

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Immunologie

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

Charakterisierung putativer humaner Autoantigene

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von:

Jan Henrik Schirmer
aus Braunschweig

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 24.07.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. F. Haag

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. C. Iking-Konert

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/n: PD Dr. E. Tolosa

Für meine Eltern Adelheid und Stephan
und meinen Bruder Felix

Inhaltsverzeichnis

1. Zielsetzung	1
2. Einleitung	2
2.1. Das Immunsystem.....	2
2.2. Antikörper und antikörperproduzierende Zellen.....	5
2.2.1. Antikörper.....	5
2.2.1.1. Struktur.....	5
2.2.1.2. Funktion.....	7
2.2.1.3. Entstehung der Antigenspezifität.....	7
2.2.2. Reifung von B-Zellen, Entwicklung zu Plasmazellen.....	8
2.3. Autoimmunerkrankungen.....	10
2.3.1. Autoimmunerkrankungen allgemein.....	10
2.3.2. Verlust immunologischer Toleranz.....	11
2.3.3. Autoantikörper.....	13
2.3.4. Vaskulitiden und ANCA.....	15
2.4. Untersuchte Autoantigene.....	16
2.4.1. LAMP2 (Lysosomen assoziiertes Membranprotein 2).....	16
2.4.2. Identifizierung putativer Autoantigene durch Cindy Hempp.....	17
2.4.2.1. LSM14 (SM-Like Protein 14; RNA-associated protein 55 / RAP 55).....	18
2.4.2.2. NOL8 (Nucleolar protein 8, NOP 132).....	19
2.4.2.3. SHC2 (SHC-transforming protein 2).....	19
2.5. Immunisierung und Antikörperproduktion.....	20
3. Materialien	22
3.1. Laborgeräte.....	22
3.2. Verbrauchsmaterialien und Kits.....	23
3.3. Chemikalien, Puffer und Wasser.....	24
3.4. Medien & Zellkulturreagenzien.....	25
3.5. Zusätze.....	26
3.6. Oligonukleotide.....	26
3.6.1. Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation.....	27
3.6.2. Oligonukleotide zur Mutagenese.....	27
3.6.3. Oligonukleotide für die Sequenzierung.....	28
3.7. Plasmide & Klone.....	28
3.8. Antikörper.....	29
3.9. Enzyme & zugehörige Supplemente.....	30
3.10. Bakterienstämme.....	30
3.11. Zelllinien.....	30
3.12. Tierexperimente.....	31
3.12.1. Versuchstiere.....	31
3.12.2. Narkotika.....	31
3.13. Software und Recherche.....	31
4. Methoden	32
4.1. Molekularbiologische Methoden.....	32
4.1.1. Kultivierung von Bakterien.....	32
4.1.2. Transformation kompetenter E.coli-Zellen.....	32
4.1.3. Arbeiten mit DNA.....	32
4.1.3.1. Präparation von Plasmid-DNA.....	32

4.1.3.2. Quantifizierung von DNA.....	32
4.1.3.3. PCR-Amplifikation und Einbringen von Restriktionsschnittstellen.....	33
4.1.3.4. Zielgerichtete PCR-Mutagenese.....	33
4.1.3.5. Restriktionsverdau von DNA.....	34
4.1.3.5. Agarose-Gelelektrophorese mit DNA-Proben.....	35
4.1.3.6. DNA-Standard.....	35
4.1.3.7. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	35
4.1.3.8. Dephosphorylierung von linearisierten Plasmidvektoren.....	35
4.1.3.9. Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
4.1.3.10.: Sequenzanalyse von DNA.....	36
4.2. Zellbiologische Methoden.....	36
4.2.1. Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	36
4.2.2. Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.....	36
4.2.3. Transfektion eukaryontischer Zellen mit Konstrukten in Expressionsvektoren.....	36
4.2.3.1. Transiente Transfektion.....	36
4.2.3.2. Stabile Transfektion.....	37
4.2.4. Antikörperbasierte Zellsortierung.....	37
4.3. Immunologische Methoden.....	38
4.3.1. Präparation von Seren.....	38
4.3.1.1. Gewinnung von Tierseren.....	38
4.3.1.2. Gewinnung von Patientenserum.....	38
4.3.1.3. Verwendete Serensammlung.....	39
4.3.2. DNA-Immunisierung von Ratten und Kaninchen.....	40
4.3.2.1. Herstellung von Gene Gun-Munition.....	40
4.3.2.2. Immunisierung per Gene Gun.....	42
4.3.2.3. Immunisierung per Tätowierung.....	43
4.3.2.4. Immunisierungsplan und Durchführung der DNA-Immunisierungen.....	44
4.3.3. Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting / FACS).....	45
4.3.3.1. Durchflusszytometrie allgemein.....	45
4.3.3.2. Anfärbung mit Serum- und monoklonalen Antikörpern.....	45
4.3.4. Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT).....	46
4.3.4.1. Vitale eukaryontischen Zellen.....	47
4.3.4.2. ANCA-Testung von Tierseren.....	48
4.3.4.3. LAMP 2-Testträger der AG Kain, Wien.....	49
4.3.4.4. ANCA-Testung von Humanseren.....	49
4.3.5. PR3-AK-Testung von Humanseren.....	49
5. Ergebnisse.....	50
5.1. Klonierung eukaryontischer Expressionskonstrukte.....	50
5.1.1. Klonierungsstrategie.....	50
5.1.2. Durchführung der Klonierung.....	52
5.1.3.: Einbringen der S176A-Mutation in das PR3-Expressionskonstrukt.....	54
5.1.4.: Charakterisierung der klonierten Konstrukte.....	55
5.1.4.1.: Testung im FACS.....	55
5.1.4.2.: Expressionsnachweis im indirekten Immunfluoreszenztest.....	56
5.1.5. Etablierung stabil transfizierter Zelllinien.....	59
5.1.6. Sequenzierung des SHC2-Klons.....	60
5.2. Autoantikörper-Screeningsystem für Humanseren.....	61
5.2.1. Konzept des Screeningsystems.....	61
5.2.2. Bewertung positiver und negativer Proben.....	62
5.2.3. Validierung des Konzepts anhand eines Screeningsystems für PR3-AK.....	66

5.2.4. Ergebnisse des Patientenserum-Screenings auf die untersuchten Autoantikörper.....	69
5.2.4.1. Screeningergebnisse für LAMP2.....	69
5.2.4.2. Screeningergebnisse für LSM14 und NOL8.....	70
5.3. Serumtestung auf LAMP2-Testträgern der AG Kain, Wien.....	70
5.4. Entfernung der Proteintags, Klonierung eines nativen LAMP2-Konstruktes.....	72
5.4.1. Klonierungsstrategie zur Entfernung der Modifikationen an LAMP2.....	72
5.4.2. Inaktivierung des lysosomalen Targetingsignals von LAMP2 durch Mutagenese.....	74
5.4.3. Mutagenese der extrazellulären Domäne von LAMP2 B zu LAMP2 A.....	75
5.4.4. Übersicht über die unterschiedlichen LAMP2-Expressionskonstrukte.....	76
5.4.5. Testung der neuen LAMP2-Expressionskonstrukte.....	76
5.5. Testung der LAMP2-Antikörper-positiven Seren auf den neuen Konstrukten.....	78
5.6. Immunisierungsversuche (Gene Gun / Tätowierung).....	80
5.6.1. Durchführung der Immunisierungen.....	80
5.6.2. Untersuchung der Immunsereen im FACS.....	81
5.6.3. Untersuchung der Immunsereen im indirekten Immunfluoreszenztest.....	83
5.6.4. Untersuchung der Immunsereen auf ANCA-Testträgern.....	86
6. Diskussion.....	89
6.1. Klonierung eukaryontischer Expressionskonstrukte.....	89
6.2. Krankheitsassoziation des Proteinproduktes des RZPD-SHC2-Klons.....	92
6.3. Autoantikörperscreeningsystem für Humansereen.....	92
6.3.1. Validierung des Screeningsystems anhand des Assays für PR3-AK.....	92
6.3.2. Antikörper gegen putative Autoantigene.....	94
6.3.2.1. NOL8 und LSM14.....	94
6.3.2.2. LAMP2.....	95
6.4. Gezielte Entfernung der Modifikationen aus den LAMP2-Konstrukten.....	97
6.4.1. Expression der neuen Konstrukte.....	97
6.4.2. Reaktivität der Kain-Serumsammlung gegen die neuen Konstrukte.....	97
6.5. Vergleich der Immunisierungsprotokolle Gene Gun / Tattoo.....	99
6.6. ANCA-Fluoreszenzmuster von LAMP2-AK.....	101
7. Zusammenfassung.....	102
8. Abkürzungsverzeichnis.....	104
9. Literaturverzeichnis.....	107
10. Anhang.....	115
10.1. Vektorkarten.....	115
10.2. Sequenzen und Translation der klonierten Konstrukte.....	118
11. Danksagung.....	128
12. Lebenslauf.....	129
13. Eidesstattliche Versicherung.....	130

1. Zielsetzung

Autoantikörper sind Ausdruck vieler Autoimmunerkrankungen. In den letzten Jahren sind die putativen Autoantigene LAMP2 (Kain et al., 1995, 2008), LSM14, NOL8 und SHC2 (Hempp, 2007) beschrieben worden. LAMP2 ist assoziiert mit pauci-immunen fokal nekrotisierenden Glomerulonephritiden. Die anderen Autoantigene sind weniger gut charakterisiert und ihre möglichen Krankheitsassoziationen sind nicht abschließend geklärt.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, Detektionssysteme für gegen die genannten Autoantigene gerichtete Antikörper in Humanseren zu entwickeln. Mit deren Hilfe sollte dann eine möglichst große Zahl an Seren von Patienten mit Erkrankungen aus dem rheumatologischen Formenkreis hinsichtlich des Vorkommens dieser Antikörper untersucht werden, um einen Eindruck über ihre Häufigkeiten und mögliche Krankheitsassoziationen zu gewinnen. Diese Arbeit sollte die Grundlage dafür liefern, die Relevanz dieser Antikörper für die Autoimmundiagnostik und möglicherweise ihre Rolle innerhalb der Pathogenese der jeweiligen Erkrankung verstehen zu können.

Im Rahmen der Experimente wurden Tierimmunisierungen zur Produktion von Antikörpern gegen LAMP2 durchgeführt. Neben der als 'Goldstandard' der DNA-Immunisierungstechniken geltenden Gene Gun-Immunisierung wurde von uns die DNA-Immunisierung per Tätowierung durchgeführt, die so hinsichtlich ihrer Vor- bzw. Nachteile mit der Gene Gun-Technik verglichen werden konnte.

2. Einleitung

2.1. Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem erfüllt für das Überleben elementare Funktionen, die komplexen Mechanismen unterliegen (Burmester & Pezzutto, 1998, ss 1 - 57; Janeway et al., 2008, ss 1 - 38): Es dient dem Organismus als Schutz z.B. vor eingedrungenen Mikroorganismen oder Toxinen, „ungefährliche“ Antigene, wie z.B. Pollen oder Nahrungsmittelantigene, werden jedoch, wie auch körpereigenes Gewebe, physiologischerweise toleriert. Das Immunsystem hat vier Hauptfunktionen: Die Erkennung von Pathogenen (wie z.B. Viren, Bakterien, Parasiten, Pilze), die Effektorfunktion gegen selbige, die Selbstregulierung zur Vermeidung von Schäden des eigenen Organismus und die Gedächtnisfunktion zum Schutz vor erneuter Infektion. Zwei große Funktionssysteme bilden das menschliche Immunsystem: Das angeborene / unspezifische und das adaptive / spezifische Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem wird unabhängig vom Typ des eingedrungenen Erregers aktiv und bildet die unspezifische aber frühe Abwehrreaktion. Es besteht aus der Epidermis bzw. Hautbarriere, dem Komplementsystem, antimikrobiellen Enzymen und Peptiden (z.B. Lysozym), unspezifischen Mediatoren (z.B. Interferone, Interleukine) sowie einer Zellkomponente aus Granulozyten, dem Monozyten-Makrophagen-System und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Der vielleicht wichtigste unspezifische Abwehrmechanismus ist die Entzündungsreaktion, ein komplexes Zusammenspiel der zellulären und löslichen Komponenten des angeborenen Immunsystems. Hierbei wird durch die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren die Permeabilität der Kapillaren in einem z.B. von einem Erreger befallenen Gebiet erhöht und Neutrophile Granulozyten wandern als erste „Verteidigungswelle“ ein. In dieser ersten Reaktion wird bereits ein großer Anteil der Pathogene vernichtet. Zerstörtes Eigengewebe sowie abgetötete und vitale Pathogene werden dann von eingewanderten Makrophagen phagozytiert. Das angeborene Immunsystem reagiert auf sogenannte PAMPs (Pathogen associated molecular patterns), Antigenmotive, die von vielen Pathogenen geteilt werden, die aber nicht im menschlichen Organismus vorkommen (z.B. Lipopolysaccharid, Peptidoglykan, mannosereiche Oligosaccharide, unmethylierte DNA). Die Erkennung dieser PAMPs erfolgt über für diese Strukturen spezifische Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs), wie zum Beispiel Toll-like-Rezeptoren oder LPS-Rezeptoren. (Auch die Aktivierung der die T-Zellen aktivierenden dendritischen Zellen erfolgt über PRRs). Die frühe Antwort des angeborenen Immunsystems verschafft dem Organismus Zeit, eine spezifische Immunantwort zu bilden (die nach Erstkontakt mit einem Pathogen einige Tage

benötigt).

Das adaptive Immunsystem besteht aus den B-Lymphozyten, die zu Antikörper produzierenden Plasmazellen ausdifferenzieren sowie den T-Lymphozyten. Letztere können grob in zytokinproduzierende, die Immunantwort modulierende (CD4-positive) T-Zellen sowie z.B. Tumorzellen oder virusbefallene Zellen abtötende (CD8-positive) zytotoxische T-Zellen eingeteilt werden. Während alle CD8-positiven T-Zellen zytotoxische T-Zellen sind (also z.B. Tumorzellen und virusinfizierte Zellen direkt abtöten), lassen sich die CD4-positiven in diverse Subklassen unterteilen: T_H1-Zellen, die an der Bekämpfung von intrazellulären Erregern wie Mykobakterien beteiligt sind, aber auch über Zytokine die Antikörperproduktion stimulieren, T_H2-Zellen, die primär B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen, regulatorische T-Zellen (T_{Regs}), die überschießende Immunantworten unterdrücken und diverse mehr. In den letzten Jahren sind viele neue T-Zell-Subpopulationen beschrieben worden, deren Relevanz im Organismus nicht abschließend geklärt ist. Auch bei den bisher meist als reine „Antikörperproduzenten“ betrachteten B-Zellen sind in den letzten Jahren vermehrt Subtypen beschrieben worden (z.B. regulatorische B-Zellen / B_{Regs}), deren klinische Relevanz ebenfalls kaum geklärt ist (Mauri & Ehrenstein, 2008).

CD8 und CD4 sind sogenannte Co-Rezeptoren. Sie ermöglichen den T-Lymphozyten die Interaktion mit MHC-Molekülen (MHC: Major Histocompatibility Complex). Auf MHC-Molekülen werden prozessierte Peptidfragmente von Proteinen auf der Zelloberfläche präsentiert. Auf den auf jeder kernhaltigen Zelle vorkommenden MHC I-Molekülen finden sich Peptidfragmente aus dem Zellinneren, auf den nur von spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, B-Zellen, Dendritische Zellen / DCs) getragenen MHC II-Molekülen nur prozessierte Peptide phagozytierter Proteine. Erkannt werden die präsentierten Peptide durch die T-Zell-Rezeptoren (TCR); CD4 und CD8 bestimmen, mit welchem Typ MHC-Molekül die T-Zelle interagieren kann. CD8 bindet an MHC I und ermöglicht zytotoxischen T-Zellen, Zellen abzutöten, wenn sie z.B. Viruspartikel präsentieren. MHC II dient der Interaktion CD4-positiver T-Zellen mit z.B. Makrophagen oder B-Zellen zu deren Stimulation und Aktivierung.

Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems erfolgt in den sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, Mukosa assoziierte lymphatische Systeme). Hier wird durch bestimmte Zytokinmilieus und Zell-Zell-Interaktionen die Immunantwort an das Pathogen adaptiert gesteuert (z.B. Antikörperproduktion bei extrazellulären Erregern, Stimulation zytotoxischer T-Zellen bei Virusbefall, usw.) und die geeigneten Effektorzellen expandieren klonal. Dies ermöglicht nicht nur die effektive, zielgerichtete Zerstörung von Pathogenen, sondern auch die Entstehung klonaler

Gedächtniszellen, die bei erneuter Konfrontation mit dem Pathogen schnell aktiviert werden können (erworbene Immunität). Auch das Prinzip der Impfung beruht auf der Induktion von Gedächtniszellen.

Die Aktivierung und Stimulation von T-Zellen erfolgt durch antigenpräsentierende Zellen (APCs). Die mit Abstand wichtigste Rolle kommt hier der dendritischen Zelle (DC) zu, die, nachdem sie Pathogene phagozytiert und prozessiert hat, diese in den sekundären lymphatischen Organen präsentiert. B-Zellen werden dann durch aktivierte T-Helferzellen (v.A. T_H2) aktiviert und stimuliert.

Die Vielzahl der für ein Epitop hochspezifischen Lymphozyten entsteht durch Rearrangement der Rezeptorgene (T-, bzw. B-Zellrezeptoren) während der Reifung der Zelle. Die zufällige Neuordnung bewirkt, dass aus einer limitierten Anzahl von Gensegmenten eine enorme Anzahl möglicher spezifischer Rezeptoren entsteht. Nach der Neuordnung der Gensegmente trägt jeder Lymphozyt Rezeptoren einer definierten Spezifität, die jeder Klon der Zelle nach Expansion auch tragen wird (B-Zellen unterliegen jedoch auch später noch einem 'Affinitätsreifung' genannten Prozess, bei dem die Affinität der produzierten Antikörper erhöht wird).

Die Nichtreaktivität gegen ungefährliche körpereigene und Fremddantigene heißt Toleranz. Um diese zu gewährleisten werden autoreaktive Lymphozytenvorläufer in den primären lymphatischen Organen (Thymus, Knochenmark) deletiert (zentrale Toleranz). Nicht autoreaktive Lymphozyten überleben und können in der Peripherie durch APCs oder T-Helferzellen aktiviert werden. Daneben existieren jedoch auch Mechanismen der peripheren Toleranz, die dazu führen, dass autoreaktive Zellen (oder Zellen, die gegen harmlose Antigene reagieren) beispielsweise durch die Induktion von Anergie (Reaktionsunfähigkeit, auch bei erneuter Aktivierung), durch Deletion oder Suppression durch regulatorische T-Zellen inhibiert werden. Bei der Induktion wahlweise von Nichtreaktivität gegen harmlose Antigene oder von Reaktivität gegen Pathogene kommt den PRRs der dendritischen Zellen eine zentrale Bedeutung zu. Für eine definitive Aktivierung durch T-Helferzellen oder DCs muss der Lymphozyt nicht nur ein präsentiertes Antigen erkennen, sondern auch ein „zweites Signal“ (z.B. auf DCs nach PRR-Aktivierung hochregulierte Liganden) empfangen, ohne das er anerg würde. Nichttoleranz gegenüber harmlosen Fremddantigenen führt zu allergischen Erkrankungen (z.B. allergische Rhinokonjunktivitis), die Reaktivität gegen körpereigene Antigene führt zu Autoimmunerkrankungen (z.B. Autoimmunthyreoiditis).

Um Schutz vor Pathogenen zu gewährleisten, ohne dem eigenen Organismus Schaden zuzufügen, unterliegt das Immunsystem also permanent einer komplexen und äußerst effektiven Regulation.

2.2. Antikörper und antikörperproduzierende Zellen

2.2.1. Antikörper

2.2.1.1. Struktur

Antikörper sind antigenbindende Effektormoleküle in Form von sezernierten B-Zell-Rezeptoren (Janeway et al., 2008, ss 111 - 142). Sie haben eine konstante (C-Domäne) und eine variable (V-Domäne) Region. Die konstante Domäne ist bei jedem Antikörper der gleichen Klasse (und ggf. des gleichen Subtyps) identisch und dient der Stabilität sowie den Effektorfunktionen (Komplementaktivierung, Bindung von Phagozyten, usw.), die variable Domäne unterscheidet sich bei den einzelnen Antikörpern und stellt die Antigenbindungsstelle dar. B-Zell-Rezeptoren unterscheiden sich von den Antikörpern nur dahingehend, dass sie im C-Terminus der C-Domäne (s.u.) eine membranverankernde hydrophobe Aminosäuresequenz tragen, die an den intrazellulären Signalkaskaden nach Rezeptoraktivierung beteiligt ist.

Generell finden sich fünf Klassen von Antikörpern: IgM, IgD, IgG (Subklasse 1 bis 4), IgA (Subklasse 1 und 2) und IgE, die sich hinsichtlich ihrer C-Domäne unterscheiden und damit unterschiedliche Funktionen erfüllen. Zunächst soll jedoch auf ihre Gemeinsamkeiten eingegangen werden.

Strukturell besteht jeder der Y-förmigen Antikörper (Gesamtgewicht ca. 150 kDa) aus zwei schweren (H, heavy chain, ca. 50 kDa) und zwei leichten (L, light chain, ca. 25 kDa) Ketten. Die schweren Ketten sind durch zwei Disulfidbrücken, jede leichte Kette ist mit je einer schweren Kette durch eine Disulfidbrücke verbunden. Jede Kette hat einen Anteil konstante und einen Anteil variable Domäne – jede Kette trägt also sowohl zu einer der beiden Antigenbindungsdomänen, als auch zur konstanten Effektordomäne bei, wobei die beiden schweren und die beiden leichten Ketten in einem Antikörper identisch sind. Somit hat ein Antikörper zwei identische Antigenbindungsstellen. Die Antigenbindungsstellen werden durch sechs hypervariable Regionen am Ende der V-Domänen gebildet. Leichte und schwere Ketten haben je drei hypervariable Regionen. Die Antigenbindungsstelle hat eine zum gebundenen Epitop komplementäre Struktur, deren Beschaffenheit durch die hypervariablen Regionen definiert ist. Abbildung 2.1. zeigt die Struktur von Antikörpern.

Es sind zwei strukturell (aber nicht funktionell) leicht unterschiedliche Typen leichte Ketten bekannt: lambda (λ) und kappa (κ). Jeder Antikörper hat entweder zwei λ - oder zwei κ - Ketten.

Die Antikörperklasse bestimmenden schweren Ketten sind mit den zu ihrem namensgebenden Buchstaben korrespondierenden kleinen Buchstaben des griechischen Alphabets benannt: μ (IgM),

δ (IgD), γ (IgG), α (IgA) und ϵ (IgE). Die einzelnen Klassen haben unterschiedliche Effektorfunktionen, die von den schweren Ketten vermittelt werden (z.B. Komplementaktivierung durch IgG und IgM, Affinität zu Mastzellen von IgE, usw.).

Die Antigenbindungsstelle von B-Zellrezeptoren, bzw. Antikörpern bindet im Gegensatz zum T-Zell-Rezeptor keine kleinen, prozessierten Peptide, sondern konformationelle, dreidimensionale Strukturen, die aus nahezu jeder Art Molekül (Proteine, Lipide, Saccharide, usw.) bestehen können. Eine von einem Antikörper detektierbare Struktur eines Moleküls nennt man Epitop. Einige Moleküle, die von Antikörpern gebunden werden können, sind dennoch zu klein, um eine Antikörperantwort zu initiieren. Sie heißen Haptene. Aktivierung von B-Zellen durch Haptene ist dennoch möglich, wenn diese an ein Protein gebunden sind (z.B. an Albumin).

Die Bindung der Antigenbindungsstelle (Paratop) an ein Epitop erfolgt durch nichtkovalente Kräfte: elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Van der Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen.

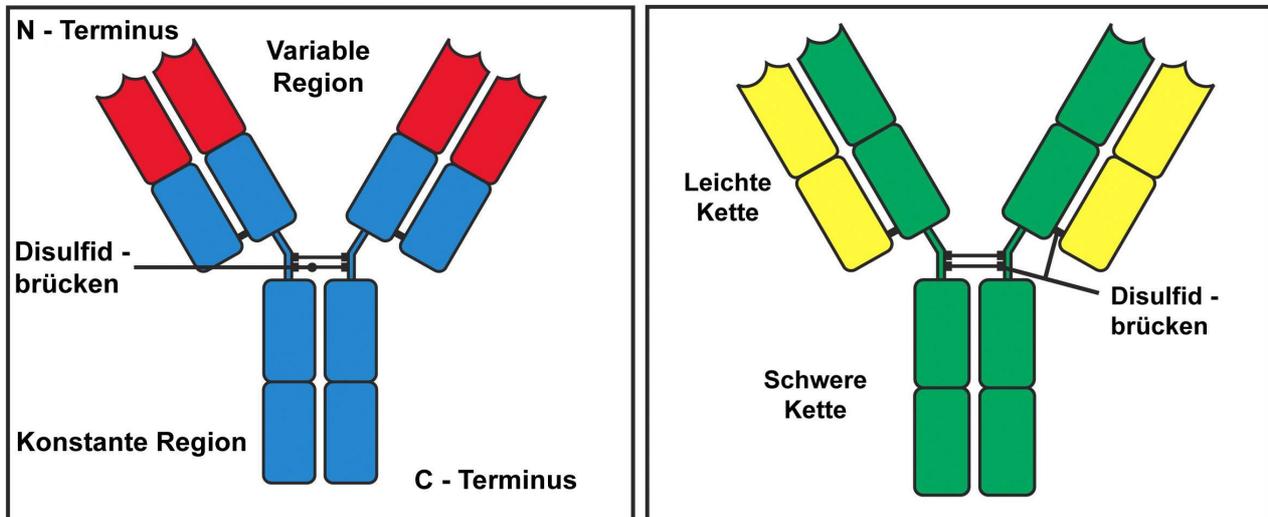


Abb. 2.1.: Struktur von Antikörpern, modifiziert nach Janeway et. al (2008), S. 112, 113

2.2.1.2. Funktion

Antikörper haben drei Hauptfunktionen (Janeway et al., 2008, ss 400 - 417): Die Neutralisation von Pathogenen (durch Bindung können z.B. Viren und Toxine inaktiviert und am Eindringen in ihre Wirtszellen gehindert werden), die Opsonisierung (Überschichtung des Pathogens mit Antikörpern als 'Markierung', was die Aufnahme durch Makrophagen bzw. Neutrophile Granulozyten ermöglicht, selbst wenn diese das Pathogen nicht durch PRRs detektieren können) und die Aktivierung des Komplementsystems (Aktivierung des klassischen Wegs der Komplementkaskade der einerseits zur Lyse der Zielzelle, andererseits wiederum zur Opsonisation mit Komplement und damit der Ermöglichung der Aufnahme durch Phagozyten führt). Die hochspezifischen Antikörper lassen also – neben ihren neutralisierenden Effekten – die Elemente des unspezifischen Immunsystems (Phagozyten, Komplement) zielgerichteter und effektiver arbeiten.

Die einzelnen Antikörperklassen haben spezifische Funktionen. Antikörper vom Typ IgM sind Pentamere und können durch die Co-Lokalisation ihrer Fc-Teile sehr effektiv das Komplementsystem aktivieren. In monomerer und membrangebundener Form fungieren sie – wie IgD – als B-Zell-Rezeptor. IgA wird als Dimer von den Schleimhäuten des Körpers sezerniert und dient dort als antimikrobielle 'Beschichtung'. Über die Muttermilch wird es als gastrointestinaler Schutz auch an das trinkende Baby weitergegeben. IgG macht den größten gelösten Anteil der Antikörper im Serum aus. Es dient besonders der Inaktivierung und Opsonisierung von Pathogenen. IgG ist die einzige Plazenta-gängige Antikörperklasse, die von der Mutter als 'Nestschutz' auf ihren Föten übertragen wird. IgE spielt eine besondere Rolle in der Parasitenabwehr. Es aktiviert vor allem Mastzellen, Basophile und Eosinophile. Unterschiedliche Leukozyten können mit ihren spezifischen Fc-Rezeptoren an Antikörper binden.

Gegen körpereigene Strukturen gerichtete Antikörper, sogenannte Autoantikörper sind Ausdruck, teils auch Auslöser diverser Autoimmunerkrankungen.

In der modernen Forschung sind monoklonale Antikörper (Köhler & Milstein, 1975) zu unschätzbar wertvollen Werkzeugen geworden. Sie lassen sich heute durch Immunisierung von Tieren und Fusion von antikörperproduzierenden Plasmazellen mit Myelomzellen gezielt in beliebiger Menge herstellen und mit Fluorochromen, Toxinen, usw. konjugieren.

2.2.1.3. Entstehung der Antigen-spezifität

Die geschätzte Gesamtzahl an Antigen-spezifitäten von Antikörpern in einem menschlichen Organismus (ca. 10^{11}) wird durch komplexe Mechanismen begründet (Allen et al., 2007; Janeway et

al., 2008, ss 143 - 177; Sallusto et al., 2010):

Die für Antikörperketten kodierenden Genloci (ein Locus für schwere, je ein Locus für leichte λ - und κ -Ketten) bestehen aus sogenannten Variable- (V-), Joining- (J-), Constant- (C-) und für schwere Ketten zusätzlich aus Diversity- (D-) Gensegmenten. Besonders die V-Segmente sind in großer Zahl vorhanden. Die hypervariablen Antigenbindungsstellen entstehen durch somatische Rekombination – also ein dem Zufall unterliegendes Zusammenfügen je eines V-, J-, und D-Exons (kombinatorische Diversität), welches unter Addition oder Subtraktion einzelner Basen in der DNA erfolgt (junktionelle Diversität). Dies geschieht durch Zusammenlagern konservierter Gensequenzen am Ende der Domänen, enzymatisches Herausschneiden der dazwischenliegenden Gensegmente und eine anschließende Ligation. Die Zusammenlagerung der hypervariablen Regionen von schwerer und leichter Kette ergibt dann die Antigenbindungsstelle. Dieser Mechanismus begründet das direkt genetisch bedingte Repertoire an Antikörpern.

Die folgenden Mechanismen werden dagegen durch den Kontakt der B-Zelle mit ihrem Zielantigen hervorgerufen:

Während der somatischen Hypermutation werden Punktmutationen in die V-Domänen der Antikörpergene von B-Zellen eingebracht. Im Prozess der Affinitätsreifung konkurrieren diese B-Zellen mit mutierten Antigenbindungsstellen und somit veränderter Antigenpezifität in den Keimzentren der Lymphknoten um 'Überlebens'-Signale. Es werden somit B-Zellen mit gesteigerter Antigenaffinität selektiert, die dann klonal expandieren.

Aktivierte B-Zellen produzieren zunächst immer IgM-Antikörper. Nach Antigenkontakt kann der gezielte Subklassenwechsel zu IgA, IgG oder IgE durch entsprechende Signale, wie vor allem Zytokine, durch DNA-Rekombination zwischen den VDJ- und einer der für einen der unterschiedlichen Isotypen codierenden C-Regionen, erfolgen.

2.2.2. Reifung von B-Zellen, Entwicklung zu Plasmazellen

B-Zellen entstammen der lymphatischen Reihe pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark. Essentiell für die Reifung der B-Zellen sind die Stromazellen des Knochenmarks, die durch Zell-Zell-Interaktion und Zytokine die Reifungsprozesse beeinflussen (Allen et al., 2007; Janeway et al., 2008, ss 257 - 273, 299 - 317, 379 - 400; Sallusto et al., 2010).

Die Entwicklung beginnt mit dem VDJ-Gen-Rearrangement der schweren Ig-Ketten der pro-B-Zellen (siehe 2.2.2.3. Entstehung der Antigenpezifität). Nur B-Zellen, die daraufhin einen aus funktionellen schweren Ketten bestehenden prä-B-Zell-Rezeptor exprimieren, überleben und

werden zu prä-B-Zellen. Pro-B-Zellen, die keine schwere Kette exprimieren, werden eliminiert. In den Prä-B-Zellen erfolgt nun das VJ-Gen-Rearrangement der leichten Ketten, das – sofern erfolgreich – in der Expression eines kompletten (also aus zwei leichten und einer schweren Kette bestehenden) membrangebundenen IgM-B-Zell-Rezeptors resultiert. Diesen Rezeptor tragenden Zellen werden nun unreife B-Zellen genannt. Bei Nichtentstehen eines kompletten Ig-Rezeptors werden die Zellen eliminiert, ebenso wie autoreaktive unreife B-Zellen, im Rahmen der 'Zentrale Toleranz' genannten komplexen Selektionsmechanismen. Die möglichen Schicksale der autoreaktiven Vorläuferzellen sind: Zelltod durch Apoptose / klonale Deletion, Produktion eines veränderten Rezeptors (Rezeptor Editierung), Induktion von Anergie oder Entstehung immunologischer Ignoranz. Nicht selbstreaktive B-Zellen mit funktionellen Rezeptoren können als reife B-Zellen in die Peripherie auswandern. Durch alternatives Spleißen zwischen den C-Regionen ihrer Rezeptorgene exprimieren sie als B-Zell-Rezeptoren nun membrangebundenes IgM und IgD. In der Peripherie binden reife B-Zellen ihr Zielantigen mit dem Membrangebundenen Ig-Rezeptor, internalisieren und verdauen es proteolytisch, um es dann auf MHC II-Molekülen zu präsentieren. Ihr Antigen präsentierende B-Zellen müssen von einer T-Helferzelle aktiviert werden. Um die Chancen, auf eine das gleiche Antigen erkennende T-Helferzelle zu stoßen, zu erhöhen, siedeln sich antigenpräsentierende B-Zellen an der Grenze zwischen den T- und B-Zell-Arealen der peripheren lymphatischen Gewebe an. Die Antikörperantwort wird dann durch Interaktion einer T-Helferzelle mit einer das gemeinsame Antigen präsentierenden B-Zelle induziert. Die aktivierten B-Zellen expandieren klonal, einige als schon in größerer Menge Antikörper sezernierender Plasmablasten. Andere unterlaufen im Keimzentrum in Interaktion mit für ihr Antigen spezifischen T-Zellen oder sogenannten folliculären dendritischen Zellen die durch somatische Hypermutation bedingte Affinitätsreifung und/oder einen Ig-Klassenwechsel (beides gesteuert durch Zell-Zell-Interaktion und Zytokine). B-Zellen, deren Affinität für ihr Antigen in der Affinitätsreifung steigt, werden durch 'Überlebenssignale' selektioniert, bei Affinitätsverlust werden sie eliminiert. Die ausgewählten Klone entwickeln sich dann zu B-Gedächtniszellen oder den wichtigsten Antikörperproduzenten, den Plasmazellen. Plasmazellen haben einen Phänotyp, der sich deutlich von dem der B-Zellen unterscheidet: Ihre Morphologie ändert sich, die Ausbildung von B-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche nimmt auf ein Minimum ab und die Transkription der für Affinitätsreifung und Isotypwechsel notwendigen Gene wird supprimiert. Sie dienen vorrangig der Produktion eines nun klar definierten Antikörpers.

Während die meisten Gedächtniszellen in den peripheren lymphatischen Organen verbleiben,

wandern die meisten Plasmazellen zur Antikörperproduktion ins Knochenmark und einige in die rote Pulpa der Milz. Im Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) entstandene Plasmazellen verbleiben größtenteils dort.

2.3. Autoimmunerkrankungen

Der folgende Abschnitt gibt eine kurze Einführung in die Grundlagen der Autoimmunerkrankungen, deren Entstehung und Einteilung, mit besonderem Blick auf Autoantikörper.

2.3.1. Autoimmunerkrankungen allgemein

Abzugrenzen von den Immunreaktionen gegen 'harmlose' Fremdartige (Hypersensitivitätsreaktionen, z.B. Allergien) sind die Autoimmunreaktionen – hier reagiert das Immunsystem gegen körpereigene Antigene – mit der Folge von Autoimmunerkrankungen (Janeway et al., 2008, ss 600 - 618).

Die Genese der Autoimmunerkrankungen wird als multifaktoriell angesehen. Eine Kombination aus genetischer Prädisposition (z.B. unterschiedliches Auftreten spezifischer Autoimmunerkrankungen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen, familiäre Häufung), Verlust einzelner immunologischer Toleranzmechanismen sowie Umweltfaktoren (z.B. Infektionen, Toxine, Ernährung, Medikamente) sind ursächlich beteiligt (Shapira et al., 2010).

Autoimmunerkrankungen sind hinsichtlich der betroffenen Gewebe, der Krankheitsmechanismen und des Schweregrades der Krankheiten sehr unterschiedlich.

Generell können sie in zwei Typen eingeteilt werden: Organspezifische (z.B. Diabetes mellitus Typ I) und systemische (z.B. systemischer Lupus Erythematoses) Autoimmunerkrankungen, je nach Lokalisation des Antigens (Inselzellen des Pankreas beim Diabetes Typ I bzw. Kernbestandteile, die in jeder Zelle vorkommen beim SLE). Besonders die systemischen Autoimmunerkrankungen neigen zur Chronifizierung, da das Antigen niemals aus dem Körper entfernt werden kann.

In der medizinischen Praxis erfolgt die Zuordnung zu drei großen Krankheitsgruppen (Renz-Polster, 2008, ss 1065 - 1069): Entzündliche Arthritiden (Gelenkentzündungen, z.B. Rheumatoide Arthritis), Vaskulitiden (Gefäßentzündungen, z.B. Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener)) und Kollagenosen (Bindegewebs- / Weichteilentzündungen, z.B. Systemischer Lupus Erythematoses). Darüber hinaus kann praktisch jedes Organ einzeln oder im Rahmen systemischer Erkrankungen von Autoimmunprozessen betroffen sein.

An den Pathomechanismen von Autoimmunerkrankungen sind komplexe Interaktionen der

verschiedenen Anteile des Immunsystems beteiligt. So treten bei vielen Autoimmunerkrankungen autoreaktive T- und B-Zellen sowie Autoantikörper auf. Hierbei sind meist Teile der Immunantwort direkt pathogen, andere nur aktivierend und wieder andere nur Ausdruck der Krankheit, jedoch nicht selbst schädigend.

Autoimmunerkrankungen können (wie Tabelle 2.1. zeigt) anhand des Schemas für Hypersensitivitätsreaktionen nach der Hauptkomponente ihres Pathomechanismus eingeteilt werden (Coombs & Gell, 1968). Jedoch sind viele Autoimmunkrankheiten auf ein komplexes Zusammenspiel dieser Mechanismen zurückzuführen.

Tabelle 2.1.: Einteilung Hypersensitivität/Autoimmunität anhand des Pathomechanismus, nach Coombs & Gell, 1968, modifiziert nach Janeway et. al., 2008, S. 556 & 618

Einteilung	Mechanismus	Beispiele
Typ I	IgE- und Mastzellvermittelt	Allergien, Anaphylaxie
Typ II	IgG/IgM gegen Zell- oder Matrixproteine	Goodpasture Syndrom, Pemphigus vulgaris, SLE
Typ III	IgG/IgM gegen lösliches Antigen / Immunkomplexe	Rheumatoide Arthritis, Cryoglobulinämie, SLE
Typ IV	T-Zell-vermittelt (T _{H1/2} / CTL)	Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Typ I Diabetes

2.3.2. Verlust immunologischer Toleranz

Für gewöhnlich unterliegt das Immunsystem den Mechanismen der Selbsttoleranz (Janeway et al., 2008, ss 601 - 611, 631 - 637), die Reaktionen gegen körpereigene Strukturen verhindern. Sie setzen sich zusammen aus der zentralen Toleranz, in der unreife autoreaktive Lymphozytenvorläufer in Thymus (T-Zellen) und Knochenmark (B-Zellen) abgetötet oder inaktiviert werden und der peripheren Toleranz, bei der leicht autoreaktive Zellen, die zentral nicht eliminiert wurden, durch komplexe Prozesse inhibiert oder inaktiviert werden. Ein Versagen dieser Toleranzmechanismen ist (zusammen mit genetischen Prädispositionen und Umweltfaktoren) die Ursache für Autoimmunität. In Thymus und Knochenmark werden viele gewebespezifische Antigene exprimiert – Lymphozyten, die dagegen reagieren, werden eliminiert. Es sind Autoimmunerkrankungen bekannt, die durch Versagen der zentralen Toleranz bedingt sind: Defekte des für die Expression

gewebespezifischer Antigene verantwortlichen AIRE-Gens führen z.B. zum autoimmunen polyglandulären Syndrom 1 / APS-1.

Lymphozyten mit schwacher Autoreaktivität passieren gelegentlich die zentralen Toleranzmechanismen, werden aber in der Regel wegen fehlender PRR-vermittelter zweiter Signale peripher nicht aktiviert (sondern anerg). Manche Autoantigene können aber potentiell PRRs aktivieren (z.B. auch beim Menschen vorkommende unmethylierte DNA-Fragmente). Dies kann zu Autoreaktivität gegen strukturell Pathogen-ähnliche Antigene des Körpers führen.

Durch körpereigene Antigene ausgelöste Daueraktivierung von Lymphozyten in der Peripherie kann Anergie induzieren. Jedoch können in großen Mengen vorhandene potentielle Autoantigene (z.B. IgG), die einzeln keine Immunreaktion induzieren, bei Gruppierung (z.B. mit IgG opsonierte Mikroorganismen) durch eine Kreuzvernetzung des B-Zellrezeptors eine Autoantikörperantwort auslösen (z.B. Rheumafaktor, gegen IgG gerichtetes IgM).

Strukturen des Körpers, die normalerweise toleriert werden und zu denen das Immunsystem keinen uneingeschränkten Zugang hat, können unter bestimmten Voraussetzungen ohne Abstoßungsreaktionen transplantiert werden. Man nennt sie immunologisch privilegierte Strukturen (z.B. Hirn, Hoden/Keimzellen). Findet jedoch eine Immunisierung mit Antigenen privilegierter Strukturen abseits der normalen Antigenlokalisation statt, (etwa durch Verschleppung in die Blutbahn durch eine Verletzung), so können Immunreaktionen entstehen (z.B. sympathische Ophthalmie, Multiple Sklerose).

Eine weitere Ursache kann in einem Ungleichgewicht der unterschiedlichen zytokinproduzierenden und damit die Immunantwort modulierenden T-Zell-Subpopulationen bestehen. Eine besondere Stellung nehmen hier die T_{Regs} ein. Sie haben die Fähigkeit, autoreaktive Lymphozyten mit gleicher Gewebespezifität wie sie selbst durch antiinflammatorische Zytokine zu hemmen (IL-10, TGF- β).

Viele Immunantworten enthalten geringe Mengen autoreaktiver Lymphozyten. Solange ihre Zahl durch klonale Deletion in Grenzen gehalten werden kann, sind sie nicht ausreichend, um eine Autoimmunerkrankung auszulösen. Versagen diese Deletionsmechanismen (z.B. durch defekte apoptoseassoziierte Gene), so kann dies zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen beitragen. Auch ist eine infektionsassoziierte Aktivierung dieser autoreaktiven Zellen (Hochregulation stimulatorischer Moleküle nach PRR-Aktivierung, proinflammatorisches Zytokinmilieu) denkbar.

Die Molekulare Mimikry (Christen & von Herrath, 2004) ist eine weitere Ursache für autoreaktive Lymphozyten. Hier wird eine Immunreaktion gegen ein Pathogen-Epitop ausgebildet, das einem körpereigenen ähnelt oder gleicht. Neben der Reaktion gegen das Pathogen wird also eine

Immunantwort, die gegen körpereigene Strukturen kreuzreagiert, gebildet (z.B. rheumatisches Fieber nach Streptokokkus pyogenes-Infektionen oder die Lyme-Arthritis).

Die Entwicklung vieler Autoimmunerkrankungen steht ferner mit dem Vorkommen bestimmter HLA/MHC-Moleküle in Zusammenhang, die Autoreaktivität gegen bestimmte Antigene zu begünstigen scheinen (z.B. HLA-B27 bei Morbus Bechterew).

Die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ist jedoch komplex und kann in den meisten Fällen nicht auf einen einzigen Mechanismus reduziert werden. Sie stellt in der Regel ein Zusammenspiel mehrerer Autoimmunität begünstigender Mechanismen und Prozesse dar, von denen viele nicht vollständig verstanden sind.

2.3.3. Autoantikörper

Viele Autoimmunerkrankungen sind mit dem Auftreten bestimmter Autoantikörper assoziiert (Janeway et al., 2008, ss 610 - 626). Diese können selbst Teil des Pathomechanismus oder ein nicht selbst schädigender Ausdruck der vorliegenden Erkrankung sein. Ihre Kenntnis ist von großem Nutzen in der klinischen Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von Autoimmunerkrankungen. Auch die Kenntnis ihrer Rolle in der Pathogenese kann der Entwicklung von Therapiekonzepten dienen.

Antikörper, die körpereigene Antigene binden, können zur Zerstörung der betroffenen Gewebe beitragen, indem sie z.B. das Komplementsystem (Chemokinsignale, Opsonisierung, Ausbildung von Membranangriffskomplexen, Zellyse) und Fc-Rezeptor tragende Phagozyten aktivieren. Ein Beispiel für einen solchen Pathomechanismus ist die Hashimoto-Thyreoiditis (Autoantikörper gegen das Schilddrüsenenzym Thyreoperoxidase), eine die Schilddrüse zerstörende Erkrankung.

Eine Sonderform von Autoantikörpern sind diejenigen, die Rezeptoren aktivieren oder blockieren können. Beim Morbus Basedow wird die Schilddrüsenhormonproduktion durch Antikörper stimuliert, die den TSH-Rezeptor der Schilddrüse aktivieren. Dadurch entsteht eine Schilddrüsenüberfunktion. Gegensätzlich wirken die Autoantikörper bei der Myasthenia gravis: Sie inhibieren durch Blockierung des nikotinischen Acetylcholinrezeptors die neuromuskuläre Erregungsleitung – und führen damit zu Muskelschwäche.

Eine Kombination von Typ II- und III-Autoimmunreaktionen findet sich beim Goodpasture Syndrom: Antikörper binden die α_3 -Kette des Typ 4-Kollagens in den Basalmembranen der Gefäße von Nieren und Lunge. Einerseits aktivieren die gebundenen Antikörper eine Reihe von Leukozyten sowie das Komplementsystem, was zu Gewebeerstörung führt. Andererseits kann es, wenn Immunkomplexe aus der Zirkulation nicht ausreichend entfernt werden können, dazu kommen, dass

Immunkomplexe sich in anderen Organen ablagern und Leukozyten bzw. das Komplementsystem aktivieren – mit entsprechenden Gewebeschäden. Es kommt unbehandelt zur fulminanten Glomerulonephritis, eventuell auch zu Lungenbeteiligung mit möglicher Todesfolge. Auch beim SLE kommt es durch Bindung ubiquitärer Autoantigene (z.B. DNA und Histone) zur Überlastung der Immunkomplex-Clearance mit systemischen autoimmunen Auswirkungen.

Plazentagängige Autoantikörper von Typ IgG können von der Mutter auf den Fetus übertragen werden. Dies führt z.B. zur Übertragung einer Myasthenia gravis oder zu einem kongenitalen Herzblock bei Kindern von an SLE-erkrankten Müttern.

Autoantikörper haben auch einen hohen diagnostischen Nutzen (Burmester & Pezzutto, 1998, ss 170, 171; Dörner, 2006, ss 340 - 346; Renz-Polster, 2008, ss 1069, 1097): Für bestimmte Autoimmunerkrankungen spezifische, gut charakterisierte Autoantikörper spielen in der immunologischen Labormedizin eine große Rolle. Ihre Detektion ist bei der Diagnose von Autoimmunerkrankungen von unschätzbarem Wert. Generell werden in der Immunfluoreszenz detektierbare Autoantikörper-Muster (z.B. ANA, ANCA, AMA) von gegen definierte Antigene gerichteten Antikörpern (z.B. Anti Proteinase 3-AK, Anti Myeloperoxidase-AK, Anti Phospholipid-AK, uvm.), die mittels spezifischer Verfahren (z.B. ELISA) detektiert werden können, unterschieden.

Auch natürliche Autoantikörper (Natural autoantibodies, Nabs) sind beschrieben worden (Mouthon et al., 1995; Kohler et al., 2003; Lleo et al., 2010). Sie machen physiologischerweise einen großen Anteil der Serumimmunglobuline von Gesunden aus und sind unabhängig von exogener Stimulation. Diese, in Bezug auf ihre Reaktivität und ihr Auftreten interindividuell sehr unterschiedlichen, schwach affinen Antikörper sind meist polyreaktiv und können sowohl an Eigen-Antigene, als auch an Fremd-Antigene (teils Pathogene) binden. Krankheiten werden nicht durch sie induziert. Ihr Auftreten liegt vermutlich in der (nicht absoluten) Funktionsweise der positiven und negativen Selektionsmechanismen der Toleranz begründet. Die Funktion der Nabs im Immunsystem ist nicht hinreichend geklärt.

2.3.4. Vaskulitiden und ANCA

Vaskulitiden sind eine Erkrankungsgruppe, die mit Entzündungen der Gefäßwände einhergehen (Falk & Jennette, 1997; Jennette & Falk, 1997). Theoretisch können die Gefäße jedes Organs – und damit auch das Organ selbst – davon betroffen sein, besonders typisch sind jedoch der Befall von Nieren (Glomerulonephritis) und Atemwegen. Die Klinik besteht in der Regel aus einem oder mehreren der folgenden Symptome: abdominelle Schmerzen, Nephritis, Purpura, periphere Neuropathie, Myalgie, Arthralgie / Arthritis.

Die Einteilung der Vaskulitiden (Falk & Jennette, 1997; Jennette & Falk, 1997; Harper et al., 2000) erfolgt zunächst nach Größe der betroffenen Gefäße in Vaskulitiden der großen (Riesenzellararteriitis, Takayasu-Arteriitis), mittelgroßen (Polyarteriitis nodosa, Kawasaki-Syndrom) und kleinen Gefäße (Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener), Churg-Strauss-Syndrom, Mikroskopische Polyangiitis, Purpura Schönlein-Henoch, Essentielle Kryoglobulinämie, Kutane leukozytoklastische Angiitis). Eine Subgruppe der Kleingefäßentzündungen sind die pauci-immunen Vaskulitiden. Diese gehen nicht mit Antikörper- / Immunkomplexablagerungen in den Gefäßwänden oder Kryoglobulinen einher, sondern mit dem Auftreten von ANCA (anti Neutrophilen Zytoplasma Antikörper). Beispiele für pauci-immune Vaskulitiden sind: die Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener), das Churg-Strauss-Syndrom und die mikroskopische Polyangiitis.

Die Nomenklatur der ursprünglich von Wegener als eigenes Krankheitsbild beschriebenen Erkrankung (Wegener, 1937), traditionell als Wegenerschen Granulomatose bezeichnet, erfuhr jüngst eine Veränderung: Vertreter des American College of Rheumatology, der American Society of Nephrology und der European League Against Rheumatism einigten sich, im Rahmen von Bestrebungen, eine Vaskulitis-Nomenklatur ohne Eponyme zu schaffen, auf den neuen Namen Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), dem für eine Übergangsphase von einigen Jahren der Name Wegener weiterhin angefügt werden soll (Falk et al., 2011). Diesen Empfehlungen folgend wird in dieser Arbeit der Name Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener) für dieses Krankheitsbild verwendet.

Davies u. a. beschrieben erstmals das Auftreten von ANCA (Davies et al., 1982). ANCA binden in zwei typischen in der Immunfluoreszenz nachweisbaren Mustern an fixierte Neutrophile: zytoplasmatisch (cytoplasmic / cANCA) und perinukleär (pANCA). Sie werden zur Diagnostik der pauci-immunen Vaskulitiden herangezogen (Bosch et al., 2006). Auch die Zielantigene sind definiert worden: 90 % der pANCA sind spezifisch für Myeloperoxidase (MPO), 90% der cANCA für Proteinase 3 (PR3), beides Proteine, die in Vesikeln der Neutrophilen vorkommen. Die je

restlichen 10% gelten als atypische ANCA. In der Regel haben Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener) PR3-ANCA, die meisten Patienten mit Churg-Strauss-Syndrom oder Mikroskopischer Polyangiitis MPO-ANCA. Atypische ANCA dienen nicht der Diagnosestellung von ANCA-assoziierten Vaskulitiden. In vitro können ANCA Neutrophile aktivieren und führen so zu einer Dysregulation von Apoptose- und Phagozytosevorgängen.

Die Komplikationen der Vaskulitiden (z.B. rapid progressive Glomerulonephritis) sind potentiell lebensgefährlich. Daher müssen diese Erkrankungen schnell und exakt diagnostiziert und immunsuppressiv behandelt werden.

Auch ANCA-assoziierte Glomerulonephritiden ohne systemische Vaskulitiden (RLV, renal limited vasculitis) sind beschrieben worden (Morgan et al., 2006).

2.4. Untersuchte Autoantigene

2.4.1. LAMP2 (Lysosomen assoziiertes Membranprotein 2)

LAMP2 (CD107b) ist ein durch viele Arbeiten gut charakterisiertes Glykoprotein (Carlsson et al., 1988; Fukuda et al., 1988; Fritz et al., 1993; Eskelinen et al., 2003; *UniProt*: 14.12.2010, Accession: P13473 / LAMP2_HUMAN). Es ist ein 410 Aminosäuren großes, stark N- und O-glykosyliertes, vier Disulfidbrücken enthaltendes Typ I-Membranprotein, das seine Lokalisation dynamisch zwischen Lysosomen, Endosomen und der Zellmembran wechselt. Die Mehrheit der LAMP2-Moleküle ist in den Lysosomen lokalisiert, auf der Zellmembran findet es sich nur in geringer Zahl. Die Aminosäuren (AS) 1 bis 28 bilden das Signal-Peptid für exkretorische Proteine, die lumenale Domäne besteht aus den AS 29 bis 192 (erste lumenale Domäne), AS 193 bis 228 (Hinge-Region) und AS 229 bis 375 (zweite lumenale Domäne). Die AS 376 bis 399 bilden die helikale Transmembrandomäne, die AS 400 bis 410 die zytoplasmatische Domäne, welche die lysosomale Targetingsequenz enthält. Es existieren die drei Spleißvarianten LAMP2 A, -B und -C, die sich in ihrer lumenalen Domäne kaum unterscheiden. In der Transmembrandomäne und dem zytoplasmatischen Teil bestehen jedoch teils deutliche Unterschiede zwischen den Isoformen.

Beteiligt ist LAMP2 vermutlich an Tumorzellmetastasierungen, dem Schutz von Zellen vor Autodigestion, der Erhaltung des sauren Milieus der Lysosomen, Adhäsionsprozessen, intra- und interzellulärer Signaltransduktion, dem Schutz der Zelle vor den toxischen Effekten methylierender Substanzen, Chaperon-vermittelten Autophagieprozessen sowie der Antigenpräsentation durch MHC-II-Moleküle.

Unterschiedliche Mutationen im LAMP2-Gen können zur x-chromosomalen vakuolären

Kardiomyo-, Myo- und Enzephalopathie (Danonsche Erkrankung) führen (Arad et al., 2005). Holcombe et al. zeigten, dass der Anteil von LAMP2 auf der Oberfläche exprimierenden PBMCs (peripheral blood mononuclear cells / einkernige Zellen des peripheren Blutes) bei Sklerodermie-Patienten gegenüber Gesunden signifikant erhöht ist und das Ausmaß der Erhöhung mit der Krankheitsaktivität korreliert (Holcombe et al., 1993).

Autoantikörper gegen LAMP2 wurden als Mechanismus zur Entstehung einer rapid progredienten Glomerulonephritis (RPGN) vom pauci-immunen, fokal nekrotisierenden Typ (FNGN) beschrieben (Kain et al., 1995, 2008; Kallenberg et al., 2008). Sie sind atypische cANCA, haben bei FNGN-Patienten jedoch eine höhere Prävalenz als Antikörper gegen die kanonischen Zielproteine der ANCA (MPO und PR3). In vitro aktivieren anti LAMP2-Antikörper Neutrophile und führen zum Absterben von Endothelzellen. In Nagern lösen injizierte anti LAMP2-AK eine FNGN aus. Zwei Hauptepitope für die Bindung von LAMP2-AK aus Patientenserum wurden beschrieben: P₄₁₋₄₉ (HGTVTYNGS) und P₃₃₁₋₃₄₁ (QGKYSTAQDCS). Das Epitop P₄₁₋₄₉ zeigt 100% Homologie mit der reifen Form des bakteriellen Fimbrienproteins FimH (Vorkommen bei vielen gramnegativen Bakterien). Auch das Epitop P₃₃₁₋₃₄₁ zeigt unvollständige Homologien zu bakteriellen Proteinsequenzen. Ratten, die mit FimH immunisiert worden waren, entwickelten daraufhin Antikörperantworten, die gegen humanes und Ratten-LAMP2 kreuzreagierten und ein cANCA-Fluoreszenzmuster zeigten. Die immunisierten Tiere entwickelten weiterhin eine FNGN. Dieser Zusammenbruch der Eigentoleranz nach einer Immunisierung mit FimH, das von vielen gramnegativen Bakterien exprimiert wird, deutet auf eine durch Beteiligung molekularer Mimikry ausgelöste Autoimmunreaktion gegen LAMP2 hin. Die Titer dieser Autoantikörper fallen im Patientenserum nach Therapieinduktion rasch ab.

In Einzelfallberichten wurde außerdem das Auftreten von LAMP2-AK bei einem Fall von (mit Colitis ulcerosa assoziiertem) Pyoderma gangraenosum (Hoffman, 2001) sowie bei einem Fall eines Goodpasture-Syndroms mit anti-GBM-AK und MPO-ANCA (Etter et al., 2011) beschrieben.

2.4.2. Identifizierung putativer Autoantigene durch Cindy Hempp

In ihrer 2007 verfassten Diplomarbeit beschreibt Cindy Hempp putative, bisher nicht oder kaum charakterisierte Autoantigene (Hempp, 2007). Inhalt der Arbeit war die Analyse von Patientenserum, die mit immunologischen Fragestellungen in das immunologische Diagnostiklabor des UKE, Hamburg, gingen und ungewöhnliche ANA-Fluoreszenzmuster zeigten und deren Zielantigene durch spezifische ELISA-Verfahren nicht näher differenziert werden konnten. Diese Seren wurden

auf Proteinmakroarrays der Firma RZPD, die auf Grundlage einer cDNA-Expressionsbibliothek (Büssow et al., 2000) des humanen fötalen Gehirns hergestellt worden waren, auf die Reaktivität mit humanen Proteinen getestet.

Die entsprechenden proteinexprimierenden Bakterienklone, gegen deren Protein eine Reaktivität von Seren gezeigt werden konnte, wurden daraufhin von RZPD bezogen und die (mit einem His-Tag versehenen) Proteine wurden per Metallionen-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Es erfolgte anschließend die Bestätigung der Ergebnisse von den Proteinmakroarrays per Western-Blot. Durch dieses Verfahren wurden unter anderem die putativen Autoantigene LSM14, NOL8 und SHC2 identifiziert. Eine genaue Zuordnung der spezifischen Autoantikörper zu Krankheitsbildern oder ANA-Fluoreszenzmustern war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

2.4.2.1. LSM14 (SM-like protein 14; RNA-associated protein 55 / RAP 55)

LSM14 (Homolog A, in Vertebraten existiert außerdem noch das hochkonservierte Homolog B, wobei Homolog A ubiquitär exprimiert wird, Homolog B eventuell nur in Keimzellen) ist ein 55kDa schweres, 463 Aminosäuren langes Protein, das unter anderem an der Organisation von P-Körperchen (mRNA speichernde / abbauende Zellkompartimente, in posttranskriptionale Genregulierung involviert) beteiligt ist (Marnef et al., 2009; *UniProt*: 14.12.2010, Accession: Q8ND56 / LS14A_HUMAN). Die Homologe teilen diverse Domänen und Strukturen: die Lsm14-Domäne (Serin- und Threoninreiche Region), ein FDF(Phenylalanin-Aspartat-Phenylalanin)-Motiv, eine FFD-TGF box und ein RGG(Arginin-Glycin-Glycin)-Wiederholungsmotiv. Zusammen sind diese Strukturen an Translations-Unterdrückungsprozessen, Protein-Protein-Interaktionen, Aufnahme in mRNA-Partikel, P-Körperchen-Aufbau und Lokalisation in Stressgranula beteiligt. Generell scheint LSM14 in mRNA-Erkennungs-, Bindungs- und Degradationsprozesse involviert zu sein. Es besitzt diverse Phosphorylierungsstellen und wird bei DNA-Schädigung phosphoryliert. Ein Vorkommen von anti-P-Körperchen-Antikörpern in 5% der Patienten, die an Primärer Biliärer Zirrhose (PBC), einer autoimmunologischen Erkrankung unklarer Ätiologie, die mit progressiver Zerstörung der intrahepatischen Gallenkanälchen und daraus resultierender Fibrose und Leberversagen einhergeht, leiden, ist beschrieben worden (Bloch et al., 2005; Yang et al., 2006; Yang & Bloch, 2007). Einige dieser Antikörper, die in der Immunfluoreszenz das Muster der zytoplasmatischen Punkte / Dots zeigen, sind anti-LSM14-Antikörper.

Die Krankheitsbilder der LSM14-Antikörper positiven Patienten sind in Cindy Hempps Arbeit nicht angegeben. Eines von neun gesunden Kontrollseren reagierte in Cindy Hempps Versuchen im

Western-Blot gegen LSM14 (Hempp, 2007).

2.4.2.2. NOL8 (Nucleolar protein 8, NOP 132)

NOL8 ist ein 121,5 kDa schweres, 1167 Aminosäuren langes Protein, das vor allem in Magenkarzinomen vom diffusen Typ sowie schwach in Skelettmuskeln, nicht jedoch in den meisten anderen Geweben exprimiert wird (Jinawath et al., 2004; Sekiguchi et al., 2004, 2006; *UniProt*: 14.12.2010, Access: Q76FK4 / NOL8_HUMAN). Seine zelluläre Lokalisation sind die Nukleoli. NOL8 enthält ein RNA-Bindungsmotiv und wird posttranslational phosphoryliert. Außerdem interagiert es mit kleinen G-Proteinen der Ras-ähnlichen Familie sowie mit der RNA-Helicase DDX47 (beteiligt an der prä-rRNA-Prozessierung). Es spielt eine Rolle in der DNA-Replikation und der Regulation des Zellwachstums .

Meiner Kenntnis nach ist NOL8 (außer in Cindy Hempps Arbeit) noch nicht als Autoantigen beschrieben worden. Die Krankheitsbilder der NOL8-Antikörper positiven Patienten sind in Cindy Hempps Arbeit angegeben, wie in Tabelle 2.2. aufgeführt:

Tabelle 2.2.: Erkrankungen von NOL8-AK-positiven Patienten (nach Hempp, 2007)

Patient (NOL8)	Erkrankung(en)
Patient Nr. 1	Heerfordtsyndrom
Patient Nr. 2	Alopecia areata (hier ebenso Auftreten von anti SHC2-Antikörpern)
Patient Nr. 3	SLE-Overlap-Syndrom: Lupus discoides, Raynaud-Syndrom, Heberden- und Bouchardarthrose
Patient Nr. 4	Diabetes mellitus Typ II (multiple Komplikationen), Schmerzsyndrom
Patient Nr. 5	Mitralklappeninsuffizienz, Pulmonale Hypertonie
Patient Nr. 6	Thrombotisch bedingter ischämischer Insult, A. Carotis-Stenose, Zerebrale Arteriitis
Patient Nr. 7	Ulcus cruris

Keines von neun gesunden Kontrollseren reagierte in Cindy Hempps Versuchen im Western-Blot gegen NOL8 (Hempp, 2007).

2.4.2.3. SHC2 (SHC-transforming protein 2)

SHC2 ist ein 582 Aminosäuren langes, 61,9 kDa schweres Protein, das an Signaltransduktionsprozessen im ZNS beteiligt zu sein scheint (McGlade et al., 1992; Pelicci et al., 1992; Rozakis-Adcock et al., 1992; van der Geer et al., 1996a, b; Nakamura et al., 1998; Liu & Meakin, 2002; : 14.12.2010, Access: P98077 / SHC2_HUMAN *UniProt*). Es enthält eine SH2- (Src homolog 2) und eine PID-Domäne und wird im ZNS (v.A. Hypothalamus, Nucleus caudatus)

exprimiert. Mit der PID-Domäne bindet es an Phosphotyrosine unterschiedlicher Signalkaskademoleküle. SH2-Domänen sind an Autophosphorylierungen und ebenso an der Interaktion mit Phosphotyrosinen, bzw. der Bindung an weitere 2nd-messenger-Moleküle, die ihrerseits SH2-Domänen enthalten, beteiligt. SHC2 kann sowohl von membranständigen, als auch von zytoplasmatischen Tyrosinkinase phosphoryliert werden. Aufgrund struktureller Homologien zum ubiquitär exprimierten SHC-Protein (einem potenten, mitogenen Proto-Onkogen), wird angenommen, dass SHC2 eine Rolle in neuronalen, durch Tyrosinkinase (evtl. aktiviert durch Wachstumsfaktoren PDGF und EGF) vermittelten, Signalkaskaden (z.B. Src-Signalweg / Ras-MAP-Kinasekaskade) eine Rolle spielt .

Meiner Kenntnis nach ist SCH2 (außer in Cindy Hempps Arbeit) noch nicht als Autoantigen beschrieben worden.

Die Krankheitsbilder der SHC2-Antikörper positiven Patienten sind in Cindy Hempps Arbeit angegeben, wie in Tabelle 2.3. aufgeführt:

Tabelle 2.3.: Erkrankungen von SHC2-AK-positiven Patienten (nach Hempp, 2007)

Patient (SHC2)	Erkrankung(en)
Patient Nr. 1	Pulmonale Hypertonie bei chronischer Thromboembolie der Lunge, Nicht näher bezeichnete pulmonale Herzkrankheit
Patient Nr. 2	Juvenile Spondylitis ankylosans (M. Bechterew)
Patient Nr. 3	Fieber unklarer Ursache, Entzündung des Ganglion geniculi
Patient Nr. 4	Alopezia areata
Patient Nr. 5	Alopezia areata (hier ebenso Auftreten von NOL8-AK)

Zwei von fünf Patienten mit anti SHC2-Antikörpern litten an einer Alopezia areata (kreisrunder Haarausfall). Keines von neun gesunden Kontrollseren reagierte in Cindy Hempps Versuchen im Western-Blot gegen SHC2 (Hempp, 2007).

2.5. Immunisierung und Antikörperproduktion

Zur gezielten Produktion von polyklonalen Immunsereen oder monoklonalen Antikörpern dient die Immunisierung (Janeway et al., 2008, ss 735 - 740). In ihr werden definierte (meist Protein-) Immunogene einem Tier oder Menschen (z.B. Impfung) mit dem Ziel einer Antikörperantwort verabreicht. Im Serum lässt sich dann die Antikörperantwort (z.B. via ELISA) messen. Ein häufiges Phänomen hierbei ist die Kreuzreaktivität – also Reaktivität gegen strukturähnliche Antigene.

Die Immunisierung erfolgt meist in einer Grundimmunisierung (oder Priming, Etablierung einer primären Immunantwort) und mehreren Boost-Schritten, um die Spezifität und den Titer der

Antikörperantwort anzuheben. Die Stärke der Immunantwort hängt von der Beschaffenheit des Antigens (Molekülart, Größe, Denaturierungsgrad, Löslichkeit, usw.) sowie von der Zugabe von Adjuvantien (reaktionsverstärkend) und dem Zuführungsweg (subcutan, intramuskulär, per os, usw.) ab.

Eine besondere Art der Immunisierung ist die DNA-Immunisierung (Webster & Robinson, 1997; Koch-Nolte et al., 2005; Möller et al., 2007). Hier wird z.B. mittels Gene Gun die für das Zielprotein der gewünschten Antikörper codierende DNA in die Zellen eines Organismus eingebracht. Die DNA muss z.B. durch Verwendung eines eukaryontischen Expressionplasmids so modifiziert sein, dass das Antigen dem Immunsystem zugänglich von den Zellen des Organismus hergestellt wird. Dieses Verfahren stellt sicher, dass Antikörper gegen die native Konformation des Antigens (ADAPINCs / antibodies directed against proteins in native conformation) hergestellt werden; diese sind besonders geeignet für Immunfluoreszenztest- und Immunpräzipitationsverfahren, im Gegensatz zu Antikörpern aus Immunisierungen mit synthetischen Peptiden, die meist nur effektiv in Western-Blot-Analysen einsetzbar sind.

Die Möglichkeit der DNA-Transfektion vitaler Zellen in lebenden Organismen durch Eintätowieren von DNA-Lösung ist beschrieben worden (Webster & Robinson, 1997; Bins et al., 2005, 2007; Pokorna et al., 2008). Hierbei werden unter anderem die antigenpräsentierenden Langerhans-Zellen transfiziert. Auch die Induktion von Antikörperantworten durch DNA-Immunisierung per Tätowierung ist möglich, sie ist sogar ohne Zugabe von Adjuvantien effizienter als eine intramuskuläre DNA-Injektion mit Adjuvantien. Die Gene Gun-Immunisierung gilt jedoch als die effizienteste Technik unter den DNA-Immunisierungsverfahren.

3. Materialien

3.1. Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller / Lieferant
Analysewaage	Type 1412	Sartorius (Göttingen)
Autoklav	2540EK	Tuttnauer (Breda, Niederlande)
Brutschrank	CO ₂ Incubator	Sanyo (Bad Nenndorf)
Brutschrank	Incubat	Melag (Berlin)
Digitalkamera	PowerShot G2	Canon (Krefeld)
Durchflusszytometer	FACS Calibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
ELISA-Automat	Phadia 250	Phadia (Österreich, Wien)
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 25	Zeiss (Oberkochen)
Fluoreszenzmikroskop	Olympus IX81	Olympus (Hamburg)
Fotodokumentation	-	Peqlab (Erlangen)
Gene Gun	Helios	BioRad (München)
Gelelektrophoresekammer	klein	Peqlab (Erlangen)
Gelelektrophoresekammer	groß	Owl Separation Systems (Rochester, NY, USA)
Goldkopplungsanlage	Tubing Prep Station	BioRad (München)
Magnet	Easy Sep	Stemcell, (Grenoble, Frankreich)
Lichtmikroskop	47 17 01 - 9901	Zeiss (Oberkochen)
Objektiv	1095 - 522	Canon (Krefeld)
PCR-Maschine	T Gradient	Biometra (Göttingen)
PCR-Maschine	Programmable Thermal Controller	MJ Research (Waltham, MA, USA)
Photometer	Ultrospec	Pharmacia Biotech (Stockholm, Schweden)
Schlauchschnidegerät	Tubing Cutter	BioRad (München)
Schüttelinkubator	Unitron	Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
Spannungsquelle	BI 0105 BVD	Biometra (Göttingen)
Sterile Werkbank	20229	MDH (Leeds, UK)
Stickstofftank	Level Controller Type M305CE	Taylor-Wharton (Husum)
Tätowiergerät	SP-2256	Profitec (Geesthacht)
Tätowiernadel	10fach-Nadel	Profitec (Geesthacht)
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Tischzentrifuge	i Spin	Promega (Mannheim)
Tischzentrifuge	5417 R	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallbad	Sono Rex Super 10P	Bandelin (Berlin)
UV-Werkbank	Electrophoresis Documentation and Analysis System	Kodak (Stuttgart)
Vortex	VF2	Janke & Kunkel (Staufen)
Zählkammer	Neubauer improved	LaborOptik (Friedrichsdorf)
Zentrifuge	Rotanta 460 R	Hettich (Tuttlingen)

3.2. Verbrauchsmaterialien und Kits

Verbrauchsmaterial	Format / Volumen	Hersteller / Lieferant
ANCA Test Slides (Ethanol fixiert)	6 / 12 Auftragstellen	A.Menarini (Berlin)
ANCA Test Slides (Formalin fixiert)	6 / 12 Auftragstellen	A.Menarini (Berlin)
Butterfly	BD Vacutainer	Becton Dickinson (Heidelberg)
Cryo-Röhrchen	1,8ml	NUNC (Langenselbold)
Deckgläschen	24 x 60 mm	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
EDTA K Monovette	2,7 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Einwegspritzen	10ml	Sarstedt (Nümbrecht)
FACS-Röhrchen	5ml, Polystyren	Becton Dickinson (Heidelberg)
Falcon-Röhrchen	15ml / 50ml konisch	Greiner (Solingen)
Filtrationseinheit (steril)	Stericup, 150ml	Millipore (Billerica, MA, USA)
Impfösen	Einweg	Greiner (Solingen)
LAMP2 Test Slides	Transfizierte CHO IdID	AG Kain (Wien, Österreich)
Mikrotiterplatten	96well, Flat-Bottom	NUNC (Langenselbold)
Mikrotiterplatten	96well, V-Bottom	Greiner (Solingen)
Mini Plastic Tubes	1,2ml, round bottom	Ratiolab (Dreieich)
Parafilm	Parafilm „M“	Pechiney (Menasha, WI, USA)
Petrischalen	Ø 8,75 cm	Greiner (Solingen)
Pipettenspitzen	Verschiedene Größen	Sarstedt (Nümbrecht)
Plastikschlauch	Tefzel Tubing	BioRad (München)
Polypropylenröhrchen	14 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße	0,2 / 0,5 / 1,5 / 2,0 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Saugies	Biognost	Bios (München)
Zellkulturflaschen	T25 / T75	NUNC (Langenselbold)
Kits	Größe	Hersteller / Lieferant
EndoFree Plasmid Maxi Kit	10 preps	QIAGEN (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	250 preps	QIAGEN (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	250 preps	QIAGEN (Hilden)

3.3. Chemikalien, Puffer und Wasser

Das zum Ansetzen der Bakterienkulturmedien und des Agars sowie für das Ansetzen von TAE-Puffer verwendete Wasser wurde zuvor über die zentrale Aufbereitungsanlage des Campus Forschung des UKE bis zu einer Qualität von Aqua dest. (vollentsalzt) aufgereinigt. Sofern erforderlich, erfolgte eine Sterilisation durch Autoklavieren (30 Minuten, 121°C) in einem Autoklaven Modell 2540EK (Tuttnauer). Polymerase-Kettenreaktionen sowie Primer-Lösungen wurden mit LiChrosolv-Wasser (Merck, Darmstadt) angesetzt. Für Reaktionen mit Restriktionsenzymen wurde Aqua ad injectabilia (Braun) verwendet.

Chemikalie	Konzentration / Art	Hersteller / Lieferant
Agarose	UltraPure Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Aqua ad injectabilia	100ml	Braun (Melsungen)
CaCl ₂	Salz, 500g	Serva (Heidelberg)
DPBS -/-	1x, 500ml	Gibco (Karlsruhe)
DPBS +/-	1x, 500ml	Gibco (Karlsruhe)
Ethanol	99,90%	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	10 mg/ml	Molecular Probes / Invitrogen (Darmstadt)
Goldpartikel	1µm Ø, Gold microcarriers	BioRad (München)
Isopropanol	>99,8%	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
LiChrosolv H ₂ O	-	Merck (Darmstadt)
NaCl-Lösung	0,9 %, steril	Braun (Melsungen)
Na-Acetat	Pulver	Merck (Darmstadt)
Na-Acid	99,00%	Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Pulver	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PMA	100 µg/ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Poly-L-Lysin	0,01%, steril	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Polyvinyl Pyrrolidon	-	BioRad (München)
Spermidin	> 98%	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Stickstoff	Gasflasche	Linde (Pullach)
TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer	50x, DNA Typing Grade	Gibco (Karlsruhe)

3.4. Medien & Zellkulturreagenzien

LB-Medium und Agar wurden nach dem Ansetzen nach Herstellerangaben aber vor der Zugabe von Antibiotika autoklaviert. Die Zusätze zu eukaryotischen Zellkulturmedien wurden vor der Zugabe in steriles Zellkulturmedium in einem Stericup sterilfiltriert.

Bakterienkultur	Komponenten	Hersteller / Lieferant
LB-Agar	-	Becton Dickinson (Heidelberg)
LB _{Carb} -Agar	LB-Agar Carbenicillin 100µg/ml	Becton Dickinson (Heidelberg) Serva (Heidelberg)
LB-Medium	-	Invitrogen (Karlsruhe)
LB _{Carb} -Medium	LB-Medium Carbenicillin 100µg/ml	Invitrogen (Karlsruhe) Serva (Heidelberg)
SOC-Medium	-	Invitrogen (Karlsruhe)
Eukaryotische Zellkultur	Komponenten	Hersteller / Lieferant
DMEM 500ml	-	Gibco (Karlsruhe)
DMEM (komplett)	DMEM 500ml	Gibco (Karlsruhe)
	5ml Na-Pyruvat (KONZ)	Gibco (Karlsruhe)
	5ml Glutamin	Gibco (Karlsruhe)
	5ml HEPES	Gibco (Karlsruhe)
	5ml NEAA	Gibco (Karlsruhe)
DMEM _{Blasticidin}	25ml FCS (inaktiviert)	PAA (Pasching, Österreich)
	DMEM (komplett)	-
	Blasticidin (10µg/ml)	InvivoGen (Toulouse, Frankreich)
Einfriermedium	10ml FCS	PAA (Pasching, Österreich)
	2ml DMSO	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypsin 10x	8ml DMEM (komplett)	-
	-	Gibco (Karlsruhe)

3.5. Zusätze

Zusatz	Konzentration	Hersteller / Lieferant
DNA loading dye	6x	Fermentas (St. Leon-Rot)
Blasticidin-Stammlösung	10mg/ml	InvivoGen (Toulouse, Frankreich)
β-Mercaptoethanol	2,4M	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
Carbenicillin	Pulver	Serva (Heidelberg)
DMSO	-	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Fötales Kälberserum (FCS)	-	PAA (Pasching, Österreich)
Generuler 1kb DNA ladder	-	Fermentas (St. Leon-Rot)
Gentamycin-Stammlösung	50mg/ml	Gibco (Karlsruhe)
L-Glutamin	100x	Gibco (Karlsruhe)
HEPES	100x	Gibco (Karlsruhe)
JetPEI transfection reagent	-	Polyplus / Peqlab (Erlangen)
Na-Pyruvat	100x	Gibco (Karlsruhe)
NEAA	100x	Gibco (Karlsruhe)
Präparat - Eindeckmedium	Eindeckmedium perm.	Generic Assays (Dahlewitz)
Tätowierfarbe	Animal Tattoo Ink Green paste	Ketchum (Brockville, ON, Canada)

3.6. Oligonukleotide

Oligonukleotid-Primer für den Einsatz in der Polymerase-Kettenreaktion wurden mit Hilfe der Lasergene-Programme SeqMan, SeqBuilder und EditSeq (DNA Star, Madison, WI, USA) sowie der NCBI-Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entworfen. Die Synthese erfolgte durch die Firma Metabion (Martinsried).

In den hier dargestellten Primersequenzen sind Nukleotide, die von der amplifizierten Originalsequenz abweichen, also Schnittstellen / Aminosäureaustausche einbringen, als Kleinbuchstaben dargestellt. **Schnittstellensequenzen** sind **rot** markiert.

3.6.1. Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation

Name	Sequenz	Schnittstelle	Amplifizierter Strang
LAMP2_23_Bam_F	5' - GCT GTG gga TCc TAT GCA TTG GAA C - 3'	BamHI	Codogener Strang
LAMP2_190_Sal_R	5' - AGT TTT GTC gac ATC ACA CAG GAA C - 3'	Sall	Komplemetärstrang
LAMP2_377_Sal_R	5' - TAT GGG gtC gAc GAA GTT GTC GTC - 3'	Sall	Komplemetärstrang
LAMP2_5utr_Hind	5' - GTG TTG aAG CTt TTG TTG TAC CGC CG - 3'	HindIII	Codogener Strang
LSM_1_Bgl_F	5' - GCC ATG AGC aGa TCt TCA GGC ACC - 3'	BglII	Codogener Strang
LSM_385_Hind_R	5' - CCC TCA agC ttT GCC AGT CCC GGC CC - 3'	HindIII	Komplemetärstrang
NOL8_769_Bam_F	5' - GCG GAC Gga Tcc GGG CAA AAA GC - 3'	BamHI	Codogener Strang
NOL8_970_Hind_R	5' - TTT TTa aGC TTT ACT TTC TTT TGG C - 3'	HindIII	Komplemetärstrang
PR3_28_Bam_F	5' - CGA GCT Gga tcc ATC GTG GGC GGG CAC - 3'	BamHI	Codogener Strang
PR3_252_Hind_R	5' - GCC CTa aGC tTC CAC ACG GCG CAG CG - 3'	HindIII	Komplemetärstrang

3.6.2. Oligonukleotide zur Mutagenese

Zur Mutagenese von Plasmiden wurden revers komplementäre Primerpaare verwendet.

Name	Sequenz	Mutation	Amplifizierter Strang
LAMP2 B to A F	5' - GCC CAA GAc TGT TCG gcG GAT GA - 3'	E367D, L370A	Codogener Strang
LAMP2 B to A R	5' - TCA TCC gcC GAA CAg TCT TGG GC - 3'	E367D, L370A	Komplementärstrang
LAMP2 LysTX F	5' - GTT ATG CTG GAc ATC AGA CTC TG - 3'	Y407H	Codogener Strang
LAMP2 LysTX R	5' - CAG AGT CTG ATg TCC AGC ATAAC - 3'	Y407H	Komplementärstrang
PR3_S176A_F	5' - TTC GGA GAC gCA GGT GGC CCC - 3'	S176A	Codogener Strang
PR3_S176A_R	5' - GGG GCC ACC TGc GTC TCC GAA - 3'	S176A	Komplementärstrang

3.6.3. Oligonukleotide für die Sequenzierung

Primernamen	Sequenz	Sequenzrichtung
BGH rev	5' - TAG AAG GCA CAG TCG AGG - 3'	Revers
pQE 30 fov	5' - CCC GAA AAG TGC CAC CTG - 3'	Vorwärts
SHC2walkingfov	5' - CCC ACC CCC TCC TTT GCC TGG - 3'	Vorwärts
T7	5' - TAA TAC GAG TCA CTA TAG GGA - 3'	Vorwärts
TAF	5' - CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC - 3'	Vorwärts
TAR	5' - GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA G - 3'	Revers

3.7. Plasmide & Klone

Plasmide	Verwendungszweck	Quelle
pCMV-SPORT6/hART4	Transfektion, genetische Immunisierung	UKE, Inst. f. Immunologie
pD8F Leervektor	Transfektion, genetische Immunisierung	UKE, Inst. f. Immunologie
cDNA-Klone	Verwendungszweck	Quelle
LAMP2 in pOTB7 (<i>IRAU</i> p969A0717D)	Matritze für Umklonierung	Imagenes (Berlin)
LSM14 in pQE30 (<i>MPMG</i> p800K20545Q207)	Matritze für Umklonierung	RZPD (Berlin)
NOL8 in pQE30 (<i>MPMG</i> p800J01523Q207)	Matritze für Umklonierung	RZPD (Berlin)
Proteinase 3 in pCR II (<i>IRAM</i> p995E012Q)	Matritze für Umklonierung	Imagenes (Berlin)
SHC2 in pQE30 (<i>MPMG</i> p800A13562Q209)	Sequenzierung	RZPD (Berlin)
Co-Transfektion	Verwendungszweck	Quelle
eGFP in pCMV-SPORT6	Co-Transfektion für IFT	UKE, Inst. f. Immunologie
pCDNA6 Leervektor	Co-Transfektion für Blastidinresistenz	UKE, Inst. f. Immunologie

3.8. Antikörper / Seren

Für FACS-Analysen sowie indirekte Immunfluoreszenztests mit fixierten Zellen (ANCA-Schnitte, von Renate Kain, Klinisches Institut für Pathologie, Medizinische Universität Wien, Österreich, zur Verfügung gestellte LAMP2-Testslides) wurden die Antikörper jeweils in DPBS +/- verdünnt. Im Falle von indirekten Immunfluoreszenztests mit vitalen Zellen wurde DPBS +/- verwendet.

Primärantikörper	Spezies	Konjugat	Klon	Hersteller / Lieferant
M2 / anti FLAG-Tag	Maus	-	M2	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Anti human LAMP2	Maus	-	H4B4	eBioscience (Frankfurt)
Anti human LAMP2	Maus	Biotin	H4B4	eBioscience (Frankfurt)
Anti human Proteinase 3	Maus	FITC	PR3-G2	Hycult (Uden, Niederlande)
Sekundärantikörper	Spezies	Konjugat	Klon	Hersteller / Lieferant
Anti Maus IgG (H+L)	Ziege	PE	-	Dianova (Hamburg)
Anti Maus IgG (H+L)	Ziege	FITC	-	Dianova (Hamburg)
Anti Maus IgG (H+L)	Ziege	Alexa 647	A-21236	Molecular Probes / Invitrogen (Darmstadt)
Anti Human IgG (Fc)	Ziege	Biotin	-	Dianova (Hamburg)
Anti Human IgG (H+L)	Ziege	FITC	-	Dianova (Hamburg)
Anti Human IgG (H+L)	Ziege	PE	-	Dianova (Hamburg)
Anti Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	FITC	-	Dianova (Hamburg)
Anti Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	PE	-	Dianova (Hamburg)
Anti Ratte IgG (H+L)	Ziege	FITC	-	Dianova (Hamburg)
Anti Ratte IgG (H+L)	Ziege	PE	-	Dianova (Hamburg)
Streptavidin-Konjugate	Konjugat		Hersteller / Lieferant	
Streptavidin	PE		Dianova (Hamburg)	
Streptavidin	APC		Becton Dickinson (Heidelberg)	
Kernfarbstoff	Farbstoff		Hersteller / Lieferant	
Hoechst 33342	Bisbenzimid H 33342		Fluka (Buchs, Schweiz)	
Zellsortierung	Markierungstechnik		Hersteller / Lieferant	
EasySep Cell Sorting Kit	PE Selection Cocktail		Stemcell (Grenoble, Frankreich)	

Die Erstellung der verwendeten Tierseren wird im Methodikteil unter 4.3.1. und 4.3.2. beschrieben, eine Übersicht über die für die gesammelten Humanseren ist unter 4.3.1.3. / Tabelle 4.5. gegeben.

3.9. Enzyme & zugehörige Supplemente

Die Benennung der Restriktionsendonukleasen in dieser Arbeit folgt der von Roberts et. al. vorgeschlagenen Nomenklatur (Roberts et al., 2003).

Restriktionsenzyme	Aktivität	Hersteller / Lieferant
BamHI	20 U/µl	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
BglII	10 U/µl	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
DpnI	20 U/µl	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
EcoRI	20 U/µl	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
HindIII	20 U/µl	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
NotI	10 U/µl	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Scal	10 U/µl	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Sall	100 U/µl	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
DNA-Polymerase	Aktivität	Hersteller / Lieferant
Pfu Turbo	2,5 U/µl	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
Ligase	Aktivität	Hersteller / Lieferant
T4-Ligase	5 U/µl	Invitrogen (Karlsruhe)
Alkalische Phosphatase	Aktivität	Hersteller / Lieferant
Antarctic Phosphatase	5 U/µl	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Puffer / Supplemente	Konzentration	Hersteller / Lieferant
Antarctic Buffer	10x	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
BSA	100x	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Cloned Pfu Buffer	10x	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
dATP	100mM	Invitrogen (Karlsruhe)
dCTP	100mM	Invitrogen (Karlsruhe)
dGTP	100mM	Invitrogen (Karlsruhe)
dTTP	100mM	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTPs	10mM/Nukleotid	-
N.E.B. Puffer 2	10x	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
N.E.B. Puffer 3	10x	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
N.E.B. Puffer 4	10x	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
N.E.B. Puffer EcoRI	10x	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
T4-Ligase-Puffer	5x	Invitrogen (Karlsruhe)

3.10. Bakterienstämme

Für die Transformation von Ligationsansätzen und Plasmid-Präparationen wurden ultrakompetente XL10-GOLD *E. coli*-Zellen der Firma Stratagene (Amsterdam, Niederlande) verwendet.

3.11. Zelllinien

Es wurden zwei eukaryontische Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

1. HEK293T-Zellen (Human Embryonic Kidney 293, exprimiert zusätzlich das zur Replikation einiger Viren benötigte „SV40 Large T-Antigen“) aus den Beständen des Instituts für Immunologie,

Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg.

2. CHO IdID-Zellen (Chinese Hamster Ovary) Die Synthese des für die O-Glykosylierung essentiellen UDP-N-Acetylgalaktosamins der IdID-Zelllinie ist durch Mutation inaktiviert. N-Acetylgalaktosamin ist der erste Zuckerrest, der bei der O-Glykosylierung an die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin angefügt wird. Damit ist diese Zelllinie O-Glykosylierungs-defizient. Dieses O-Glykosylierungsdefizit kann durch Zugabe von N-Acetylgalaktosamin ins Nährmedium aufgehoben werden (Kozarsky et al., 1988). Diese Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Renate Kain, Klinisches Institut für Pathologie, Medizinische Universität Wien, Österreich zur Verfügung gestellt.

3.12. Tierexperimente

3.12.1. Versuchstiere

Für die Immunisierungs-Experimente wurden vier Kaninchen (CHB) und vier Ratten (Wistar) im Alter von je 12 Wochen von der Firma Charles River (Wilmington, MA, USA) bezogen.

Zur Enthaarung der Tiere wurde Enthaarungscreme von Balea (Karlsruhe) verwendet.

3.12.2. Narkotika

Narkotikum	Konzentration / Menge	Hersteller / Lieferant
Ketamin	10ml, 115,3mg	Gräub (Bern, Schweiz)
Trapanal	20ml, 0,5g	Nycomed (Hamburg)
Xylacin	25ml, 20mg	Nycomed (Hamburg)
Xylocain	1,8ml, 2%	Densply (Konstanz)

3.13. Software und Recherche

Verwendung	Programm	Hersteller / Lieferant
FACS-Auswertung	Cellquest pro	Becton Dickinson (Heidelberg)
DNA-Sequenzanalyse	Seq Man	DNA Star (Madison, WI, USA)
	Seq Builder	
	Edit Seq	
Verwendung	Website / Tool	url
Literaturrecherche	Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Proteindatenbankrecherche	Uniprot	http://www.uniprot.org/
DNA-Datenbankrecherche	NCBI Gendatenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Sequenzdienstleister	SeqLab	http://seqlab.de/

4. Methoden

4.1. Molekularbiologische Methoden

4.1.1. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien wurde in LB-Medium bei 37°C im Schüttelinkubator vorgenommen. Zur Plasmidselektion wurden dem Medium 100 µg/ml Carbenicillin zugegeben.

Als Festmedium diente LB-Agar (nach den Angaben des Herstellers angesetzt und zur Selektion mit 100 µg/ml versetzt) in Petrischalen (Durchmesser: 8,75cm).

4.1.2. Transformation kompetenter E.coli-Zellen

Die Hitzeschock-Transformation (nach vorherigem Zusatz von β-Mercaptoethanol) chemisch ultrakompetenter XL10-GOLD-Zellen der Firma Stratagene (Amsterdam, Niederlande) wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Ligationen und Mutationen nach DpnI-Verdau wurden unverdünnt transformiert, MiniPreps wurden 1:200, Maxipreps 1:1000 vorverdünnt re-transformiert.

4.1.3. Arbeiten mit DNA

4.1.3.1. Präparation von Plasmid-DNA

Je nach dem weiteren Verwendungszweck und der benötigten Menge an Plasmid wurden zwei verschiedene Kits zur Präparation angewendet.

Für Sequenzanalysen und Klonierungen wurden *E. coli*-Kulturen eines Volumens von 5 ml kultiviert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) präpariert.

Für die genetische Immunisierung und die Transfektion von eukaryontischen Zellen wurden größere Mengen endotoxinfreier Plasmid-DNA benötigt, sodass *E. coli*-Kulturen eines Volumens von 100 ml kultiviert und die Plasmide mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) präpariert wurden.

4.1.3.2. Quantifizierung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde spektralphotometrisch ermittelt, wobei anschließend die folgende Formel angewendet wurde: $Konzentration\ dsDNA = A_{260} \times 50\ \mu g/ml \times Verdünnung$.

Als Qualitätsmerkmal galt das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} , welches $\geq 1,8$ sein sollte.

4.1.3.3. PCR-Amplifikation und Einbringen von Restriktionsschnittstellen

Zur PCR-Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente aus cDNA-Klonen wurde die DNA-Polymerase Pfu Turbo (Invitrogen) in Kombination mit entsprechenden Oligonukleotiden verwendet (Tab. 4.1). Die Primer wurden so entworfen, dass Restriktionsschnittstellen zur späteren Umklonierung in eukaryontische Expressionsvektoren an den Enden der amplifizierten Genfragmente einmütiert wurden (siehe 3.6.1. Oligonukleotide). Von der Originalsequenz abweichende Nukleotide wurden von mindesten 15 perfekt mit der Matrize paarenden Nukleotiden flankiert. Als DNA-Matrize diente 1 µl DNA-Miniprep (ca. 250 - 600 ng/µl). Für den Amplifikationsvorgang wurde eine „GG17-Touchdown“-PCR programmiert (Tab. 4.2).

Tab. 4.1.: Ansatz PCR-Amplifikation

	PCR-Ansatz (Standard)	Hersteller / Lieferant
1µl	Plasmid DNA Miniprep (QIAGEN)	-
2µl	Primer forw. 10µM	Metabion (Martinsried)
2µl	Primer rev. 10µM	Metabion (Martinsried)
5µl	Cloned Pfu Buffer 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
1µl	DNTPs 10mM pro Nukleotid	Invitrogen (Karlsruhe)
1µl	Pfu Turbo DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
ad 50µl	LiChrosolv H ₂ O	Merck (Darmstadt)

Tab. 4.2.: GG17-Touchdown-PCR-Programm

Schritt	Dauer	Temperatur (°C)	Zyklenzahl	Rückkehr zu
1	0h 5m 0s	94		
2	0h 0m 45s	94		
3	0h 0m 45s	65		
4	0h 1m 30s	72	2x	2
5	0h 0m 45s	94		
6	0h 0m 45s	60		
7	0h 1m 30s	72	2x	5
8	0h 0m 45s	94		
9	0h 0m 45s	55		
10	0h 1m 30s	72	35x	8
11	0h 10m 0s	72		
12	∞	4		

4.1.3.4. Zielgerichtete PCR-Mutagenese

Für die PCR-Mutagenese, durch die ein oder mehrere Nukleotide in einem Gen zielgerichtet verändert werden sollten, wurde die Polymerase Pfu Turbo (Invitrogen) eingesetzt (Tab. 4.3). Die für die Mutagenesen konzipierten Primer waren stets komplementäre Primerpaare. Eine zu mutierende Nukleotidfolge wurde von Primerabschnitten von mindestens 15 perfekt mit der Matrize

paarenden Nukleotiden flankiert. Es wurde das in Tabelle 4.4 dargestellte „PCR-Mutagenese-Programm“ verwendet.

Tab. 4.3.: Ansatz PCR-Mutagenese

Menge	PCR-Ansatz (Mutagenese)	Hersteller / Lieferant
1µl	DNA-Matrize (MaxiPrep / MiniPrep)	-
1,25µl	Primer forw.	Metabion (Martinsried)
1,25µl	Primer rev.	Metabion (Martinsried)
5µl	Cloned Pfu Buffer 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
1µl	DNTPs 10mM pro Nukleotid	Invitrogen (Karlsruhe)
1µl	Pfu Turbo DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
ad 50µl	LiChrosolv H ₂ O	Merck (Darmstadt)

Tab.: 4.4.: Mutagenese-PCR-Programm

Schritt	Dauer	Temperatur (°C)	Zyklenzahl	Rückkehr zu
1	0h 0m 30s	95		
2	0h 0m 30s	95		
3	0h 1m 0s	55		
4	0h 7m 0s	68	17x	2
5	0h 10m 0s	68		
6	∞	4		

Nach der Polymerase-Kettenreaktion wurde dem Ansatz 1 µl DpnI (20 U/µl) zugesetzt. Dieser wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. 1 µl des verdauten Mutageneseansatzes wurde nach Agarosegelelektrophorese und DNA-Elution aus dem Gel in XL10-Gold ultrakompetente Zellen transformiert und auf LB_{Carb}-Agarplatten ausgestrichen. 5 ml-Kulturen in LB_{Carb}-Medium angeimpft wurden mit je einer Einzelkolonie. Aus der Kultur wurde nach Inkubation Plasmid-DNA isoliert (MiniPrep) und durch Sequenzierung der Erfolg der Mutagenese überprüft. Nach Re-Transformation, Selektion auf LB_{Carb}-Agarplatten und Animpfen von 100ml LB_{Carb}-Medium mit einer Einzelkolonie konnte auch von mutierten Plasmiden Maxipreps nach QIAGEN erstellt werden.

4.1.3.5. Restriktionsverdau von DNA

Zur Restriktion von DNA-Fragmenten oder Plasmid-DNA wurden mindestens 1 U der entsprechenden Endonuklease pro µg DNA und der vom Hersteller (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) empfohlene Reaktionspuffer sowie ggf. BSA verwendet. Der Verdau erfolgte bei 37°C im Heizblock. Informationen bezüglich des geeigneten Puffers und der Notwendigkeit des Zusatzes von BSA wurden den Herstellerinformationen auf der New England Biolabs-Homepage entnommen. Der Verdau erfolgte für 2,5 Stunden bei Klonierungen oder 30 Minuten bei Kontrollverdauen. Für „Double Digest“-Ansätze mit zwei Restriktionsenzymen wurde das „Double

Digest Finder“-Tool auf der New England Biolabs-Homepage verwendet (www.neb.com).

4.1.3.5. Agarose-Gelelektrophorese mit DNA-Proben

Für die größenabhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Es wurden Agarosekonzentrationen von 1.0% (w/v) mit 0.1 µg/ml Ethidiumbromid in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) eingesetzt. DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen 6x DNA Loading Dye (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 70 bis 120 Volt. Nukleinsäurebanden wurden nach Beendigung des Gellaufes über das mit ihnen interkalierende Ethidiumbromid unter UV-Strahlung analysiert und fotografisch dokumentiert.

4.1.3.6. DNA-Standard

Als Längen- sowie Massenstandard fand der Marker „1kb DNA Ladder“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) Verwendung.

4.1.3.7. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN (Hilden) verwendet. Im letzten Schritt des verwendeten Protokolls („using a microcentrifuge“) wurde standardmäßig das minimale Elutionsvolumen von 30 µl EB-Puffer gewählt.

4.1.3.8. Dephosphorylierung von linearisierten Plasmidvektoren

Für die Dephosphorylierung zur Vermeidung einer Re-Ligation eines Vektors mit sich selbst, anstatt einem amplifizierten DNA-Insert wurde die alkalische Phosphatase „Antarctic Phosphatase“ (N.E.B., Ipswich, MA, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Die Inkubation erfolgte eine Stunde im Heizblock bei 37°C, die Inaktivierung für 20 Minuten bei 65°C.

4.1.3.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die während dieser Arbeit durchgeführten Ligrationsreaktionen wurde die T4 DNA Ligase der Firma Invitrogen (Karlsruhe) sowie der zugehörige Puffer verwendet. Dabei wurde nach den Empfehlungen des Herstellers verfahren.

4.1.3.10.: Sequenzanalyse von DNA

Die Sequenzierungen wurden als „Extend Hot Shot“-Sequenzen durch die Firma SeqLab vorgenommen. Im Labor mussten vor dem Versand pro Sequenzreaktion lediglich 2 µl des Sequenzprimers (Konzentration: 10µM) sowie 700ng präparierte Plasmid-DNA (Mini- oder Maxiprep) mit LiChrosolv-Wasser (Merck, Darmstadt) auf 7 µl aufgefüllt und die Bestellung online aufgegeben werden. (<http://seqlab.de/>)

4.2. Zellbiologische Methoden

4.2.1. Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die adhärenenten HEK T- und CHO ldlD-Zellen wurden in DMEM komplett in T25- , bzw. T75-Zellkulturflaschen bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit / 5 % CO₂ kultiviert.

Die Subkultivierung erfolgte unter der sterilen Werkbank durch Abnahme des Medium, spülen der Zellen mit DPBS „- / -“ und Abtrypsinierung der Zellen. Unter dem Lichtmikroskop wurde der Erfolg der Trypsinierungsreaktion kontrolliert, die Reaktion anschließend mit DMEM komplett in vierfachem Überschuss zum Trypsin gestoppt. Nach Abzentrifugation (1600rpm, Rotanta 460 R, 4°C, 5min) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in einer Verdünnung im Verhältnis 1:5 bis 1:20 in frischem DMEM komplett in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Subkultivierung erfolgte im Abstand von zwei bis drei Tagen.

4.2.2. Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zahl von Zellen in einer Zellsuspension wurde eine Neubauer- Zählkammer (Neubauer improved, LaborOptik) mit einer Tiefe von 0,1 mm verwendet. Hierbei wurde stellvertretend ein 10 µl-Aliquot einer Suspension untersucht, die Zellzahl in der Ausgangssuspension anschließend rechnerisch bestimmt.

4.2.3. Transfektion eukaryontischer Zellen mit Konstrukten in Expressionsvektoren

4.2.3.1. Transiente Transfektion

Nach der Herstellung von DNA-Konstrukten in eukaryontischen Expressionsvektoren konnten die verwendeten Zelllinien mit diesen transfiziert werden. Transfizierte Zellen wurden dann 24 bis 48 Stunden nach Transfektion im FACS oder der indirekten Immunfluoreszenz weiter untersucht.

Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Lipofektion mit Hilfe des jetPEI-Systems. Hierbei wurde

nach den Empfehlungen des Herstellers verfahren (üblicherweise wurde eine T25-Flasche, in der die Zellen ca. 70% konfluent gewachsen waren, mit 5µg Plasmid-DNA transfiziert).

Für einige indirekte Immunfluoreszenztests erfolgte die Co-Transfektion mit einem nukleär exprimierten EGFP-Konstrukt. Die Menge der eingesetzten Co-Transfektante betrug 1/10 der Haupttransfektante (meist 0,5µg).

4.2.3.2. Stabile Transfektion

Um die Expressionskonstrukte stabil exprimierende Zelllinien zu erhalten, erfolgte die Transfektion, wie unter 4.2.3.1. beschrieben, jedoch mit einigen Modifikationen:

a) Die Plasmide wurden zur Hälfte linearisiert eingesetzt (dies ermöglicht einen besseren stabilen Einbau der DNA-Konstrukte in die Zellen), also erfolgte die Transfektion mit 2,5µg zirkulärer Plasmid-DNA und 2,5µg linearisierter Plasmid-DNA. Die Linearisierung wurde mittels eines Restriktionsverdau der Plasmide mit dem Enzym ScaI im (auf allen verwendeten Expressionsvektoren vorhandenen) Ampicillin-Resistenzgen, und anschließender Agarosegelelektrophorese sowie Elution der geschnittenen DNA aus dem Gel durchgeführt.

b) Es erfolgte eine Co-Transfektion mit 1µg des das Blasticidin-Resistenzgen tragenden pCDNA6-Leervektors. Auch dieser wurde zur Hälfte (0,5µg) linearisiert eingesetzt (ebenfalls Verdau mit ScaI).

c) 24 Stunden nach Transfektion wurde der Erfolg der Transfektion im FACS überprüft. Bei Erfolg wurden die Zellen zur Selektion der stabil transfizierten Zellen von da an mit DMEM komplett + Blasticidin (1µl Blasticidin pro ml DMEM) versorgt. Innerhalb der nächsten vier Wochen starb dann ein Großteil der nicht transfizierten Zellen ab, die Transfektante blieb in den überlebenden Zellen erhalten.

d) Um den Anteil der das Konstrukt exprimierenden Zellen zu erhöhen, wurde die Antikörperbasierte Zellsortierung (4.2.4.) eingesetzt.

4.2.4. Antikörperbasierte Zellsortierung

Um den Anteil von das Konstrukt exprimierenden Zellen zu erhöhen, wurde die antikörperbasierte

Zellsortierung mit Hilfe des Easy Sep-Kits verwendet. Dies war möglich, da die verwendeten Konstrukte auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Die Sortierung erfolgte, indem das betreffende Zielantigen mit das Fluorochrom PE tragenden Antikörpern markiert wurde. Dann erfolgte mithilfe des „PE Selection Cocktails“ die Kopplung der Fluorochrome mit magnetischen Microbeads. Die eigentliche Sortierung erfolgt mit dem Easy-Sep-Magneten, der die auf diese Weise mit den magnetischen Partikeln markierten Zellen anzieht, während man die nichtmarkierten Zellen dekantiert.

Es wurde nach dem Easy Sep-PE-Selection-Protokoll des Herstellers verfahren. Hierbei wurde der Fc-Blocking-Schritt (Schritt 2) ausgelassen.

Die Markierung mit PE erfolgte über zwei Antikörper: Als Erstantikörper wurde der den von allen Konstrukten getragenen FLAG-Tag bindende murine M2-Antikörper (Sigma-Aldrich, Verdünnung 1:1000) verwendet. Dieser wurde dann mit einem Anti-Maus IgG bindenden, PE-konjugierten Zweitantikörper (Dianova, Verdünnung 1:200) markiert.

4.3. Immunologische Methoden

4.3.1. Präparation von Seren

4.3.1.1. Gewinnung von Tierseren

Gewonnene Blutproben immunisierter Tiere wurden, nach der Koagulationsreaktion, in einer Tischzentrifuge bei 10.000 rpm, Raumtemperatur für zehn Minuten abzentrifugiert. Der Serumüberstand konnte nun mit einer Pipette vom „Blutkuchen“ abgenommen und in ein neues Eppendorftube überführt werden. Zur Inaktivierung des Komplementsystems erfolgte dann die Erhitzung auf 56°C in einem Wasserbad (Dauer: 30 Minuten). Diese Seren wurden mit 0,05 % Na-Acid versetzt und bei 4°C gelagert.

4.3.1.2. Gewinnung von Patientenseren

Patientenblutproben wurden im Routinebetrieb des klinischen Diagnostiklabors von den dortigen Mitarbeitern zu Serum weiterverarbeitet. Vor FACS- oder IFT-Analysen auf eukaryontischen Zellen wurden diese Seren, wie unter 4.3.1.1. beschrieben, ebenfalls inaktiviert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C oder kurzfristig bei 4°C ohne Zusätze.

4.3.1.3. Verwendete Serensammlung

Im Rahmen der Experimente wurden anonymisierte Patientenserum (einige mit bekannten vorliegenden Erkrankungen) aus mehreren Quellen verwendet (s. Tab. 4.5.). Elena Csernok (Abteilung für Rheumatologie, Uni Lübeck und Rheumaklinik Bad Bramstedt), Renate Kain (Klinisches Institut für Pathologie, Medizinische Universität Wien, Österreich) und Thorsten Krieger (AescuLab, Hamburg) stellten uns freundlicherweise diverse für uns interessante Seren zur Verfügung. Renate Kain sandte uns zweimal je 9 Humanseren, von denen jeweils vier (welche nicht markiert) positiv für LAMP2-AK getestet worden waren sowie 5 Negativkontrollen.

Tab. 4.5.: Verwendete Humanseren

JHS Serensammlung	Charakteristik	Herkunft
Nr. 1 - 64	Atypische ANA-Muster	Diagnostiklabor, Institut. f. Immunologie, UKE
Nr. 65 - 174	Sammlung auffälliger Befunde / Diagnosen *	Diagnostiklabor, Institut. f. Immunologie, UKE
Nr. 175 - 390	Aus Hepatologie / Gastroenterologie	Diagnostiklabor Institut. f. Immunologie, UKE
Sammlung E. Csernok	Charakteristik	Herkunft
RA 1 - 20	Rheumatoide Arthritis	Elena Csernok, Med. Uni Lübeck
SLE 1 - 15	Systemischer Lupus Erythematodes	Elena Csernok, Med. Uni Lübeck
GPAGN 1 - 30	Glomerulonephritis bei Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener)	Elena Csernok, Med. Uni Lübeck
Sammlung R. Kain	Charakteristik	Herkunft
Kain 1.1 - 1.9	LAMP2-AK-positive und negative Seren	Renate Kain, Med. Uni Wien
Kain 2.1 - 2.9	LAMP2-AK-positive und negative Seren	Renate Kain, Med. Uni Wien
Sammlung T. Krieger	Charakteristik	Herkunft
TK 1 - 15	Sarkoidose	Thorsten Krieger, AescuLab, Hamburg

* Die Sammlung auffälliger Befunde / Diagnosen wurde zusammengestellt aus anonymisierten Seren, bei denen auffällige immunologische Laborbefunde (hohe ANCA-/ANA-Titer, hohe anti PR3-/MPO-AK, diverse andere Autoantikörperkonstellationen) sowie seltene und/oder interessant erscheinende autoimmunologische Erkrankungen, zum Beispiel GPA (WG), SLE, Antiphospholipidsyndrom, Alopecia areata, Zöliakie, uvm., vorhanden waren.

4.3.2. DNA-Immunisierung von Ratten und Kaninchen

Die DNA-Immunisierung ist eine Immunisierungstechnik, die vor allem zur Erzeugung von Antikörpern, die gegen Proteine in nativer Konformation gerichtet sind, geeignet ist (Koch-Nolte et al., 2005; Möller et al., 2007).

Das Konzept dieser Immunisierungstechnik ist, dass nicht ein Peptid oder Protein, gegen das Antikörper gebildet werden sollen, selbst injiziert werden, sondern die dafür codierende DNA-Sequenz (in einem geeigneten Expressionsvektor). Die Einbringung der DNA kann in verschiedene Kompartimente erfolgen (intra- und subcutan, intramuskulär). Nach dem Prinzip der genetischen Immunisierung sollten Zellen der Haut, der Muskulatur, oder Antigen präsentierende Zellen (Langerhans-Zellen) bei ihrer Wanderung durch die Epidermis, transfiziert werden. Durch entsprechende Modifikation der in den Expressionsvektor klonierten cDNA-Sequenz (leader-Sequenz für Proteinexport sowie eine Membranverankerung) wird das „Fremdprotein“ dann nicht nur von den körpereigenen Zellen des immunisierten Organismus produziert, sondern auf der Zelloberfläche, also den relevanten Effektorzellen des Immunsystems für eine Antikörperantwort gut zugänglich exprimiert. Eine Antikörperantwort gegen in Vivo exprimiertes und gefaltetes Protein ist die Folge.

In den durchgeführten Versuchen sollte die Immunisierung per Gene Gun mit der Immunisierung durch per Tätowierung intracutan eingebrachter Plasmidlösung verglichen werden. Das zur Immunisierung verwendete DNA-Konstrukt war das beide extrazelluläre Domänen von LAMP2 enthaltende Konstrukt pD8F/LAMP2B (inklusive FLAG Tag, Cmyc Tag und PDGF-Rezeptor-Transmembrandomäne, s. 5.1.).

4.3.2.1. Herstellung von Gene Gun-Munition

Versuchsvorbereitung: Die gewünschte DNA musste als EndoFree MaxiPrep (QIAGEN, Konzentration $\geq 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) vorliegen. Der verwendete Ethanol (99,9%) wurde aus einer ungeöffneten Flasche genommen. Eine Gasflasche mit molekularem Stickstoff musste vorhanden sein. Pro 80 Patronen wurden 5mg Goldcarrier (BioRad) abgewogen und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt.

1mg PVP (Polyvinyl Pyrrolidon) wurde abgewogen und zusammen mit 20ml frischem Ethanol in ein 50ml FALCON-Tube überführt (Endkonz.: 0,05mg/ml). Weiterhin wurden 0,05M Spermidin aufgetaut und eine 1M CaCl_2 -Lösung vorbereitet.

DNA-Fällung: 50µg Maxiprep DNA wurden entnommen, mit EndoFreeTE-Puffer (aus QIAGEN Maxiprep-Kit) auf 100µl Gesamtvolumen aufgefüllt und anschließend 10µl 3M NaAcetat und 300µl frischer Ethanol abs (99,9%) zugegeben. Nach vortexten der Präparation erfolgte die Fällung bei -20°C über eine Stunde.

Anschließend wurde die Präparation 30 Minuten bei 20.000rpm, 4°C in einer Tischzentrifuge (5467 R, Eppendorf) abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, ohne das Pellet zu beschädigen.

Nach dem Waschen des Pellets mit 250µl EndoToxinFree Ethanol (QIAGEN Maxiprep Kit), folgte wieder die Abzentrifugation der DNA in einer Tischzentrifuge (Biofuge pico, Heraeus) für 15 Minuten bei 13.000rpm, Raumtemperatur. Der Überstand wurde wieder ohne Beschädigung des Pellets abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde nach Lufttrocknung 50µl EndoToxinFree TE-Puffer (QIAGEN Maxiprep Kit) aufgenommen.

Gold-Kopplung: Nach Voreinstellung des Ultraschallbades (Bandelin Sono Rex) auf Stufe 10 wurden 25mg Gold in 100µl 0,05M Spermidin aufgenommen, gevortext und eine Minute in das Ultraschallbad gehalten.

50µl gefällte, gewaschene DNA wurde nun auf die Goldlösung gegeben und die Mischung gevortext. Die anschließende tropfenweise Zugabe von 100µl 1M CaCl₂-Lösung in das Falcon-Tube erfolgte unter Vortexen und die Gold-DNA-CaCl₂-Mischung wurde dann 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

In einer kleinen Tischzentrifuge (i Spin, Promega) wurde die Mischung 30 Sekunden lang abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet musste nun dreimal mit je 1ml frischem Ethanol abs. gewaschen und nach jedem Schritt 30 Sekunden abzentrifugiert werden. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Ein vierter Waschvorgang erfolgte mit 1ml PVP-Ethanol (siehe Versuchsvorbereitung). Nach Verwerfen auch dieses Überstandes wurde das Pellet in 3ml PVP-Ethanol aufgenommen. Die Suspension war nun fertig zur Tube-Beladung (Patronenherstellung).

Schlauch(Tube)-Beladung: Während der 10minütigen Inkubation der DNA-Gold-Suspension mit der CaCl₂-Lösung wurde der Schlauch zur Beladung vorbereitet.

Ein zu beladender Schlauch (Tefzel Tubing, BioRad, München) wurde in die Tubing-Prep-Station (BioRad, München) eingeführt und so zugeschnitten, dass 10 bis 15cm am offenen Ende der

PrepStation überstanden. Die Waschung des Schlauches erfolgte, indem der Ethanol abs aus dem vorbereiteten FalconTube (s. Versuchsvorbereitung) mithilfe einer Spritze mehrfach eingespritzt und abgezogen wurde. Nach Entfernung des Ethanols konnte der Schlauch in der Prep-Station unter N₂-Zufuhr (Stufe 3 bis 4) für ca. 15 Minuten getrocknet werden (die Trocknung musste direkt vor der Beladung erfolgen). Wenn der Schlauch komplett getrocknet war, wurde das Gas abgestellt und die Gold-Suspension nach nochmaligem Vortexen mit einer passenden Spritze zügig in den Schlauch geladen. Die Sedimentation der Gold-Suspension erfolgte nun für einige Minuten in, mittels der Präp-Station unterschiedlich gedrehten, Schlauchpositionen (0° und 180°) sowie unter konstanter Drehung des Schlauches. Nun konnte das PVP-Ethanol langsam (in etwa 20 Sekunden) mit einer Spritze abgezogen werden. Der Schlauch wurde dann durch Durchfluss von N₂ (Stufe 3 bis 4) für 3 bis 5 Minuten getrocknet.

Mithilfe eines Tubing-Cutters (Bio-Rad, München) wurden 10mm lange Stücke (Patronen) aus dem getrockneten Schlauch geschnitten. Die beiden Endstücke des Schlauches wurden aufgrund von schlechter Goldsedimentation verworfen. Als Aufbewahrungsgefäß diente ein luftdicht verschließbares Glasgefäß mit einer Trocknungspatrone.

4.3.2.2. Immunisierung per Gene Gun

Die Durchführung der Immunisierung erfolgte bei Kaninchen auf dem rasierten und mit Enthaarungscreme enthaarten Rücken ohne Narkose. Ratten mussten vor dem Rasieren mit 0,5ml / 10g Körpergewicht einer Mischung aus Ketamin und Xylacin i.p. narkotisiert und anschließend durch Rasur und Einsatz von Enthaarungscreme enthaart werden.

Mit Hilfe einer Helios Gene Gun (Bio-Rad, München) wurden auf den enthaarten Stellen zwölf Patronen für Kaninchen bzw. acht Patronen bei Ratten per Gasdruckbeschleunigung mit 400-500 psi appliziert. Abbildung 4.1. zeigt exemplarisch Bilder von der Durchführung der Gene Gun Immunisierung.



Abb. 4.1.: Gene Gun-Immunisierung; links: Ratte, rechts: Kaninchen (Bilder aus dem Archiv des Instituts für Immunologie, UK Eppendorf, Hamburg)

4.3.2.3. Immunisierung per Tätowierung

Vorbereitung der Versuchstiere:

Kaninchen: Die Versuchstiere wurden rasiert und mit Enthaarungscreme enthaart. Nach Verabreichung von initial 25mg/kg Trapanal i.v. zur Sedierung (und bei Nichtausreichen ggf. Nachapplikation) wurden zwei 1,5 bis 2,5 cm² große Areale auf der enthaarten Stelle mit einem Stift markiert und zur Schmerzlinderung aufgrund der erfahrungsgemäß geringeren Narkosetiefe bei diesem Sedationsprotokoll mit je 1,5ml Xylocain (2%) unterspritzt.

Ratten: Die Versuchstiere wurden mit einer Mischung aus Ketamin und Xylacin (1,2 ml Ketamin, 0,8ml Xylacin + 8ml NaCl, isoton) i.p. narkotisiert und wie die Kaninchen enthaart. Auf der enthaarten Stelle wurde nun ein 1,5 bis 2,5 cm² großes Areal mit einem Stift markiert. Hier war keine Lokalanästhesie nötig.

Vorbereitung der zu tätowierenden DNA-Lösungen:

Es wurden DNA-Maxipreps nach QIAGEN verwendet. Pro Markierung (zwei auf Kaninchen, eine auf Ratten) wurden 20 µl Maxiprep (Konz.: 2,3µg/µl) mit ca. 1-2µl Tätowierfarbe vermischt, um kontrollieren zu können, ob die Lösung in die Haut eingedrungen war.

Immunisierung:

Die Maxiprep-DNA-Tätowierfarbe-Mischung wurde nun nacheinander auf die markierten Stellen pipettiert und mit einer gereinigten, desinfizierten Zehnfachnadel und einem SP2256-Tätowiergerät

(Profitec) bei 1,3 bis 1,5 Volt für 30 Sekunden auf dem gesamten markierten Areal der narkotisierten (und im Falle der Kaninchen lokalanästhetisch) behandelten Tiere eintätowiert (je eine Tätowierung pro Ratte, zwei Tätowierungen bei Kaninchen). Kaninchen erhielten also die doppelte DNA-Dosis. Abbildung 4.2. zeigt die Durchführung der Tattoo-Immunisierung.



Abb. 4.2.: Tattoo-Immunisierung; links: Ratte, rechts: Kaninchen

4.3.2.4. Immunisierungsplan und Durchführung der DNA-Immunisierungen

Es wurden je zwei Ratten (R66, R67) und zwei Kaninchen (K124, K125) per Gene Gun und zwei Ratten (R68, R69) und zwei Kaninchen (K126, K127) per Tätowierung immunisiert.

Vor der ersten Immunisierung erfolgte bei allen Tieren eine Blutentnahme (0,5ml) zur Gewinnung von Präimmunseren (pIS).

Die Immunisierung erfolgte mit einer Grundimmunisierung und drei BOOST-Immunisierungen, um den Antikörpertiter zu erhöhen. Die erste BOOST-Immunisierung fand bei allen Tieren sechs Wochen nach der Grundimmunisierung, die zweite BOOST-Immunisierung drei Wochen nach BOOST 1 statt. Der dritte BOOST schließlich erfolgte drei Wochen nach dem zweiten BOOST. Tabelle 4.6. zeigt die Termine der Immunisierungen.

Tab. 4.6.: Immunisierungsplan

Immunisierung	Gene Gun (K124, K125, R66, R67)	Tätowierung (K126, K127, R68, R69)
Grundimmunisierung	26.08.09	27.08.09
1. BOOST	07.10.09	08.10.09
2. BOOST	28.10.09	29.10.09
3. BOOST	18.11.09	18.11.09

Zur Dokumentation wurde die immunisierte Hautstelle direkt nach jeder Immunisierung fotografiert, ebenso am Folgetag der Immunisierung.

Zur Kontrolle der Antikörperproduktion wurden vierzehn Tage nach dem dritten BOOST wieder 0,5ml Blut abgenommen und wie oben beschrieben (s. 4.3.1.1.) zu Serum (Immuneserum / IS) weiterverarbeitet und haltbar gemacht.

4.3.3. Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting / FACS)

4.3.3.1. Durchflusszytometrie allgemein

Dieses Verfahren ermöglicht die Analyse einer großen Zahl von Zellen in kurzer Zeit. Die zu untersuchenden Zellen werden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern oder fluoreszierenden Molekülen oder Farbstoffen angefärbt und durch eine Kapillare gespült, sodass ein Strom einzelner Zellen entsteht. Hierbei werden die Einzelzellen von einem Laserstrahl definierter Wellenlänge bestrahlt. Photodetektoren messen die durch die Zelle verursachte Streuung des Lichtes und die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Diese Informationen werden durch einen Computer mit entsprechender Software (*Cellquest pro*, Becton Dickinson) analysiert und interpretiert.

Bei der Lichtstreuung wird die Vorwärts-Streuung (*Forward Scatter*), die dem Schatten einer angestrahlten Zelle entspricht und ein Maß für ihre Größe darstellt, von der seitlichen Streuung (*Side Scatter*), einem Maß für die Granularität der Zelle, unterschieden. Die detektierte Fluoreszenz entspricht in ihrer Intensität der Stärke der Anfärbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern bzw. fluoreszierenden Molekülen. Sie erlaubt daher sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussagen über die Expressionsstärke des entsprechenden Antigens oder Interaktionspartners.

Die Epitope der für solche Untersuchungen eingesetzten Antikörper können sowohl Zelloberflächenproteine als auch Modifikationen an solchen sein. In dieser Arbeit wird der Nachweis gebundener Serumantikörper aus Human- oder Tierseren an ein spezifisches Antigen auf der Zelloberfläche exprimierende Zellen als Nachweissystem verwendet.

4.3.3.2. Anfärbung mit Serum- und monoklonalen Antikörpern

Nachweisreaktionen mit Antikörpern wurden in 4ml FACS-Röhrchen (BD, Heidelberg) oder 96-well Platten mit V-Boden (Greiner, Solingen) an Aliquots von ca. 5×10^5 transfizierten oder untransfizierten Zellen pro Ansatz durchgeführt. Für alle Inkubationsschritte wurden die Antikörper

in 100 µl DPBS -/- gelöst. Die Waschschritte erfolgten mit 4ml DPBS -/- für Ansätze in FACS-Röhrchen oder 100 µl DPBS -/- für Ansätze in 96well V-Boden-Platten. Zentrifugationen erfolgten für 5 Minuten bei 4°C und 1600rpm (Rotanta 460 R). Antikörperinkubationen fanden in unterschiedlichen Verdünnungen, je nach vorheriger Austitrierung der Antikörper statt (s. Tab. 4.7.). Die Inkubation eines Antikörpers / Serums mit den Zellen erfolgte je für 30 Minuten, die Inkubation fluorochrommarkierter Antikörper fand im Dunkeln statt. Bei Verwendung unkonjugierter Antikörper / Seren wurde nach der ersten Inkubation und einem Waschschritt eine zweite Inkubation mit einem oder mehreren entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper(n) durchgeführt. Danach erfolgte wieder ein Waschschritt. (Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden in 96-well V-Boden-Platten vorbereitete Ansätze in FACS-Röhrchen überführt.) Die fertig gefärbten und gewaschenen Proben wurden mit DPBS auf ein Volumen von 300 µl aufgefüllt.

Tab. 4.7.: *Verwendete Antikörper und Verdünnungen (FACS)*

Erstantikörper	Verdünnung (wenn nicht im Ergebnisteil anders angegeben)
Humanserum	1:20
Tierserum (Ratte / Kaninchen)	1:200
M2 / anti FLAG Tag	1:1000
Anti cMyc Tag	1:100
Anti human LAMP2	1:200
Anti human LAMP2 Biotin	1:200
Zweitantikörper	Verdünnung (wenn nicht im Ergebnisteil anders angegeben)
Anti human IgG PE	1:300
Anti human PR3 FITC	1:100
Anti Kaninchen IgG PE	1:300
Anti Ratte IgG PE	1:300
Anti Maus IgG Alexa 647	1:200
Streptavidin APC	1:200

4.3.4. Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

Der indirekte Immunfluoreszenztest ermöglicht, ähnlich wie das FACS, den Nachweis gebundener fluorochromkonjugierter Antikörper auf Zellen. Hierzu werden transfizierte oder untransfizierte Zellen auf 96-well Plastikplatten oder Glasträgern fixiert und anschließend mit Antikörpern und evtl. einem DNA-Farbstoff gefärbt. Die Analyse erfolgt unter einem Fluoreszenzmikroskop, das die Fluorochrome mit dem Licht einer Quecksilberdampflampe anregt. Unterschiedliche Farbfilter ermöglichen das optische Trennen verschiedenfarbiger Fluorochrome.

Blaufilter: BP 566/12, FT 560, BP 575-640 (Hoechst 33342)

Grünfilter: BP 450-490, FT 510, LP 515 (eGFP, FITC)

Rotfilter: BP 546, FT 580, LP 590 (PE)

Rot-Grünfilter: BP 450-490, FT 510, BP 515-565 (eGFP, FITC, PE)

Die Analyse erfolgt mikroskopisch und die Ergebnisse werden fotografisch festgehalten.

Auswertung und Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe des Olympus IX 81-Mikroskopes im Falle von ANCA-Testungen (4.3.4.2. und 4.3.4.4.). Im Falle von vitalen eukaryontischen Zellen oder LAMP2-Testträgern der AG Kain, Wien (4.3.4.1 und 4.3.4.3.) wurden das Axiovert 25-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) mit einer Canon PowerShot G2-Digitalkamera und einem entsprechenden Adapterobjektiv verwendet.

4.3.4.1. Vitale eukaryontischen Zellen

Zur Untersuchung transfizierter eukaryontischer Zellen wurden diese zwei Tage vor der Untersuchung mithilfe des jetPEI-Systems mit den entsprechenden Expressionskonstrukten transfiziert. Nach 24 Stunden konnten die Zellen aus der Zellkulturflasche abtrypsinieren, zentrifugiert, in neues Medium überführt und auf eine lysinierte 96-well Platte (mit 50 µl sterilem Poly-L-Lysin, 0,01 %, pro well für 30 Minuten inkubiert und nach Abnahme des Poly-L-Lysins getrocknet) überführt werden (je 100 µl Zellen aus einer in 5ml Medium resuspendierten vollen T25-Flasche pro Napf). Die Zellen verblieben wieder über Nacht im Brutschrank, um absedimentieren und festwachsen zu können. Am Folgetag konnte nach Abnahme des Zellkulturmediums die Färbung mit Antikörpern in mehreren Schritten erfolgen. Die Vorinkubation mit Poly-L-Lysin bewirkte, dass die Zellen, obwohl sie vor der Färbung nicht (z.B. mit PFA) fixiert worden waren, bei den Waschsritten an der Platte haften blieben.

Alle Inkubations- und Waschsritte wurden mit je 100 µl DPBS „+/+“ durchgeführt. Die Inkubation eines Antikörpers/Serums (Verdünnungen s. Tab. 4.8.) mit den Zellen erfolgte je für 60 Minuten bei Raumtemperatur, die Inkubation fluorochrommarkierter Antikörper fand im Dunkeln statt. Bei Verwendung unkonjugierter Antikörper / Seren wurde nach der ersten Inkubation und drei Waschsritten eine zweite Inkubation mit einem oder mehreren entsprechenden Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper(n) durchgeführt. Danach erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 (Endkonzentration 1:10.000) für 15 Minuten, anschließend wieder drei Waschsritte. Zu den fertig gefärbten und gewaschenen Zellen wurden, um sie vor Austrocknung zu schützen, 100 µl DPBS „+/+“ gegeben. Anschließend erfolgte die Mikroskopie

und Fotodokumentation.

Alternativ fand ein leicht modifiziertes Protokoll (Fast-Protokoll) Verwendung: Die Zellen wurden hier direkt mit im Medium befindlicher Transfektionslösung ausplattiert, die Trypsinierung aus der Zellkulturflasche nach 24 Stunden mit dann erst folgender Ausplattierung und einer weiteren Wartezeit bis zum Folgetag wurde also eingespart. Der Rest des Protokolls erfolgte gleich.

Tab. 4.8.: *Verwendete Antikörper und Verdünnungen (IFT vitale Zellen)*

Erstantikörper	Verdünnung (wenn nicht im Ergebnisteil anders angegeben)
Humanserum	1:20
Tierserum (Ratte / Kaninchen)	1:200
M2 / anti FLAG Tag	1:1000
Anti human LAMP2	1:200
Zweitantikörper	Verdünnung (wenn nicht im Ergebnisteil anders angegeben)
Anti human IgG PE	1:300
Anti Kaninchen IgG PE	1:300
Anti Ratte IgG PE	1:300
Anti Maus IgG FITC	1:100
Anti Maus IgG PE	1:300

4.3.4.2. ANCA-Testung von Tierseren

Die Färbung wurde auf Glasträgern mit fixierten humanen neutrophilen Granulozyten für den Routinebetrieb in Diagnostiklabors (A. Menarini) durchgeführt.

Die Testung wurde mit je einem Tierserum (pIS oder IS von K124, K125, K126, K127, R66, R67 Verdünnung 1:100) als Erstantikörper sowie dessen Detektion durch einen speziesspezifischen, FITC-markierten anti IgG-Zweitantikörper durchgeführt. Für alle Verdünnungen wurde DPBS -/- verwendet.

Es wurden 30 µl verdünntes Tierserum pro Auftragestelle eingesetzt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit (Raumtemperatur) wurde die Serumlösung mit sogenannten 'Saugies' abgetupft und der Objektträger drei mal fünf Minuten in einer mit frischem DPBS -/- gefüllten Glasküvette geschwenkt. (IKA HS260 basic) Anschließend erfolgte der Nachweis gebundener Serumantikörper mit 25 µl eines FITC-konjugierten anti Ratte- oder anti Kaninchen-IgG-Zweitantikörpers (Verdünnung 1:100). Die Inkubation fand für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur statt. Es erfolgten die gleichen Abtupf- und Waschschrte, wie nach der Erstantikörperfärbung. Nach dem dritten Waschschrte wurde der Objektträger noch einmal in Aqua bidest getaucht, anschließend wieder abgetupft und mit Eindeckmedium und einem Deckgläschen eingedeckt.

4.3.4.3. LAMP 2-Testträger der AG Kain, Wien

Um die Reaktivität positiv für Antikörper gegen LAMP 2 getesteter Seren auch mit einem anderen, unabhängigen System testen zu können, erfolgte die Testung der Seren auf diesem System. Die Testträger aus Glas, mit darauf fixierten CHO IdID-Zellen (untransfiziert oder mit einem Expressionskonstrukt für nur am intrazellulären lysosomalen Targetingsignal modifizierten LAMP2 transfiziert), wurden uns freundlicherweise von Renate Kain (Klinisches Institut für Pathologie, Medizinische Universität Wien, Österreich) zur Verfügung gestellt.

Die Färbung erfolgte mit 30 µl in DPBS +/- verdünntem Humanserum (1:20) als Erstantikörper. Nach 30 Minuten Inkubationszeit (Raumtemperatur) wurde die Serumlösung mit 'Saugies' abgetupft und der Objektträger drei mal fünf Minuten in einer mit frischem DPBS +/- gefüllten Glasküvette geschwenkt (IKA HS260 basic). Anschließend erfolgte der Nachweis gebundener Serumantikörper mit 25 µl eines FITC-konjugierten anti Human IgG-Zweitantikörpers (1:100). Die Inkubation fand für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur statt. Es erfolgten die gleichen Abtupf- und Waschschriffe wie nach der Erstantikörperfärbung. Nach dem dritten Waschschriff wurde der Objektträger noch einmal in Aqua bidest getaucht, anschließend wieder abgetupft und mit Eindeckmedium und einem Deckgläschen eingedeckt.

4.3.4.4. ANCA-Testung von Humanseren

Die Färbung wurde auf Glasträgern mit fixierten humanen neutrophilen Granulozyten für den Routinebetrieb in Diagnostiklabors (A. Menarini, Berlin) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.3.5. PR3-AK-Testung von Humanseren

Die Bestimmung von Proteinase 3-Antikörpern in Humanseren erfolgte vollautomatisiert als EliA mit dem Phadia 250-EliA-Automaten von Phadia (Wien, Österreich). Die zugehörigen PR3-beschichteten Immuno-Cups wurden ebenfalls von Phadia bezogen.

5. Ergebnisse

5.1. Klonierung eukaryontischer Expressionskonstrukte

5.1.1. Klonierungsstrategie

Da die putativen Autoantigene für das Screeningsystem auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellkulturzellen exprimiert werden sollten, mussten sie zunächst in entsprechende Expressionsplasmide kloniert werden. Die Expression klonierter Gene auf Zellen ist eine gebräuchliche Methode und es liegen diverse geeignete Plasmide mit sogenannten 'multiple cloning sites' vor, in welche Gene leicht eingebracht werden können.

Um sicherzustellen, dass die Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert würden, musste zum einen dafür Sorge getragen werden, dass ihnen ein Leaderpeptid vorausgeht, das den Syntheseweg für ein Exportprotein über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat signalisiert. Zum anderen wurde die Fixierung auf der äußeren Zellmembran durch Anfügen einer Membranverankerung, wie z.B. eines GPI-Ankers oder einer zusätzlichen Transmembrandomäne erreicht.

Da für einige der zu untersuchenden Proteine keine käuflichen monoklonalen Antikörper existieren, es aber dennoch nötig war, sie durch eine Antikörperfärbung nachzuweisen oder – im Falle von verfügbaren käuflichen Antikörpern – diese bei einer Doppelfärbung Epitope blockieren könnten, die für die Bindung von Human- oder Tierseren nötig sind, sollte an jedes Protein ein FLAG-Tag angefügt werden, dessen Nachweis leicht durch den kommerziellen M2-Antikörper (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) möglich ist.

Als für die Klonierung geeignete Expressionsplasmide wurden pD8F (ein hauseigener modifizierter pDisplay-Vektor) und pCMV-SPORT6 (in den bereits humane ADP-Ribosyltransferase 4 mit einigen Modifikationen inkloniert worden war) gewählt. (Nähere Informationen bezüglich der verwendeten modifizierten Plasmide sind unter 10. Anhang angefügt.)

Der Vektor pD8F stellt einen modifizierten pDisplay-Vektor (Invitrogen) dar, in dem die ursprünglich im Vektor vorhandene Leadersequenz der IgK-Kette durch eine CD8-Leadersequenz und einen N-terminalen FLAG-tag ersetzt ist. Diese Modifikation geht in die 'multiple cloning site' über, an die sich ein cMyc-tag und die Transmembran- sowie eine verkürzte zytoplasmatische Domäne des PDGF- Rezeptors anschließen. In der 'multiple cloning site' von pD8F (für die Klonierung von LAMP2) wurden die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme BglII und Sall

gewählt.

In das verwendete pCMV-SPORT6-Plasmid war bereits humane ADP-Ribosyltransferase 4 (ART4), die eine Rolle in der purinergeren Signaltransduktion (Haag et al., 2007) und als Antigen im Dombrock-Blutgruppen-System (Lomas-Francis & Reid, 2010) spielt, inkloniert worden, welches N-terminal mit einem CD8-Leaderpeptid und einem FLAG-tag versehen worden war (pCMV-SPORT6/hART4). C-terminal besitzt das Gen eine Signalsequenz für einen GPI-Anker. Für pCMV-SPORT6 wählten wir die Enzyme, mit denen das einzuklonierende Protein anstelle von hART4 zwischen den FLAG-tag und die GPI-Ankersequenz eingebracht werden konnte: BglII und HindIII. Einen Überblick über die Klonierungsstrategie für die Expressionskonstrukte gibt Abb. 5.1. Das Ziel der Klonierung in pCMV-SPORT6 wird durch Abb. 5.2., das Ziel der Klonierung in pD8F durch Abb. 5.3. verdeutlicht.

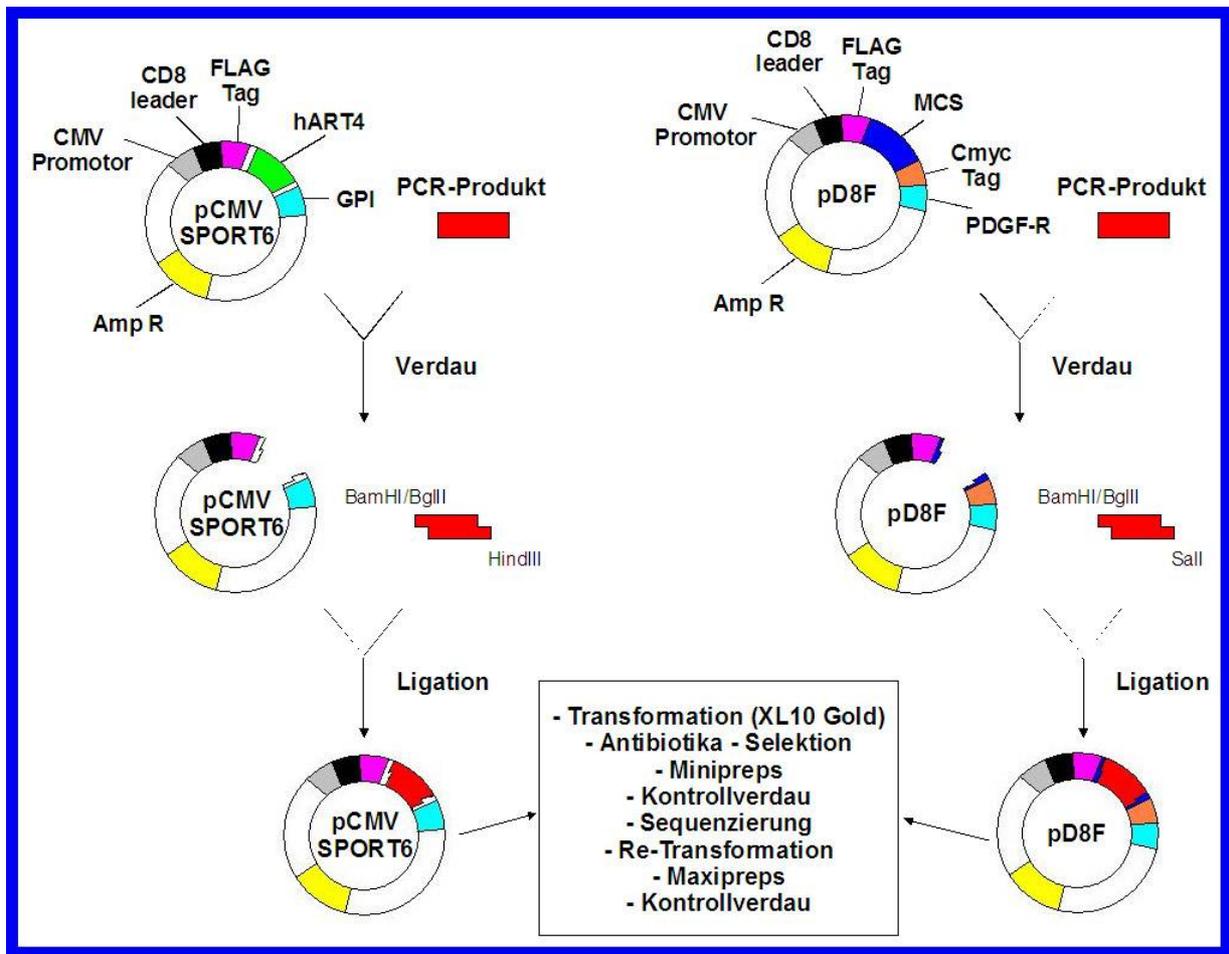


Abb. 5.1.: Klonierungsstrategie

In die einzuklonierenden cDNA-Sequenzen (bezogen von Imagenes, Berlin und RZPD, Berlin) sollten jeweils an das 5'-Ende bei einer Amplifikations-PCR BamHI, bzw. BglII, an das 3'-Ende Sall bzw. HindIII mit einmutiert werden. Nach einem entsprechenden Restriktionsverdau konnten dann die mit Schnittstellen versehenen cDNA-Sequenz-Abschnitte in die Plasmide ligiert werden.

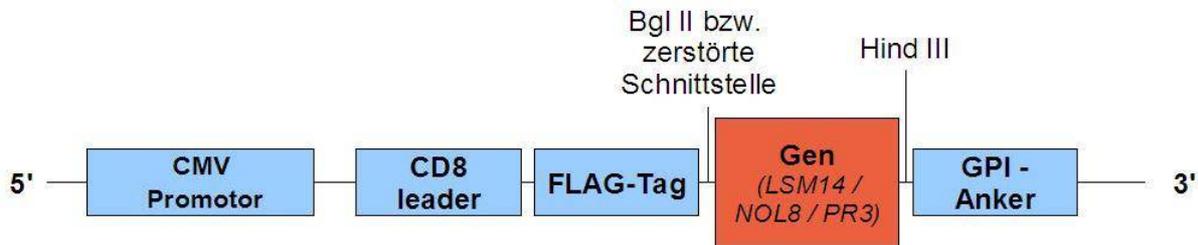


Abb. 5.2.: Ziel der Klonierung in pCMV-SPORT6

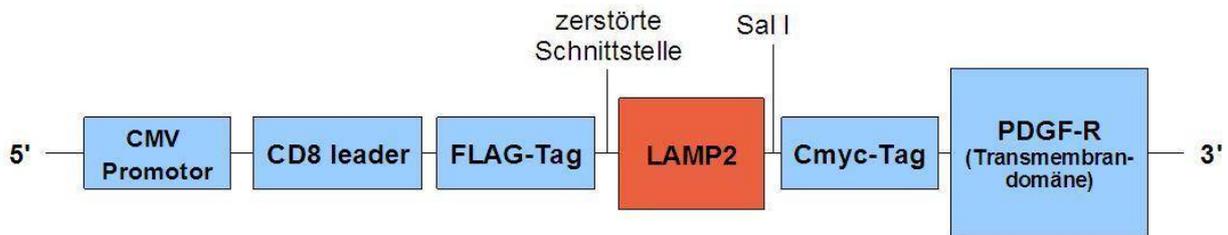


Abb. 5.3.: Ziel der Klonierung in pD8F

Zur besseren Nachvollziehbarkeit der Klonierungen sind sowohl die Vektorkarten, die Multiple Cloning Site von pD8F, die Sequenz von hART4 in pCMV-SPORT6 als auch die Sequenzen der durch Klonierung erstellten Expressionskonstrukte im Anhang (Kapitel 10) dargestellt.

5.1.2. Durchführung der Klonierung

Die Expressionsplasmide pD8F und pCMV-SPORT6/hART4 wurden mit den gewählten Restriktionsendonukleasen verdaut (pD8F mit BglII und Sall, pCMV-SPORT6 mit BglII und HindIII) und in einem ethidiumbromidhaltigen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die verdauten Vektor-“Backbones“, in die kloniert werden sollte, wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (QIAquick Gel Extraction Kit). Um eine Religation des Plasmids mit sich selbst zu vermeiden, erfolgte die Dephosphorylierung mit dem Antarctic Phosphatase-System.

Der gewünschte, in Kassettenvektoren enthaltene, cDNA-Sequenzabschnitt für die Inserts wurde mit zwei die Sequenz flankierenden Primern per PCR amplifiziert (unter Einbringung der gewünschten Restriktionsschnittstellen durch die verwendeten Primer). Nach TAE-

Gelelektrophorese und Aufreinigung des Amplifikats aus dem Gel wurde auch das Amplifikat mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, wiederum in einem TAE-Agarosogel elektrophoretisch von den im Restriktionsverdau entfernten Fragmenten getrennt und erneut aufgereinigt.

In einer Ligationsreaktion mit der T4-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) konnte nun je ein Insert in ein Vektor-Backbone ligiert werden. Als Kontrolle erfolgten parallel Religationsansätze der Vektoren ohne Insert. Die verwendeten Primer und Restriktionsenzyme sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. (Die Ligation einer BglII-Schnittstelle mit einer BamHI-Schnittstelle ist möglich, da beide Restriktionsendonukleasen kompatible „sticky ends“ produzieren. Die für einen erneuten Restriktionsverdau nötige Palindromstruktur der Schnittstelle geht bei der Ligation jedoch verloren. Bei einigen Konstrukten konnte das Amplifikat nicht mit BglII geschnitten werden, da die amplifizierte Sequenz bereits eine solche Schnittstelle enthielt und sonst beim Verdau zerstört worden wäre. Daher wurde hier das Amplifikat mit BamHI, der Vektor aber mit BglII verdaut und diese unterschiedlichen Schnittstellen miteinander ligiert.)

Tab. 5.1.: Zur Klonierung verwendete Primer und Restriktionsenzyme

Vektor	Verwendete Primer	Restriktionsstellen	Aminosäuren
pCMV-SPORT6/hART4	-	BglII, HindIII	-
pD8F	-	BglII, Sall	-
PCR-Amplifikat	Verwendete Primer	Restriktionsstellen	Aminosäuren
LAMP2 B	LAMP2_23_Bam_F LAMP2_377_Sal_R	BamHI, Sall	23 bis 377
LSM14	LSM_Bgl_F LSM_385_Hind_R	BglII, HindIII	1 bis 385
NOL8	NOL8_769_Bam_F NOL8_970_Hind_R	BamHI, HindIII	769 bis 970
PR3	PR3_28_Bam_F PR3_252_Hind_R	BamHI, HindIII	28 bis 252

Nach erfolgter Ligation wurden die Ligationsansätze per Hitzeshock in XL10 Gold-Zellen transformiert und diese zur Selektion auf Carbenicillin-Agarplatten ausgestrichen. Am Folgetag wurden DNA-Minipreps kontrollverdaut und sequenziert. Der Kontrollverdau erfolgte mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI für pD8F und EcoRI und HindIII für pCMV-SPORT6 (Abbildung 5.4. zeigt den Kontrollverdau der in pCMV-SPORT6 klonierten Konstrukte).

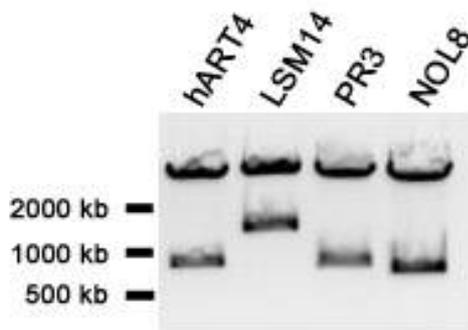


Abb. 5.4.: Kontrollverdau der in pCMV-SPORT6 klonierten Konstrukte

Die Sequenzierung von Minipreps, die ein Insert der erwarteten Länge enthielten, erfolgte für pD8F mit den Primern T7 und BGHrev, für pCMV-SPORT 6 mit den Primern TAF und TAR. Nach Auswertung der Sequenzen mit den Programmen SeqMan und SeqBuilder (Lasergene) wurden als korrekt identifizierte Minipreps wieder in XL10 Gold-Zellen transformiert, und es wurden DNA-Maxipreps zur weiteren Arbeit angefertigt. Auch für die Maxipreps erfolgte noch ein Kontrollverdau. (Die Sequenzen der klonierten Konstrukte befinden sich in Kapitel 10. Anhang.)

5.1.3. Einbringen der S176A-Mutation in das PR3-Expressionskonstrukt

Da wir befürchteten, dass die aktive Form von Proteinase 3 zytotoxisch wirken, und damit die Expressionsstärke auf Zellen, bzw. die Anzahl der das Protein exprimierenden Zellen vermindern könnte, sollte zusätzlich zu dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Proteinase 3-Expressionskonstrukt noch ein weiteres Konstrukt erstellt werden, das für eine enzymatisch inaktive Variante von PR3 kodierte. Dies sollte durch einen einfachen Aminosäureaustausch (Serin → Alanin an Position 176: S176A) im aktiven Zentrum der Proteinase 3 erfolgen, ohne dass nennenswerte konformationelle Änderungen stattfinden, bei denen wichtige Epitope für die Bindung von Humansenen verloren gingen (Sun et al., 1998b; Damoiseaux et al., 2009). Dieser Aminosäureaustausch kann durch eine einfache Punktmutation des codierenden Basentriplets (TCA → GCA) erreicht werden.

Zum Einbringen der Mutation wurde ein μl einer pCMV-SPORT6/PR3 Miniprep in einer Mutagenese-PCR mit den Primern PR3_S176A_F und PR3_S176A_R amplifiziert. Danach erfolgten, wie unter 4.1.3.4. beschrieben, ein Verdau mit DpnI (zur Zerstörung der methylierten, also nicht durch PCR mutierten DNA), Auftrennung der verdauten DNA im Agarosegel, Elution der korrekten DNA-Bande aus dem Gel, Transformation, Antibiotikaselektion, Erstellung von

Minipreps, Sequenzierung und schließlich die Erstellung von Maxipreps des mutierten Konstrukts (pCMV-SPORT6/PR3_S176A).

5.1.4.: Charakterisierung der klonierten Konstrukte

5.1.4.1.: Testung im FACS

Die neu klonierten Konstrukte wurden mit dem jetPEI-System in adhären wachsende HEK293 T-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Abtrypsinierung und Antikörperfärbung der Zellen. Die Färbung wurde mit dem M2 Antikörper (muriner IgG antiFLAG) sowie einem Alexa 647 gekoppelten Zweitantikörper gegen murines IgG durchgeführt. Die LAMP2-Konstrukte wurden außerdem mit einem murinen anti LAMP2 Antikörper (Erstantikörper) sowie wiederum dem Alexa 647 gekoppelten Zweitantikörper gegen murines IgG gefärbt. Als zusätzlicher Nachweis der Proteinase 3 erfolgte eine Färbung mit einem FITC-gekoppelten anti-Proteinase 3 Antikörper. Zur Messung wurde das FACS Calibur verwendet.

Abbildung 5.5. zeigt den FACS-Nachweis der Konstrukte auf HEK293T-Zellen, die mit den Expressionskonstrukten, wie unter Punkt 5.1.5. beschrieben, stabil transfiziert worden waren.

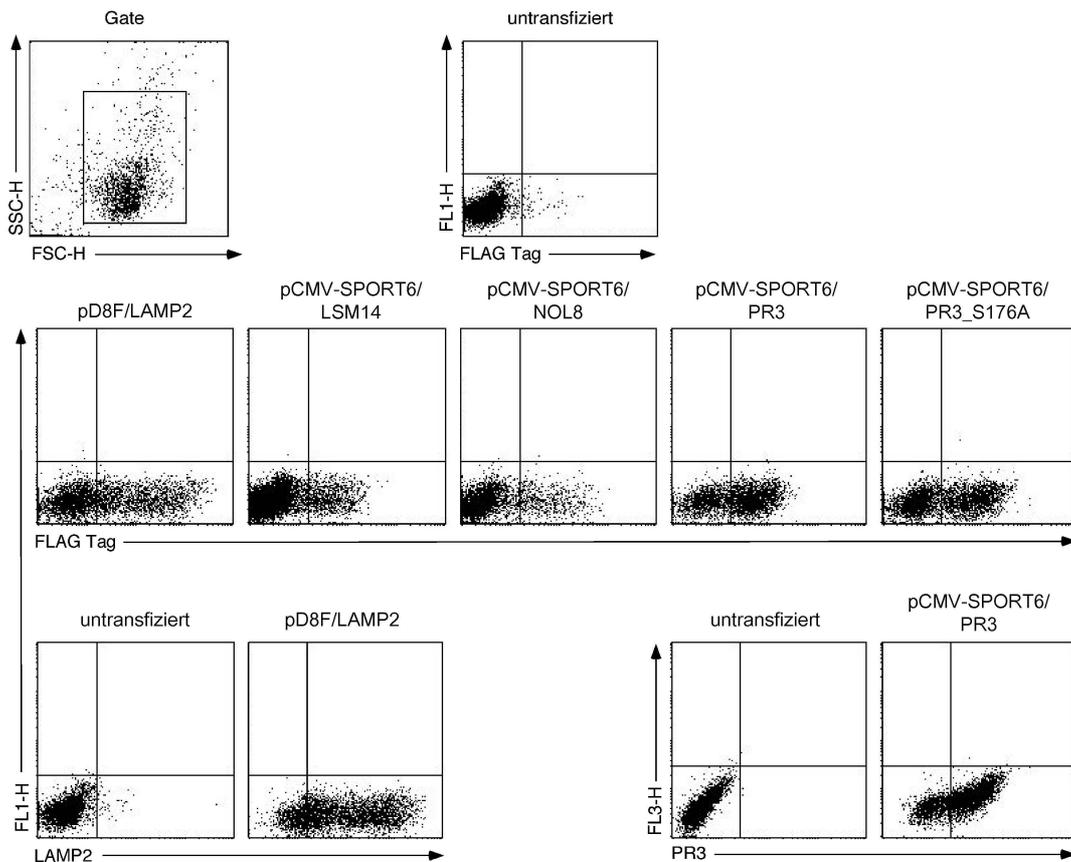


Abb. 5.5.: Antikörpernachweis der Expressionskonstrukte auf HEK293T-Zellen

Alle Expressionskonstrukte ließen sich mittels des M2(anti FLAG-tag)-Antikörpers detektieren, während dieser praktisch keine untransfizierten Zellen band. Die Expressionsstärke (gemessen an der Fluoreszenzintensität, nicht der absoluten Zahl transfizierter Zellen) war in allen Experimenten für pD8F/LAMP2B sehr hoch und für pCMV-SPORT6/NOL8 relativ hoch. Im Falle von pCMV-SPORT6/LSM14 und den PR3-Konstrukten (pCMV-SPORT6/PR3 und pCMV-SPORT6/PR3_S176A) wurden stark exprimierende Varianten durch magnetische Sortierung (Easy-Sep) deutlich angereichert (hohe Zahl der positiven Zellen, auch bei transienter Transfektion konnten über 30% der Zellen als deutlich positiv detektiert werden, Ergebnisse nicht gezeigt), jedoch konnte keine so hohe Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen erreicht werden (weder durch transiente, noch durch stabile Transfektion), wie bei z.B. pD8F/LAMP2B. Für LAMP2 und PR3 standen kommerziell verfügbare monoklonale Antikörper zur Verfügung. Auch mittels dieser konnte das entsprechende Antigen auf transfizierten, nicht aber auf untransfizierten Zellen detektiert werden.

5.1.4.2. Expressionsnachweis im indirekten Immunfluoreszenztest

Zur definitiven Feststellung, dass die exprimierten Proteine auf der Zelloberfläche lokalisiert waren, wurde eine Antikörperfärbung auf vitalen transfizierten HEK293 T-Zellen durchgeführt und im indirekten Immunfluoreszenztest mikroskopisch untersucht.

Dafür wurden die Zellen mit einem Konstrukt ko-transfiziert, das für eine kernständige Variante des grün fluoreszenzierenden Proteins eGFP kodiert. Die Färbung wurde mit dem M2-Antikörper, im Falle von LAMP2 zusätzlich mit dem anti LAMP-Antikörper und anti Maus-IgG (PE) als Detektionsantikörper durchgeführt. Zur Darstellung aller Zellkerne diente der Hoechst 33342 Farbstoff.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie sind in Abb. 5.6. und 5.7. dargestellt. Die Transfektion der Zellen mit pCMV-SPORT6/LSM14, pCMV-SPORT6/NOL8 und den beiden PR3-Konstrukten (pCMV-SPORT6/PR3 und pCMV-SPORT6/PR3_S176A) erfolgte in diesem Versuch unter direkter Zugabe der Transfektionslösung ins Nährmedium der Zellen und Mikroskopie am Folgetag, also ohne dass die Zellen nach der Transfektion noch einmal trypsiniert und dann erst auf 96 well-Platten aufgebracht worden wären (Fast-Protokoll).

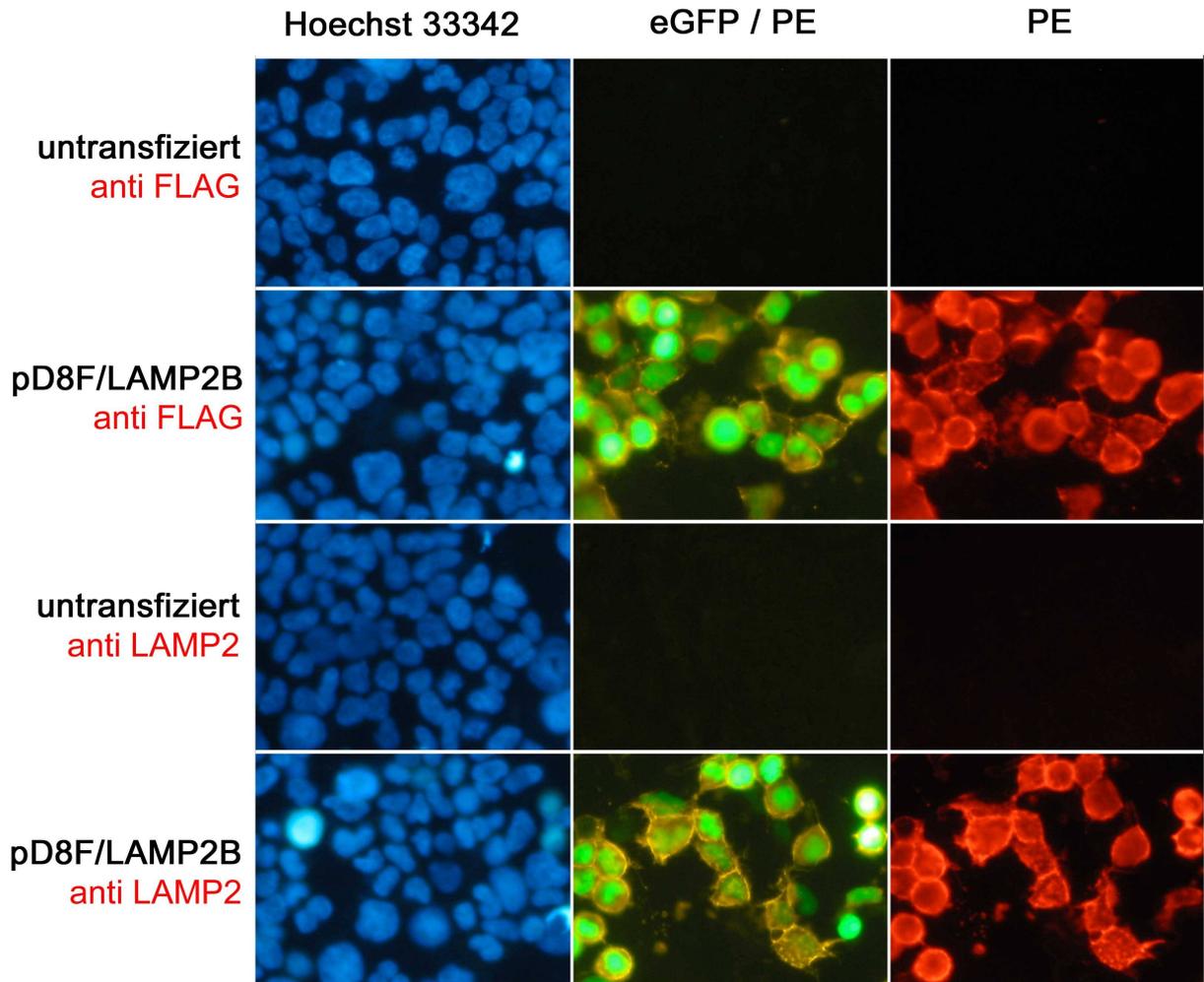


Abb. 5.6.: Nachweis des pD8F/LAMP2B-Expressionskonstruktes im IFT

Abbildung 5.6. zeigt die Detektion von LAMP2 mittels des M2 (anti FLAG-tag)-Antikörpers sowie des anti LAMP2-Antikörpers (plus eines PE-markierten Detektionsantikörpers) auf den durch die eGFP-Cotransfektion als transfiziert markierten Zellen. Die nicht transfizierten (eGFP-negativen) aber in der Hoechst 33342-Färbung sichtbaren weiteren Zellen werden nicht detektiert. Die kreisrund intensivere Fluoreszenz lässt auf eine Lokalisation der markierten Proteine an der Zelloberfläche schließen.

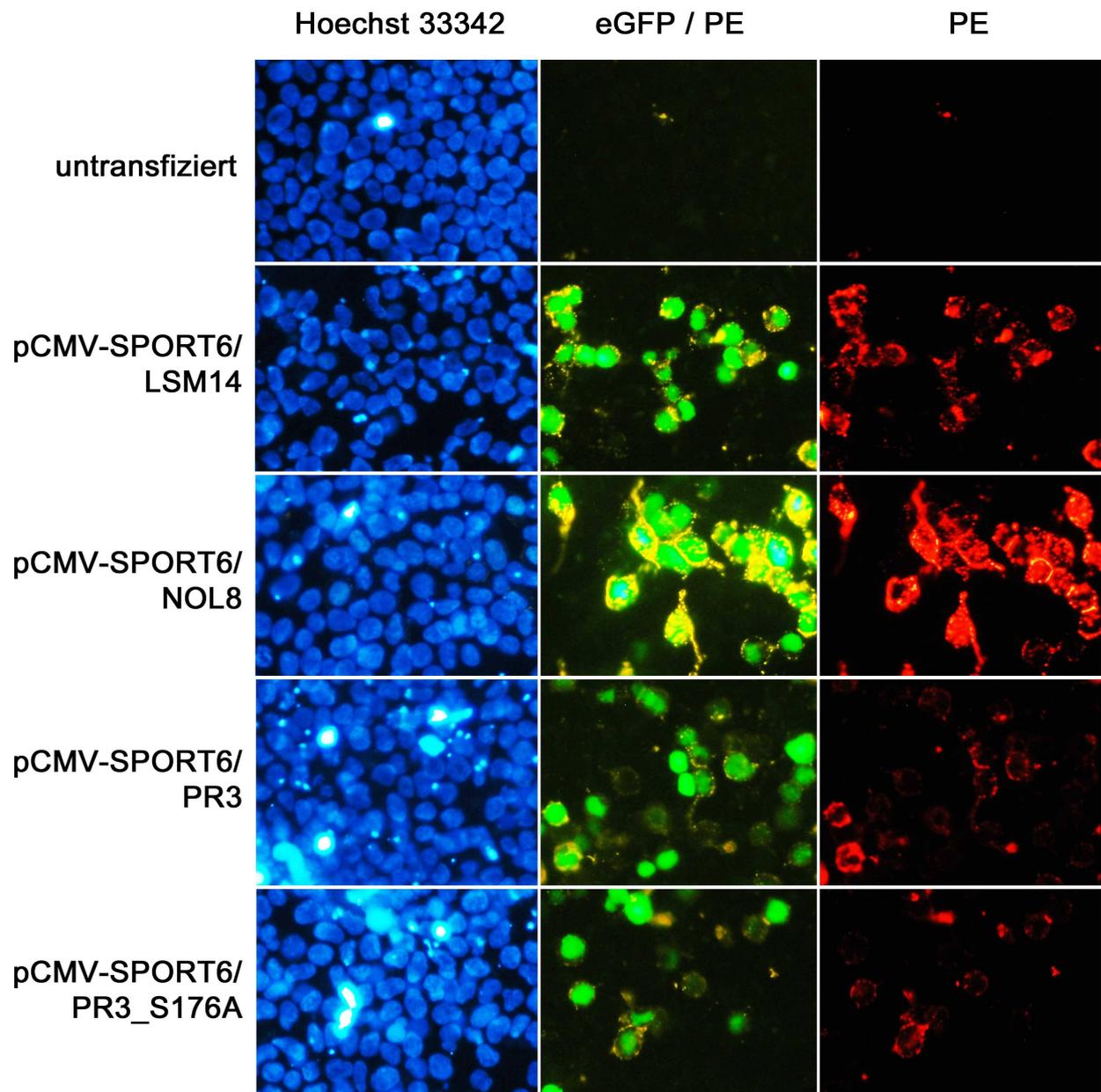


Abb. 5.7: Nachweis der pCMV-SPORT6/LSM14-, pCMV-SPORT6/NOL8-, pCMV-SPORT6/PR3- und pCMV-SPORT6/PR3_S176A-Expressionskonstrukte im IFT (Kontrast und Helligkeit erhöht)

Auch die in Abbildung 5.7. gezeigten Konstrukte konnten als PE-Fluoreszenz auf den eGFP-positiven Zellen nachgewiesen werden, untransfizierte Zellen wurden jedoch nicht angefärbt. Bei allen Konstrukten fällt eine deutlich schwächere Fluoreszenz als bei den LAMP2-Konstrukten auf.

Dieser Eindruck war auch in der FACS-Analyse entstanden und bestätigte sich bei mehrmaliger Wiederholung der FACS- und IFT-Experimente. Insbesondere die Fluoreszenzintensität bei Nachweis der PR3-Konstrukte war weniger intensiv, jedoch im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich positiv. Auch diese Konstrukte zeigten alle ein membranständiges Expressionsmuster.

Die Abbildungen 5.6. und 5.7. sind wegen der im Nachhinein vorgenommenen Kontrast- und Helligkeitserhöhung von Abb. 5.7. zur klareren Darstellbarkeit des Ergebnisses nicht direkt miteinander vergleichbar. Die Fluoreszenzintensität der mit pCMV-SPORT6/NOL8-transfizierten Zellen war generell etwas geringer als die der mit pD8F/LAMP2B transfizierten, die Intensität bei Transfektion mit pCMV-SPORT6/LSM14 oder eines der beiden PR3-Konstrukte entsprechend noch etwas niedriger.

In der Hoechst 33342-Färbung in Abb. 5.7. sind weiterhin sowohl einzelne größere, sehr helle Punkte (etwa Zellkerngröße) als auch kleine recht hell gefärbte 'Sprenkel' zu sehen. Sie traten regelhaft auf, wenn die Zellen, wie in dem im Abb. 5.7. gezeigten Experiment, nach dem Fast-Protokoll (s. 4.3.4.1.) transfiziert wurden und entsprechen durch den DNA-Farbstoff angefärbter Plasmid-DNA aus der Transfektionslösung, die hier mit ausplattiert wurde.

5.1.5. Etablierung stabil transfizierter Zelllinien

Nach erfolgreicher Testung der erstellten Konstrukte wurden, wie unter 4.2.3.1. und 4.2.3.2. beschrieben, stabile Transfektanten in HEK293T-Zellen hergestellt. Dazu mussten die Zellen mit dem pCDNA6-Vektor ko-transfiziert werden, um eine Blasticidin-Resistenz für die Selektion einzubringen.

Eine Anreicherung der Zellen wurde durch antikörperbasierte Zellsortierung (Easy Sep Cell Selection Kit, s. 4.2.4.) erreicht. Die Zellen wurden, während sie in Kultur gehalten wurden, alle zwei Wochen im FACS auf ihre Positivität kontrolliert (Färbung und Messung wie unter 5.1.4.1) und gegebenenfalls nachsortiert.

Auch für das als Ursprungskonstrukt der Klonierung benutzte pCMV-SPORT6/hART4 wurde eine stabil exprimierende HEK293T-Zelllinie etabliert, die als Negativkontrolle verwendet werden konnte.

Der Nachweis der Expression der Autoantigene in den stabil transfizierten Zellen wurde bereits in Abbildung 5.5. gezeigt.

5.1.6. Sequenzierung des SHC2-Klons

Eines der von Cindy Hempp gefundenen Autoantigene war als SHC2 identifiziert worden (Hempp, 2007). Eine genaue Nachsequenzierung des von ihr aus der Expressionsbibliothek der Firma RZPD isolierten Plasmids zeigte jedoch, dass dieser (N-terminal mit einem His-Tag versehene) SHC2-Klon das Gen nicht im richtigen Leseraster enthält und dass daher das Protein nicht korrekt produziert werden kann. Abbildung 5.8. zeigt das durch wiederholte Sequenzierungen bestätigte Ergebnis.

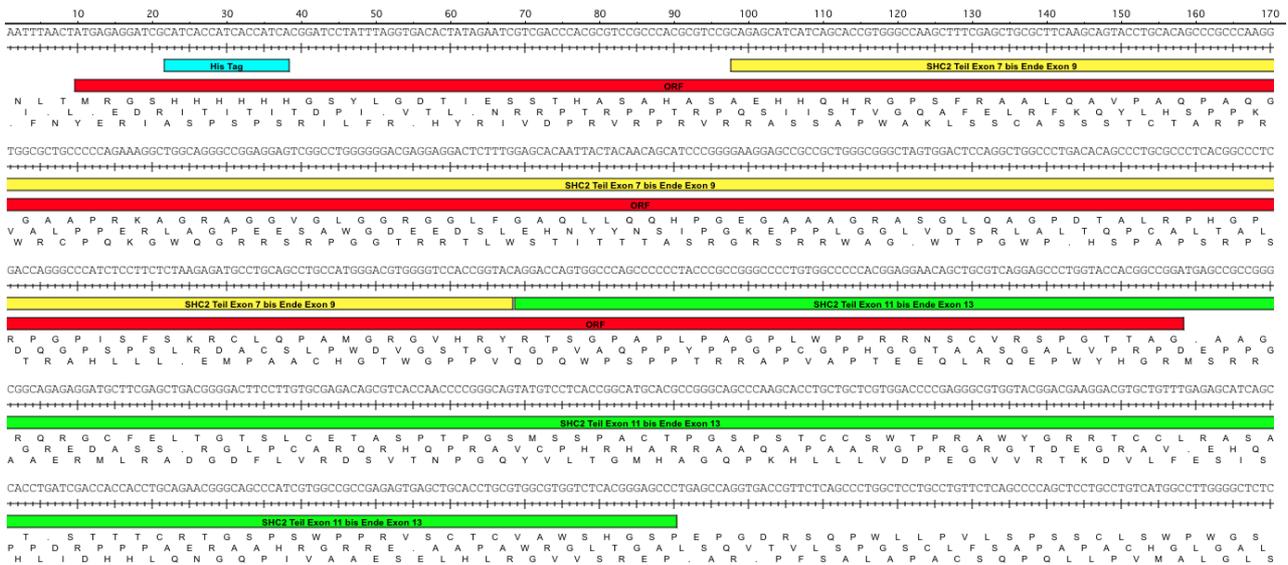


Abb. 5.8.: Sequenzanalyse des SHC2-Expressionsklons (RZPD)

In rot markiert ist das abgelesene offene Leseraster des Klons (beginnend mit dem Startcodon ATG). Es entspricht dem ersten der drei abgebildeten möglichen Leseraster. In diesem Leseraster folgt nach 4 Aminosäuren (MRGS) der 6x His-Tag (HHHHHH). Dieses Leseraster kodiert fortlaufend für ein Proteinprodukt, das jedoch nicht SHC2 entspricht.

Teile der DNA-Sequenz von SHC2 sind im Klon enthalten, jedoch befinden sie sich nicht im ersten Leseraster. Die DNA-Sequenz von SHC2-Exons sieben bis neun (von Exon sieben nur etwa die zweite Hälfte) ist in gelb markiert und befindet sich im zweiten Leseraster. Das Ende des Exons neun geht nahtlos über in die DNA-Sequenz der SHC2-Exons elf bis dreizehn (von Exon elf nur etwa die zweite Hälfte). Die DNA-Sequenz der Exons elf bis dreizehn ist grün markiert und befindet sich im dritten Leseraster. Da in diesem Plasmid jedoch das erste Leseraster transkribiert und translatiert wird, kann kein SHC2, auch nicht ein Teil seiner Proteinsequenz, produziert werden. Die mehrfache Sequenzierung der Klone von Cindy Hempp sowie einer bei RZPD neu bestellten

Kopie des SHC2-Expressionsklons ergab das gleiche Ergebnis.

Da der für die ursprüngliche Identifizierung des Autoantigens verwendete Klon offensichtlich kein SHC2, sondern ein künstliches Protein mit der vorhergesagten Aminosäuresequenz MRGSHHHHHHGSYLGDTIESSTHASAHASAEHHQHRGPSFRAALQAVPAQPAQGGAAPRK AGRAGGVGLGGRGGLFGAQLLQQHPGEGAAAGRASGLQAGPDTALRPHGPRPGPISFSKR CLQPAMGRGVHRYRTSGPAPLPAGPLWPPRRNSCVRSPGTTAG produzierte, wurde auf eine Klonierung des SHC2-Gens in einen eukaryontischen Expressionsvektor verzichtet.

Eine Protein-BLAST-Suche (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit dieser künstlichen Aminosäuresequenz zeigte keine signifikanten Homologien zu anderen Proteinen.

5.2.: Autoantikörper-Screeningsystem für Humansen

Die für diese Arbeit verwendeten Humansen wurden gemäß den am Universitätsklinikum Eppendorf gebräuchlichen Richtlinien zur Verwendung von Probenresten mit Einverständnis des Patienten gesammelt und durch Zuweisung chronologischer Zahlen ohne die Möglichkeit einer Rückverfolgung anonymisiert.

5.2.1. Konzept des Screeningsystems

Nach Etablierung stabil transfizierter Zelllinien mit den erstellten Konstrukten konnten diese für ein Auto-AK-Screeningsystem für humane Seren verwendet werden. Durch antikörperbasierte Zellsortierung (Easy Sep Cell Selection Kit, s. 4.2.4.) wurde dafür gesorgt, dass für das Screeningsystem immer mehr als 25% der Zellen positiv für die entsprechende Transfektante waren.

Wegen der hohen Sensitivität und des vergleichsweise hohen Probendurchsatzes erfolgte die Testung als FACS-Analyse auf stabil transfizierten Zellen. Die Färbung erfolgte mit dem M2-Antikörper gegen den FLAG-tag und je einem Humanserum als Erstantikörper. Die gebundenen Erstantikörper wurden mittels eines monoklonalen, Alexa 647 gekoppelten, anti-Maus-IgG Antikörpers (Nachweis des M2-Antikörpers) sowie eines monoklonalen, PE-konjugierten, anti-human-IgG Antikörpers (Nachweis von gebundenem Patienten-IgG) detektiert. Färbetechniken, Antikörper- und Serumverdünnungen sowie die Technik der Versuchsdurchführung sind unter 4.3.3.1. und 4.3.3.2. aufgeführt. Die gewählten Farbstoffe interferieren nicht in ihrem Emissionswellenlängenbereich miteinander.

Das Nachweiskonzept ist das Folgende: Über die M2-Alexa 647-Fluoreszenz wird der Nachweis erbracht, dass die Zellen auch tatsächlich transfiziert sind und über die Stärke der Fluoreszenz kann auf die Stärke der Antigenexpression auf jeder Zelle geschlossen werden. Die Anwesenheit von gebundenen humanen Serumantikörpern wird über die PE-Fluoreszenz, die proportional zur Genexpression, also zur Alexa 647-Fluoreszenzintensität sein sollte, sichtbar gemacht. Bei Fehlen von gebundenen Serumantikörpern kann der PE-gekoppelte Zweitantikörper nicht binden, die Zellen sind also nur positiv für Alexa 647, nicht aber für PE. Alexa 647-negative Zellen können als untransfiziert eingestuft werden. Abbildung 5.9. verdeutlicht das Konzept des Systems.

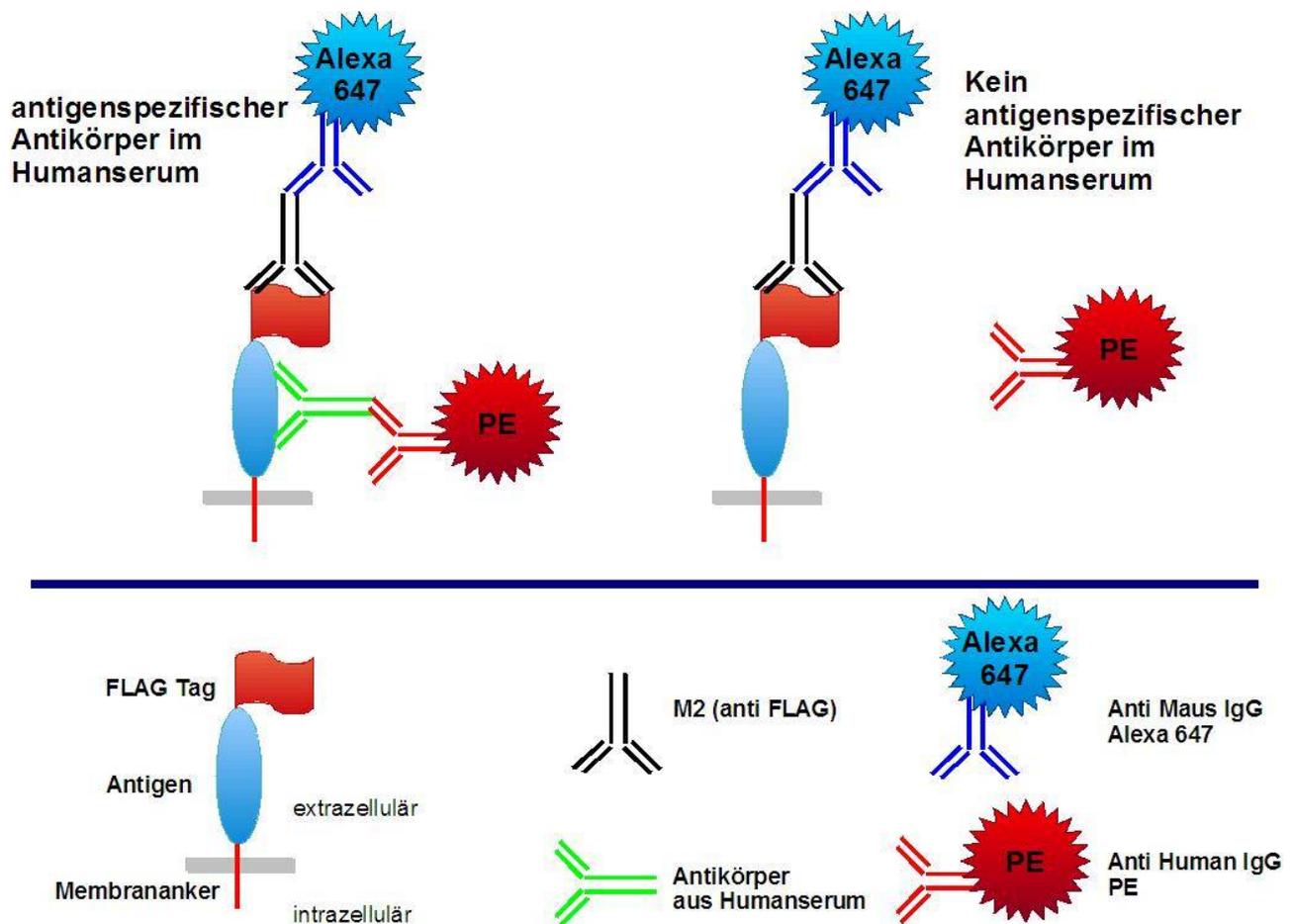


Abb. 5.9.: Konzept des Screeningsystems

5.2.2. Bewertung positiver und negativer Proben

390 humane Serumproben aus dem immunologischen Routinediagnostiklabor des Universitätsklinikums Eppendorf wurden in einem generellen Serumscreening untersucht. Weiterhin wurden Humanseren, die uns freundlicherweise von Elena Csernok (Abteilung für

Rheumatologie, Uni Lübeck und Rheumaklinik Bad Bramstedt), Renate Kain (Klinisches Institut für Pathologie, Medizinische Universität Wien, Österreich) und Thorsten Krieger (AescuLab, Hamburg) zur Verfügung gestellt wurden, untersucht.

Eine Auflistung der verwendeten Humanseren, ihrer Herkunft und möglichen bekannten Krankheitsassoziation ist unter 4.3.1.3. angegeben.

Mit jedem Serum erfolgte auf jeder stabil transfizierten Zelllinie (pD8F/LAMP2B, pCMV-SPORT6/LSM14, pCMV-SPORT6/NOL8, pCMV-SPORT6/PR3, pCMV-SPORT6/PR3_S176A) wie unter 5.2.1. angegeben, eine Färbung (inkl. Flag-Tag Gegenfärbung zur Identifizierung transfizierter Zellen).

Als Negativkontrolle für den M2-Antikörper und den anti-Maus-IgG Alexa 647-Zweitantikörper dienten untransfizierte HEK 293 T-Zellen.

Bei jeder Tagesmessung wurde für jede stabil transfizierte Zelllinie ein gesundes Kontrollserum als Negativkontrolle mitgeführt, als weitere Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem ursprünglich zur Umklonierung verwendeten pCMV-SPORT6/hART4-Konstrukt transfiziert waren. Seren, die auch an dieses Konstrukt banden, wurden als unspezifisch reaktiv (also negativ für die Bindung an das entsprechende Autoantigen) gewertet.

Als Positivkontrolle diente die Anfärbung von mit pCMV-SPORT6/PR3 transfizierten Zellen mit einem Patientenserum, für das in der Routinediagnostik ein hoher Titer an anti-Proteinase 3-Antikörpern bestimmt worden war (Abb. 5.10, rechts oben). In dieser Positivkontrolle ist gut sichtbar, wie die PE-Fluoreszenz für die Patienten-Autoantikörper proportional zur Alexa 647-Fluoreszenz ansteigt.

Exemplarisch sind die Negativkontrollen in Abb. 5.10. gezeigt. Ein als gegen ein Autoantigen spezifische Antikörper enthaltend gewertetes Serum ist in Abb. 5.11. dargestellt.

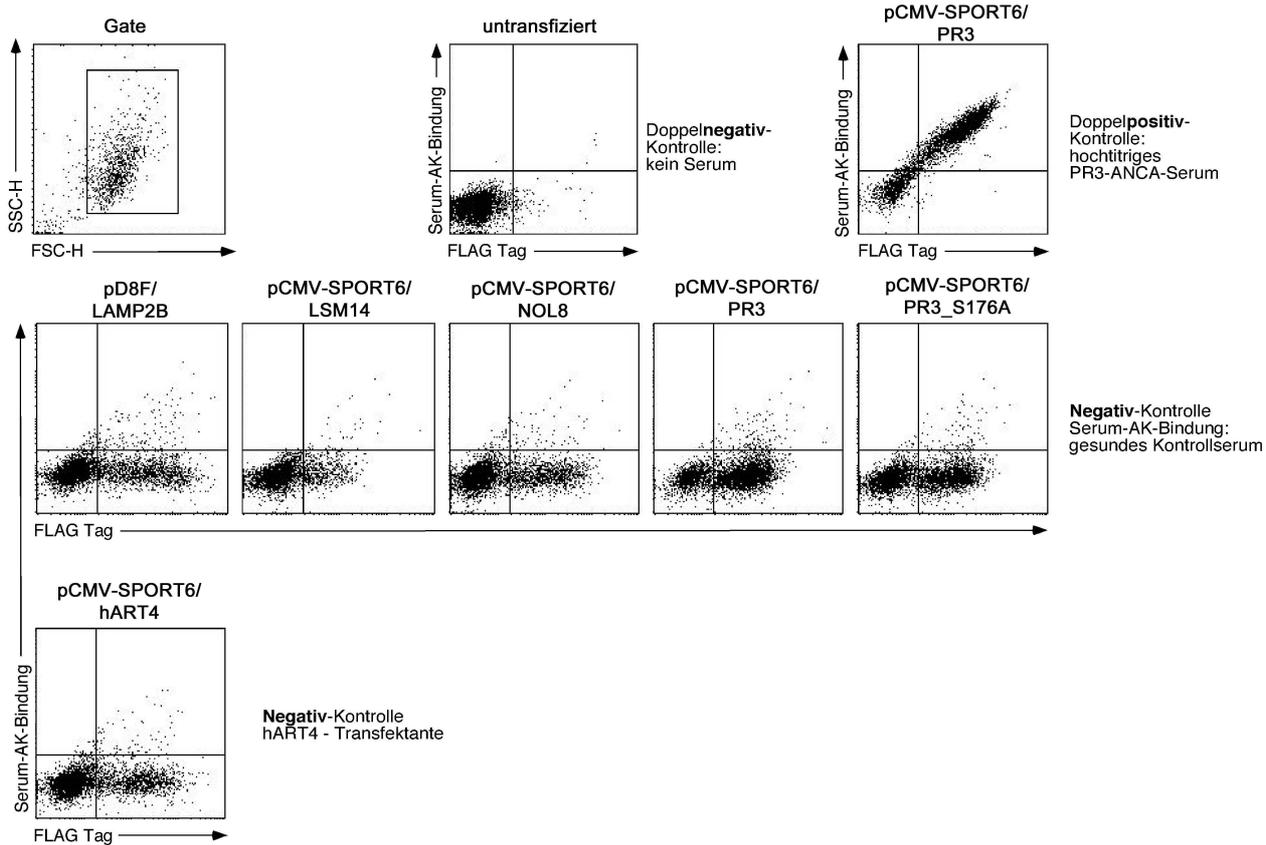


Abb. 5.10.: Kontrollen des Serumscreeningsystems

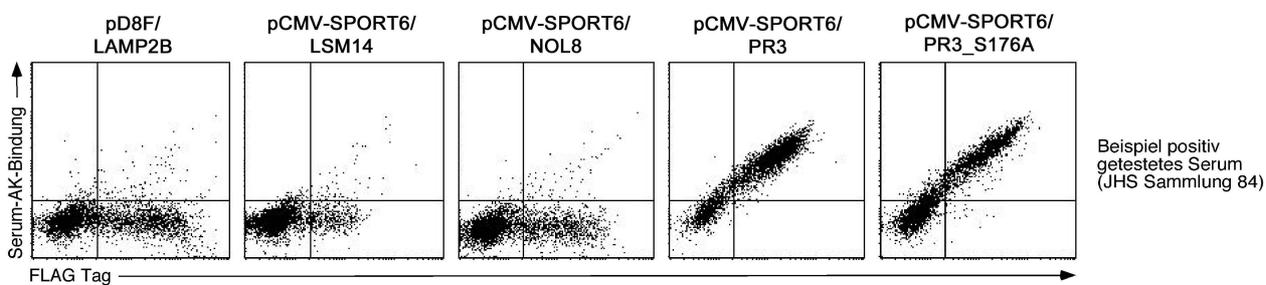


Abb. 5.11.: Beispielhaftes positiv getestetes Serum

Nicht positiv gewertet wurden Fluoreszenzen bei Seren, die

a) keine signifikante PE-Fluoreszenz zeigten (Abb. 5.12.)

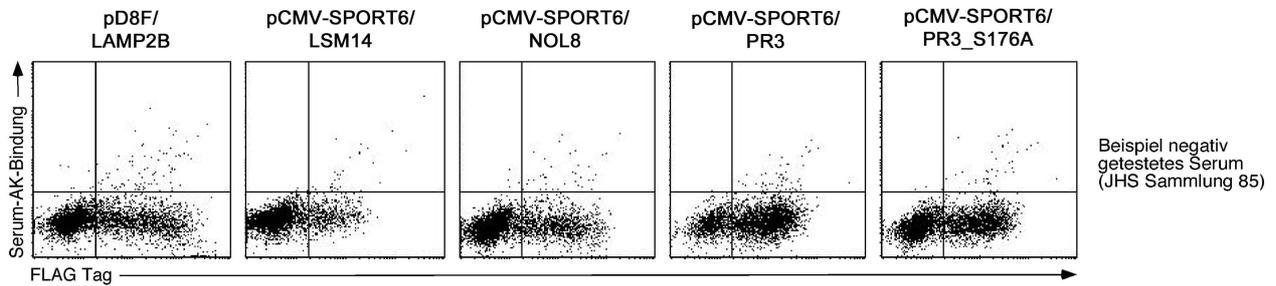


Abb. 5.12: Beispielhaftes Serum ohne signifikante PE-Fluoreszenz

b) eine von der Antigen-Expressionsstärke (Nachweis über anti FLAG-tag / M2-Antikörper) unabhängige starke PE-Fluoreszenz zeigten (unspezifische Bindung an die HEK Zellen, nicht an das Antigen; Abb. 5.13)

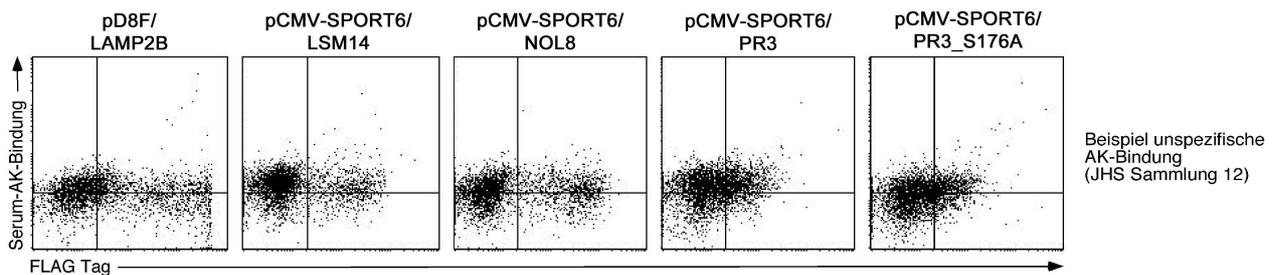


Abb. 5.13.: Beispiel unspezifische AK-Bindung

c) eine von der Transfektionsstärke abhängige, proportional ansteigende PE-Fluoreszenz auf allen transfizierten Zelllinien (inklusive der pCMV-SPORT6/hART4-Negativkontrolle) zeigten (Bindung an allen Konstrukten gemeinsame Epitope, z.B. an den FLAG-tag; Abb. 5.14.)

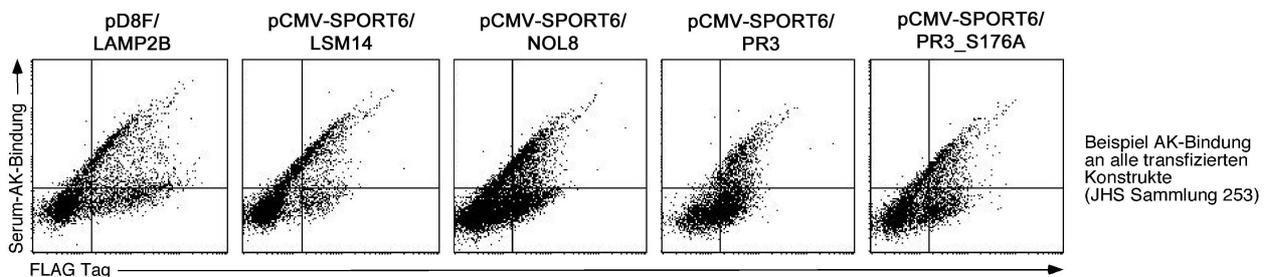


Abb. 5.14.: Beispiel AK-Bindung an alle transfizierten Konstrukte

5.2.3. Validierung des Konzepts anhand eines Screeningsystems für PR3-AK

Zur Validierung des Screeningsystems sollten dieses mit dem in der klinischen Diagnostik unseres Diagnostiklabors verwendeten PR3-Test (Phadia 250 Immunocap EliA) verglichen werden. Dazu wurden die Seren 65 bis 238 (n = 174) zusätzlich auf Reaktivität gegen die Proteinase3-Konstrukte (pCMV-SPORT6/PR3 und pCMV-SPORT6/PR3_S176A) getestet, um unsere Ergebnisse des FACS-Assays mit den Proteinase3-EliA-Messungen des immunologischen Routinediagnostiklabors vergleichen zu können. Die Errechnung der positiv und negativ prädiktiven Werte unseres zellbasierten Systems gegenüber des hier für diesen Zweck als Standard definierten Routine-EliAs sollte als Hilfsmittel zur Abschätzung der Güte unseres FACS-Screening-Systems genutzt werden (wenn auch die Aussage direkt nur für unsere Proteinase 3-Konstrukte getroffen werden konnte). Diverse Seren reagierten positiv in unserem Testsystem für Proteinase3-Antikörper. In Abbildung 5.15. sind exemplarisch die Versuchsergebnisse für die Seren 149, 157 und 180 angeführt)

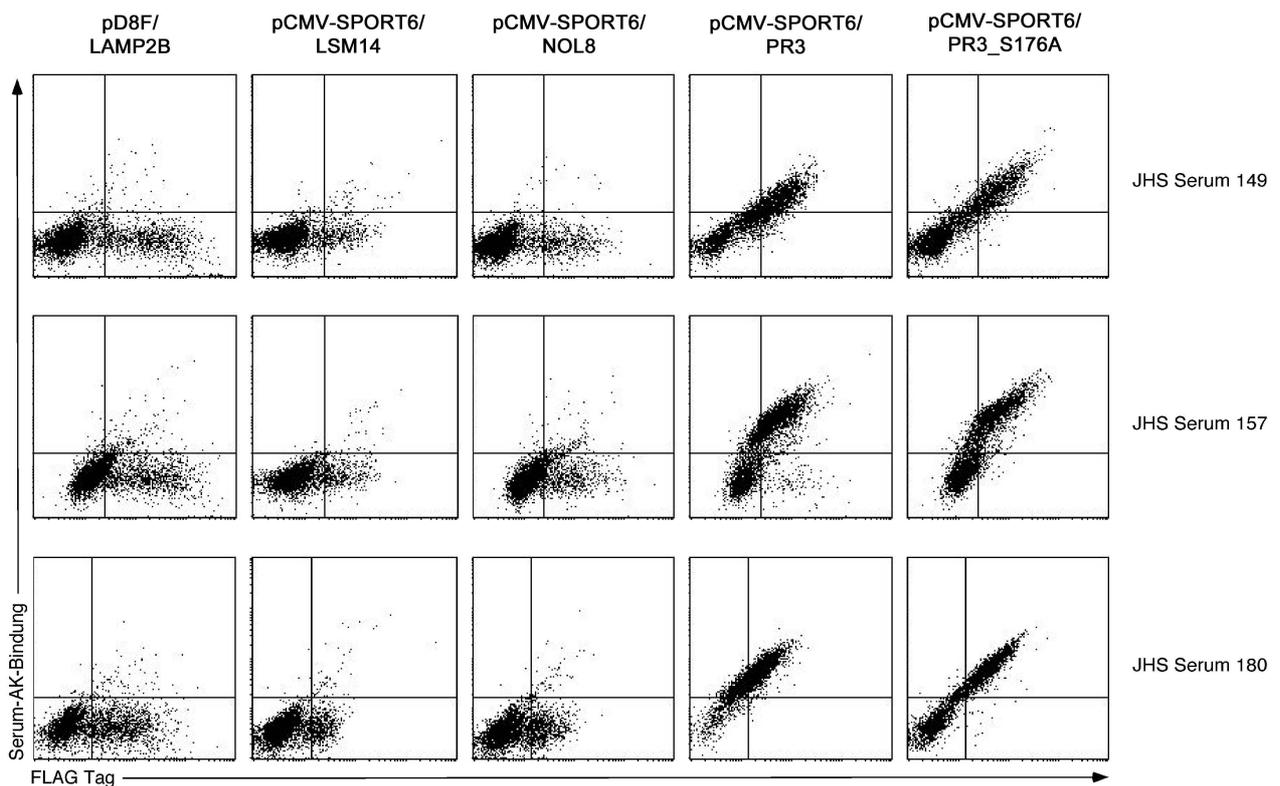


Abb. 5.15.: Exemplarische PR3-AK-positive Seren

In der Tabelle 5.2. sind alle für PR3-AK positiv getesteten Seren (entweder im Routine-EliA oder im in dieser Arbeit erstellten Screeningsystem) aufgelistet. Die Tabelle gibt Auskunft, in welchen Tests das Serum positiv reagierte.

Tab. 5.2.: PR3-AK positive Seren

Serum Nr.	Routine-EliA	pCMV-SPORT6/PR3	pCMV-SPORT6/PR3_S176A
67	+	+	+
71	+	-	-
72	+	+	+
73	Kein Material	-	+
84	+	+	+
89	+	-	+
94	+	+	+
96	+	+	+
97	+	+	+
99	+	+	-
104	+	+	+
105	Grenzwertig	+	+
107	+	+	+
108	+	+	-
110	-	-	+
111	+	-	-
115	+	+	+
119	+	+	+
120	+	+	+
121	+	+	+
129	+	+	+
134	+	+	+
135	+	+	+
138	+	-	-
148	+	+	+
149	+	+	+
155	+	+	+
156	+	+	+
157	+	+	+
160	-	-	+
164	-	+	+
168	Kein Material	+	+
180	+	+	+
181	+	+	+
197	Grenzwertig	+	+
211	+	-	-
221	+	+	+
230	+	+	+
232	+	-	-
238	+	+	+

Ca. 50% der 174 getesteten Seren waren bereits auf dem Routine-EliA-System für PR3-AK vorgetestet worden. Wenn ein Serum im HEK293T-FACS-System positiv für PR3-AK reagierte und kein Vorbefund aus dem EliA-System vorlag, wurde dieser Test nachgeholt (Nachmessung erfolgte für die Seren 148, 160, 164 und 221). Nicht vorgetestete Seren, die im FACS-System nicht reagierten, wurden nicht noch einmal getestet, sondern für die folgenden Errechnungen als negativ für PR3-AK angesehen.

Zwei der im HEK293T-FACS-System positiven Seren (Nr. 73, 168) hatten keine PR3-Vorbefunde aus dem EliA-System und konnten mangels Materials nicht nachbestimmt werden. Sie finden in den folgenden Berechnungen keine Berücksichtigung. (n = 172 Seren). Zwei im Routine-EliA als grenzwertig eingestufte Seren (Nr. 105, 197) wurden für die Berechnungen als positiv gewertet.

Sensitivität und Spezifität des HEK293T-FACS-Systems wurden im Vergleich zum Routine-EliA als diagnostischer Standard für die Definition PR3-AK positiver und -negativer Seren bestimmt.

Mit dem pCMV-SPORT6/PR3-Konstrukt wurden 30 Seren als positiv getestet, davon war 1 negativ im EliA (29 richtig positive, 1 falsch positives). 142 Seren waren auf dem PR3-Konstrukt negativ, davon wurden 6 positiv im EliA getestet (136 richtig negative, 6 falsch negative).

Mit dem pCMV-SPORT6/PR3_S176A-Konstrukt wurden 31 Seren als positiv getestet, davon waren 3 negativ im EliA (28 richtig positive, 3 falsch positive). 141 Seren waren auf dem PR3_S176A-Konstrukt negativ, davon wurden 7 positiv im EliA getestet (134 richtig negative, 7 falsch negative).

Die **Sensitivität** wurde nach folgender Formel errechnet:

$$P = \frac{\text{richtig positive}}{\text{richtig positive} + \text{falsch negative}}$$

Somit ergibt sich für die einzelnen PR3-Konstrukte:

$$P(\text{PR3}) = \frac{\text{richtig positive}(29)}{\text{richtig positive}(29) + \text{falsch negative}(6)} = 0,828$$

$$P(\text{PR3}_{S176A}) = \frac{\text{richtig positive}(28)}{\text{richtig positive}(28) + \text{falsch negative}(7)} = 0,8$$

Die **Spezifität** wurde nach folgender Formel errechnet:

$$P = \frac{\textit{richtig negative}}{\textit{richtig negative} + \textit{falsch positive}}$$

Somit ergibt sich für die einzelnen PR3-Konstrukte:

$$P(\textit{PR3}) = \frac{\textit{richtig negative}(136)}{\textit{richtig negative}(136) + \textit{falsch positive}(1)} = 0,993$$

$$P(\textit{PR3}_{S176A}) = \frac{\textit{richtig negative}(134)}{\textit{richtig negative}(134) + \textit{falsch positive}(3)} = 0,978$$

Kleine Unterschiede zwischen den Konstrukten konnten hinsichtlich der Detektion von Seren festgestellt werden: Die Seren 99 und 108 wurden im PR3-FACS-Test als positiv, im PR3_S176A-Test jedoch als negativ getestet. Beide waren im EliA PR3-positiv. Die Seren 73, 89, 110 und 160 wurden dagegen vom PR3_S176A-Test, nicht aber vom PR3-Test detektiert. Serum 89 war auch im EliA positiv, Serum 73 konnte mangels Material nicht beurteilt werden. Die Seren 106 und 110 wurden von dem EliA-Test nicht detektiert. Da über die Klinik der Patienten keine Angaben vorliegen, kann nicht beurteilt werden, ob es sich dabei um falsch positive Testergebnisse handelt, oder ob der Screeningtest mit dem S176A-mutierten PR3-Antigen möglicherweise Antikörper detektiert, die von dem kommerziellen Test nicht gefunden werden.

Die näherungsweise bestimmte Sensitivität und Spezifität unseres FACS-Screeningsystems wurde anhand dieser Ergebnisse als generell ausreichend hoch für die Folgeexperimente eingeschätzt.

5.2.4. Ergebnisse des Patientenserum-Screenings auf die untersuchten Autoantikörper

Die Testung für alle untersuchten Autoantigene und die Kontrolle hART4 erfolgte mit den Seren 1 bis 390 .

5.2.4.1. Screeningergebnisse für LAMP2

Eines der 390 getesteten Seren der aus gesammelten Seren der immunologischen Diagnostik erstellten Serumbank (JHS Serum 9) reagierte schwach, aber eindeutig gegen LAMP2. (Abb. 5.16.) Alle anderen reagierten nicht oder erfüllten eines der unter 5.2.2. genannten Kriterien für ein unspezifisch reaktives Serum. Die negativen Seren sind nicht einzeln dargestellt.

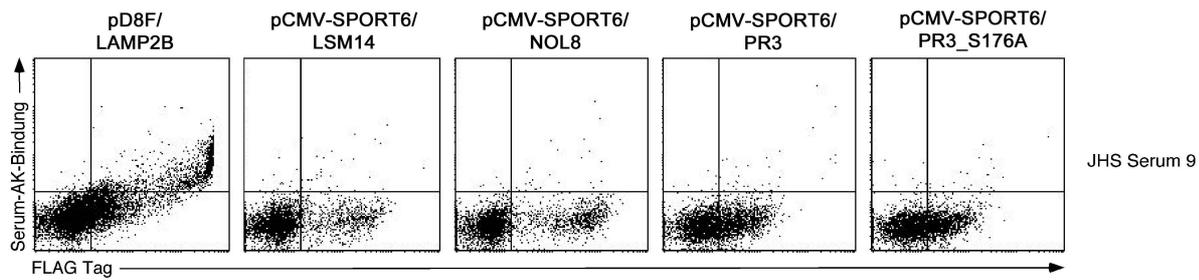


Abb. 5.16.: Positiv für anti LAMP2-AK getestetes Serum

Auffälligerweise wurde keines der von Renate Kain zur Verfügung gestellten Humansenen von unserem System detektiert. Unter diesen Seren befanden sich Positivkontrollen, die in ihrem eigenen Detektionssystem als positiv für LAMP2-AK getestet worden waren.

Ebenfalls wurde keines der von Elena Csernok zur Verfügung gestellten Seren (Patienten mit Glomerulonephritis bei Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener) sowie RA- und SLE-Kontrollen) in unserem Test als positiv detektiert. Negativ getestete Seren sind hier nicht dargestellt.

5.2.4.2. Screeningergebnisse für LSM14 und NOL8

15 Seren von Sarkoidosepatienten (zur Verfügung gestellt von Thorsten Krieger, Aesculab, Hamburg) wurden zusätzlich zu den 390 Seren aus der JHS Serumsammlung auf mit pCMV-SPORT6/NOL8-transfizierten Zellen getestet, da bei mehreren der von Cindy Hempp (Hempp, 2007) positiv für NOL8-AK getesteten Patientenseren die Verdachtsdiagnose Sarkoidose diskutiert worden war.

Es konnte bei keinem der 390 getesteten Humansenen aus der Serumbank des immunologischen Diagnostiklabors Antikörper gegen LSM14 oder NOL 8 festgestellt werden. Auch keines der 15 Seren von Sarkoidosepatienten reagierte gegen unseren NOL8-Test. Die negativ getesteten Seren sind nicht im Einzelnen dargestellt.

5.3. Serumtestung auf LAMP2-Testträgern der AG Kain, Wien

Um die Ergebnisse unseres LAMP-2 Assays zu validieren und die negative Reaktion der aus Wien zur Verfügung gestellten Positivseren in unserem Testsystem weiter zu untersuchen, sollten diese sowie das von uns als LAMP2 positiv getestete Serum in dem in Wien entwickelten und verwendeten Assaysystem getestet werden. Dazu wurden uns freundlicherweise von Renate Kain (Klinisches Institut für Pathologie, Medizinische Universität Wien, Österreich) mit LAMP2

transfizierte und untransfizierte CHO IdID-Zellen gesandt, die auf Glasträgern fixiert waren. Die Synthese des für die O-Glykosylierung essentiellen UDP-N-Acetylgalaktosamins der IdID-Zelllinie ist durch Mutation inaktiviert. N-Acetylgalaktosamin ist der erste Zuckerrest, der bei der O-Glykosylierung an die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin angefügt wird. Damit ist diese Zelllinie O-Glykosylierungs-defizient. Dieses O-Glykosylierungsdefizit kann durch Zugabe von N-Acetylgalaktosamin ins Nährmedium aufgehoben werden (Kozarsky et al., 1988).

Die Färbung der Zellen erfolgte wie unter 4.3.4.3. beschrieben. Als Seren wurden das von uns positiv für LAMP2-Antikörper getestete Serum 9 sowie 4 von der AG Kain positiv für LAMP2 getestete Seren und 5 mitgesandte Negativkontrollen (R. Kain Serensammlung 2.1 bis 2.9) verwandt (die Testung der R. Kain-Seren 1.1 bis 1.9 war aufgrund eines technischen Problems nicht auswertbar).

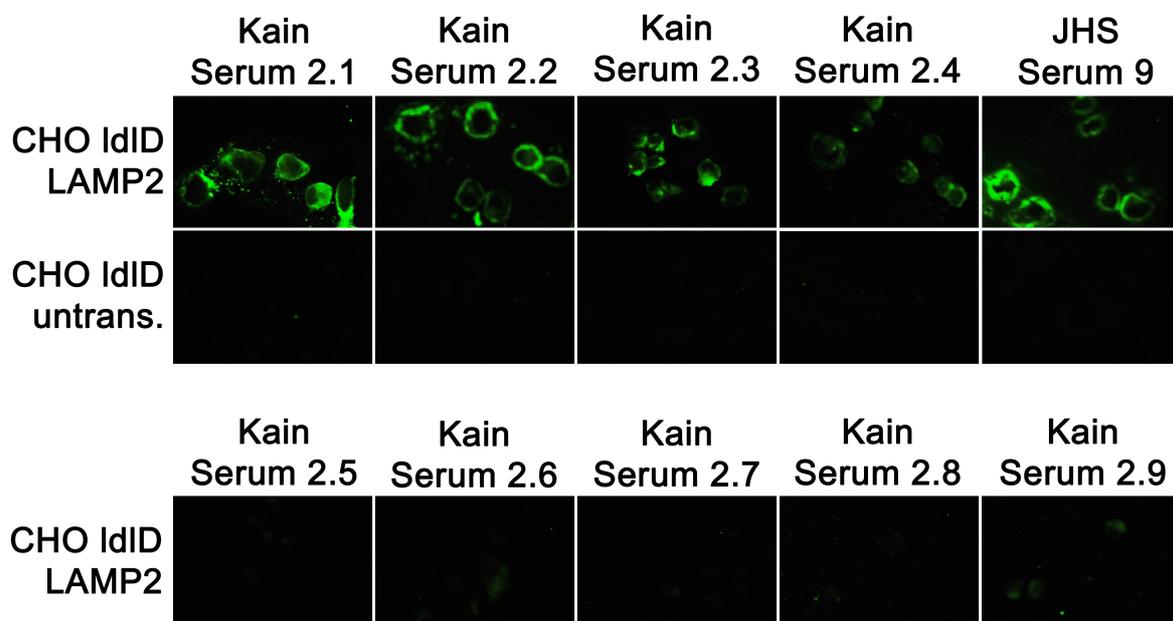


Abb. 5.17.: Testung von LAMP2-positiven Seren auf Testträgern der AG Kain, Wien (Kontrast und Helligkeit erhöht)

Wie erwartet konnten die vier Positivseren mit Hilfe dieses Systems auf den mit LAMP2 transfizierten, nicht aber auf untransfizierten CHO IdID-Zellen detektiert werden. Auch das in unserem FACS-Serumscreening positiv für LAMP2-Antikörper getestete Humanserum (JHS Serumbank Nr. 9) reagierte gegen transfizierte, nicht aber gegen die untransfizierten Zellen.

Auch erneute FACS- und IFT(vitale Zellen)-Versuche mit den stabil transfizierten Zelllinien zeigten

keine Bindung der Seren 1.1 bis 1.9 oder 2.1 bis 2.9 an mit unserem pD8F/LAMP2B-Konstrukt transfizierte Zellen. (Ergebnis nicht gezeigt.)

5.4. Entfernung der Proteintags, Klonierung eines nativen LAMP2-Konstruktes

Da die Positivseren aus Wien mit dem dort verwendeten, nicht jedoch mit unserem Assaysystem reagierten, suchten wir nach Unterschieden zwischen den beiden Expressionssystemen. Diese könnten entweder in dem für die Transfektion verwendeten Konstrukt, oder aber in den zur Expression verwendeten Zielzellen begründet sein. Ein nahe liegender Unterschied in den verwendeten Expressionskonstrukten lag darin, dass unsere LAMP-2 Konstrukte Modifikationen enthielten (N-terminaler FLAG-tag, membrannaher cMyc-tag, heterologes Leader-Peptid, Ersatz von Transmembrandomäne und zytoplasmatischer Domäne durch die entsprechenden Domänen des PDGF-Rezeptors). Diese Modifikationen wurden daher schrittweise entfernt, um herauszufinden, ob sie für die Nichtreaktivität der Seren in unserem System verantwortlich waren.

5.4.1. Klonierungsstrategie zur Entfernung der Modifikationen an LAMP2

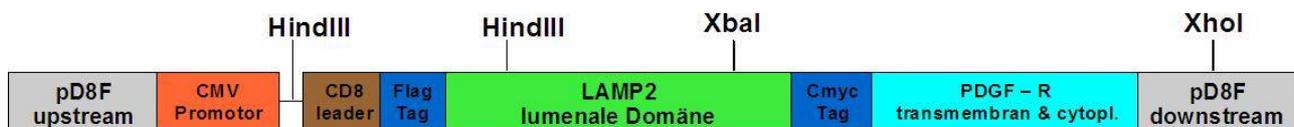


Abb. 5.18.: pD8F/LAMP2B

Im ursprünglich erstellten LAMP2-Konstrukt (pD8F/LAMP2B, Abb. 5.18.) sind alle oben genannten Modifikationen enthalten. Eine Übersicht über Restriktionsstellen in dem Konstrukt zeigt, dass das CD8 leader-Peptid und der FLAG-tag durch einen Verdau des Konstruktes mit HindIII entfernt werden konnten, um durch das native Leader-Peptid von LAMP2 ersetzt zu werden. Ebenso konnten die C-terminalen Modifikationen durch einen Verdau mit XbaI und XhoI entfernt werden, um sie durch die native Transmembran- und zytoplasmatische Domäne von LAMP2 zu ersetzen.

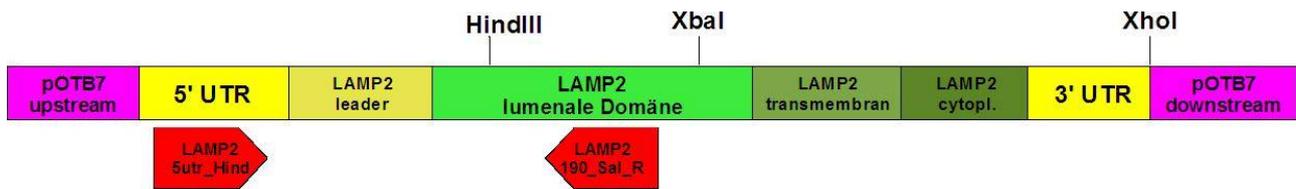


Abb. 5.19.: LAMP2 cDNA in pOTB7

Das in Abb. 5.19 abgebildete Schema des für die ursprüngliche Klonierung von LAMP2 verwendeten cDNA-Klons (pOTB7/LAMP2) verdeutlicht die Klonierungsstrategie. Die Transmembran- und intrazelluläre Domäne von LAMP2 wurden (zusammen mit einem Stück der 3'-untranslatierten Region von LAMP2) mit den Restriktionsenzymen XbaI und XhoI, ohne dass eine PCR nötig wäre, aus dem Plasmid geschnitten und in das vorher mit den gleichen Enzymen verdaute pD8F/LAMP2B-Konstrukt (Abb. 5.18) ligiert. Dieses Konstrukt wurde als pD8F/LAMP2B_natcyt benannt. (Abb. 5.20.)

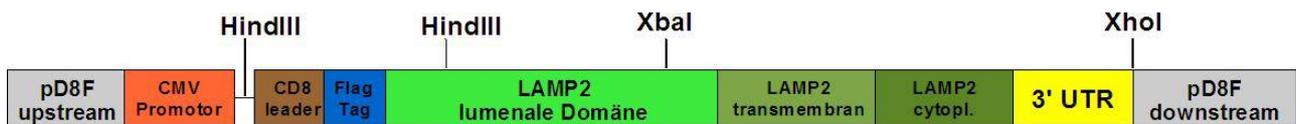


Abb. 5.20.: pD8F/LAMP2B_natcyt

Ein kurzes Stück der 5' untranslatierten Region, die Leaderpeptidsequenz und etwa die Hälfte der lumenalen Domäne von LAMP2 wurde mit den Primern LAMP2_5utr_Hind und LAMP2_190_Sal_R per PCR amplifiziert (s. Abb. 5.19.). Dabei wurde eine HindIII-Schnittstelle in die 5' untranslatierte Region von LAMP2 durch den verwendeten Vorwärtsprimer eingebracht. Die innerhalb der lumenalen Domäne durch den verwendeten Rückwärtsprimer eingebrachte SalI-Schnittstelle spielt für diese Klonierung keine Rolle, der Primer war ursprünglich für eine andere Klonierung entworfen worden. Nach Verdau des Amplifikats mit HindIII wurde es in das ebenfalls vorher mit HindIII verdaute pD8F/LAMP2B-Konstrukt (Abb. 5.18.) ligiert. Das so entstandene Konstrukt erhielt den Namen pD8F/LAMP2B_natlead (Abb. 5.21.).

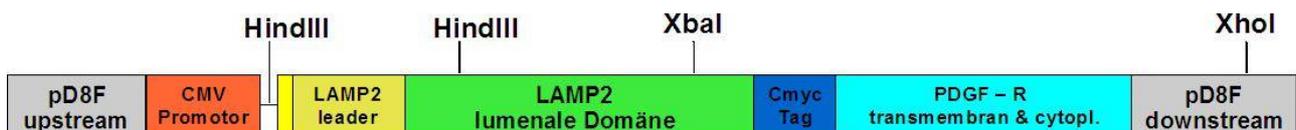


Abb. 5.21.: pD8F/LAMP2B_natlead

Um ein Expressionskonstrukt für unmodifiziertes, nicht mit Tags oder heterologen Leaderpeptiden bzw. Domänen versehenes LAMP2 zu erstellen, wurde die mit XbaI und XhoI aus dem LAMP2-mRNA-Sequenzklon in pOTB7 herausgeschnittene LAMP2 B - Originalsequenz (Transmembrandomäne und zytoplasmatische Domäne, Abb. 5.19) in das bereits am N-Terminus zu nativem LAMP2 rückklonierte Konstrukt (pD8F/LAMP2B_natlead, Abb. 5.21.), das ebenfalls mit XbaI und XhoI verdaut worden war, ligiert. Das neue Konstrukt erhielt den Namen pD8F/LAMP2B_nat (Abb. 5.22.).

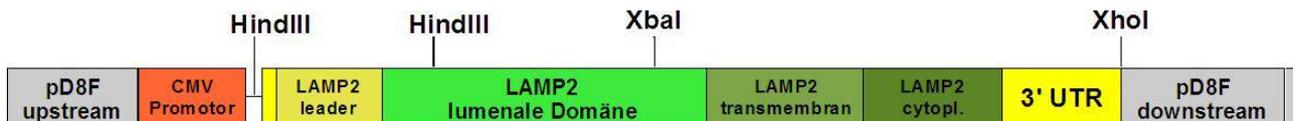


Abb. 5.22.: pD8F/LAMP2B_nat

5.4.2. Inaktivierung des lysosomalen Targetingsignals von LAMP2 durch Mutagenese

Das pD8F/LAMP2B_nat-Konstrukt ließ sich in Vorversuchen – im Gegensatz zu den anderen Konstrukten – nur in geringen Mengen auf der Oberfläche von transfizierten HEK293T-Zellen nachweisen (s. 5.4.6.). Daher vermuteten wir, dass ein Großteil der LAMP2-Moleküle bei dieser Transfektante, wie in vivo, in den Lysosomen lokalisiert sein könnte (Eskelinen et al., 2003).

Die lysosomalen Targetingsignale der strukturell sehr ähnlichen Proteine LAMP1 und LAMP2 sind bekannt und befinden sich am C-Terminus der Proteine. Beiden gemeinsam ist als essentieller Bestandteil des Signals ein Tyrosin an viertletzter Stelle der Primärstruktur (Rohrer et al., 1996; Eskelinen et al., 2003). Mehrfach wurde gezeigt, dass eine einfache Mutation des essentiellen Tyrosins eine überwiegende Lokalisation der Moleküle an der Zelloberfläche und kaum in den Lysosomen zur Folge hat (Williams & Fukuda, 1990; Rohrer et al., 1996).

Um die Oberflächenexpression zu forcieren, inaktivierten wir die lysosomale Targeting-Sequenz von LAMP2 durch gezielte PCR-Mutagenese mit den Primern LAMP2 LysTX F und LAMP2 LysTX R die das Codon für das essentielle Tyrosin zu einem Histidin-Codon mutieren sollten.

Das nach DpnI-Verdau, Agarosegelelektrophorese, Aufreinigung und Transformation, sowie Miniprep-Erstellung und hinsichtlich seiner Korrektheit sequenzierte neue Konstrukt ließ sich deutlich besser an der Oberfläche von HEK293T-Zellen exprimieren und erhielt den Namen pD8F/LAMP2B_nat_Y407H.

5.4.3. Mutagenese der extrazellulären Domäne von LAMP2 B zu LAMP2 A

Von LAMP-2 sind drei Isoformen bekannt (LAMP2 A, LAMP2 B und LAMP2 C), die durch alternatives Splicing gebildet werden (*UniProt*: 10.12.2010, Accession: P13473 / LAMP2_HUMAN). Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden aus der mRNA-Sequenz der Isoform LAMP2 B erstellt, unter der Annahme, die minimalen Unterschiede in den extrazellulären Domänen der Isoformen seien für die Detektion des Autoantigens durch LAMP2-ANCA nicht von Relevanz. Kain et al. hatten ein LAMP2 A – Konstrukt verwendet (Kain et al., 2008).

Abb. 5.23. stellt die Unterschiede zwischen den Spleißvarianten LAMP2 A und -B dar.

LAMP2 A:

370	380	390	400	410	
KYSTAQDCSA	DDDNFLVPIA	VGAALAGVLI	LVLLAYFIGL	KHHHAGYEQF	C-Terminus

LAMP2 B:

370	380	390	400	410	
KYSTAQECSL	DDDTILIPII	VGAGLSGLII	VIVIAVIVGR	RKSYAGYQTL	C-Terminus

Legende:

Schwarz: Ende der lumenalen Domäne

Blau: Transmembrandomäne

Grün: Zytoplasmatische Domäne

Rot: Essentielles Tyrosin des lysosomalen Targeting-Signals

Unterstrichen: In den Spleißvarianten unterschiedliche Aminosäuresequenz

Abb. 5.23.: Übersicht über die Aminosäuresequenzunterschiede zwischen LAMP2 A und B

Obwohl die lumenalen Domänen in der Tat nahezu identisch sind, unterscheiden sie sich in einigen wenigen Aminosäuren. So findet sich auch gerade in dem von Renate Kain beschriebenen Epitop P₃₃₁₋₃₄₁ (QGKYSTAQDCS) (Kain et al., 2008) ein Austausch des Glutamats (D) an drittletzter Stelle durch Glutamin (E). Um sicherzustellen, dass dieser Unterschied nicht für das Nichtbinden der in der AG Kain, Wien positiv für LAMP2-ANCA getesteten Humanseren an unsere Konstrukte verantwortlich ist, wurde das Epitop in unserem pD8F/LAMP2B_nat_Y407H-Konstrukt per PCR Mutagenese unter Verwendung der Primer LAMP2 B to A F und LAMP2 B to A R in die Aminosäure-Sequenz des Istotyps LAMP2 A umgewandelt. Das Konstrukt erhielt den Namen

pD8F/LAMP2A*.

5.4.4. Übersicht über die unterschiedlichen LAMP2-Expressionskonstrukte

Die Tabelle 5.3. gibt eine Übersicht über die in den LAMP2-Expressionskonstrukten vorhandenen Strukturen.

Tab. 5.3.: Übersicht über die LAMP2-Expressionskonstrukte

Konstrukt	Leader	FLAG tag	cMyc tag	Transmembran- & cytoplasmatische Domäne	Besonderheiten
pD8F/LAMP2B	CD8	+	+	PDGF-R	-
pD8F/LAMP2B_natlead	LAMP2	-	+	LAMP2	-
pD8F/LAMP2B_natcyt	CD8	+	-	PDGF-R	-
pD8F/LAMP2B_nat	LAMP2	-	-	LAMP2	-
pD8F/LAMP2B_nat_Y407H	LAMP2	-	-	LAMP2	Lysosomales Targetingsignal inaktiviert
pD8F/LAMP2A*	LAMP2	-	-	LAMP2	Lysosomales Targetingsignal inaktiviert, extrazellulär Aminosäuresequenz von LAMP2 A

5.4.5. Testung der neuen LAMP2-Expressionskonstrukte

Zum Vergleich der neuen LAMP2-Expressionskonstrukte mit dem pD8F/LAMP2B-Konstrukt wurden diese in HEK T-Zellen transfiziert. Als Marker für die erfolgreiche Transfektion diente die Co-Transfektion mit eGFP. Dann erfolgte die Färbung mit Antikörpern zur Analyse im FACS und IFT.

Zur Darstellung im FACS wurden der M2-Antikörper (anti FLAG), der anti cMyc-Antikörper sowie der anti LAMP2-Antikörper als unkonjugierte Erstantikörper und der anti Maus-IgG-Antikörper (Alexa 647) als Sekundäntikörper verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.24. dargestellt.

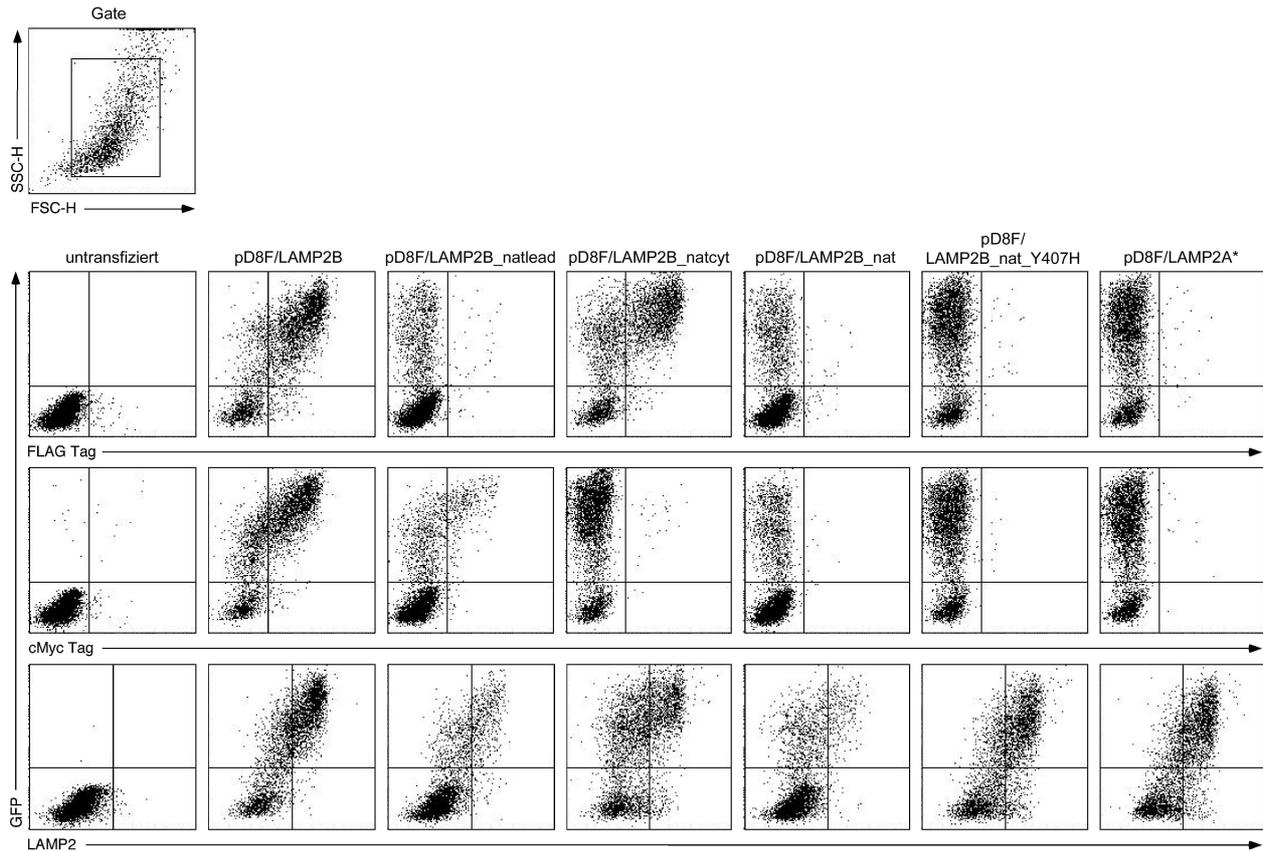


Abb. 5.24.: Testung der neuen LAMP2-Konstrukte

Wie erwartet detektierte der M2-Antikörper nur die den FLAG-tag enthaltende Konstrukte (pD8F/LAMP2B und pD8F/LAMP2B_natcyt) und der cMyc-Antikörper nur die den cMyc-tag enthaltende Konstrukte (pD8F/LAMP2B und pD8F/LAMP2B_natlead). Der LAMP2-Antikörper dagegen detektierte alle LAMP2-Expressionskonstrukte. Die Zahl doppelt positiver Zellen ist im unmodifizierten pD8F/LAMP2B_nat deutlich erniedrigt, absolut wie auch prozentual im Verhältnis zu den eGFP-positiven „transfizierten“ Zellen (ca. 25% der eGFP positiven / transfizierten Zellen wurden stets detektiert). Die Konstrukte mit nativer zytoplasmatischer Domäne und mutiertem lysosomalem Targetingsignal (pD8F/LAMP2B_nat_Y407H und pD8F/LAMP2A*) zeigten den gleich hohen Anteil detektierter Zellen an den eGFP-positiven, die auch beim pD8F/LAMP2B-Konstrukt gezeigt werden konnte (stets ca. 75% der GFP-positiven). Auch pD8F/LAMP2B_natlead (mit nativer zytoplasmatischer Domäne ohne mutiertes Targetingsignal, aber mit heterologem Leaderpeptid und einem N-terminalen FLAG-tag versehen) zeigte eine deutlich höhere detektierbare Oberflächenexpression (ca. 50% der eGFP-positiven Zellen) als natives LAMP2.

Der gleiche Nachweis wurde auch im Immunfluoreszenztest geführt. Die Färbung erfolgte mit den gleichen Erstantikörpern, allerdings mit anti Maus-IgG (PE) als Zweitantikörper nach dem Immunfluoreszenztestprotokoll für vitale eukaryotische Zellen (4.3.4.1.). Die Ergebnisse fielen denen der FACS-Analyse entsprechend aus (Ergebnisse nicht gezeigt).

5.5. Testung der LAMP2-Antikörper-positiven Seren auf den neuen Konstrukten

Die von Renate Kains Arbeitsgruppe positiv auf LAMP2 getesteten Seren sollten nun auf den neuen LAMP2 Expressionskonstrukten getestet werden, da sie nicht gegen das pD8F/LAMP2B-Konstrukt reagierten.

Alle LAMP2-Expressionskonstrukte wurden in HEK293T-Zellen transfiziert. Da eine Gegenfärbung mit dem monoklonalen anti LAMP2-Antikörper potentiell Bindungsstellen der Humansenen hätte blockieren können, wurde als Nachweis der Transfektion keine Gegenfärbung, sondern ein Co-Transfektion mit eGFP durchgeführt. Als Positivkontrolle für die Funktionalität des Assays wurden zusätzlich HEK293T-Zellen transient mit dem nicht S176A-mutierten Proteinase 3-Expressionskonstrukt transfiziert (auch hier eGFP-Co-Transfektion).

Die Positivität der Zellen auf LAMP2 und Proteinase 3 wurde in gesonderten Röhren ohne Zugabe von Serum gemessen. Sie erfolgte mittels eines biotinylierten anti LAMP2-Antikörpers sowie mit APC konjugiertem Streptavidin. Der Proteinase 3-Nachweis erfolgte direkt mit Hilfe des FITC konjugierten Proteinase 3-Antikörpers.

Jedes Serum der Serumsammlung von Renate Kain (1.1 bis 1.9 und 2.1 bis 2.9, jeweils vier in der AG Kain, Wien positiv für LAMP2-ANCA getestet, enthalten) wurde einmal mit jedem Konstrukt inkubiert (Serumverdünnung 1:100). Gebundenes Serum konnte dann mit einem biotinylierten anti Human IgG-Antikörper sowie mit APC konjugiertem Streptavidin detektiert werden. Als Positivkontrolle diente das bereits auf Reaktivität gegen das Proteinase 3-Konstrukt positiv getestete Serum 67 (JHS Serumbank, 1:100). Negativkontrollen für die Bindung der Seren sowie die eGFP-Fluoreszenz waren untransfizierte HEK293T-Zellen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.25. dargestellt.

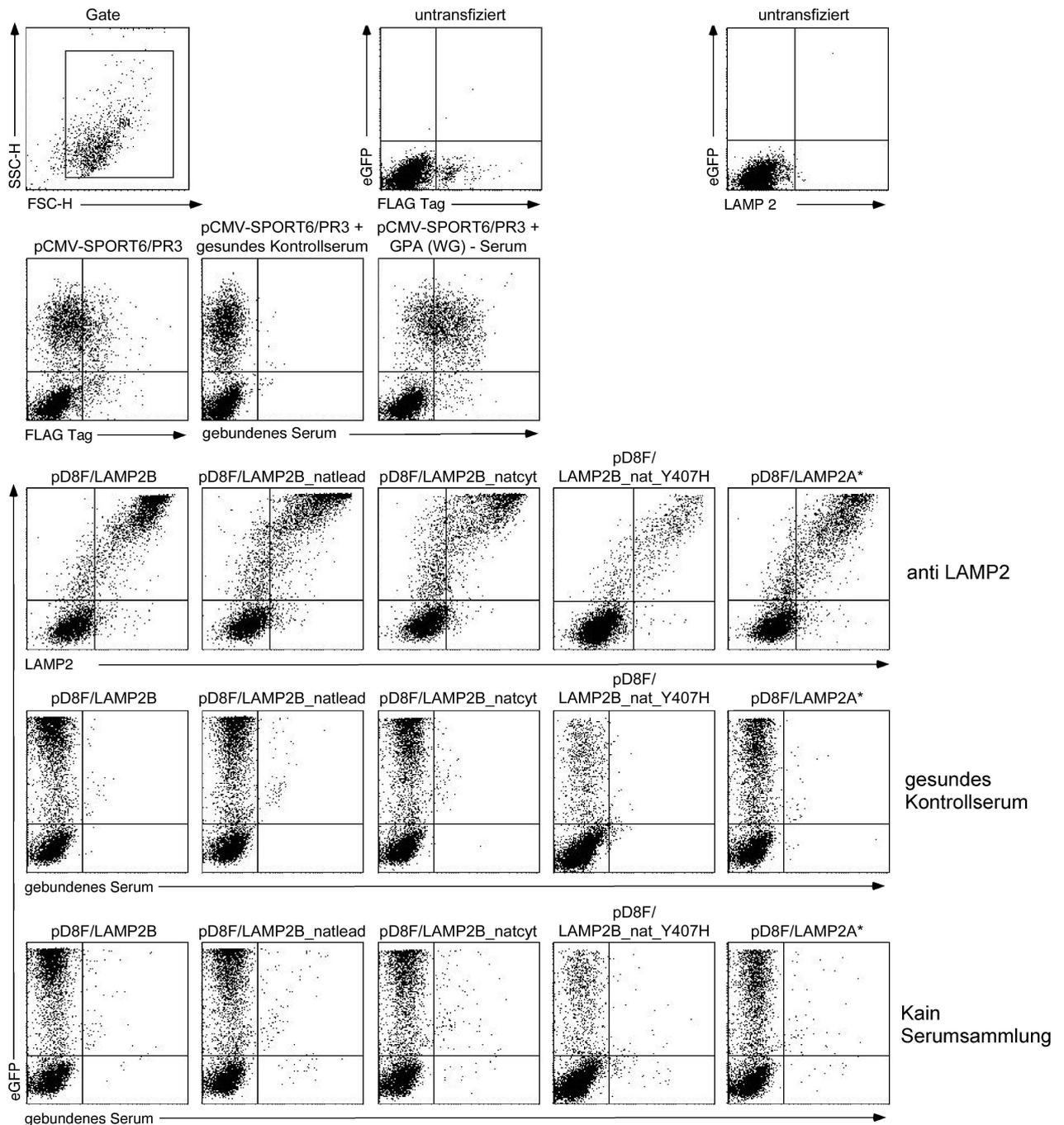


Abb. 5.25.: Testung von Humanseren auf den neuen LAMP2-Expressionskonstrukten

Obwohl die Expression der LAMP2-Konstrukte mit dem anti LAMP2-Antikörper gezeigt werden konnte, reagierte keines der Seren gegen eines der verwendeten Konstrukte. Als Beispiel für die Reaktivität aller verwendeten Seren der AG Kain ist hier (mit „Kain Serumsammlung“ beschriftet) das Serum 2.1. abgebildet. Die anderen, ebenso negativ reagierenden Seren sind nicht gezeigt. Das als Positivkontrolle dienende Serum 67 dagegen reagierte deutlich gegen die mit Proteinase 3

transfizierten Zellen.

Der gleiche Versuch wurde ebenfalls unter Verwendung von CHO IdID-Zellen zum Ausschluss der Relevanz einer unterschiedlichen Glykosylierung durch die beiden Zelllinien durchgeführt. Das Ergebnis glich dem für HEK T-Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

5.6. Immunisierungsversuche (Gene Gun / Tätowierung)

Die Tierexperimente erfolgten im Rahmen der Tierversuchsanzeige A 10a/5 „Charakterisierung von funktionell relevanten Lymphozytenoberflächenmembranantigenen und verwandter Strukturen anderer Organe, genetische Immunisierungen“ am UKE, Hamburg.

Ziel dieser Versuche war es, zu evaluieren, ob eine Antikörperproduktion durch eine DNA-Immunisierung per Tätowierung mit der Gene Gun-Immunisierung vergleichbare Resultate liefert, also als alternative (eventuell schonendere und besser kontrollierbare) Immunisierungstechnik in Frage kommt.

5.6.1. Durchführung der Immunisierungen

Den Versuchstieren wurde Blut zur Gewinnung von Prä-Immunsereen (pIS) vor der Immunisierung abgenommen. Daraufhin wurden zwei Kaninchen (K124, K125) und zwei Ratten (R66, R67) per Gene Gun sowie zwei Kaninchen (K126, K127) und zwei Ratten (R68, R69) per Tätowierung immunisiert. Das zur Immunisierung verwendete DNA-Konstrukt war das pD8F/LAMP2B-Konstrukt (also inklusive FLAG-tag, cMyc-tag und PDGF-Rezeptor-Transmembrandomäne).

Nach der letzten Boost-Immunisierung wurde jedem Versuchstier wieder eine Serumprobe (Immunsereum, IS) abgenommen. Die folgenden Experimente erfolgten mit diesen Prä-Immun- und Immunsereen.

Die gesamte Durchführung der Immunisierung ist einschließlich Vorbereitungen, Immunisierungsplan und Protokollen für unterschiedliche Methodiken und Versuchstiere unter 4.3.2. ausführlich beschrieben.

5.6.2. Untersuchung der Immunseren im FACS

Die Untersuchung erfolgte auf vitalen, stabil mit dem pD8F/LAMP2B-Konstrukt transfizierten HEK293T-Zellen sowie vitalen untransfizierten HEK293T-Zellen als Negativkontrolle. Die Färbung folgte dem gleichen Doppelkonzept wie das Serumscreeningsystem. Der FLAG-tag wurde mit dem M2-Antikörper und einem anti Maus-IgG Alexa 647-Zweitantikörper nachgewiesen. Die Bindung von Tierseren (Prä-Immun- oder Immunseren) wurde je nach Tierart mit einem PE-konjugierten anti-Ratte-IgG-Zweitantikörper oder einem PE-konjugierten anti Kaninchen-IgG-Zweitantikörper detektiert. Auch hier sollte sich die Intensität der PE-Fluoreszenz im Falle von gebundenem Serum proportional zur Intensität der Alexa 647-Fluoreszenz verhalten, da stärker LAMP2 exprimierende Zellen (Alexa 647) mehr gegen das Antigen gerichtete Serumentikörper (PE) binden sollten. Bei erfolgreicher Immunisierung sollten die Immunseren im Vergleich zu den Prä-Immunseren eine deutlich stärkere Bindung zeigen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 5.26. und 5.27 als Histogramm und Dot Plot dargestellt.

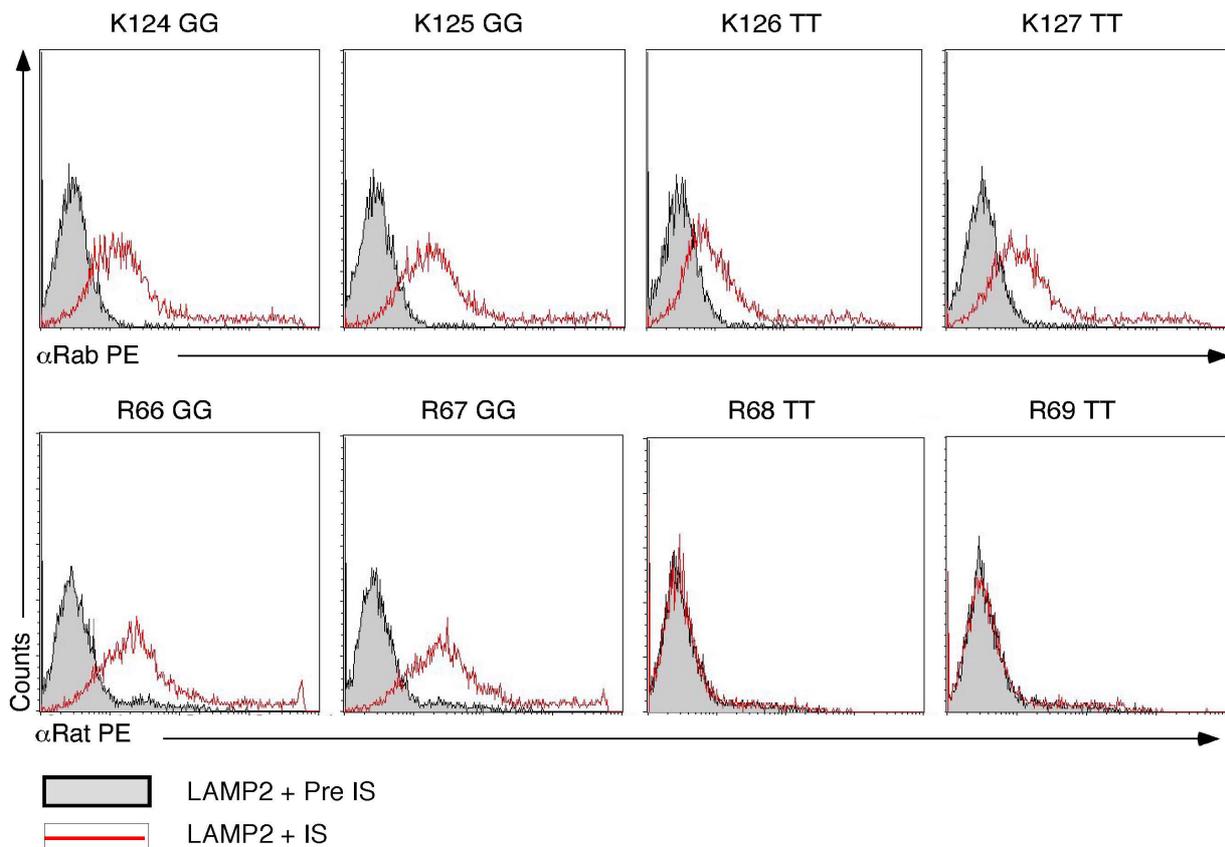


Abb. 5.26.: Testung der Immunseren im FACS (Histogramm; GG = Gene Gun, TT = Tattoo)

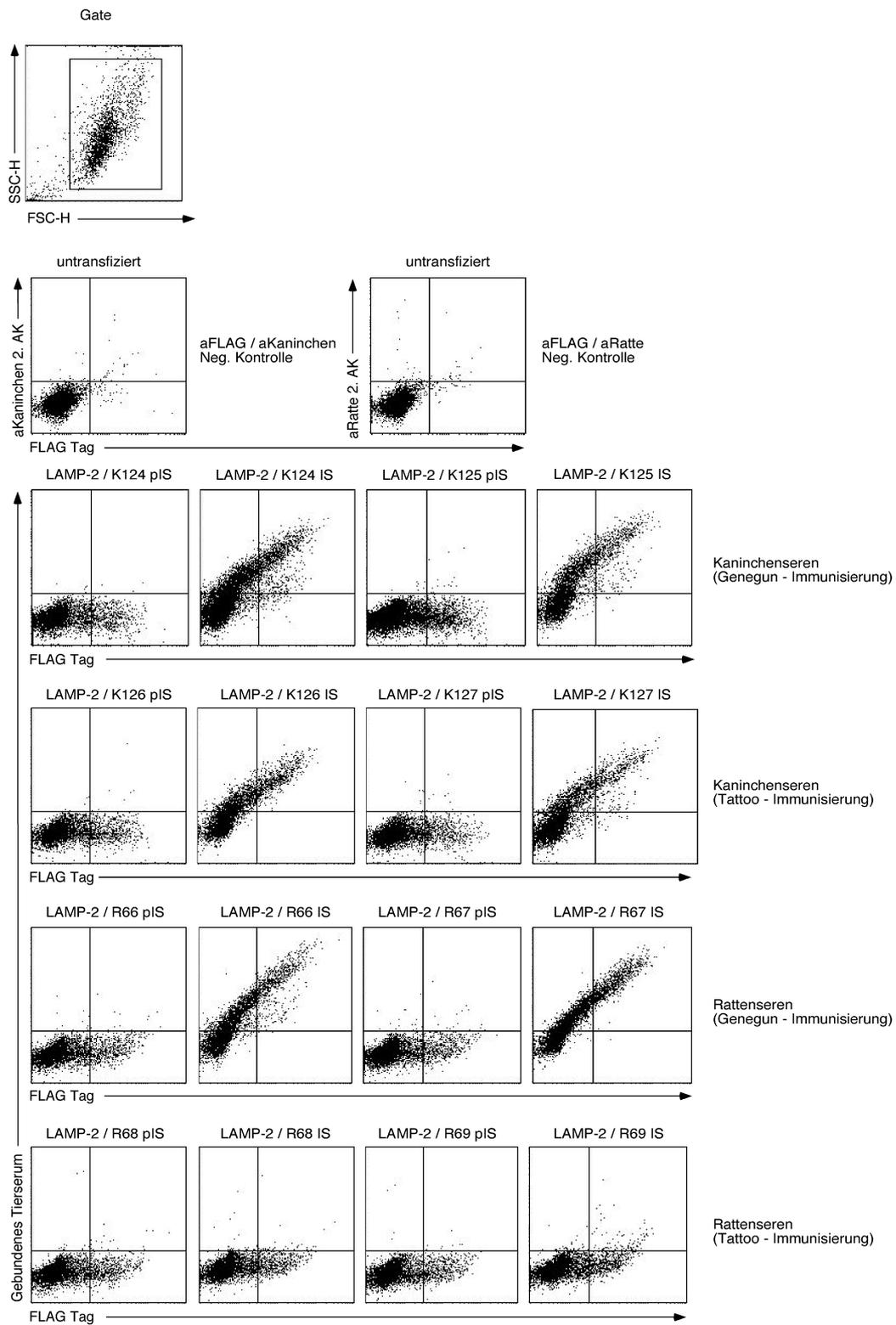


Abb. 5.27.: Testung der Immunsereen im FACS (Dot Plots)

Die Abbildungen zeigen die Testung der Präimmunseren gegen die Immunseren auf mit dem LAMP2-Konstrukt transfizierten HEK T-Zellen im FACS als Dot Plot (Abb. 5.26.) und als Histogramm (Abb. 5.27, GG: Gene Gun, TT: Tattoo).

In beiden Darstellungen kann die Antikörperbindung der Gene Gun-immunisierten Kaninchen (K124, K125) und Ratten (R66, R67) sowie die der tätowierten Kaninchen (K126, K127) im Vergleich zu den Prä-Immunseren deutlich erkannt werden: Deutliche Erhöhung der PE-positiven Zellen in Dot Plot und Histogramm, im Dot Plot proportionaler Anstieg der gebundenen Tierseren (Serum + PE-Fluoreszenz) mit der Transfektionsstärke (M2 / antiFLAG + Alexa 647-Fluoreszenz).

Die Seren der per Tätowierung immunisierten Ratten (K68, K69) zeigten jedoch keine signifikante Zunahme der Antikörperbindung im Vergleich zu den Prä-Immunseren.

5.6.3. Untersuchung der Immunseren im indirekten Immunfluoreszenztest

Als Beweis der Co-Lokalisation der gebundenen Serumantikörper mit dem LAMP2 auf der Zelloberfläche sollte das Bindungsverhalten der Immunseren zusätzlich im indirekten Immunfluoreszenztest untersucht werden. Auch hier erfolgte die Anfärbung von FLAG-tag und gebundenem Serum mit unterschiedlichen Fluorochromen (Gegenfärbung), um ihre Co-Lokalisation darstellen zu können. In den Versuchen fanden wieder vitale, stabil mit pD8F/LAMP2B transfizierte oder untransfizierte HEK293T-Zellen Verwendung. Eingesetzt wurde als Erstantikörper der M2-Antikörper, der mit einem FITC-konjugierten anti Maus-IgG-Zweitantikörper detektiert werden konnte. Die Detektion der Tierseren wurde je nach Tierart mit einem PE-konjugierten anti Ratte-IgG-Zweitantikörper oder einem PE-konjugierten anti Kaninchen-IgG-Zweitantikörper durchgeführt. Nach abschließender Färbung mit dem Hoechst 33342-Farbstoff wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht und abfotografiert. Die Abbildungen 5.28 bis 5.31 zeigen die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie. In der linken Spalte ist jeweils die Hoechst 33342-Färbung dargestellt, in der zweiten die FITC-Fluoreszenz, in der dritten FITC- und PE-Fluoreszenz gemeinsam (Rot-Grün-Filter) und in der rechten die PE-Fluoreszenz. In den Zeilen folgen jeweils der gleiche Versuch mit Prä-Immunserum (pIS) und Immunserum (IS) des gleichen Tieres aufeinander.

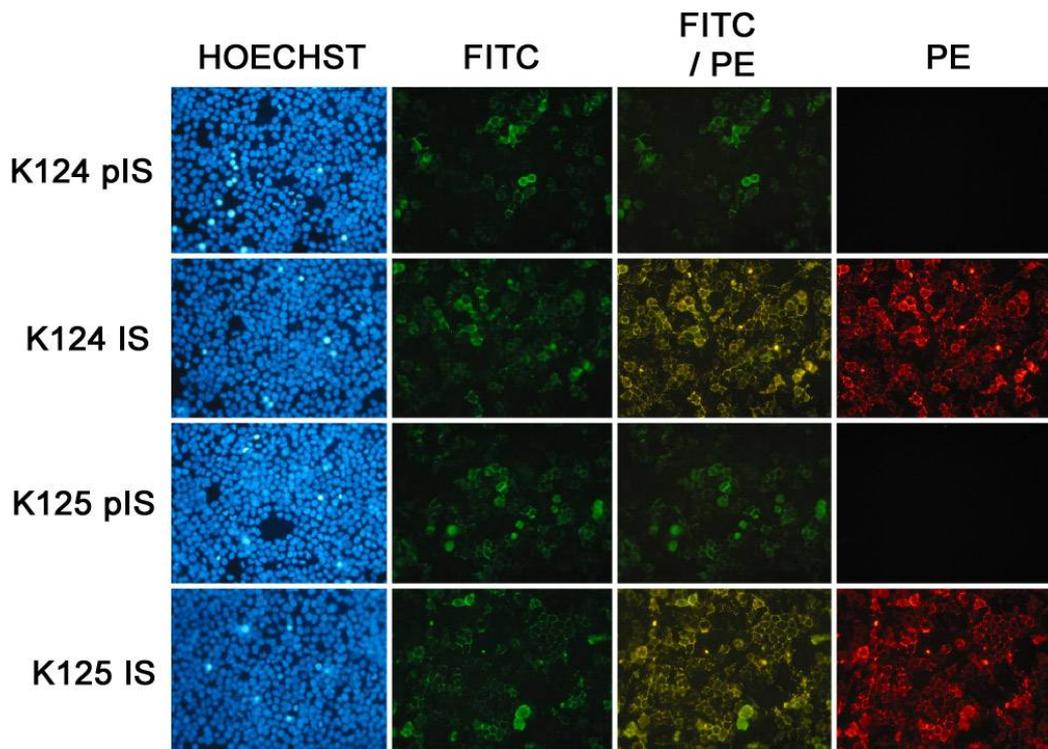


Abb. 5.28.: IFT der Seren von K124 / K125 (Kaninchen, Gene Gun-Immunisierung)

Die FITC-Fluoreszenz (M2-Antikörper) zeigt die Positivität der stabil transfizierten Zellen für das LAMP2-Konstrukt an. Die Prä-Immunsere zeigen in keinem der in den Abb. 5.28 bis 5.31 dargestellten Experimente eine PE-Fluoreszenz und damit keine Bindung an die Zellen. Dagegen zeigen die Immunsere der Gene Gun-immunisierten Tiere K124 und K125 (Abb. 5.28) sowie R67/R68 (Abb. 5.30) eine deutliche PE-Fluoreszenz, die mit der FITC-Fluoreszenz ko-lokalisiert ist. Dies zeigt eine starke Bindung der AK aus den Immunsere an die LAMP2-positiven Zellen. Die Immunsere K126 und K127 (Tattoo-immunisierte Tiere, Abb. 5.29) zeigen eine schwache Reaktivität. Die Tatto-immunisierten Ratten (R68 und R69) reagieren nicht mit LAMP-2-transfizierten Zellen (Abb. 5.31)

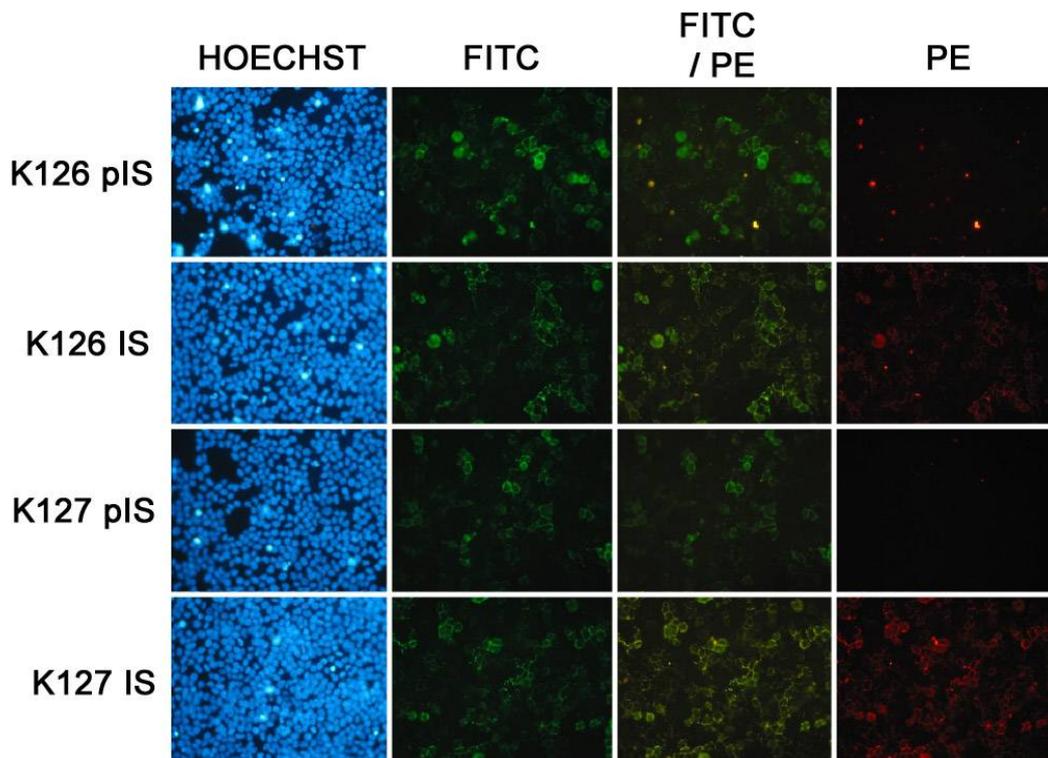


Abb. 5.29.: IFT der Seren von K126 / K127 (Kaninchen, Tattoo-Immunisierung)

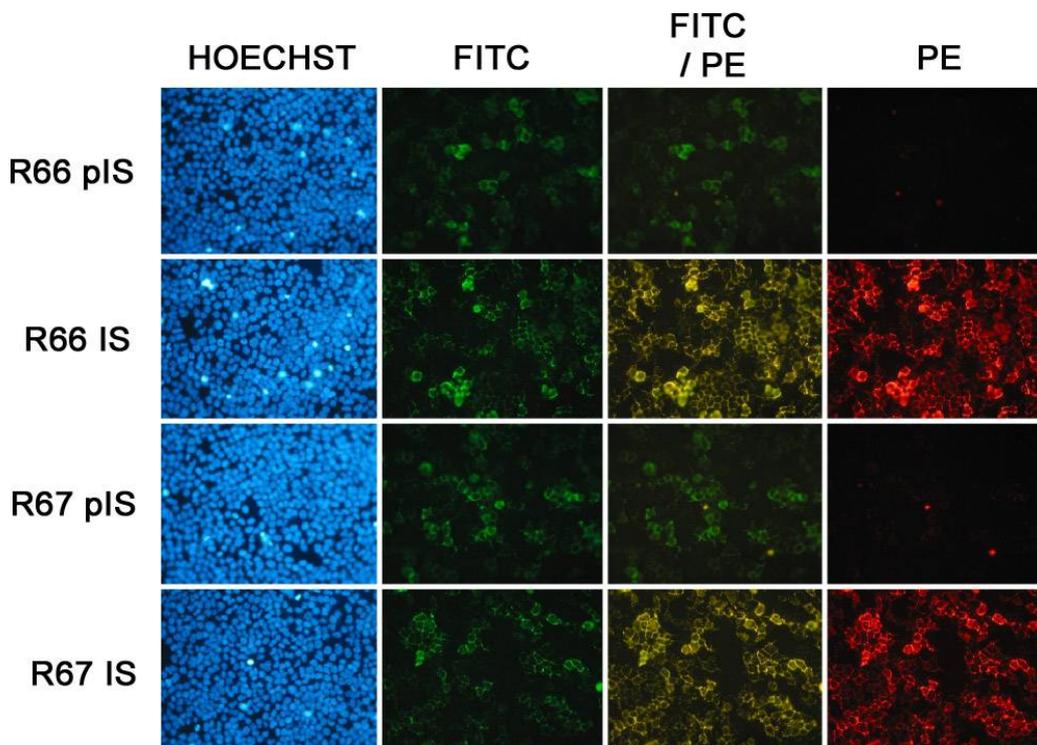


Abb. 5.30.: IFT der Seren von R66 / R67 (Ratten, Gene Gun-Immunisierung)

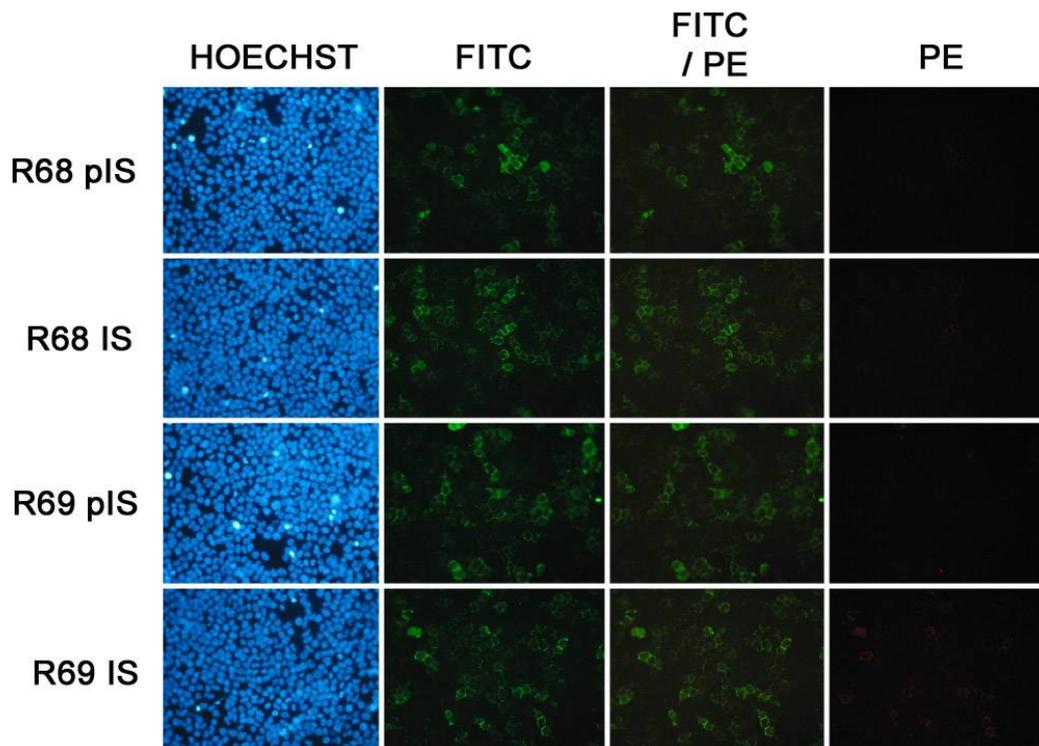


Abb. 5.31.: IFT der Seren von R68 / R69 (Ratten, Tattoo-Immunsierung)

Zusammenfassend kann ein Vorliegen von LAMP2-AK in den Immuseren aller Gene Gun-immunisierten Ratten und Kaninchen gezeigt werden. Die Bindung der Serum-Antikörper der Tattoo-immunisierten Kaninchen ist schwach detektierbar, die der Tattoo-immunisierten Ratten jedoch nicht. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der FACS-Analyse. Das Immuserum von R69 zeigt eine minimale, nicht signifikante Fluoreszenz.

5.6.4. Untersuchung der Immuseren auf ANCA-Testträgern

Zusätzlich zu den klassischen MPO- und PR3-ANCA sind auch diverse weitere, nicht krankheitsspezifische ANCA-Antigene (Hoffman & Specks, 1998; Savige et al., 1998) sowie die offenbar in der Pathogenese von Vaskulitis-assoziierten Glomerulonephritiden relevanten LAMP2-ANCA (Kain et al., 1995, 2008) beschrieben worden. Für LAMP2 spezifische Antikörper zeigen meist ein cANCA-Muster (Kain et al., 1995, 2008).

Die von mir hergestellten Kaninchen- und Rattenserum mit einer definierten Spezifität für LAMP2 B wurden in diesem Experiment verwendet, um das Muster von LAMP-2-AK in der indirekten Immunfluoreszenztechnik (IFT) auf ANCA-Testträgern (Formalin- und ethanolfixierte humane Neutrophile Granulozyten auf Glaträgern) nachzuweisen (s. Abb. 5.32). Zum Vergleich wurden

Seren von Patienten mit Proteinase-3-AK (detektiert mit dem Phadia 250 Immunocap EliA) untersucht. Als Erstantikörper wurden die Immunsereen bzw. Prä-Immunsereen eingesetzt, die mit einem FITC-markierten anti-Ratte bzw. anti-Kaninchen IgG-Zweitantikörper detektiert wurden.

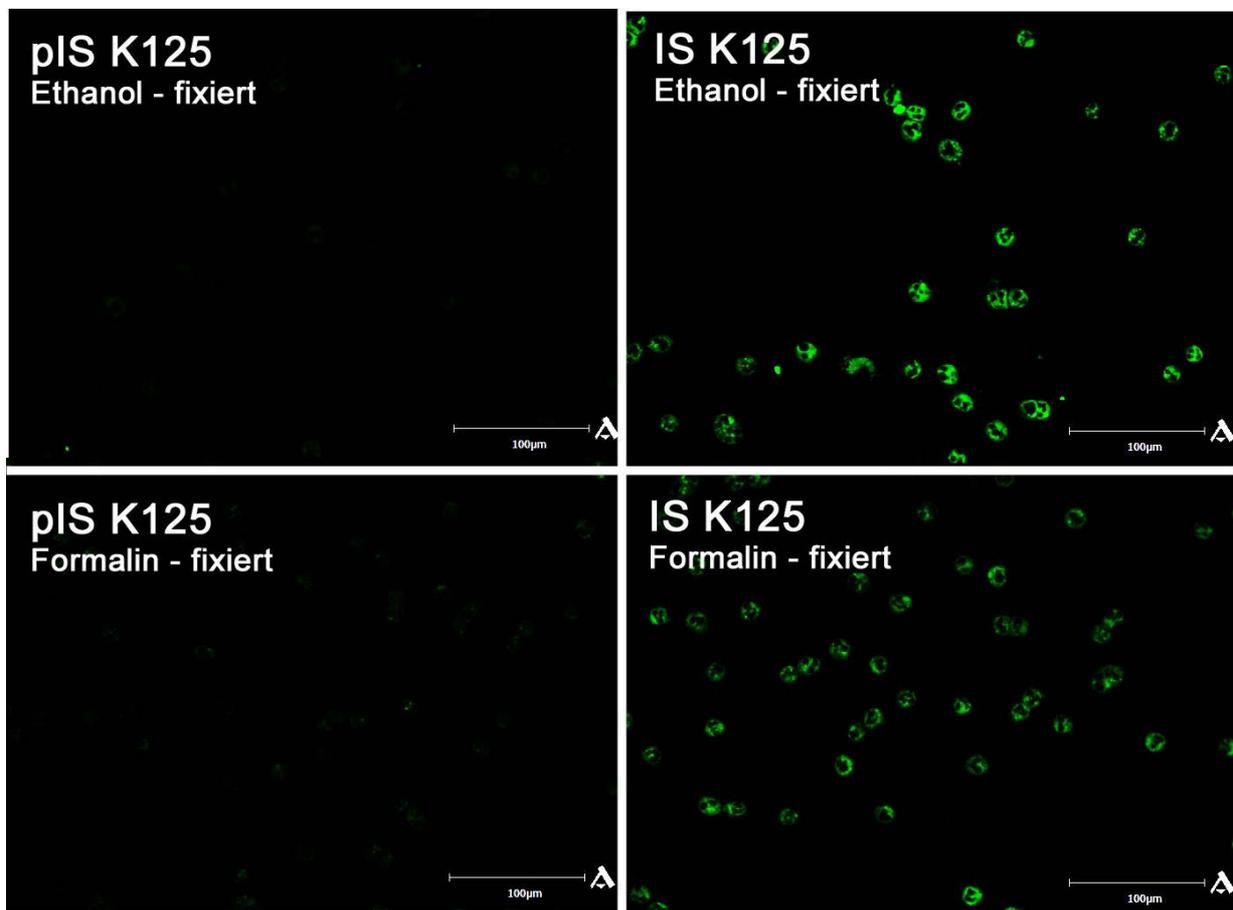


Abb. 5.32.: ANCA-Testung der Seren des Gene Gun-immunisierten Kaninchens K125 (Kontrast und Helligkeit erhöht)

Die ANCA-Fluoreszenzmikroskopie fand unter Beachtung der folgenden Besonderheiten der ANCA-Diagnostik und unter Kontrolle durch in der ANCA-Diagnostik geschulten und erfahrenen Personals statt.

Zytoplasmatische ANCA-Fluoreszenzen entsprechen nicht notwendigerweise sogenannten 'klassischen', meist PR3-spezifischen cANCA. Atypische und 'kontrastarme' (engl.: flat) cANCA-Muster sind beschrieben worden, die kaum mit dem Auftreten von PR3-AK oder Vaskulitiden korrelieren (Savige et al., 1998; Wong et al., 1999). Zur Definition 'klassischer' cANCA gehört eine granuliert zytoplasmatische Fluoreszenz mit zentraler oder interlobulärer Akzentuierung (Wong et

al., 1999). Die Untersuchung auf Formalin- und Ethanolfixierten ANCA-Testträgern ist nötig, da man nur bei gemeinsamer Betrachtung dieser eine klare Aussage über das Fluoreszenzmuster treffen kann. Die Antigene von p- und cANCA sind ursprünglich in zytoplasmatischen Granula lokalisiert, bei einer Fixierung mit Formalin verbleiben sie dort (eine Unterscheidung zwischen p- und cANCA ist bei Formalinfixierung nicht möglich). Die pANCA-Fluoreszenz ist ein Artefakt der Ethanolfixierung: Durch Schädigung der Granula-Membranen bei der Fixierung können sich positiv geladene Bestandteile an die negativ geladene Kernmembran anlagern; gegen sie gerichtete AK zeigen ein pANCA-Muster. Zur Differenzierung zwischen (durch gegen Zellkernbestandteile gerichtete Antikörper verursachte) ANA- und 'echter' pANCA-Fluoreszenzen kann wieder die Formalinfixierung herangezogen werden: ANA würden auch hier den Zellkern anfärben. Zur korrekten Bestimmung von ANCA-Mustern müssen also Ethanol- und Formalinfixierte Neutrophile Granulozyten verwendet werden (Hoffman & Specks, 1998).

Die untersuchten Immunsereen zeigten eine deutliche 'klassische' cANCA-Fluoreszenz in beiden Fixierungen, die Präimmunsereen zeigten keine Fluoreszenz. In Abbildung 5.32. sind exemplarisch die Fluoreszenzen für das Präimmun- und Immunsereum des Gene Gun-immunisierten Kaninchens K125 abgebildet. Die Seren der anderen erfolgreich immunisierten Tiere (K124, K126, K127, R66, R67) zeigten ein vergleichbares Muster (Ergebnisse nicht gezeigt).

6. Diskussion

Hauptziel der vorgelegten Arbeit war es, das Vorkommen von Antikörpern gegen putative neue Autoantigene in Seren von Patienten mit Autoimmunerkrankungen zu untersuchen. Dazu mussten zunächst geeignete Assay-Systeme etabliert werden, um solche Antikörper zu messen.

Als Assaymethode wurde die Überexpression der zu untersuchenden Autoantigene auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen durch Transfektion mit anschließendem Nachweis der Antikörperreaktivität durch Immunfluoreszenztechnik (IFT) oder Durchflusszytometrie (FACS-Analytik) ausgewählt. Diese Herangehensweise bietet viele Vorteile. Im Vergleich zur ELISA-Technik vermeidet sie die potenziell langwierige und komplizierte Herstellung und Aufreinigung von Proteinen aus bakteriellen Expressionssystemen. Die Expression in situ in eukaryontischen Zellen gewährleistet, dass die Autoantigene mit den in Säugetierzellen üblichen posttranslationalen Modifikationen produziert werden. Die Lokalisation auf der Zelloberfläche ermöglicht einen unmittelbaren Zugang der Antiseren zu den Antigenen. Der Vergleich der Reaktivitäten der Patientenserum an transfizierten und nicht-transfizierten Zellen liefert darüber hinaus eine stringente Negativkontrolle, die eine saubere Interpretation der Ergebnisse ermöglicht.

6.1. Klonierung eukaryontischer Expressionskonstrukte

Im ersten Schritt meiner Arbeit wurden die Expressionskonstrukte pD8F/LAMP2B, pCMV-SPORT6/LSM14, pCMV-SPORT6/NOL8, pCMV-SPORT6/PR3 und pCMV-SPORT6/PR3_S176A gemäß der in den Abschnitten 5.1.1. - 5.1.3. beschriebenen Klonierungsstrategie erstellt. Um die erfolgreiche Expression der entsprechenden Autoantigene auf der Oberfläche transfizierter HEK293 Zellen nachweisen zu können, wurden bei der Klonierung sog. Epitop-tags (FLAG-tag und cMyc-tag) in die Proteinsequenzen eingebaut. Dabei handelt es sich um kurze Peptidsequenzen, die von kommerziell erhältlichen Antikörpern erkannt werden können. Alle klonierten Konstrukte konnten in der FACS-Analyse und der IFT unter Verwendung des M2-Antikörpers (FLAG-tag) oder cMyc-Antikörpers (cMyc-tag) auf der Oberfläche transfizierter HEK-Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten das pD8F/LAMP2B und die beiden PR3-Expressionskonstrukte mit für sie kommerziell verfügbaren monoklonalen Antikörpern detektiert werden (s. 5.1.4.1.). In der indirekten IFT (s. 5.1.4.2.) zeigten die Proteine Fluoreszenzmuster, die mit der Lokalisation der Proteine auf der Zelloberfläche kompatibel waren. Dagegen reagierten untransfizierte Zellen in FACS und IFT nicht mit den Antikörpern. Die Richtigkeit der klonierten Konstrukte wurde durch Sequenzanalysen der Inserts und des Vektor-Insert-Übergangs bestätigt. Damit kann die

Klonierung aller Konstrukte als erfolgreich angesehen werden. Dies gilt ebenso für das durch Mutagenese mit der S176A-Mutation versehene Proteinase 3-Konstrukt.

Wie im FACS und IFT gezeigt werden konnte, war die Expressionsstärke (gemessen an der Fluoreszenzintensität) des pD8F/LAMP2B-Konstruktes sehr hoch. Die Expressionsstärke von pCMV-SPORT6/NOL8 war noch recht hoch, die von pCMV-SPORT6/LSM14 und der Proteinase 3-Konstrukte recht schwach, aber nach wie vor deutlich positiv. Zwischen pCMV-SPORT6/PR3 und der pCMV-SPORT6/PR3_S176A gab es keinen Unterschied hinsichtlich der Expressionsstärke in FACS oder IFT.

Die geringe Expressionsstärke von pCMV-SPORT6/LSM14 und pCMV-SPORT6/NOL8 in unserem Expressionssystem lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass LSM14 und NOL8 intrazellulär (in P-Körperchen / Nukleoli) vorkommende Proteine sind (Sekiguchi et al., 2004; Yang et al., 2006). Möglicherweise sind ihre korrekte dreidimensionale Struktur und Faltung vom intrazellulären Ionen- und pH-Milieu abhängig, welches bei der forcierten Oberflächenexpression nicht gegeben ist.

Als Ursache der geringen Expressionsstärke des PR3-Konstruktes nahmen wir zunächst dessen potentiell zelltoxische Enzymaktivität an, die durch das Einbringen der beschriebenen, die Konformation des Proteins nicht relevant verändernden S176A-Mutation (Specks et al., 1996; Sun et al., 1998a, b) inaktiviert werden sollte. Die Expressionsstärke des pCMV-SPORT6/PR3_S176A-Konstruktes unterschied sich jedoch nicht von der des pCMV-SPORT6/PR3-Konstruktes.

Native prä-pro-Proteinase 3 besitzt N-terminal ein Signalpeptid und ein zwei Aminosäuren langes Propeptid sowie ein C-terminales Propeptid (Specks et al., 1996; van der Geld et al., 2000; Jenne & Kuhl, 2006). Das als Markierung für sekretorische / vesikuläre Proteine nötige Signalpeptid wird während der Translation abgespalten, die Abspaltung der N- und C-terminalen Propeptide von proPR3 erfolgt erst nach der Prozessierung in ER und Golgi-Apparat (Rao et al., 1996). HEK-Zellen können auch die Proformen von PR3 effektiv synthetisieren, führen aber weder die N- noch die C-terminale Propeptidabspaltung durch (van der Geld et al., 2000; Jenne & Kuhl, 2006). Die Entfernung des N-terminalen Propeptids macht das aktive Zentrum von PR3 durch eine konformationelle Änderung zugänglich für Substrate und ist essentiell für die enzymatische Aktivität des Proteins (Specks et al., 1996; Garwicz et al., 1997; Jenne & Kuhl, 2006). Das nicht freie Vorliegen der N-terminalen Ile-Val-Gly-Gly-Sequenz nach Entfernung des Propeptids, z.B. durch eine Modifikation mit einem Proteintag, resultiert in einer konformationell veränderten, enzymatisch inaktiven Form von PR3 (Salvesen & Enghild, 1990; Jenne & Kuhl, 2006). Die

Abspaltung des C-terminalen Peptids wirkt sich nicht auf die Konformation oder Enzymaktivität der PR3 aus. Das Vorhandensein dieses Peptids sowie eine C-terminale Modifikation (und ggf. eine durch sie bedingte Immobilisierung) von PR3 durch Protein-Tags scheint sich nicht positiv oder negativ auf Antikörper-Detektionsassays für PR3-AK auszuwirken (Salvesen & Enghild, 1990; Garwicz et al., 1997; van der Geld et al., 2000; Jenne & Kuhl, 2006; Damoiseaux et al., 2009).

In unserem Konstrukt ist das für Export und korrekte Faltung essentielle Signalpeptid durch das des CD8-Moleküls ersetzt. Das N-terminale Propeptid ist ebenfalls nicht mitkloniert. Der für die korrekte Faltung und enzymatische Aktivität essentiellen freien N-terminalen Ile-Val-Gly-Gly-Sequenz geht jedoch ein FLAG-Tag voraus, so dass beide PR3-Varianten vermutlich enzymatisch inaktiv sind. Aufgrund der gleichen Expressionsstärke des pCMV-SPORT6/PR3- und des pCMV-SPORT6/PR3_S176A-Konstrukts sowie der Vermutung, dass wegen der N-terminalen FLAG-tag-Modifikation keines der Konstrukte enzymatisch aktiv sein sollte, ist es unwahrscheinlich, dass die geringe Expression von PR3 auf seine zelltoxische enzymatische Aktivität zurück zu führen ist.

Als weitere mögliche Ursache für die geringe Expressionsstärke auf der Zelloberfläche kommt eine teilweise Abspaltung des C-terminalen Peptids und somit des durch Klonierung C-terminal angefügten GPI-Ankers infrage. HEK-Zellen scheinen PR3 C-terminal jedoch nicht zu prozessieren (van der Geld et al., 2000). Auch die Tatsache, dass Damoiseaux et. al. in HEK-Zellen produzierte rekombinante PR3 (rPR3) mittels eines C-terminal an das C-Propeptid angefügten 6x His-Tags aufzureinigen konnten, zeigt, dass keine oder nur sehr geringe C-terminale Prozessierung an rPR3 durch HEK-Zellen erfolgt (Damoiseaux et al., 2009).

Auch dass die Modifikation mit dem FLAG-tag oder dem GPI-Anker selbst sich auf die Exprimierbarkeit des Proteins, z.B. durch die Änderung der 3D-Struktur bedingte Aggregatbildungen oder eingeschränkte Löslichkeit, ausgewirkt haben, muss in Betracht gezogen werden.

Durch funktionelle Analysen der Enzymaktivität, Klonierung eines nativ gefalteten Konstruktes mit freier N-terminaler Ile-Val-Gly-Gly-Sequenz (mit und ohne inaktivierender S176A-Mutation) und Western-Blot-Kontrollen des Zellkulturüberstandes auf möglicherweise sezerniertes Protein sowie Blot- und SDS-Page-Gelanalyse von Zelllysaten hinsichtlich der Proteingröße, die Hinweise auf unterschiedliche Prozessierung (Peptidabspaltung, Glykosylierungsgrad) geben könnten, könnte die Ursache möglicherweise eingegrenzt werden. Die erstellten, durch M2- und anti-PR3-Antikörper detektierbaren Konstrukte waren jedoch als Kontrolle für unser zellbasiertes Serum-Screeningsystem ausreichend. Die Erstellung eines möglichst effizienten PR3-

Expressionskonstruktes war kein vorrangiges Ziel dieser Arbeit und wurde daher nicht weiter verfolgt.

6.2. Krankheitsassoziation des Proteinproduktes des RZPD-SHC2-Klons

Die Sequenzierung des von Cindy Hempp identifizierten SHC2-Expressionsklons ergab, dass dieses Konstrukt infolge einer Leserasterverschiebung für ein künstliches Proteinprodukt, nicht aber für ein Fragment des SHC2-Proteins kodiert (s. 5.1.6.). Eine BLAST-Suche ergab keine signifikanten Homologien der vorhergesagten Aminosäuresequenz des Proteinproduktes mit bekannten Proteinen. Somit ergab sich kein Hinweis, dass SHC2 selbst oder ein über eine BLAST-Suche identifizierbares Protein mit homologen Sequenzen als Ziel von Autoantikörpern relevant sind.

6.3. Autoantikörperscreeningsystem für Humanseren

6.3.1. Validierung des Screeningsystems anhand des Assays für PR3-AK

Um die Aussagekraft des von mir neu etablierten Screeningsystems für Humanseren (s. 5.2.) im Vergleich zu einem in der Routinediagnostik bereits etablierten Testverfahren zu evaluieren, wurden anti-PR3-AK in Humanseren sowohl im FACS-basierten Screening-Assay an transfizierten HEK-Zellen als auch mit dem in der Routinediagnostik eingeführten EliA-Test vergleichend bestimmt. Hierzu wurden die Seren 65 bis 238 (n = 174) der JHS Serensammlung (erstellt aus diversen anonymisierten Seren aus dem immunologischen Diagnostiklabor des UKE, Hamburg) auf dem FACS-basierten System hinsichtlich der Detektion von PR3-AK untersucht und mit den Ergebnissen des Routine-EliAs verglichen (s. 5.2.4.).

Folgende Einschränkungen des Vergleichs müssen betont werden:

1. Nur etwa 50% der getesteten Seren waren bereits auf dem Routine-EliA vorgetestet worden. Bei den nicht getesteten Seren ist anzunehmen, dass sich aus der klinischen Situation kein Hinweis auf das Vorliegen einer Vaskulitis der kleinen Gefäße ergeben hatte. Wurde ein Serum im FACS-System als positiv getestet, für das kein oder ein negativer Befund im EliA vorlag, wurde das Serum auf dem EliA nachgetestet; im Falle von vormals negativen getesteten Seren wurde das neue Ergebnis gewertet. Alle am Ende im EliA nicht getesteten Seren wurden als PR3-AK-negativ angenommen. Die Abweichung, die dies evtl. für die Sensitivitäts- und Spezifitätsberechnungen bedeuten kann, wurde als gering und für den Zweck der Evaluierung des FACS-Systems als hinnehmbar eingeschätzt.
2. Die Seren Nr. 73 und 168 wurden vom FACS-System als positiv detektiert, ohne dass ein

EliA-Vorbefund oder genug Material für eine EliA-Nachbestimmung vorlag. Mangels eines Referenzwertes im EliA wurden sie in die Sensitivitäts- und Spezifitätsberechnungen nicht einbezogen, weshalb nur 172 Seren in die Berechnungen mit eingingen.

3. Die Seren 105 und 197 wurden im Routine-EliA als grenzwertig eingestuft. Für die Berechnungen von Sensitivität und Spezifität wurden diese als positiv definiert.

Unter den gemachten Einschränkungen wurde für den das pCMV-SPORT6/PR3-Konstrukt verwendenden Assay eine Sensitivität von $0,828 = 82,8\%$ und eine Spezifität von $0,993 = 99,3\%$ gegenüber dem Routine EliA errechnet (s. 5.2.4.).

Der das pCMV-SPORT6/PR3_S176A-Konstrukt verwendende Assay hatte eine Sensitivität von $0,800 = 80,00\%$ und eine Spezifität von $0,978 = 97,8\%$.

Die gegenüber dem Routine EliA deutlich geringere Sensitivität ist möglicherweise durch die N-terminale FLAG-tag-Modifikation beider PR3-Konstrukte zu erklären. Ohne die Abspaltung des N-terminalen Propeptids befindet sich PR3 in einer enzymatisch inaktiven Konformation (Specks et al., 1996; Jenne & Kuhl, 2006). Eine N-terminale Modifikation z.B. durch einen Proteintag, wie in unseren Konstrukten, könnte den gleichen Effekt auf PR3 haben (Jenne & Kuhl, 2006). Die durch das Propeptid in dieser Konformation gehaltenen proPR3-Moleküle werden nicht von allen antiPR3-Antikörpern detektiert (von Vietinghoff et al., 2008). Sun et. al zeigten, dass etwa 15% der PR3-ANCA-positiven Seren nur an PR3 binden, wenn dessen Propeptid abgespalten ist (Sun et al., 1998b). Die N-terminale Modifikation durch den FLAG-tag und die mit ihm verbundene Konformationsänderung kann also einen Großteil der Einschränkung der Sensitivität unseres FACS-Assays (ca. 20%) gegenüber dem Routine-EliA erklären. Hierzu passend ist beschrieben worden, dass praktisch alle Epitope, die von PR3-ANCA gebunden werden, konformationell und nicht linear sind (Bini et al., 1992).

Ein PR3-Antikörpertest kann weiterhin durch die Proteolyse der PR3-ANCA durch die enzymatische Aktivität von PR3 erschwert werden (Dolman et al., 1995). Da unsere Konstrukte N-terminal modifiziert und somit vermutlich enzymatisch inaktiv sind (Jenne & Kuhl, 2006), ist diese Erklärung unwahrscheinlich, auch wenn das Vorhandensein enzymatischer Aktivität nicht experimentell von uns ausgeschlossen wurde.

Dagegen sollte die C-terminale Modifikation durch den GPI-Anker die Antikörperbindung nicht relevant beeinflussen, da C-terminale Modifikationen an PR3 keine PR3-ANCA-relevanten Epitope maskieren (van der Geld et al., 2000; Jenne & Kuhl, 2006; Damoiseaux et al., 2009).

Dass einige wenige Seren als positiv im FACS-Assay, aber negativ im EliA getestet wurden, könnte

durch den Umstand erklärt werden, dass der EliA PR3-Protein, das aus Buffy coats humaner Blutproben aufgereinigt wurde, und keine rekombinante PR3 verwendet. Trotz der hohen diagnostischen Exaktheit des EliA (Villalta et al., 2004) kann die Sensitivität von PR3-ANCA-Tests auf Basis von nativer PR3 (nPR3) durch das Zufügen rekombinanter PR3 (rPR3) aus HEK-Zellen noch erhöht werden (Damoiseaux et al., 2009). Es ist wahrscheinlich, dass einige Epitope auf rPR3 zugänglich sind, die während der komplizierten Aufreinigung von nPR3 aus Neutrophilen durch noch ungeklärte Mechanismen zerstört oder maskiert werden.

Schließlich wurden 2 Seren mit dem pCMV-SPORT6/PR3-Konstrukt als positiv getestet, die mit pCMV-SPORT6/PR3_S176A als negativ getestet wurden, und 4 Seren mit pCMV-SPORT6/PR3_S176A positiv getestet, die mit pCMV-SPORT6/PR3 negativ getestet wurden. Da der einzige Unterschied zwischen den Konstrukten in der S176A-Mutation besteht, die keine PR3-ANCA-relevanten Epitope maskieren sollte (Specks et al., 1996; Sun et al., 1998a), kann vermutet werden, dass sich diese Mutation, zusammen mit dem N-terminal angefügten Flag-Tag oder dem C-terminalen GPI-Anker, geringfügig auf die Konformation von PR3 und damit den Test auswirkt.

Das FACS-Testsystem für PR3 könnte durch weitere Untersuchungen des Konstruktes und einige Modifikationen, wie bereits unter 6.1. genannt, verbessert werden. Dies war aber nicht das Ziel dieser Arbeit.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das FACS-System hinsichtlich seiner hohen Sensitivität (ca. 83%, durch die N-terminale Modifikation des verwendeten Konstrukts erklärbar) und hohen Spezifität (> 99%) im Vergleich mit dem Routine-EliA als sehr sensitiv und spezifisch angesehen werden kann.

6.3.2. Antikörper gegen putative Autoantigene

6.3.2.1. NOL8 und LSM14

In den 390 mit den NOL8- und LSM14-Assays getesteten Seren von Patienten mit diversen autoimmunologischen Erkrankungen sowie in den 15 zusätzlich mit dem NOL8-Assay getesteten Seren von Sarkoidosepatienten (Sammlung T. Krieger) konnte in keinem einzigen Fall das Vorkommen dieser Auto-AK nachgewiesen werden (s. 5.2.3.). Dabei war die Expression des Autoantigens auf den Zellen jeweils durch eine Gegenfärbung gegen den FLAG-tag nachgewiesen worden.

Somit bieten die durchgeführten Versuche keinen Hinweis auf ein in bestimmten Patientengruppen bzw. bei bestimmten Erkrankungen regelmäßiges Auftreten dieser Autoantikörper.

NOL8 war in der Literatur noch nicht als Autoantigen beschrieben worden. Die von Cindy Hempp als NOL8-AK positiv definierten Patienten (Hempp, 2007) zeigten keine Gemeinsamkeiten hinsichtlich der bei ihnen diagnostizierten Erkrankungen (s. Tab.2.2.). Die Assoziation von NOL8-Auto-AK mit immunologischen bzw. rheumatologischen Erkrankungen wird durch die vorliegenden Ergebnisse infrage gestellt. Zumindest sprechen die Ergebnisse nicht dafür, dass die Bestimmung der NOL8-AK einen diagnostischen Nutzen erbringen könnte.

Das Vorkommen von LSM14-AK ist bereits bei Primär Biliärer Zirrhose (PBC) in der Literatur beschrieben worden (Bloch et al., 2005; Yang et al., 2006; Yang & Bloch, 2007). Danach weisen 5 % der Seren von PBC-Patienten ein ANA-Fluoreszenzmuster mit zytoplasmatischen Dots auf, die durch Antikörper gegen P-Körperchen entstehen. In wiederum nur einigen Fällen sind diese P-Körperchen-AK gegen das dort vorkommende LSM14-Antigen gerichtet (Yang et al., 2006; Yang & Bloch, 2007). Einige Seren mit dem ANA – Muster zytoplasmatische Dots waren in die JHS-Serumsammlung eingepflegt worden. Ebenso ist davon auszugehen (aber nicht gesichert), dass sich einige Seren von PBC-Patienten unter den Gastroenterologie/Hepatology-Autoimmunsereen befanden. Da die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von LSM14-AK bei PBC-Patienten nur einen Bruchteil von 5% ausmacht, hätte die Anzahl von PBC-Seren sehr groß sein müssen, um eine reelle Chance auf den Nachweis von LSM14-AK zu haben. Einen Hinweis auf das Auftreten dieser AK über die bereits bekannte Assoziation hinaus oder in einer größeren Häufung liefern die vorliegenden Daten nicht. Der diagnostische Wert dieser Auto-AK scheint durch das extrem seltene Auftreten stark limitiert. Möglicherweise sind die durch Cindy Hempp gezeigten Vorkommen von LSM14-AK (ohne PBC-Assoziation) und NOL8-AK (Hempp, 2007) auch im Sinne von nicht pathogenen, natürlichen Autoantikörpern zu interpretieren (Lleo et al., 2010).

6.3.2.2. LAMP2

Von den 390 auf das Vorliegen von LAMP-ANCA getesteten Humanseren aus der JHS-Serumsammlung konnten nur bei einem Serum (Serum 9, Abb. 5.15, s. 5.2.3) gegen das pD8F/LAMP2B-Konstrukt gerichtete Antikörper nachgewiesen werden. Keines der getesteten Seren, die mit Glomerulonephritis bei Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener), SLE oder RA assoziiert waren (zur Verfügung gestellt von Elena Csernok, Abteilung für Rheumatologie, Uni Lübeck und Rheumaklinik Bad Bramstedt), reagierte positiv gemäß der festgelegten Kriterien für ein positives Serum. Für das vorher nicht auf ANCA getestete Serum 9 konnten im Diagnostiklabor des UKE, wie unter 4.3.4.4. beschrieben, klassische cANCA mit einem Titer von 1:80 bei

Abwesenheit von PR3-AK (sowohl im für diese Arbeit erstellten FACS-System, als auch im Routine Immuncap-EliA) nachgewiesen werden, was auf LAMP-ANCA hinweisen kann (Kain et al., 2008). Ein solches klassisches cANCA-Muster ergaben auch die Immunsereen unserer mit LAMP2 DNA-immunisierten Versuchstiere. Das Vorliegen einer Glomerulonephritis bei diesem Patienten war dem Labor nicht übermittelt worden, die Anonymisierung machte es unmöglich, eine definitive Aussage über das Vorliegen dieser Erkrankung zu machen. Ob das Serum 9 MPO-AK enthielt, konnte mangels Material nicht überprüft werden. Auch diese können, wie auch andere Autoantikörper, selten cANCA-Fluoreszenzmuster verursachen (Segelmark et al., 1994; Savige et al., 1998).

Das Serum 9 konnte auch auf den von der AG Kain, Wien zur Verfügung gestellten Testträgern mit fixierten, membranständiges LAMP2 exprimierenden CHO IdID-Zellen als positiv getestet werden (s. 5.3.). Auch von den Seren 2.1 bis 2.9 der Kain Serumsammlung (zur Verfügung gestellt von Renate Kain, Klinisches Institut für Pathologie, Medizinische Universität Wien, Österreich) konnten, wie angekündigt, vier Seren positiv auf diesen Testträgern getestet werden. Für die Testung der Seren 1.1 bis 1.9 fehlte es nach einem aufgrund eines technischen Problems nicht auswertbaren Experiment leider an weiteren Testträgern.

Bemerkenswerterweise reagierte jedoch keines der in Wien positiv für LAMP2-AK getesteten Seren (je vier der Seren 1.1 bis 1.9 und 2.1 bis 2.9) gegen unser pD8F/LAMP2B-Konstrukt im FACS oder IFT (s. 5.2.3. und 5.3.). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte im Glykosylierungsgrad des verwendeten Antigens liegen. Der in Wien entwickelte Assay verwendet für die Expression von LAMP-2 die Zelllinie CHO IdID, die einen Defekt in der O-gekoppelten Glykosylierung aufweist. Diese Ursache konnte jedoch dadurch ausgeschlossen werden, dass ich die von mir erstellten Expressionskonstrukte in diese Zelllinie (die uns von R. Kain freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden war) transfizierte. Die Ergebnisse zeigten, dass auch bei Expression in CHO IdID Zellen das von mir klonierte LAMP2-Expressionskonstrukt nicht von den Positivseren aus Wien erkannt wurde.

Wir vermuteten daher als nächstes, dass wichtige Epitope durch die von uns N- und C-terminal angefügten Tags und Modifikationen maskiert worden sein könnten. Daher wurden weitere Klonierungen zur Entfernung der Modifikationen unseres LAMP2-Konstruktes begonnen.

6.4. Gezielte Entfernung der Modifikationen aus den LAMP2-Konstrukten

Um herauszufinden, welche strukturellen Modifikationen an unserem pD8F/LAMP2B-Konstrukt möglicherweise die Detektion durch Humansenen verhinderten, wurden neue Konstrukte durch sukzessive Entfernung der Modifikationen bis hin zu nativem LAMP2 erstellt. Dieses wurde lediglich mit der Mutation einer intrazellulär lokalisierten, für das Targeting in die Lysosomen essentiellen Aminosäure versehen, um es membranständig exprimieren zu können (s. 5.4.1. bis 5.4.4.).

6.4.1. Expression der neuen Konstrukte

Die FACS- und IFT-Analysen der neuen Konstrukte zeigten, dass jedes der neu erstellten Konstrukte gut mit dem monoklonalen LAMP2-Antikörper und ggf. auch mit Antikörpern gegen verbliebene Tags detektiert werden konnte (s. 5.4.6.). Das Fluoreszenzmuster zeigte in jedem Fall eine membranständige Expression der Konstrukte. Das reine, native LAMP2-Konstrukt (pD8F/LAMP2B_nat) hatte jedoch eine stark verminderte Oberflächenexpression. Dieses geht vermutlich auf ein Targeting der Moleküle in die Lysosomen zurück, da natives LAMP2 fast ausschließlich in den Lysosomen vorkommt und nur in kleinsten Mengen (oder, z.B. nach Stimulation von Neutrophilen, in größerer Zahl) auf der Zelloberfläche detektiert werden kann (Kannan et al., 1996; Eskelinen et al., 2003). Die membranständige Expression dieses Konstruktes konnte durch Mutation des für das lysosomale Targetingsignal essentiellen Tyrosins zu Histidin stark gesteigert werden (Rohrer et al., 1996; Eskelinen et al., 2003). Dass das pD8F/LAMP2B_natcyt-Konstrukt trotz seiner nativen Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne ohne die entsprechende Mutation vergleichsweise stark extrazellulär membranständig exprimiert wird, kann nur auf die noch bestehende N-terminale Modifikation durch den Flag-Tag erklärt werden. Ein freier N-Terminus könnte also eine weitere Voraussetzung für das korrekte lysosomale Targeting von LAMP2 sein.

6.4.2. Reaktivität der Kain-Serumsammlung gegen die neuen Konstrukte

Nach Bestätigung ihrer korrekten Expression wurden die neuen Konstrukte erneut mit den von Renate Kain zur Verfügung gestellten Positiv- und Negativseren (2.1 bis 2.9) getestet. Keines der Seren detektierte eines unserer LAMP2-Konstrukte, auch nicht die native Form (s. 5.5.).

Sequenzanalysen des von uns verwendeten Klons von LAMP2 hatten ergeben, dass unser Konstrukt die Spleißvariante LAMP2 B enthielt, während die von R. Kain verwendeten Konstrukte auf der

LAMP2 A Variante basieren (Kain et al., 2008). Die extrazellulären Domänen von LAMP2 A und -B sind beinahe identisch, da das alternative Spleißen unmittelbar vor der Sequenz der Transmembrandomäne stattfindet. Die Spleißvarianten unterscheiden sich im extrazellulären Teil nur in vier Aminosäuren (s. Abb. 5.23.). Eine dieser Aminosäuren betrifft das Epitop P₃₃₁₋₃₄₁ (QGKYSTAQDCS), welches eines von zwei identifizierten Zielepitopen von LAMP2-ANCA darstellt (Kain et al., 2008). Um auszuschließen, dass die Veränderung dieses Epitops der Grund für die Nichterkennung unserer Transfektanten durch die Patientenseren aus Wien ist, erstellten wir das Konstrukt pD8F/LAMP2A*, in welchem die extrazelluläre Aminosäuresequenz des pD8F/LAMP2B_nat_Y407H-Konstruktes (welches ja LAMP2 B mit mutiertem lysosomalem Targetingsignal entspricht), durch Mutagenese derjenigen von LAMP2 A angepasst wurde. Auch gegen dieses Konstrukt konnte keine Bindung der Seren nachgewiesen werden.

Die Frage, welcher Umstand dafür verantwortlich ist, dass die Seren nicht an unsere LAMP2-Konstrukte binden, bleibt zunächst offen. Eine Möglichkeit ist, dass die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne von LAMP2 A und LAMP2 B sich unterschiedlich auf die 3D-Konformation des Moleküls auswirken und damit die Zugänglichkeit pathogenetisch relevanter Epitope in den Spleißvarianten unterschiedlich ist. Um diesen Umstand zu klären könnte der C-terminale Bereich der Konstrukte durch die Sequenz von LAMP2 A ersetzt und die Experimente wiederholt werden. Die von Renate Kain publizierten, für die Pathogenese und die molekulare Mimikry von LAMP2 verantwortlichen Epitope sind jedoch nicht konformationell, sondern linear (Kain et al., 2008). Auch die Tatsache, dass von der AG Kain in eukaryontischen Zellen für den Einsatz im LAMP2-ELISA produziertes Protein nur die extrazelluläre Domäne von LAMP2 enthielt (Kain et al., 2008), stellt die These der veränderten Konformation infrage.

Auch eine Expression dieser neuen LAMP2-Expressionskonstrukte mit entfernten Modifikationen in der O-glykosylierungsdefizienten CHO IdID-Zelllinie führte nicht zu einer Detektion der LAMP2-AK. Kain et al. hatten die identische CHO IdID-Zelllinie verwendet und die LAMP2-AK schienen im Wesentlichen Epitope des Protein-'Backbones' von LAMP2 zu detektieren (Kain et al., 2008). Die These, dass die Detektion der LAMP2-AK in unserem FACS-Assay durch eine (O-) glykosylierungsbedingte Maskierung in HEK293T-Zellen bedingt sein könnte, scheint also unzutreffend zu sein.

Die Frage, warum keines der Seren unsere Konstrukte detektierte, sollte weiter untersucht werden. Die konformationelle Änderung und Maskierung wichtiger Epitope durch die unterschiedlichen Isoformen stellt eine nahe liegende Lösung dar. Auch könnte ein detaillierter Sequenzvergleich der

Konstrukte beider Arbeitsgruppen Klärung bringen.

Interessant ist, dass ein im UKE identifiziertes Serum (JHS Serum 9, mit unklarer Krankheitsassoziation) von beiden Assays detektiert wurde, während alle Patientenseren aus Wien mit der eindeutigen klinischen Assoziation einer rapid progredienten Glomerulonephritis (RPGN) nur von dem Wiener Assay erkannt wurde. Dies deutet darauf hin, dass es unterschiedliche Epitope gibt, die möglicherweise auch unterschiedliche Krankheitsassoziationen haben. In diesem Kontext muss davon ausgegangen werden, dass der von mir entwickelte FACS-Assay gerade diejenigen Antikörper, die mit der RPGN assoziiert sind, nicht detektiert. Daher ist er in seiner gegenwärtigen Form für eine weitere Arbeit zur Charakterisierung des Auftretens von LAMP2-ANCA ungenügend. Es bleibt jedoch eine spannende und lohnende Frage für weitere Untersuchungen, ob es gelingen wird, die Bedingungen zu charakterisieren, die eine Detektion der RPGN-assoziierten LAMP2-AK erlauben.

6.5. Vergleich der Immunisierungsprotokolle Gene Gun / Tattoo

Ein Nebenziel meiner Arbeit ergab sich aus der Notwendigkeit, Immunsereen gegen nativ gefaltetes LAMP-2 durch DNA-Immunisierung von Kaninchen und Ratten zu gewinnen. Neben der traditionell im Institut für Immunologie verwendeten Technik der ballistischen DNA-Immunisierung mit Hilfe der Gene Gun wurde vor einigen Jahren die Tätowierung als Methode der DNA-Immunisierung beschrieben (Bins et al., 2005, 2007; Pokorna et al., 2008). Es ergab sich also im Rahmen meiner Arbeit die Möglichkeit, die Immunisierungstechniken per Gene Gun und Tätowiermaschine hinsichtlich ihrer guten Verträglichkeit durch die Versuchstiere, der Immunisierungseffizienz sowie ihrer unkomplizierten und gut standardisierbaren Durchführbarkeit zu vergleichen.

Die Tätowiertechnik versprach mehrere potenzielle Vorteile, die evaluiert werden sollten. Zum einen führt der zur Beschleunigung der Goldpartikel der Gene Gun Munition benötigte Gasdruck bei kleinen Versuchstieren (Mäuse, Ratten) nicht selten zu Benommenheit und anderen Nebenwirkungen. Eine mögliche Schonung der Tiere durch die alternative Möglichkeit der Tätowierung wäre daher wünschenswert.

Erfahrungsgemäß ist auch die Effizienz der Kopplung der DNA an die Goldpartikel sowie deren gleichmäßiges Einbringen in die Haut der Versuchstiere durch die Gene Gun nicht leicht zu standardisieren, was zu deutlichen Schwankungen in der Menge der eingebrachten DNA führen kann. Ob durch Eintätowieren von DNA-Lösung einer definierten Konzentration für eine definierte

Dauer die Effizienz erhöht, bzw. besser kontrollierbar sein könnte, sollte ebenfalls eingeschätzt werden.

Die Ergebnisse der FACS- und IFT-Testung (s. 5.6.2. und 5.6.3.) der Immunseren (IS) im Vergleich zu den Prä-Immunseren (pIS) zeigen deutlich, dass die Immunisierungen von Kaninchen und Ratten per Gene Gun erfolgreich waren (Colokalisation von IS-Antikörpern mit LAMP-Transfektante der Zellen). Die Tattoo-Immunisierung der Kaninchen war ebenfalls erfolgreich, jedoch mit einer im Vergleich zur Gene Gun Immunisierung schwächeren Immunantwort gegen das verwendete LAMP2-Konstrukt. Die Immunisierung der Ratten per Tätowierung zeigte keinen Erfolg. Dass alle IS von erfolgreich immunisierten Tieren, im Gegensatz zu den pIS, eine deutliche ANCA-Fluoreszenz, wie für LAMP2-AK beschrieben (Kain et al., 2008), zeigten (s.5.6.4.), verdeutlicht die erfolgreiche Generierung von LAMP2-AK.

Generell kann die Tätowierung, wie bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Bins et al., 2005, 2007; Pokorna et al., 2008), als Alternative zur Gene Gun Immunisierung angesehen werden. Eine Optimierung der Immunantwort könnte sicher durch Modifikationen des hier verwendeten, möglicherweise unausgereiften Protokolls erreicht werden; dies gilt ebenso für die Immunisierung von Ratten. Eventuell spielt die Eindringtiefe der Tätowiernadel eine essentielle Rolle, damit dendritische Zellen in der Epidermis der Versuchstiere erreicht werden können (Bins et al., 2007; Pokorna et al., 2008).

Die Tätowierung scheint jedoch für die Versuchstiere nicht schonender als die Gene Gun Immunisierung zu sein, insbesondere da bei der Immunisierung der weniger tief narkotisierten Kaninchen eine zusätzliche Lokalanästhesie nötig war.

Auch in Hinblick auf die Standardisierbarkeit des Einbringens von DNA in die Haut scheint das direkte Eintätowieren von DNA der Gene-gun Immunisierung nicht überlegen zu sein. Die Tätowierung erfolgt manuell und die Applikation in die richtigen Hautschichten lässt sich durch die Feinjustierung der Tätowiernadel nicht genau genug steuern, was sich negativ auf die Effizienz der Applikation auswirken kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die vorliegenden Experimente kein Vorteil der Tätowierung gegenüber der Gene Gun Immunisierung gezeigt werden konnte. Die Kosten für die zur Gene Gun Immunisierung benötigten Goldcarrier belaufen sich auf ca. 46,90 € - Stand Dezember 2010 - pro Kaninchen, zwei Drittel davon für eine Ratte. Es entsteht durch die Tätowierung also auch keine nennenswerte Kostenoptimierung.

Auch wenn die Effizienz der Immunisierung durch modifizierte Tätowierungsprotokolle noch

verbessert werden könnte, scheint die Verwendung der Gene Gun aufgrund ihrer deutlich besseren Ergebnisse hinsichtlich der Immunisierungseffizienz der Tattoo-Immunsierung, wie zuvor beschrieben (Webster & Robinson, 1997), vorzuziehen zu sein. Da die Tätowierung belastender für die Versuchstiere ist, sollte auch aus ethischen Gründen streng geprüft werden, ob eine Optimierung dieser Technik lohnens- und erstrebenswert ist.

6.6. ANCA-Fluoreszenzmuster von LAMP2-AK

Die klassischen ANCA-Fluoreszenzmuster, die mit Vaskulitiden der kleinen Gefäße assoziiert sind, sind pANCA mit MPO-Spezifität und cANCA mit PR3-Spezifität (Falk & Jennette, 1997; Jennette & Falk, 1997). Ihr Auftreten ist nicht obligat und Ausnahmen von der Assoziation des Antigens mit dem zugehörigen Fluoreszenzmuster sind beschrieben worden (Segelmark et al., 1994). Auch andere, nicht für Vaskulitiden signifikante Autoantikörper können sich als ANCA darstellen (Hoffman & Specks, 1998; Savige et al., 1998). Eine Unterscheidung des durch PR3-AK ausgelösten 'klassischen' cANCA-Musters (granuläre cytoplasmatische Fluoreszenz mit internukleärer Akzentuierung) von atypischen und blassen (engl.: flat) ANCA ist daher für die Diagnostik (neben spezifischen Verfahren wie dem ELISA) essentiell (Wong et al., 1999). Auch die Verwendung von Ethanol- und Formalinfixierten ANCA-Testträgern ist zur definitiven Bestimmung eines ANCA-Fluoreszenzmusters notwendig (s. 5.6.4.).

Um Aussagen über das zu LAMP2-AK zugehörige Fluoreszenzmuster machen zu können, wurden die Immunsereen der mit LAMP2 immunisierten Tiere auf ANCA-Testträgern getestet. Alle zeigten eine deutliche 'klassische' cANCA-Fluoreszenz auf Ethanol- und Formalinfixierten Neutrophilen Granulozyten. Dies deckt sich mit den von Kain et al. publizierten Daten, nach denen sich beim Einsatz gegen LAMP2 reagierender Antikörper sich eine cANCA-Fluoreszenz zeigte (Kain et al., 1995, 2008).

In vivo treten LAMP2-AK jedoch meist in Verbindung mit MPO- oder PR3-AK auf. Laut den publizierten Daten zu den mit diesen Seren durchgeführten ANCA-Testungen waren unterschiedliche Muster, entweder p- oder cANCA sowie atypische Kombinationen beider Fluoreszenzmuster detektierbar (Kain et al., 1995, 2008), was den diagnostischen Wert von Rückschlüssen vom Fluoreszenzmuster auf das Vorhandensein von LAMP2-AK fragwürdig erscheinen lässt. Sollte in weiteren Studien ein diagnostischer Wert der Bestimmung von LAMP2-AK gezeigt werden können, müsste der LAMP2- Nachweis, wie für die klassischen Vaskulitis-Antigene MPO und PR3 bereits üblich, durch direkte Nachweisverfahren, z.B. ELISA erfolgen.

7. Zusammenfassung

Ziel meiner Arbeit war es, ein Screening-System für Autoantikörper gegen neu beschriebene putative Autoantigene zu entwickeln und das Vorkommen dieser Autoantikörper in einem Kollektiv von Patientenseren zu untersuchen. Als Methode wählte ich die forcierte Expression der Autoantigene auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen, mit anschließender Detektion der Antikörper durch Immunfluoreszenz (IFT) oder Durchflusszytometrie (FACS). Nach erfolgreicher Klonierung von Expressionskonstrukten für die zu untersuchenden Autoantigene wurden stabile Transfektanten in HEK293T-Zellen erstellt. Sensitivität und Spezifität dieses Systems im Vergleich zu den in der Routinediagnostik verwendeten EliA-Assays wurden anhand der Detektion von Antikörpern gegen Proteinase-3 (PR3) untersucht und für ausreichend hoch befunden.

In einer großen Sammlung von Seren von Patienten mit Autoimmunerkrankungen (N=390) wurden keine Antikörper gegen die putativen Autoantigene LSM14 und NOL8 gefunden. Die publizierte Assoziation von LSM14-AK mit der primär biliären Zirrhose (PBC) konnte in der vorliegenden Arbeit, möglicherweise aufgrund einer zu geringen Zahl an PBC-Seren, nicht bestätigt werden.

In einem Serum (mit unbekannter Krankheitsassoziation) wurden LAMP2-Antikörper detektiert. Dieses Serum zeigte in der IFT auch das dazu passende Fluoreszenzmuster (cANCA ohne Reaktivität mit PR3). Dahingegen wurde in unserem Screeningsystem eine Serie von Seren von Patienten mit klinisch charakterisierter rapid progredienter Glomerulonephritis (RPGN), die von R. Kain im Klinischen Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Wien als LAMP2-AK positiv charakterisiert worden waren, nicht detektiert. Diese Befunde legen nahe, dass unser Screeningsystem für LAMP2-AK möglicherweise gerade die krankheitsrelevanten LAMP2-AK nicht detektiert.

Um die Ursache für die Diskrepanz zwischen dem von mir entwickelten und dem in Wien verwendeten Detektionssystem zu ergründen, wurden strukturelle Modifikationen in unserem LAMP2-Expressionskonstrukt schrittweise entfernt. Ferner wurde die in der AG Kain verwendete O-Glykosylierungs-defiziente Zelllinie für die Transfektion eingesetzt. Keines dieser Maßnahmen führte dazu, dass die in Wien als positiv charakterisierten Seren in unserem Screeningsystem identifiziert werden konnten. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Ursache der Nichtreaktivität der LAMP2-AK positiven RPGN-Seren mit unserem Detektionssystem aufzuklären. Neben der Schaffung eines effektiven diagnostischen Instruments zur Detektion von LAMP2-AK könnten solche Untersuchungen die konformationellen Voraussetzungen klären, die für die Bindung krankheitsrelevanter LAMP2-ANCA nötig sind und dadurch zu einem verbesserten

Verständnis von LAMP2-ANCA-assoziiierter Glomerulonephritiden beitragen.

Ein Nebenziel der Arbeit war der Vergleich von Gene Gun und Tätowierung als Methoden der DNA-Immunisierung zur Herstellung von Antikörpern gegen Proteine in ihrer nativen Konformation. Die Ergebnisse zeigten, dass die Tätowierung der Gene Gun Immunisierung deutlich unterlegen ist. Mit Hilfe der Immunsereen konnte jedoch gezeigt werden, dass die gewonnenen Antikörper gegen LAMP2 B in nativer Konformation als cANCA-Fluoreszenz detektiert werden können.

8. Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibody / Antikörper
APC	Allophycocyanin
APS-1	Autoimmunes polyglanduläres Syndrom 1
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin Diphosphat
ADAPINCs	Antibodies directed against proteins in native conformation
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AMA	Antimitochondriale Antikörper
Amp R	Ampicillin Resistenz
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANCA	Anti Neutrophilen Cytoplasma Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
cANCA	ANCA vom cytoplasmatischen Typ
CD	Cluster of differetiation
cDNA	complementary DNA / komplementäre DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMV	Cytomegalievirus
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Deoxyribonucleotide / Desoxyribonukleotid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum / Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat

FNGN	Fokal nekrotisierende Glomerulonephritis
GBM	Glomerular basement membrane (Glomeruläre Basalmembran)
GN	Glomerulonephritis
GPA (WG)	Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
hART4	Humane ADP-Ribosyltransferase 4
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin der Klasse A
IgD	Immunglobulin der Klasse D
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IL	Interleukin
IS	Immunsrum
kDa	Kilo Dalton
LAMP2	Lysosomen assoziiertes Membranprotein 2
LSM14	Like Sm Protein 14
MALT	Mucosa associated lymphatic tissue / Mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe
MCS	Multiple Cloning Site
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	Non essential amino acids / Nichtessentielle Aminosäuren
NOL8	Nucleolar protein 8
nPR3	Native Proteinase 3
pANCA	ANCA vom perinukleären Typ
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PCR	Polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGF-R	Platelet derived growth factor receptor
PE	Phycoerythrin
pIS	Prä-Immunsrum

PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (einkernige Zellen des peripheren Blutes)
PR3	Proteinase 3
RA	Rheumatoide Arthritis
RLV	Renal limited vasculitis
RPGN	Rapid progrediente Glomerulonephritis
rpm	Revolutions per minute
rPR3	Rekombinante Proteinase 3
SHC2	SHC transforming protein 2
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCR	T-Cell Receptor / T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming growth factor β
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
UV	Ultraviolett
w/v	Weight per volume percentage (Gewicht pro Volumen in %)
ZNS	Zentralnervensystem

9. Literaturverzeichnis

- Allen, C. D. C., Okada, T. & Cyster, J. G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27(2), 190-202.
- Arad, M., Maron, B. J., Gorham, J. M., Johnson, W. H., Saul, J. P., Perez-Atayde, A. R., Spirito, P., Wright, G. B., Kanter, R. J., Seidman, C. E. & Seidman, J. G. (2005). Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* 352(4), 362-372.
- Bini, P., Gabay, J. E., Teitel, A., Melchior, M., Zhou, J. L. & Elkon, K. B. (1992). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in Wegener's granulomatosis recognize conformational epitope(s) on proteinase 3. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 149(4), 1409-1415.
- Bins, A. D., Jorritsma, A., Wolkers, M. C., Hung, C.-F., Wu, T.-C., Schumacher, T. N. M. & Haanen, J. B. A. G. (2005). A rapid and potent DNA vaccination strategy defined by in vivo monitoring of antigen expression. *Nature Medicine* 11(8), 899-904.
- Bins, A. D., van Rheenen, J., Jalink, K., Halstead, J. R., Divecha, N., Spencer, D. M., Haanen, J. B. A. G. & Schumacher, T. N. M. (2007). Intravital imaging of fluorescent markers and FRET probes by DNA tattooing. *BMC Biotechnology* 7, 2.
- Bloch, D. B., Yu, J. H., Yang, W.-H., Graeme-Cook, F., Lindor, K. D., Viswanathan, A., Bloch, K. D. & Nakajima, A. (2005). The cytoplasmic dot staining pattern is detected in a subgroup of patients with primary biliary cirrhosis. *The Journal of Rheumatology* 32(3), 477-483.
- Bosch, X., Guilabert, A. & Font, J. (2006). Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Lancet* 368(9533), 404-418.
- Burmester, G.-R. & Pezzutto, A. (1998). *Taschenatlas der Immunologie Grundlagen, Labor, Klinik*. Stuttgart [u.a.]: Thieme. (1998). ISBN 9783131153814.
- Büssow, K., Nordhoff, E., Lübbert, C., Lehrach, H. & Walter, G. (2000). A human cDNA library for high-throughput protein expression screening. *Genomics* 65(1), 1-8.
- Carlsson, S. R., Roth, J., Piller, F. & Fukuda, M. (1988). Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylectosaminoglycan. *The Journal of Biological Chemistry* 263(35), 18911-18919.
- Christen, U. & von Herrath, M. G. (2004). Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. *Molecular Immunology* 40(14-15), 1113-1120.

- Coombs, R. & Gell, P. (1968). *Clinical aspects of immunology*. 2. uppl. Oxford;Edinburgh: Blackwell Scientific. (1968). ISBN 9780632018000.
- Damoiseaux, J., Dahnrich, C., Rosemann, A., Probst, C., Komorowski, L., Stegeman, C. A., Egerer, K., Hiepe, F., van Paassen, P., Stocker, W., Schlumberger, W. & Tervaert, J. W. C. (2009). A novel enzyme-linked immunosorbent assay using a mixture of human native and recombinant proteinase-3 significantly improves the diagnostic potential for antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68(2), 228-233.
- Davies, D. J., Moran, J. E., Niall, J. F. & Ryan, G. B. (1982). Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 285(6342), 606.
- Dolman, K. M., Jager, A., Sonnenberg, A., von dem Borne, A. E. & Goldschmeding, R. (1995). Proteolysis of classic anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (C-ANCA) by neutrophil proteinase 3. *Clinical and Experimental Immunology* 101(1), 8-12.
- Dörner, K. (2006). *Klinische Chemie und Hämatologie*. 6. uppl. Stuttgart [u.a.]:: Thieme,. (2006). ISBN 9783131297167.
- Eskelinen, E.-L., Tanaka, Y. & Saftig, P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends in Cell Biology* 13(3), 137-145.
- Etter, C., Gaspert, A., Regenass, S., Wüthrich, R. P., Kistler, T., Kain, R. & Cohen, C. D. (2011). Anti-hLAMP2-antibodies and dual positivity for anti-GBM and MPO-ANCA in a patient with relapsing pulmonary-renal syndrome. *BMC Nephrology* 12, 26.
- Falk, R. J. & Jennette, J. C. (1997). ANCA small-vessel vasculitis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 8(2), 314-322.
- Falk, R. J., Gross, W. L., Guillevin, L., Hoffman, G. S., Jayne, D. R. W., Jennette, J. C., Kallenberg, C. G. M., Luqmani, R., Mahr, A. D., Matteson, E. L., Merkel, P. A., Specks, U. & Watts, R. A. (2011). Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): an alternative name for Wegener's granulomatosis. *Arthritis and Rheumatism* 63(4), 863-864.
- Fritz, G., Dosch, J., Thielmann, H. W. & Kaina, B. (1993). Molecular and cellular characterization of Mex-/methylation-resistant phenotype. Gene and cDNA cloning, serum dependence, and tumor suppression of transfectant strains. *The Journal of Biological Chemistry* 268(28), 21102-21112.
- Fukuda, M., Viitala, J., Matteson, J. & Carlsson, S. R. (1988). Cloning of cDNAs encoding human

- lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Comparison of their deduced amino acid sequences. *The Journal of Biological Chemistry* 263(35), 18920-18928.
- Garwicz, D., Lindmark, A., Hellmark, T., Gladh, M., Jögi, J. & Gullberg, U. (1997). Characterization of the processing and granular targeting of human proteinase 3 after transfection to the rat RBL or the murine 32D leukemic cell lines. *Journal of Leukocyte Biology* 61(1), 113-123.
- van der Geer, P., Wiley, S., Gish, G. D. & Pawson, T. (1996a). The Shc adaptor protein is highly phosphorylated at conserved, twin tyrosine residues (Y239/240) that mediate protein-protein interactions. *Current Biology: CB* 6(11), 1435-1444.
- van der Geer, P., Wiley, S., Gish, G. D., Lai, V. K., Stephens, R., White, M. F., Kaplan, D. & Pawson, T. (1996b). Identification of residues that control specific binding of the Shc phosphotyrosine-binding domain to phosphotyrosine sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(3), 963-968.
- van der Geld, Y. M., Oost-Kort, W., Limburg, P. C., Specks, U. & Kallenberg, C. G. (2000). Recombinant proteinase 3 produced in different expression systems: recognition by anti-PR3 antibodies. *Journal of Immunological Methods* 244(1-2), 117-131.
- Haag, F., Adriouch, S., Braß, A., Jung, C., Möller, S., Scheuplein, F., Bannas, P., Seman, M. & Koch-Nolte, F. (2007). Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signalling* 3(1-2), 71-81.
- Harper, L., Ren, Y., Savill, J., Adu, D. & Savage, C. O. (2000). Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce reactive oxygen-dependent dysregulation of primed neutrophil apoptosis and clearance by macrophages. *The American Journal of Pathology* 157(1), 211-220.
- Hempp, C. (2007). *Identifizierung und Charakterisierung von humanen Autoantigenen*. Diss. Hamburg: Universität Hamburg.
- Hoffman, G. S. & Specks, U. (1998). Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Arthritis and Rheumatism* 41(9), 1521-1537.
- Hoffman, M. D. (2001). Pyoderma gangrenosum associated with c-ANCA (h-lamp-2). *International Journal of Dermatology* 40(2), 135-137.
- Holcombe, R. F., Baethge, B. A., Stewart, R. M., Betzing, K., Hall, V. C., Fukuda, M. & Wolf, R. E. (1993). Cell surface expression of lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) in scleroderma: relationship of lamp2 to disease duration, anti-Sc170 antibodies, serum interleukin-8, and soluble interleukin-2 receptor levels. *Clinical Immunology and*

Immunopathology 67(1), 31-39.

- Janeway, C., Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2008). *Janeway's immuno biology*. 7. uppl. New York: Garland Science. (2008). ISBN 9780815341239.
- Jenne, D. E. & Kuhl, A. (2006). Production and applications of recombinant proteinase 3, Wegener's autoantigen: problems and perspectives. *Clinical Nephrology* 66(3), 153-159.
- Jennette, J. C. & Falk, R. J. (1997). Small-vessel vasculitis. *The New England Journal of Medicine* 337(21), 1512-1523.
- Jinawath, N., Furukawa, Y. & Nakamura, Y. (2004). Identification of NOL8, a nucleolar protein containing an RNA recognition motif (RRM), which was overexpressed in diffuse-type gastric cancer. *Cancer Science* 95(5), 430-435.
- Kain, R., Matsui, K., Exner, M., Binder, S., Schaffner, G., Sommer, E. M. & Kerjaschki, D. (1995). A novel class of autoantigens of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis: the lysosomal membrane glycoprotein h-lamp-2 in neutrophil granulocytes and a related membrane protein in glomerular endothelial cells. *The Journal of Experimental Medicine* 181(2), 585-597.
- Kain, R., Exner, M., Brandes, R., Ziehermayr, R., Cunningham, D., Alderson, C. A., Davidovits, A., Raab, I., Jahn, R., Ashour, O., Spitzauer, S., Sunder-Plassmann, G., Fukuda, M., Klemm, P., Rees, A. J. & Kerjaschki, D. (2008). Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nature Medicine* 14(10), 1088-1096.
- Kallenberg, C. G. M., Stegeman, C. A. & Heeringa, P. (2008). Autoantibodies vex the vasculature. *Nature Medicine* 14(10), 1018-1019.
- Kannan, K., Stewart, R. M., Bounds, W., Carlsson, S. R., Fukuda, M., Betzing, K. W. & Holcombe, R. F. (1996). Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cellular Immunology* 171(1), 10-19.
- Koch-Nolte, F., Glowacki, G., Bannas, P., Braasch, F., Dubberke, G., Ortolan, E., Funaro, A., Malavasi, F. & Haag, F. (2005). Use of genetic immunization to raise antibodies recognizing toxin-related cell surface ADP-ribosyltransferases in native conformation. *Cellular Immunology* 236(1-2), 66-71.
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517), 495-497.

- Kohler, H., Bayry, J., Nicoletti, A. & Kaveri, S. V. (2003). Natural autoantibodies as tools to predict the outcome of immune response? *Scandinavian Journal of Immunology* 58(3), 285-289.
- Kozarsky, K., Kingsley, D. & Krieger, M. (1988). Use of a mutant cell line to study the kinetics and function of O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(12), 4335-4339.
- Liu, H.-Y. & Meakin, S. O. (2002). ShcB and ShcC activation by the Trk family of receptor tyrosine kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 277(29), 26046-26056.
- Lleo, A., Invernizzi, P., Gao, B., Podda, M. & Gershwin, M. E. (2010). Definition of human autoimmunity — autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews* 9(5), A259-A266.
- Lomas-Francis, C. & Reid, M. E. (2010). The Dombrock blood group system: a review. *Immunohematology / American Red Cross* 26(2), 71-78.
- Marnef, A., Sommerville, J. & Ladomery, M. R. (2009). RAP55: insights into an evolutionarily conserved protein family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41(5), 977-981.
- Mauri, C. & Ehrenstein, M. R. (2008). The "short" history of regulatory B cells. *Trends in Immunology* 29(1), 34-40.
- McGlade, J., Cheng, A., Pelicci, G., Pelicci, P. G. & Pawson, T. (1992). Shc proteins are phosphorylated and regulated by the v-Src and v-Fps protein-tyrosine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(19), 8869-8873.
- Möller, S., Jung, C., Adriouch, S., Dubberke, G., Seyfried, F., Seman, M., Haag, F. & Koch-Nolte, F. (2007). Monitoring the expression of purinoceptors and nucleotide-metabolizing ectoenzymes with antibodies directed against proteins in native conformation. *Purinergic Signalling* 3(4), 359-366.
- Morgan, M. D., Harper, L., Williams, J. & Savage, C. (2006). Anti-Neutrophil Cytoplasm-Associated Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology* 17(5), 1224-1234.
- Mouthon, L., Haury, M., Lacroix-Desmazes, S., Barreau, C., Coutinho, A. & Kazatchkine, M. D. (1995). Analysis of the normal human IgG antibody repertoire. Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 154(11), 5769-5778.
- Nakamura, T., Muraoka, S., Sanokawa, R. & Mori, N. (1998). N-Shc and Sck, two neuronally

- expressed Shc adapter homologs. Their differential regional expression in the brain and roles in neurotrophin and Src signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 273(12), 6960-6967.
- Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Grignani, F., Pawson, T. & Pelicci, P. G. (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70(1), 93-104.
- Pokorna, D., Rubio, I. & Müller, M. (2008). DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. *Genetic Vaccines and Therapy* 6, 4.
- Rao, N. V., Rao, G. V., Marshall, B. C. & Hoidal, J. R. (1996). Biosynthesis and processing of proteinase 3 in U937 cells. Processing pathways are distinct from those of cathepsin G. *The Journal of Biological Chemistry* 271(6), 2972-2978.
- Renz-Polster, H. (2008). *Basislehrbuch Innere Medizin*. 4. uppl. München;Jena: Elsevier Urban & Fischer. (2008). ISBN 9783437410536.
- Roberts, R. J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A. S., Bickle, T. A., Bitinaite, J., Blumenthal, R. M., Degtyarev, S. K., Dryden, D. T. F., Dybvig, K., Firman, K., Gromova, E. S., Gumpport, R. I., Halford, S. E., Hattman, S., Heitman, J., Hornby, D. P., Janulaitis, A., Jeltsch, A., Josephsen, J., Kiss, A., Klaenhammer, T. R., Kobayashi, I., Kong, H., Krüger, D. H., Lacks, S., Marinus, M. G., Miyahara, M., Morgan, R. D., Murray, N. E., Nagaraja, V., Piekarowicz, A., Pingoud, A., Raleigh, E., Rao, D. N., Reich, N., Repin, V. E., Selker, E. U., Shaw, P.-C., Stein, D. C., Stoddard, B. L., Szybalski, W., Trautner, T. A., Van Etten, J. L., Vitor, J. M. B., Wilson, G. G. & Xu, S.-yong (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research* 31(7), 1805-1812.
- Rohrer, J., Schweizer, A., Russell, D. & Kornfeld, S. (1996). The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *The Journal of Cell Biology* 132(4), 565-576.
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J. & Pelicci, P. G. (1992). Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360(6405), 689-692.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Araki, K. & Ahmed, R. (2010). From Vaccines to Memory and Back. *Immunity* 33(4), 451-463.

- Salvesen, G. & Enghild, J. J. (1990). An unusual specificity in the activation of neutrophil serine proteinase zymogens. *Biochemistry* 29(22), 5304-5308.
- Savige, J. A., Paspaliaris, B., Silvestrini, R., Davies, D., Nikoloutsopoulos, T., Sturgess, A., Neil, J., Pollock, W., Dunster, K. & Hendle, M. (1998). A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. *Journal of Clinical Pathology* 51(8), 568-575.
- Segelmark, M., Baslund, B. & Wieslander, J. (1994). Some patients with anti-myeloperoxidase autoantibodies have a C-ANCA pattern. *Clinical and Experimental Immunology* 96(3), 458-465.
- Sekiguchi, T., Hayano, T., Yanagida, M., Takahashi, N. & Nishimoto, T. (2006). NOP132 is required for proper nucleolus localization of DEAD-box RNA helicase DDX47. *Nucleic Acids Research* 34(16), 4593-4608.
- Sekiguchi, T., Todaka, Y., Wang, Y., Hirose, E., Nakashima, N. & Nishimoto, T. (2004). A novel human nucleolar protein, Nop132, binds to the G proteins, RRAG A/C/D. *The Journal of Biological Chemistry* 279(9), 8343-8350.
- Shapira, Y., Agmon-Levin, N. & Shoenfeld, Y. (2010). Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 34(3), J168-J177.
- Specks, U., Fass, D. N., Fautsch, M. P., Hummel, A. M. & Viss, M. A. (1996). Recombinant human proteinase 3, the Wegener's autoantigen, expressed in HMC-1 cells is enzymatically active and recognized by c-ANCA. *FEBS Letters* 390(3), 265-270.
- Sun, J., Fass, D. N., Hudson, J. A., Viss, M. A., Wieslander, J., Homburger, H. A. & Specks, U. (1998a). Capture-ELISA based on recombinant PR3 is sensitive for PR3-ANCA testing and allows detection of PR3 and PR3-ANCA/PR3 immunocomplexes. *Journal of Immunological Methods* 211(1-2), 111-123.
- Sun, J., Fass, D. N., Viss, M. A., Hummel, A. M., Tang, H., Homburger, H. A. & Specks, U. (1998b). A proportion of proteinase 3 (PR3)-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) only react with PR3 after cleavage of its N-terminal activation dipeptide. *Clinical and Experimental Immunology* 114(2), 320-326.
- UniProt* [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/>.
- von Vietinghoff, S., Eulenberg, C., Wellner, M., Luft, F. C. & Kettritz, R. (2008). Neutrophil surface presentation of the anti-neutrophil cytoplasmic antibody-antigen proteinase 3 depends on N-terminal processing. *Clinical and Experimental Immunology* 152(3), 508-516.

- Villalta, D., Tonutti, E., Tampoia, M., Bizzaro, N., Papisch, W., Tozzoli, R. & Stella, S. (2004). Analytical and diagnostic accuracy of the EliA automated enzyme fluoroimmunoassay for antineutrophil cytoplasmic autoantibody detection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM / FESCC* 42(10), 1161-1167.
- Webster, R. G. & Robinson, H. L. (1997). DNA vaccines: a review of developments. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 8(4), 273-292.
- Wegener, F. (1937). Über generalisierte, septische Gefäßerkrankungen. *Verh. Dtsch. Pathol. Ges.* 29. s 202 ff.
- Williams, M. A. & Fukuda, M. (1990). Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *The Journal of Cell Biology* 111(3), 955-966.
- Wong, R. C., Silvestrini, R. A., Savige, J. A., Fulcher, D. A. & Benson, E. M. (1999). Diagnostic value of classical and atypical antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) immunofluorescence patterns. *Journal of Clinical Pathology* 52(2), 124-128.
- Yang, W.-H. & Bloch, D. B. (2007). Probing the mRNA processing body using protein macroarrays and "autoantigenomics". *RNA (New York, N.Y.)* 13(5), 704-712.
- Yang, W.-H., Yu, J. H., Gulick, T., Bloch, K. D. & Bloch, D. B. (2006). RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *RNA (New York, N.Y.)* 12(4), 547-554.

10. Anhang

10.1. Vektorkarten

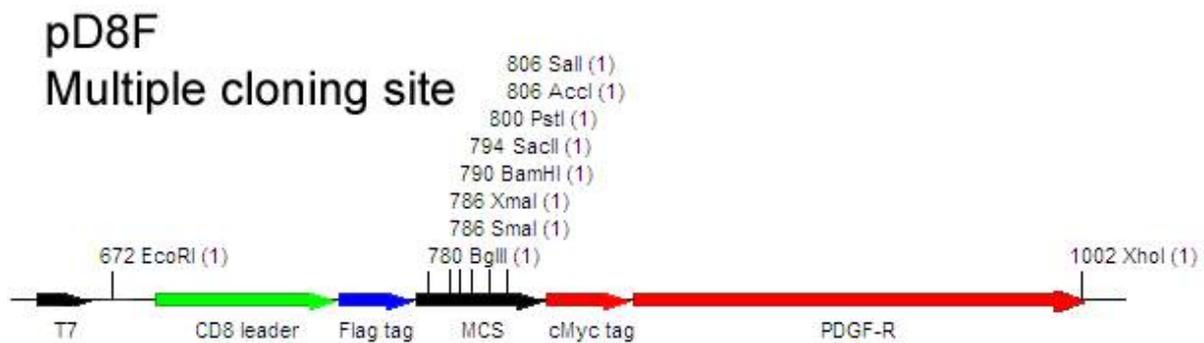
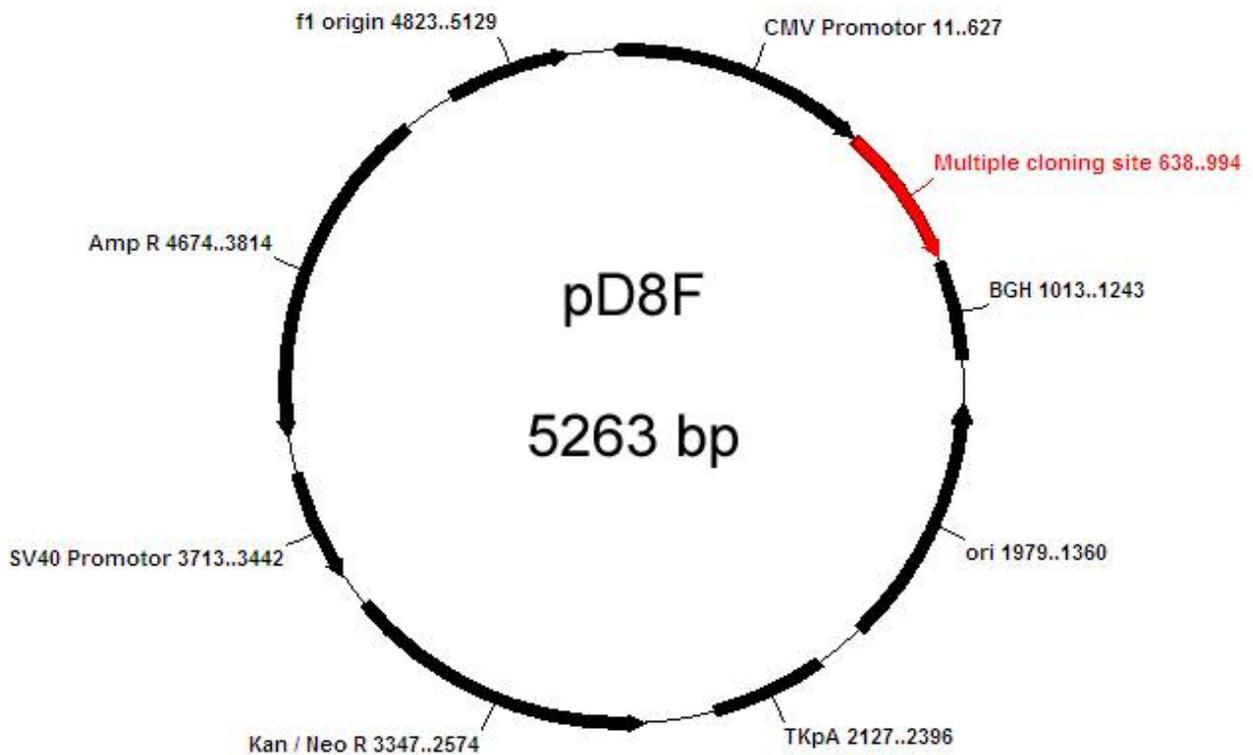


Abb. 10.1.: pD8F Vektorkarte

Der Vektor pD8F entspricht einem modifizierten pDisplay-Vektor, in dem das IgK-Leaderpeptid durch ein CD8-Leaderpeptid sowie einen N-terminal an das Protein angefügten Flag tag ersetzt ist. C-terminal werden ein cMyc tag und die Transmembran- sowie intrazelluläre Domäne des PDGF-Rezeptors angehängt.

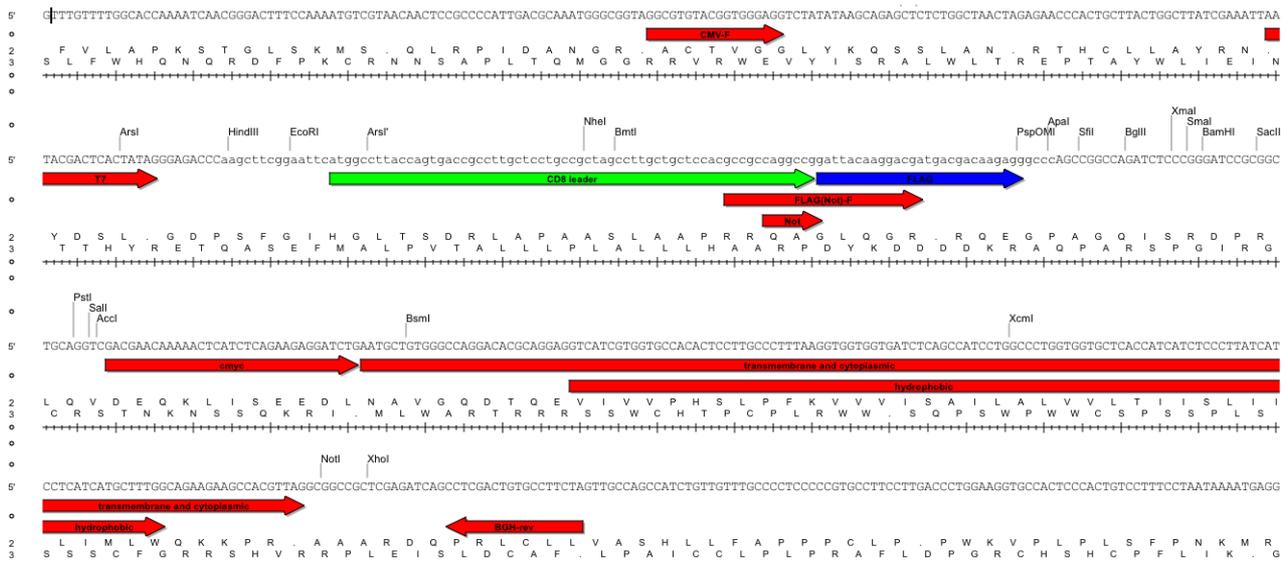


Abb. 10.2.: Multiple cloning site von pD8F (Detailansicht)

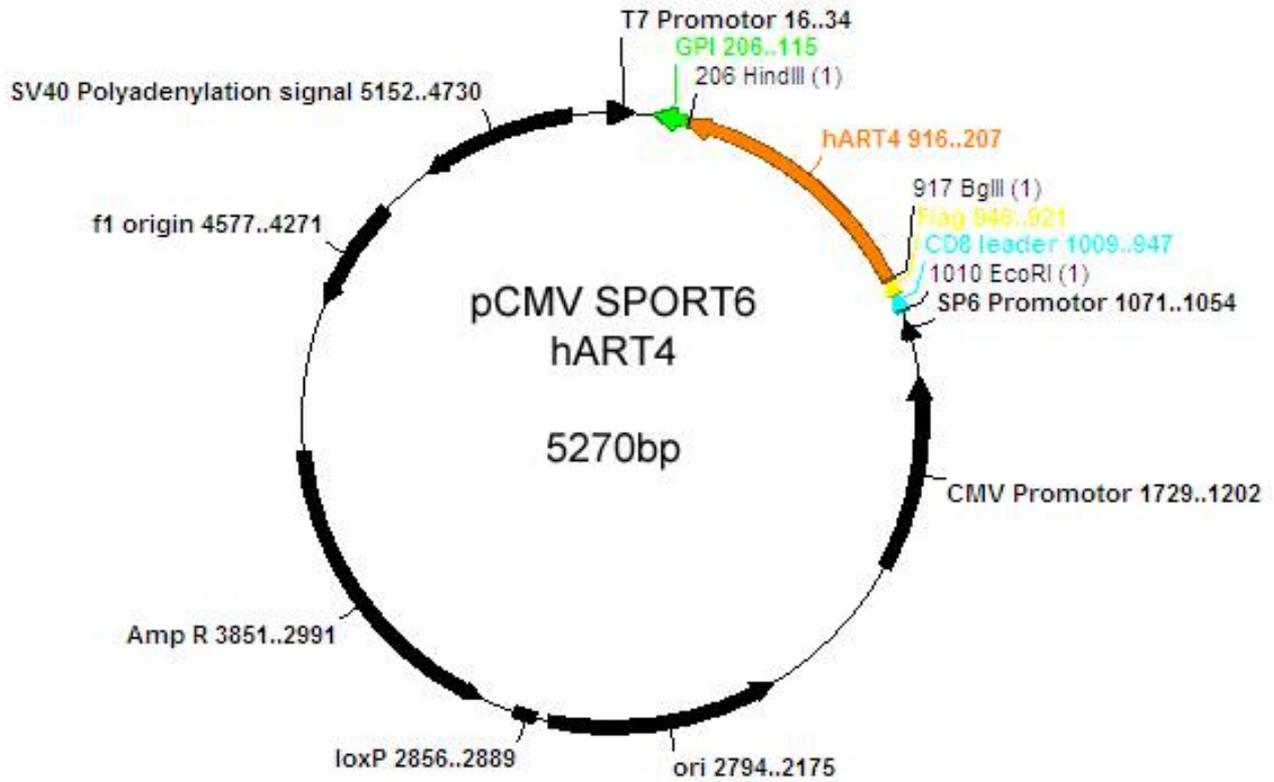


Abb. 10.3.: pCMV-SPORT6 hART4

In den Vektor pCMV-SPORT6 war bereits die humane ART4, N-terminal flankiert von einer CD8-Leadersequenz und einem Flag tag und C-terminal vom auch im hART4-Gen angeschlossenen GPI-Anker. Unter Ausnutzung der Schnittstellen BglII und HindIII kann eine für ein Protein codierende DNA-Sequenz zwischen den Flag tag und den GPI-Anker eingebracht werden.

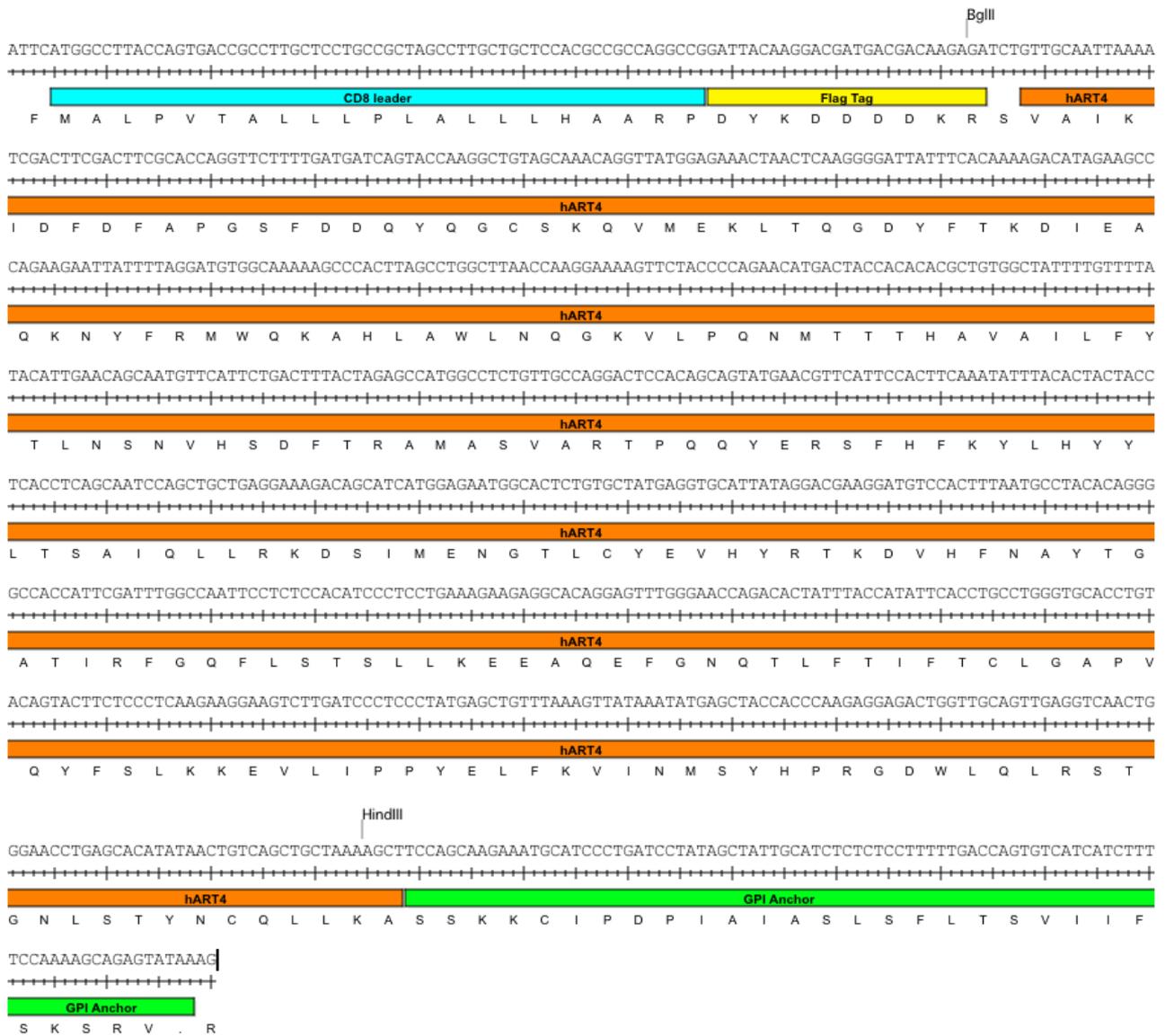


Abb. 10.4.: pCMV-SPORT6/hART4 (Detailansicht)

10.2. Sequenzen und Translation der klonierten Konstrukte

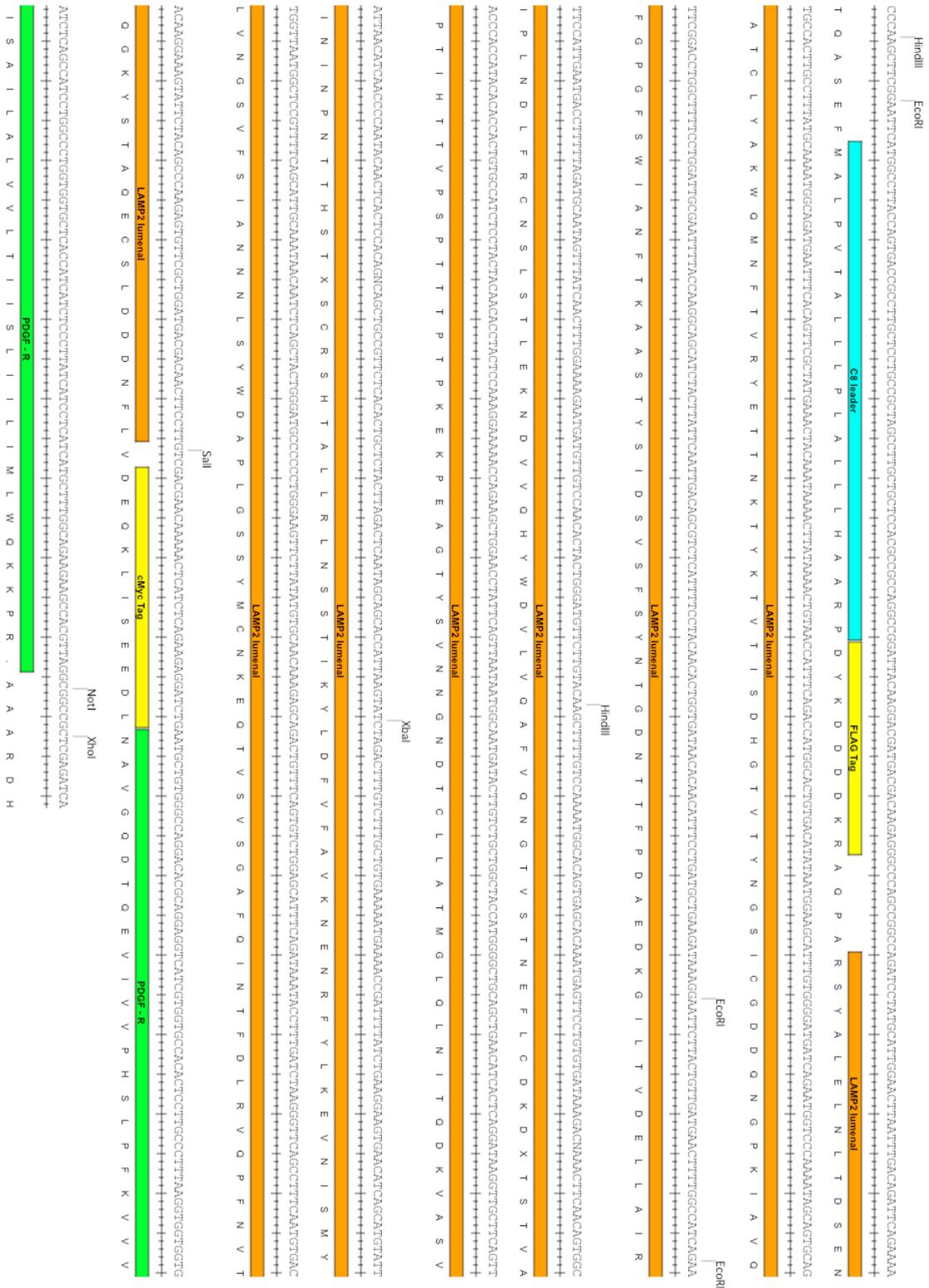


Abb.10.5.: pD8F/LAMP2B

BgIII

ATGGCCTTACGATGACCGCCCTTGCCTTGGCCCTTACCCCTTGCCTCCACCGCCGCCAGGCGGATTTACAAAGGACGATGACGACAAAGATGCTTCAGAGGACCCCGGATATGCTGGGGCAGCAAGATTCAGAGGCGAGATCCGCTAACGAGGCGATTCTTACAC

+++++

+++++ **G08 leader** +++++ **FLAG Tag** +++++ **LSM14 homolog B** +++++

M A L P V T A L L L L P L A L L L H A A R P D Y K D D D D K R S S G T P Y L G S K I S L I S K A Q I R Y E G I L Y T

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

CATGACACCGCAAACTCCACCGTGGGGCCCGCCAAAGTGAAGGCTTTGGACCTGAAGACCGTCCACAGATAGGGCTGGGCCCGCCCAAGAGAGGATTTTATGATACATCATTTTCCGAGAGTGA.CATTCAGAGATATCATCTGTGTGAACCTCCGAAAGCTCAAC

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

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

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

AGCAACTCCCGGAGATCCCGCAATTGTCACTTCCCTGGGTTCTGGCCCTCCGCCCTCCAGCCGCAAGTGGCTTACAGCCCTTTCCAGAGGATGGCCCGCTTACGGCCCGTGGGGCCAGCTCCCTGCTCAGCCAGCATGGCCCGCTCCCTGGGTCTAAGCA

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

H T L P Q D P A I V Q S S L G S A S A S P F Q P H V P Y S P F F R G M A P Y G P L A A S S L L S Q Q Y A A S L G L G

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

GGTGGTTTCCATCCATCCAGTGGCAAGACCCCATGGATGGAGCAAGGCTGTGCAGACTGTGCTGACACCTGAAATGCTTMAAAAGCTGTACCTGGCAAGGGCA.CCAAGGGACGAGCTCAGCGCTCAGGCCCGCCAGCCAGCAAGCCGCGCAAGC

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

A G F P S I P V G K S P M V E Q A V Q T G S A D N L N A K K L L P G K G T T G T Q L N G R Q A Q P S S K T A S D V

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

AGTCCACCGCGGAGCTGTCAAGGCTCAAGGGGAGGTGAATGACAGAAAGAAAGAACCTCAGAGGAGCGCATCGGCTCAGAGGGGCAAAACCGTCCAACTTACGTTAAGAAACACAAATTTGAGGGGTGA.CTTGATTTCCGAGCA

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

V Q P A A V Q A Q G Q V N D E N R R P Q R R S G N R R T R N R S R G Q N R P T N V K E N T I K F E G D F D F E

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

GTCGAAATGCCCCAGTTCAGCAGAGGAGCTTGA.CAAAGATTTTAAAGATGACAAAGGCTGAGAAAGGGGAAAGAAAGAACCTGGCTGTGTGACCCAGAGTGGCCAGCGCCGCTGAGAGAAAGACCTTGTGGGCCAACTGCTGACTATAGAC

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

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

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

AAATCCAAAGTCCGTTCCGCAAACTCCTTCTGACTGAAGCCAGCCTCCAGGGGAGACGTTGGGCCGAAAGAGAGGCTCAACAGAGACCTTTGGGGGTGTCAAGGAGGTTTCTGTGGCCGCAAGTTCCGAGAGGCAAGGGCCAAATGGGAC

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

K S K S F F D N I S S E L K T S S R R T T W A E E R K L N T E T F G V S G R F L R G R S S R G G F R G G R G N G T

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++

HindIII

CAACCCGTCCGAACCCCACTTCCCAAGGGGCCGGACTGGCAAAAGCTTCCAGCAAGAAATGCAATCCCTGATTCCTTATAGCTAATGGATGCTCTCTCTTTTGA.CCAGTGTCAICATCTTTTCCAAAGCAGAGTATMAAGAA

+++++

+++++ **LSM14 homolog B** +++++ **GPI Anchor** +++++

T R R N P T S H R A G T G K A S S K K C I P D P I A I A S L S F L T S V I I F S K S R V . R K

Abb. 10.11.: pCMV-SPORT6/LSM14


```

ATGGCCCTTACCAGTAGACCGCCCTTGTCTCTGCGCCTTAGCCTTGTGCTCCACGGCCCAAGCCGGATTTACAAGACGATGACGACAAGATCCATTCGTGGGGGCAAGGCGCCACACACTCCCGG
+++++
CD8 leader
+++++
FLAG Tag
+++++
Proteinase 3
+++++
M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P D Y K D D D K R S I V G G H E A Q P H S R
+++++
CCTACATGGCCCTCCCTGCAGATGGGGGGAACCCGGGCAACCATTCTGGGAGGCACTTGATCCACCACCGTTGCTGACGGCCCGCACTGCCCTGCGGGACATACCCACGCCCTGGTGAACGT
+++++
Proteinase 3
+++++
P Y M A S L Q M R G N P G S H F C G G T L I H P S F V L T A A H C L R D I P Q R L V N V
+++++
GGTGCCTGGAGCCCAACACGTGGGAGCGAGGAGCCCAACCAGCAGCACTTCTGGGTGCTCAGTGTCTGAACAACACTACGACGGGAGAACAAACTGAACGACGTTCTCTCATCCAGCTGAGCAGC
+++++
Proteinase 3
+++++
V L G A H N V R T Q E P T Q Q H F S V A Q V F L N N Y D A E N K L N D V L L I Q L S S
+++++
CCAGCCAACTCAGTGCCTCCGTCGCCACAGTCCAGTCCACAGCAGGACCAAGCCAGTGCACCACCGGCAAGTGCCTGGCCATGGGCTGGGGCCCGGTGGGTCCCCACGACCCCCCAAGCCCAAGTCC
+++++
Proteinase 3
+++++
P A N L S A S V A T V Q L P Q Q D P V P H G T Q C L A M G W G R V G A H D P P A Q V
+++++
TGCAGGACCTCAATGTCAACCGTGCACCTTCTTCCGGCCACATTAACATTTGACACTTGTCCCTCGCCGCAAGGCCGCACTGTTCGGAGACTCAGGTTGCCCCCTGATCTGTGATGGCATTCAT
+++++
Proteinase 3
+++++
L Q E L N V T V V T F C R P H N I C T F V P R R K A G I C F G D S G G P L I C D G I I
+++++
Proteinase 3
+++++
HindIII
+++++
CCAAGAAATAGACTCCTTCGTGATCTGGGGATGTGCCACCCCGCCTTTCCCTGACTTCTTCAAGCCGGGTAGCCCTCTAAGTGGACTGATCCGTTCCACAGCTGCCCGGTGGAAGCTTCCAGCAAGAAA
+++++
Proteinase 3
+++++
Q G I D S F V I W G C A T R L F P D F F T R V A L Y V D W I R S T L R R V E A S S K K
+++++
GPI Anchor
+++++
TGCATCCCTGATCCCTAATAGCTATTGCAATCTCTCCCTTTTGAACAGTGCATCATCTTTCCMAAAGCAGATATMAAGAAA
+++++
GPI Anchor
+++++
C I P D P I A I A S L S F L T S V I I F S K S R V . R K

```

Abb. 10.13.: pCMV-SPORT6/PR3

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Friedrich Haag für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die ständige intensive Anleitung, freundliche und hilfsbereite Betreuung und Möglichkeit zur konstruktiven Diskussion während der gesamten Arbeit an diesem Projekt. Weiterhin danke ich ihm für die Möglichkeit, an internationalen Kongressen teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte, Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker und PD Dr. Eva Tolosa danke ich vielmals für ihre freundliche Unterstützung, ihren Rat und konstruktive Kritik.

Gudrun Dubberke und Fabienne Seyfried gilt weiterhin mein ganz besonderer Dank für die exzellente technische Betreuung, Anleitung und Einarbeitung in alle verwendeten Methodiken sowie die hilfreiche Unterstützung bei vielen Experimenten.

Weiterhin danke ich für die große Hilfe und technische Unterstützung in allen Belangen der Routinediagnostik Astrid Potthas, Anke Rennecke, Cornelia Ritter und Karin Schreiber. Bianca Ziesch danke ich für die Hilfe und Betreuung bei der Durchführung der Immunisierungen.

Für das zur Verfügung stellen von Humanseren und anderer Materialien sowie Diskussion und Gedankenaustausch danke ich Prof. Dr. Renate Kain, Dr. Elena Csernok und Dr. Thorsten Krieger.

Für eine sehr gute Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit im Labor danke ich besonders Gudrun Dubberke, Karla Oyuky Juarez, Mehrdad Irai, Tanja Schoknecht, Kristina Kliesch, Soroush Nader und Kira Heesch sowie allen anderen Mitarbeitern des Forschungslabors und des Diagnostiklabors des Institutes für Immunologie des UKE.

12. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

13. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 10.10.2011

Unterschrift: **gez. Unterschrift**