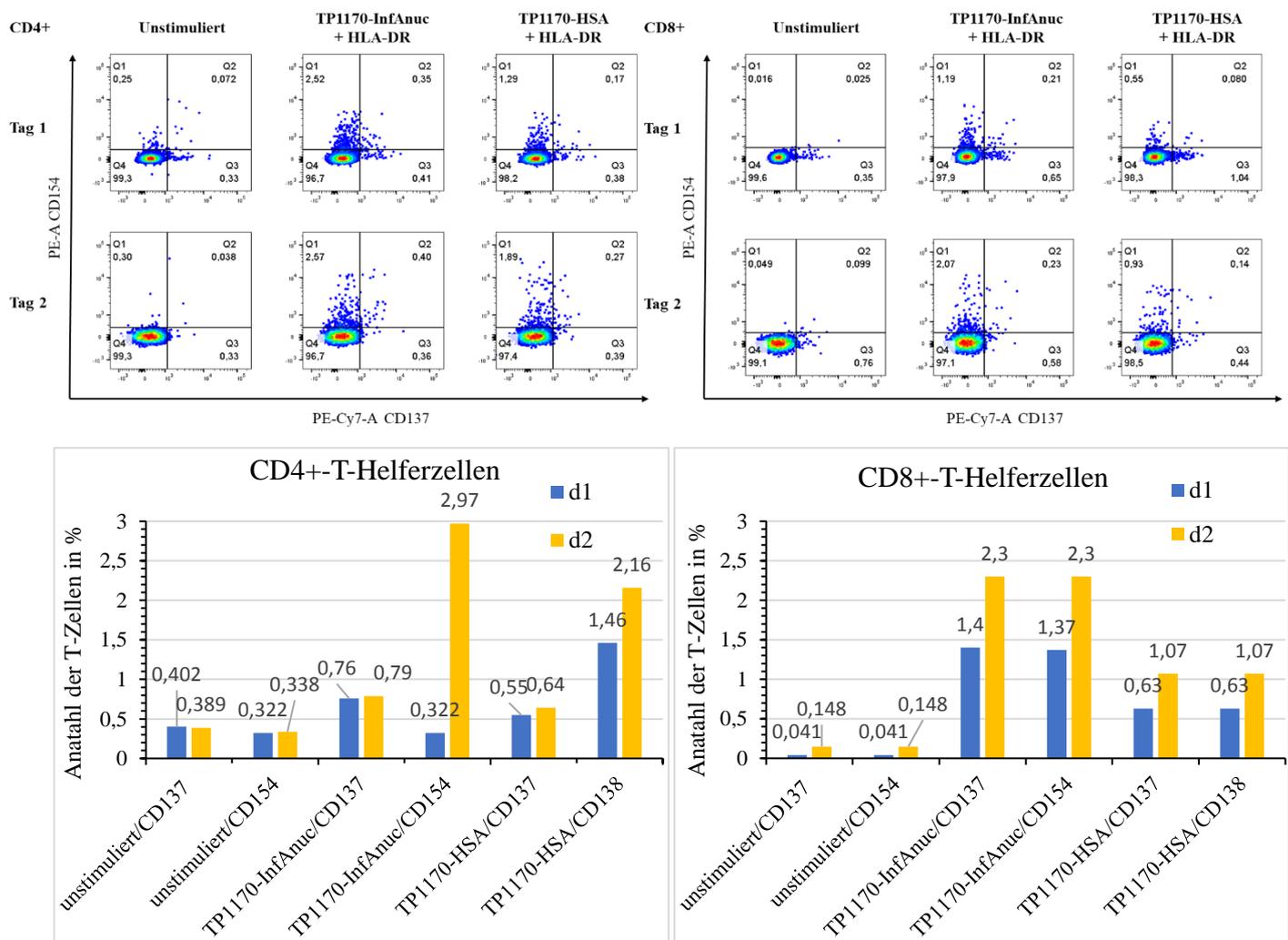


Abbildung 27: Ergebnis von aktivierten T-Lymphozyten der CD136+/CD154+ Expression nach einer Kurzzeitstimulation. Darstellung der CD136+ Zellen und die CD154+ Zellen in Dot-Plot-Diagrammen und im Balkendiagramm zur Auslegung von d1 (24h) und d2 (48h) Inkubationen.

Die Dot-Plot-Diagramme in Abbildung 27 stellen die CD154/CD137 -Expression von unstimulierten, mit TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA in Anwesenheit von HLA-DR stimulierten CD4+-und CD8+-T-Zellen dar. Bei der unstimulierten Probe tritt die geringste CD154+/CD137+- Aktivität (<0,4%) von CD4+- und CD8+-T- Zellen auf. Die

Stimulationsansätze zeigen mit dem behandelnden HLA-DR-Protein-Komplex nach 48h eine höhere Expression der Aktivierungsmarker als nach 24h. Die höchste CD154+/CD137+ Expression zeigen die Stimulationsansätze mit dem Fusionsprotein TP1170-InfAnuc. Dabei werden 2,97 % CD154 positive T-Zellen nach 48h durch den gebundenem HLA-DR-TP1170-InfAnu-Komplex das Influenza-Nukleoprotein-Antigen präsentiert. Die CD4+ Zellen weisen zwischen der NK (TP117-HSA) und TP1170-InfAnuc keine wesentlichen hohen Unterschiede auf (mit Ausnahme der Probe TP170-InfAnuc/CD154). Hier zeigt das Fusionsprotein TP117-HSA eine relativ hohe T-Zellaktivität auf, obwohl am human Serum Albumin keine Prozessierung stattfinden soll. Ähnlich stellen die CD8+-T-Zellen keine ausschlaggebenden Unterschiede zwischen Tag 1 und Tag 2 auf.

5 Diskussion

In Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Herstellung von rekombinanten Fusionsproteine entwickelt, um eine gezielte Antigenaufnahme in APCs über membrangebunden Rezeptoren von einem bestimmten Antikörper einzuleiten. Dadurch sind APCs in der Lage eine gezielte T-Zell-Aktivität auszulösen. Als Antigenmodell zur Einschleusung in antigenpräsentierenden Zellen dient der Influenza A- und Cytomegalie-Virus. Im Folgenden wird die Diskussion der gezeigten Ergebnisse in vier Teilen dargestellt.

5.1 Bindefähigkeit von Sphero™-Beads gekoppelte TP 1170-scFv Proteine

Um die Bindefähigkeit des hergestellten Fusionsproteins TP1170-scFv zu untersuchen, wurden blau-fluoreszierenden Latex-Beads (Sphero™ Sky-Blue-Beads) verwendet. Die Beads werden mit dem AK P2X1 auf der Oberfläche gekoppelt. Hierbei soll getestet werden, ob das scF-Fragment am AK P2X1 (Isotyp Polyklonal; Kaninchen als Wirt) und das Maus-kappa Nb TP1170 am AK H-2Dd (Isotyp IgG1, k; Maus als Wirt) binden. Als Vergleich zu diesem Ansatz wurde eine NK ohne Zugabe des Fusionsproteins verwendet. Aufgrund das H-2Dd eine PE-A Fluoreszenz nachweist, wurden die Ansätze der gekoppelten Beads durch die Aktivität im PE-A Channel am Durchflusszytometer verglichen. Die Stimulationsansätze erfolgten in einer 30-minütigen Inkubation auf Eis. Die Bindung des Fusionsproteins TP1170-scFv, an den Beads konnte am FACS gezeigt werden. Somit hat der scFv-Fragment am mit P2X1 gekoppelten Beads gebunden und somit der Nb-Bereich gekoppelte AK H-2Dd am Durchflusszytometer detektiert. Ohne TP1170-scFv fehlt die Verbindung zum gekoppelten Bead, dies ist in Abbildung 18 zu sehen, da keine PE-A Fluoreszenz zu sehen ist. Somit ist die Bindung zum Beads über das Fusionsprotein nötig.

Das hergestellte Fusionsprotein zeigt, aufgrund der spezifischen Bindung an dem jeweiligen AK die gezielten Bindungseigenschaften auf. Dies lässt sich auf die Funktionalität des rekombinanten Fusionsprotein schließen. Dies lässt auf eine erfolgreiche Klonierung als auch Expression in HEK Zellen schließen

5.2 Antigenpräsentation von aktivierten T-Lymphozyten durch isolierte B-Lymphozyten aus PBMCs

In diesem Versuchsabschnitt wurde die gezielte Einschleusung von Influenza Nukleoprotein-Antigenen in antigenpräsentierenden Zellen mithilfe der Fusionsproteine TP1170-InfAnuc und TP1170-HSA zur Antigenpräsentation untersucht. Als APC wurden B-Zellen verwendet die aus PBMCs isoliert wurden. Mit dem BZR, (Komplementrezeptor 2 (CR2) oder CD21) nimmt die B-Zelle das Fusionsprotein über den Antikörper CD21 auf. Zuvor werden die Fusionsproteine mit dem AK CD21 inkubiert, somit wird die Bindung vom Maus-kappa Nanobody (TP1170) an CD21 erreicht. In dem folgenden Versuch werden die AK-Fusionsprotein-Komplexe mit aufgereinigten B-Zellen in einem Zeitraum von 5 Tage analysiert. Die Versuche in Abbildung 20 belegen, dass eine gezielte Influenzaantigenaufnahme über den BZR von B-Zellen stattgefunden hat.

Es stellte sich heraus, dass eine CD4⁺ T-Zellaktivierung und keine CD8⁺-T-Zellaktivierung über die Antigenprozessierung stattgefunden hat (siehe Abbildung 18). Die Antigenpräsentation von B-Zellen wird über den MHC-II-Komplex an CD4⁺ T-Zellen eingeleitet. Die Behandlung von B-Zellen mit TP1170-InfAnuc ergaben eine 0,4 % CD25⁺/eFluor670- Expression. Daraus lässt sich zeigen, dass das Influenza-Antigen über den gekoppelten CD21-TP1170-InfAnuc-Komplex in den Signalweg der Antigenpräsentation von B-Zellen aufgenommen wurde. Dadurch konnte auch die erfolgreiche Bindefähigkeit des rekombinanten Fusionsproteine belegt werden. Der Ansatz mit TP1170-HSA als NK bestätigt die nichtfähige Antigenaufnahme und Prozessierung. HSA ist das humane Protein Albumin und ist das häufigste Protein im Blut (He und Carter,1992). Somit sollten jegliche Bindungen am HSA-Fragment von Antigenen nicht eingegangen werden. Im gleichen Ansatz zeigten die CD8⁺T-Zellen keine CD25⁺/eFluor670- Expression durch APCs, weil keine Präsentation von Influenza Nukleoprotein-Antigen über dem MHC-I-Komplex stattgefunden hat. Durch die Aufreinigung von B-Zellen von restlichen antigenpräsentierenden Zellen und Stimulation der Fusionsproteine konnte die gezielte rezeptorvermittelnde Antigenaufnahme nur von B-Zellen gezeigt werden.

In diesem Versuch fehlt der Vergleichsansatz von unstimulierten B-Zellen und die mit den Fusionsproteinen behandelten B-Zellen. Dadurch kann man keine Rückschlüsse ziehen, wie die B-Zellen ohne jegliche Stimulanzen reagieren würden.

Abschließend ergeben B-Zellen, die mit dem CD21-TP1170-InfAnuc-Komplex inkubiert wurden, eine höhere Aktivierung von CD4+ T-Zellen als die mit der Stimulation vom CD21-TP1170-HSA-Komplex.

5.3 Stimulation von antigenpräsentierenden Zellen aus Vollblut durch rezeptorvermitteltes Einschleusen von Influenza mittels Fusionsproteine (TP1170, -InfAnuc und -HSA)

Die Antigenpräsentation durch rezeptorvermitteltes Einschleusen von Influenza-Nukleoprotein-Antigenen mittels der Fusionsproteine TP1170, -InfAnuc und -HSA von unterschiedlichen APCs wurde in diesem Versuch untersucht. Dabei werden die Rezeptoren CD205 und CD303 auf Dendritische Zellen mit den gekoppelten Fusionsproteine auf die Antigenaufnahme betrachtet.

5.3.1 Langzeitstimulation

Für die Messung aktivierter T-Zellen wurde eine Langzeitstimulation mit Vollblutproben aus vier unterschiedlichen Probanden durchgeführt. Der Versuch zeigte, dass die mit AK-TP1170-InfAnuc behandelten APCs mit eFluor670 markierten T-Zellen eine höhere Aktivierung antigenspezifischer CD4+ und CD8+ T-Zellen als die mit AK-TP1170-HSA stimulierten APCs bewirkte. Dabei vermittelten die B-Zellen, die über den CD21-Rezeptor das Influenza Nukleoprotein-Antigen mittels dem TP1170-InfAnuc aufgenommen haben, die geringste durchschnittliche CD4+ T-Zellaktivität (1,58%). B-Zellen nehmen hier über den MHC-II den klassischen Antigenprozessierungsweg auf. Dendritischen Zellen zeigten bei Zugabe von TP1170-InfAnuc die höchste CD25+/eFluor- Expression von CD4+ T-Zellen. Dabei wurde die Antigenaufnahme über den Rezeptor CD303 eingeleitet und das A/H1N1-Antigen über MHC-I an CD8+ T-Zellen und über MHC-II an CD4+ T-Zellen präsentiert. Dieser zelluläre Mechanismus wird als Kreuzreaktion bezeichnet. Im gezeigten Versuch resultiert bei allen Stimulationansätzen mit TP1170-InfAnuc eine Aktivierung von CD8+ Zellen. In Abbildung 25 zeigt der Ansatz mit dem eingebrachten CD21-TP1170-InfAnuc-Komplex eine CD8+ Zellaktivität (0,4% CD25+/eFluor670- Expression) auf. Obwohl hier die B-Zellen gezielt über den CD21-Rezeptor stimuliert werden, bewirken sie trotz dessen eine hohe CD8+ T-Zellaktivität als zu den anderen Stimulationsansätze. Grund hierfür ist, dass nicht nur B-Zellen als APC vorhanden sind, sondern auch Monozyten und Dendritische Zellen in PBMCs zur Kreuzpräsentation über MHC-I eingeleitet werden.

Außerdem stellt der Versuch, das unstimulierte PBMCs ohne Behandlung der Fusionsproteine keine wirkliche Antigenprozessierung von Influenza-Nukleoprotein-Antigenen an CD4+ (0,06% CD CD25+/eFluor670-) und CD8+ (0,02% CD CD25+/eFluor670-) bewirken.

5.3.2 Kurzzeitstimulation

Wie auch bei der Langzeitstimulation wurde in diesem Versuch der gleiche Ansatz mit einer Vollblutprobe aus Proband 1 durchgeführt. Dabei wurde die T-Zellaktivierung von T-Zellen mittels von gezielter Influenzaantigenaufnahme durch den gekoppelten HLA-DR-Rezeptor (MHC-II) mit Fusionsproteine an APCs untersucht. Die Antigenpräsentation erfolgt nicht nur über den klassischen Prozessierungsweg von MHC-Molekülen auf APCs, sondern mittels eines zweiten Signals von costimulierenden Molekülen (CD28 und CD40) wird die vollständige Aktivierung der APCs eingeleitet.

Im gezeigten Versuch in Abbildung 25 zeigen die CD4+ T-Zellen die höchste CD154+ Expression nach 48-stündiger Inkubation (2,97 %). Diese Zellen haben das Influenza-Nukleoprotein-Antigen mittels dem HLA-DR-TP1170-InfAnuc-Komplex über MHC-II von APCs präsentiert bekommen. Im Vergleich stellten die CD4+- T-Zellen beim gleichen Ansatz nur eine 0,322 % CD154+- Expression nach 24-stündiger Inkubation. Zudem bewirken auch die CD8+ T-Zellen bei allen Stimulationsansätze eine höhere CD137+/CD154+ Expression nach 42h aus.

Ein weiterer Aspekt, den man in Betrachtung ziehen sollte, ist die Durchführung von Einfrieren und Auftauen von aufgereinigten PBMCs. Dadurch werden die Zellen unter Stress gesetzt. In Abbildung 19 wird im ersten Dot-Plot-Diagramm eine größere Population, die tote Zellen nachweisen, angezeigt. Im Versuch 4.4 (Abbildung 21) sollte eine kleine tote Population anzeigen.

Jedoch ist es schwierig die Versuche 4.3 und 4.4 aufgrund der unterschiedlichen Zellzahl zu vergleichen, jedoch besteht die Vermutung, dass die Population der lebenden Zellen im frischen Vollblut höher sind als von aufgetauten PBMCs.

6 Ausblick

Die Methode zur Herstellung von Fusionsproteinen aus Virusantigenen (Influenza A Nucleoprotein, CMV pp65) mit Nanobodies hat eine gezielte Einschleusung von Antigenen von APCs erreicht.

Da das klonierte Konstrukt TP1104-CMV keine hohe oder gar keine Expression in HEK-Zellen erzielt hat, könnte man das Klonieren von TP1170-CMV in Betracht ziehen. Eine gezielte Antigenpräsentation von CMV_pp65 über unterschiedliche APCs würde von Interesse der Prozessierung über MHC-I und MHC-II sein.

Das Vergleichen von verschiedenen Rezeptorwegen auf APCs und das Untersuchen der Fähigkeit Antigene an T-Zellen zu präsentieren oder kreuzpräsentieren könnte in weiterer Hinsicht ermittelt werden.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei jeder einzelnen Person bedanken, die mich während meiner Bachelorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Als Erstes möchte ich mich bei meinem Betreuer Herr Prof. Dr. med. Friedrich Haag für die Unterstützung und Betreuung meines Bachelor-Projekts bedanken. Für meinen Beruflichen Werdegang hat mich das Arbeiten im Forschungsbereich und das Erzielen von neuen Ansätzen viele neue Perspektiven gegeben. Dafür möchte mich für die Zusammenarbeit bedanken. Bei meinem Gutachter Herr Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker bedanke ich mich sehr für die Betreuung und das Interesse dieser Arbeit.

An meiner Arbeitsgruppe Gudrun Dubberke, Klaus Kaschubowski, Sana Javed, Samantha Wittke und Philipp Schmidt geht ein besonderer Dank für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die unglaubliche Hilfsbereitschaft. Dabei bedanke ich mich an meine Liebe Gudrun, die mir an Tag 1 ans Herz geschlossen ist. Unsere gemeinsamen Gespräche über die neusten Nachrichten und der Welt werde ich missen. Ein riesiges Dankeschön an Klaus, für die Korrektur dieser Arbeit und das ich bei Fragen und Hilfe mich immer an dich wenden konnte.

Ein besonderer Dank geht an meinen Kollegen Stephan Menzel für die Mitbetreuung an meinem Projekt und an Birte Albrecht, die mir von Anfang die praktische Unterstützung gegeben haben. Für die liebevolle Aufnahme im Team des Instituts für Immunologie und der unvergesslichen und erlebnisreichen Zeit im Labor am UKE bedanke ich mich.

Meine Familie und Freunden gilt mein Dank für die seelische und kräftige Unterstützung während der intensiven Zeit die Arbeit zu erstellen. Ein besonderes Dankeschön geht an meiner besten Freundin Wajea Hosseni, die für die Unterstützung der Korrektur zu mir stand.

Der größte Dank geht an meinen Eltern, die mich von Anfang meiner schulischen Laufbahn und im Studium unterstützt und zu mir gehalten haben. Wie sehr eure Förderung und stützenden Halt, die Ihr mir jeden Tag gibt, mir bedeuten, reichen keine Worte dafür aus.

8 Literaturverzeichnis

- MCCMAHON C., BAIER A.S. , PASCOLUTTI R., WEGRECKI M. , ZHENG S., ONG J.X., ERLANDSON S.C., HILGER D., RASMUSSEN S.G.F., RING A.M. , MANGLIK A., KRUSE A.C.. (2018): Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. In: HHS Public Access. NAT STRUCT MOL BIOL 25 3: 289-296.
- HEILMANN K., MESSERSCHMIDT K., HOLZLOEHNER P.(2012): Monoklonal Antikörper – Herstellung und Verwendung. In: BIOSpektrum. 18. Jahrgang. S.167- 169:
- MURPHY, KENNETH, WEAVER, CASEY (2018): Janeway Immunologie. In: SpringerSpektrum. 9. Auflage.
- KAUFMANN, S. H. E. (2012) Basiswissen Immunologie. Mit 52 Abbildungen und 17 Tabellen. Berlin, Heidelberg: Springer-Lehrbuch. 7. Auflage.
- LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M., MYRTEK, D. (2014): Der Experimentator Immunologie. In: SpringerSpektrum. 4. Vollständig überarbeitete und korrigierte Auflage.
- SCHÜTT, C., BRÖKER, B. (2011): Grundwissen Immunologie. In: Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 3. Auflage.
- NEUMANN, J. (2008): Immunbiologie. Eine Einführung. Mit 124 Abbildungen. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag.
- RINK, L., KRUSE A., HAASE, H. (2015): Immunologie für Einsteiger. Heidelberg: Springer Spektrum. 2. neu bearbeitete und aktualisierte Auflage.
- KAMBAYASHI, T., LAUFER T. M. (2014): Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell?". Nature Reviews Immunology. 14(11): 719–730.
- HOLLIGER, P., HUDSON, P.J., (2005): Engineered antibody fragments and the rise of single domains. NatBiotechnol 23, 1126-1136.
- PURCELL, ANTHONY W., CROFT, NATHAN P., TSCHARKE, DAVID C. (2016): Immunology by numbers: quantitation of antigen presentation completes the quantitative milieu of systems immunology! Current Opinion in Immunology. 40: 88-95.

- STERN, LAWRENCE J, SANTAMBROGIO, LAURA (2016): The melting pot of the MHC II peptidome. *Current Opinion in Immunology*. 40: 70-77.
- HUSTON, JAMES S., MUDGETT-HUNTER MEREDITH, TAI, MEI-SHENG, MCCARTNEY, JOHN, WARREN, FREDERICK, HABER, EDGAR, OPPERMAN, HERMANN (1991): Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. In: Elsevier. S. 46-52.
- HOF, HERBERT, DÖRRIES, RÜDIGER (2009): *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*. 4. Auflage. In: Georg Thieme Verlag.
- BREITLING, FRANK, DÜBEL, STEFAN (1997): *Rekombinante Antikörper*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- TOMTISHEN III, J. P. (2012): *Humane Cytomegalievirus-Tegument-Proteine* (pp65, pp71, pp150, pp28).
- SCHLEGEL, H. G. (2007): *Allgemeine Mikrobiologie*. (Hrsg.): Georg Fuchs. Stuttgart, NewYork: Georg Thieme Verlag. 8. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage.
- NIAL P. A. S. JOHNSON, MUELLER, JUERGEN D. (2012): Updating the Accounts: Global Mortality of the 1918–1920 „Spanish“ Influenza Pandemic. In: *Bulletin of the History of Medicine*. Band 76. Nr. 1. S. 105–115.
- KLEIN, J. S. A. (2000): The HLA System. In: *The New England Journal of Medicine*. 343:702-709.
- CHASAN, ACHMET IMAM, KURTS, CHRISTIAN, BURGDORF, SVEN (2009): Antigenpräsentation. Molekulare und zellbiologische Mechanismen der Kreuzpräsentation. In: *Universitätsklinikum Bonn. Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie*. 15. Jahrgang. S. 606-608.
- CHENAVAS, S., CRÉPIN ,T., DELMAS , B., RUIGROK, R. W., SLAMA-SCHWOK A. (2013):Influenza virusnucleoprotein: structure, RNA binding, oligomerization and antiviral drug target.In:*Futuremicrobiology* .Band 8. Nummer 12.
- VAN ROMPUY, LUDO, MIN JOU, WILLY, HUYLEBROECK, DANNY, DEVOS, RENE, FIERS, WALTER (1981): Complete Nucleotide Sequence of the Nucleoprotein Gene from the Human Influenza Strain A/PR/8/34 (HON1). Vol. 116. Issue 2. S.347-353.
- RIBBERT, H. (1904): Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zbl All Pathol* 15: 945- 948.

- WELLER, T.H., MACAULEY, J. C., CRAIG, J. M., WIRTH, P. (1957): Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illness resembling cytomegalic inclusion disease. Proc Coc Exp Biol Med 94: 4-12.
- ROBERT KOCH INSTITUT (RKI) (2018): Influenza (Teil 1): Erkrankungen durch saisonale Influenzaviren.
- IMD LABOR BERLIN: IgG- Subklassen- und IgA- Mangelsyndrome. Diagnostikinformation. Nr. 207.
- STACK, GABRIELLE STACEY, MARIA (-): HUMAN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV). In: British Society for Immunology. Bite-Sized Immunology.
- BUNDESMINISTERIUM FÜR GESUNDHEIT (2010): Humanes Cytomegalievirus (HCMV). Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. 53: 973-983. In: Springer-Verlag.
- WILEY, D.C., SKEHEL, JOHN J. (1987): The structure and function of the Hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. Ann. Rev. Biochem. 56: 365-394.
- WUTZLER, P. (2009): Virologische Grundlagen. In: Zepp F, Ruf BR (Hrsg) H1N1 Update 2009 – Kompendium Influenza 2009. Springer, Ärzte Zeitung Verlags-GmbH, Heidelberg, Neu-Isenburg, S 2–16
- PLEINER, TINO, BATES, MARK, GÖRLICH, Dirk (2017): A toolbox of anti-mouse and anti-rabbit IgG secondary nanobodies. In: The journal of cell biology (JCB). Volume 217. Nummer 3. S. 1143-1154.
- MUYLDERMANS, SERGE (2013): Nanobodies: Natural Single- Domain Antibodies. In: Department of Structural Biology. VIB; Vrije Universität Brussel, Belgium. 82: 775-797.
- HAMERS-CASTERMAN, C., ATARHOUCHE, T., MUYLDERMANS, S., ROBINSON, G., HAMERS, C., BAJYANA SONGA, E., BENDAHMANN, N., HAMERS, R. (1993): Naturally occurring antibodies devoid of light chains. In: Letters to nature. 363: 446- 448.
- PEZZUTO, A., ULRICH, T., BURMESTER, G. R., (2006): Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen - Labor - Klinik Taschenbuch. Stuttgart- New York: Georg Thieme Verlag 2. Auflage

- ROITT, I.M., BROSTOFF, J., MALE, D.K. (1996): Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Stuttgart-New York: Thieme Verlag. 3 Auflage
- HOLLÄNDER, G.A. (2006): Immunologie Grundlagen für Klinik und Praxis. München-Jena: Urban & Fischer.
- HE, X. M., CARTER, D. C. (1992): Atomic structure and chemistry of human serum albumin. In: Nature 358, 209–215
- WELLER, T. H., MACAULEY, J. C., CRAIG, J. M., AND WIRTH, P. (1957). Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illness resembling cytomegalic inclusion disease. Proc Coc Exp Biol Med 94, 4-12

9 Anhang

9.1 DNA-Sequenzen

→TP1170 anti Maus-kappa light chain Nanobody

QVQLVESGGGWVQPGGSLRLSCAASGFTFSDTAMMWVRQAPGKGREWVAAIDTGGGYTTYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTARYYCAKTYSGNYYSNYTVANYGTTGRGTLVTV
SS

→TP1104 anti Maus-IgG1 light chain Nanobody

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSDSPMTWARQAPGKRLEWVSTISSDGEKIGYRD
AVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCLNVVLVGREVFSNGTLVTVSS

CMV_pp65

MESRGRRCPEMISVLGPISGHVLKAVFSRGDTPVLPHETRLLQTGIHVRVSQPSLILVSQYT
PDSTPCHRGDNLQVQHTYFTGSEVENVSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPLKMLNIP
SINVHHYPSAAERKHRHLPVADAVIHASGKQMWQARL

→HAS Human Serum Albumin

Dahksevahrfkdlgeenfkalvliafaqylqqcpfedhvklvnevtcfaktcvadesaenc
dkslhtlfgdklctvatlretygemadccakqepernecflqhkddnplprlvrvpevdvmc
tafhdneetflkkylieiarrrhpyfyapellffakrykaafteccqaadkaacllpkldele
degkassakqrlkcaslqkfgerafkawavarlsqrfpkaefaevsklvtdltkvhtecchg
dllecaddradlakycicnqdsissklkeccepllekshciaevendempadlpslaadv
eskdvcknyaeakdvflgmflyeyarrhpdysvlllrlaktyettlekccaaadphecycak
vfdefkplveepqnlkqncelfeqlgeykfqnallvrytkkvpqvstptlvevsrnlgkvg
skcckhpeakrmpcaedyllsvlnqlcvlhektvpsdrvtkccteslvnrrpcfsalevde
yvpkefnaetftfhadictlsekerqikkqtalvelvkhkpkatkeqlkavmddfaafvekc
ckaddketcfaeegkklvaasqaalgl

→Inf_Anu Nucleoprotein gegen A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)

MASQGTKRSYEQMETDGERQNAATEIRASVGMIGGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNSLT
IERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRVNGKWMRELILYDKEEIRRIWRQAN
NGDDATAGLTHMMIWHSNLNDATYQORTRALVRTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAGA AVKGV
GTMVMELVRMIKRGINDRNFWRGENGRKTRIAYERMCNILKGKFQTAAQKAMMDQVRESRNP
GNAEFEDLTFILARSALILRGSVAHKSCLPACVYGPAVASGYDFEREGYSLVGIDPFRLQNS

QVYSLIRPNENPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRVLSFIKGTKVLPRGKLSTRGVQIASNENME
TMESSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQRASAGQISIQPTFSVQRNLPFDRTTIMAAFNGNTE
GRTSDMRTEIIRMMESARPEDVSFQGRGVFELSDEKAASPIVPSFDMSNEGSYFFGDNAEEY
DN

→scFv single chain variable fragment

AKNSVYLQMNSLRVEDTAVYYCARRSYDSSGYWGHFYSYMDVWGQGTTLVTVSSLEGGGGSGG
GGSGGGASSVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSKR
PSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGTKLTVLG--SRT

9.2 Klonierte DNA-Konstrukte

→ TP1170-rbFc

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSM^{MAQVQLVESGGGWVQPGGSLRLS}CAASGFTFS^{DTAMMWVR}
QAPGKGREWVAAIDTGGGYTTYADSVKGRFTISRDN^{AKNTLYLQMNSL}KPEDTARYYCAKTY
SGNYYSNYTVANYGTTGRGTLVTVSSAAASTCSKPTCPPPELLGGPSVFI^{FPPKPKDTLMIS}
RTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQV^{RTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRG}
KEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELNSRSVSLTCMINGFHPSKSR
GK

→ TP1104-rbFc

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSM^{MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS}CTASGFTFS^{SDSPMTWAR}
QAPGKRLEWVSTISSDGEKIGYRDAVKGRFTISRDN^{AKNTLYLQMNSL}KPEDTAVYYCLNVV
LVGREVFSNGTLVTVSSAAASTCSKPTCPPPELLGGPSVFI^{FPPKPKDTLMIS}RTPEVTCVV
VDVSQDDPEVQFTWYINNEQV^{RTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHN}
KALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELN^{NRSVSLTCMINGFYPSDISGEWEKNGKG}
KTTTEHARPG

→ CMV-rbFc

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSM^{MAQVQLQESGGGLVQPGGALRLS}CAASGLTLADTATGWFR
QAPGKEREWVACISRRKAGTFYADSLKDRFTISR^{DDSVNTVYLQIISLKPDDTANYVCVQIP}
FCNEFMRGDLDRAILGQGTQVTVASAHHSEDP^{SAAAMESRGRRCPEMISVLGPI}SGHVLKAV
FSRGDTPVLPHE^{TRLLQGTGIHVRVVSQPSLILVSQYTPDSTPCHR}GDNQLQVQHTYFTGSEVE
NVSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPLKMLNIP^{SINVHHYPSAAERKHRHLPVANASSL}
AVEKNWATSIEWFW

→ InfAnuc-rbFc

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSM^{MAQVQLQESGGGLVQPGGALRLS}CAASGLTLADTATGWFR
QAPGKEREWVACISRRKAGTFYADSLKDRFTISR^{DDSVNTVYLQIISLKPDDTANYVCVQIP}
FCNEFMRGDLDRAILGQGTQVTVASAHHSEDP^{SAAAMASQGTKRSYEQMETDGERQ}NATEIR
ASVGKMIGGIGRFYIQMCTELKLS^{DYEGRLIQNSLTI}ERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKD
PKKTGGPIYRRVNGKWMRELILYDKEEIRRIWRQ^{ANNGDDATAGLTHMMI}WHSNLNDATYQK
KRGLG

→ TP1104-InfAnuc

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSM^{MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS}CTASGFTFS^{SDSPMTWAR}
QAPGKRLEWVSTISSDGEKIGYRDAVKGRFTISRDN^{AKNTLYLQMNSL}KPEDTAVYYCLNVV
LVGREVFSNGTLVTVSSAAAMASQGTKRSYEQMETDGERQ^{NATEIRASVGKMIGGIGRFYIQ}

MCTELKLSDYEGRLIQNSLTIERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRVNGKW
MRELILYDKEEIRRIWRQANNGDDATAGLTHMMIWHSNLNDATYQRTRALVKTGMDPPKVYL
GAGFHALPRRFRPS

→TP1170-InfAnuc

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSMAQVQLVESGGGWVQPGGSLRLS CAASGFTFS DTAMMWVR
QAPGKGREWVAAIDTGGGYTYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSLKPEDTARYYCAKTY
SGNYYSNYTVANYGTTGRGTLVTVSSAAAMASQGTKRSYEQMETDGERQNATEIRASVGKMI
GGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNSLTIERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKTGGP
IYRRVNGKWMRELILYDKEEIRRIWRQANNGDDATAGLTHMMIWHSNLNDATYQRTRALVRT
GMDPPKCNLKEGSP LPPASGLPG

→TP1104-CMV

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSMAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFS DSPMTWAR
QAPGKRLEWVSTISSDGEKIGYRDAVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCLNVV
LVGREVFSNGTLVTVSSAAAMESRGRRCPEMISVLGPISGHVLKAVFSRGDTPVLPHE TRLL
QTGIHVRVSQPSLILVSQYTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYFTGSEVENVSVNVHNPTGRSICP
SQEPMSIYVYALPLKMLNIP SINVHHYPSAAERKHRHLPVADAVIHASGKQMWQARLTVSGL
AWTKTAKTMERTGRDKPLPCFSTKNFPLGIVFWLPDFLVKGNPKPQMAGSG

→TP1170-HSA

NYTVANYGTTGRGTLVTVSSAAADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDH
VKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQE PERNEC
FLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFPTMKKR

→TP1104-scFv

GLDIYMGDNDIHFAFLSTGAHSMAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFS DSPMTWAR
QAPGKRLEWVSTISSDGEKIGYRDAVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCLNVV
LVGREVFSNGTLVTVSSAAAGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGTLGQPGGSLRLS CSASGF
TLGSFSMSWQ