

Aus dem Institut für Immunologie des  
Universitätsklinikums  
Hamburg Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

**„Gewinnung, Aufreinigung und Charakterisierung von polyklonalen  
Antiseren aus Kaninchen und Ente gegen rekombinante Fusionsproteine  
aus  $\beta$ -Galaktosidase und RT6. Einsatz der Antiseren zur Analyse von  
T-Zell-extrakten aus Ratte, Maus und Mensch.“**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Dietmar Kühn

Lutherstadt Wittenberg 2004

**Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 21.02. 2005**

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin  
der Universität Hamburg

**Prüfungsausschuss:**

Der Vorsitzende: Prof. Dr. F. Koch-Nolte, Institut für Immunologie,  
Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf

2. Gutachter: PD Dr. F. Haag, Institut für Immunologie,  
Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf

3. Gutachter: Prof. Dr. A. Guse, Institut für Biochemie und  
Molekularbiologie, Universitätsklinikum  
Hamburg - Eppendorf

**Für Susanne 1964 – 1979**

**Das Versprechen ist erfüllt!**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>RT6 in der Immunologie</b>	<b>7</b>
1.1.1	„Immunologie die Kernwissenschaft der Medizin“	
1.1.2	T-Zellen als wesentlicher Bestandteil des Immunsystems	
1.1.3	RT6-Gen Struktur und Charakterisierung	
1.1.4	RT6 und Autoimmunität	
1.1.5	RT6 nur ein T-Zell Differenzierungsmarker?	
<b>1.2</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis und Anglizismen</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>14</b>
3.1.1	Verbrauchsmaterial	
3.1.2	Geräte	
3.1.3	Lösungen, Reagenzien	
3.1.4	Antikörper, Bakterienstämme, Versuchstiere, Zellen	
<b>3.2</b>	<b>Gewinnung polyklonaler anti RT6 Immunsereen</b>	<b>25</b>
3.2.1	Immunisierung von Kaninchen und Ente	
3.2.2	Aufbereitung der Immunsereen aus Kaninchen und Ente	
<b>3.3</b>	<b>Präparation lymphatischen Gewebes aus Ratte und Maus</b>	<b>28</b>
3.3.1	Präparation und Verarbeitung von Lymphknoten der Ratte	
3.3.2	Verarbeitung von Milzen der Maus	
3.3.3	Verarbeitung von Milzen der Ratte	
<b>3.4</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>29</b>
3.4.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen	

3.4.2	Prävention von Kontamination	
3.4.3	Neubauer Kammer	
3.4.4	Zellernte	
3.4.5	Zellreinigung	
3.4.6	Zellsolubilisierung	
3.4.7	Kontrolle der Proteinexpression	
<b>3.5</b>	<b>Auftrennung und Nachweis von Zellproteinen</b>	<b>33</b>
3.5.1	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	
3.5.2	Aufbereitung der Proben für die SDS-PAGE	
3.5.3	Silberfärbung	
<b>3.6</b>	<b>Übertragung und Fixierung von Zellproteinen</b>	<b>35</b>
3.6.1	Western-Blot Techniken	
<b>3.7</b>	<b>Immunodetektion</b>	<b>36</b>
3.7.1	Alkalische Phosphatase	
3.7.2	Chemilumineszenz	
3.7.3	Streptavidin-Alkalische Phosphatase	
<b>3.8</b>	<b>Affinitätschromatografie</b>	<b>38</b>
3.8.1	Aufreinigung großer Zellsolubilisatmengen im Säulenverfahren	
3.8.2	Gewinnung aufgereinigter Antikörper durch Epitopselektion	
<b>3.9</b>	<b>Zellseparationsverfahren</b>	<b>43</b>
3.9.1	Zelltrennung von B- und T-Zellen der Ratte mit Dynabeads	
3.9.2	Zellseparation aus humanen Leukozytenkonzentraten	
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>

<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der durch Immunisierung mit beta-Galaktosidase-RT6 rekombinanten Fusionsprotein gewonnenen Antiseren</b>	<b>45</b>
4.1.1	Testung der Immunreaktivität der gewonnenen Antiseren an mit RT6-β-Galaktosidase Fusionsprotein transformierten Escherichia coli Lysaten	
4.1.2	Titrierung der Antiseren und Sekundärantikörper zur Entwicklung optimaler Arbeitsbereiche	
4.1.3	Affinitätsreinigung RT6-spezifischer Antikörper an immobilisierten RT6-beta-Galaktosidase Fusionsproteinen	
<b>4.2</b>	<b>Nachweis von nativem RT6 in T-Zellen und T-Zelllinien</b>	<b>63</b>
4.2.1	Vergleichende FACS-Analyse der RT6 Expression auf primären T-Zellen der Ratte und auf der Ratten T-T Hybridomzelllinie EpD3 mit dem monoklonalen Antikörper Gy1/12	
4.2.2	Affinitätsreinigung von nativem RT6 aus EpD3 Zellsolubilisaten an immobilisiertem Gy1/12 Antikörper im Säulenverfahren	
4.2.3	Nachweis RT6 spezifischer Antikörper aus affinitätschromatografisch aufgereinigten Immunsereen aus Kaninchen und Ente	
4.2.4	Nachweis von RT6 in Gesamtzelllysaten aus EpD3 Hybridomzellen und primären T-Zellen der Ratte, der Maus und des Menschen	
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>90</b>

# 1. Einleitung

Immunität stammt vom lateinischen Begriff *immunitas* = Privileg römischer Senatoren, dass sie vor gesetzlicher Verfolgung schützt (Abbas 94).

Das Immunsystem setzt sich aus unterschiedlichen Zellen, Molekülen und Organen zusammen, die durch ein fein koordiniertes Netzwerk miteinander „kommunizieren“ und dem jeweiligen Immunstatus angepasst sind. Nur durch dieses koordinierte Zusammenspiel ist die Immunität des Organismus überhaupt möglich. Ein kleiner Baustein in dem fast unüberschaubaren Netzwerk von Zellen und Molekülen ist das RT6. Mit dem Kürzel RT6 wird eine Gruppe von T-Zell Molekülen bezeichnet, die seit vielen Jahren das Hauptforschungsgebiet unserer Arbeitsgruppe darstellen. RT6 ist an Ratten T-Zellen entdeckt und dort zunächst untersucht worden. Es zeigten sich im Verlauf verschiedener Arbeiten viele interessante Details eines polymorphen Moleküls, das inzwischen mit erstaunlichen Merkmalen wie z.B. einer enzymatischen Aktivität aufwarten kann!

## 1.1 RT6 in der Immunologie

### 1.1.1 „Immunologie die Kernwissenschaft der Medizin“

Dieser Ausspruch von Prof. Dr. Thiele wurde für mich zu einem Leitspruch. Mit diesen Worten und anhand von diversen Beispielen erläuterte er zu Beginn eines Semesters die umfassende Bedeutung der Immunologie für die Medizin, angefangen mit den Umbauprozessen eines frakturierten Knochens bis zur aufwendigen Forschung für die Entwicklung einer Therapie bei HIV-Infektion.

Unabhängig davon, ob man dieser Aussage nun folgen möchte oder nicht, macht sie die zunehmende Bedeutung der Immunologie deutlich. Die Reihe der Nobelpreisträger, die sich mit Fragestellungen der Immunologie beschäftigen, wächst: Sir Frank Macfarlane Burnet, Niels Kaj Jerne, César Milstein, Georges J. F. Köhler und Susumu Tonegawa seien an dieser Stelle nur beispielhaft genannt.

Dies macht einen weiteren wesentlichen Punkt des Forschungsgebiets deutlich und zwar die Dynamik mit der neue Erkenntnisse entdeckt werden. Mit der gleichen Dynamik verändert sich das Immunsystem selbst, es hat sich in den zurückliegenden Zeitepochen immer wieder an das Umfeld angepasst und erbringt diese enorme Adaptationsleistung bis zum heutigen Tag (Janeway 89).

### 1.1.2 T-Zellen als wesentlicher Bestandteil des Immunsystems

Die Zellen des Immunsystems werden in T- und B-Zellen, sowie Antigen-Präsentierende-Zellen (APC) unterteilt. Die Bildung der T-Zellen erfolgt im Knochenmark. Im Gegensatz zu anderen Zellen durchlaufen die T-Zellen auch Reifungsstadien außerhalb des Knochenmarks

z.B. im Thymus (Hobom 1991). Diese Reifung führt auch zur Ausbildung von T-Zell-Differenzierungsmarkern (Smith 1984, Bluestone 1983), die für die Einteilung der T-Zellen in unterschiedliche Subpopulationen verantwortlich sind. Die Dynamik des Immunsystems bedingt eine ständige Kontrolle des Organismus nach Fremdstoffen (Antigenen), der Immunsurveillance (Jerne 73, Roitt 88). Um dies zu ermöglichen, zirkulieren die immunkompetenten Zellen durch die Gefäße und können diese teilweise verlassen, um im Gewebe ihre Aufgaben wahrzunehmen. Eine herausragende Rolle für die Abwehr von Mikroorganismen stellt das lymphatische Gewebe des Organismus dar, in diesem konzentrieren sich die Zellen des Immunsystems. Abb. 1 zeigt die Verteilung des lymphatischen Gewebes im Organismus.

**Abbildung 1 Lymphatisches Gewebe im Organismus**

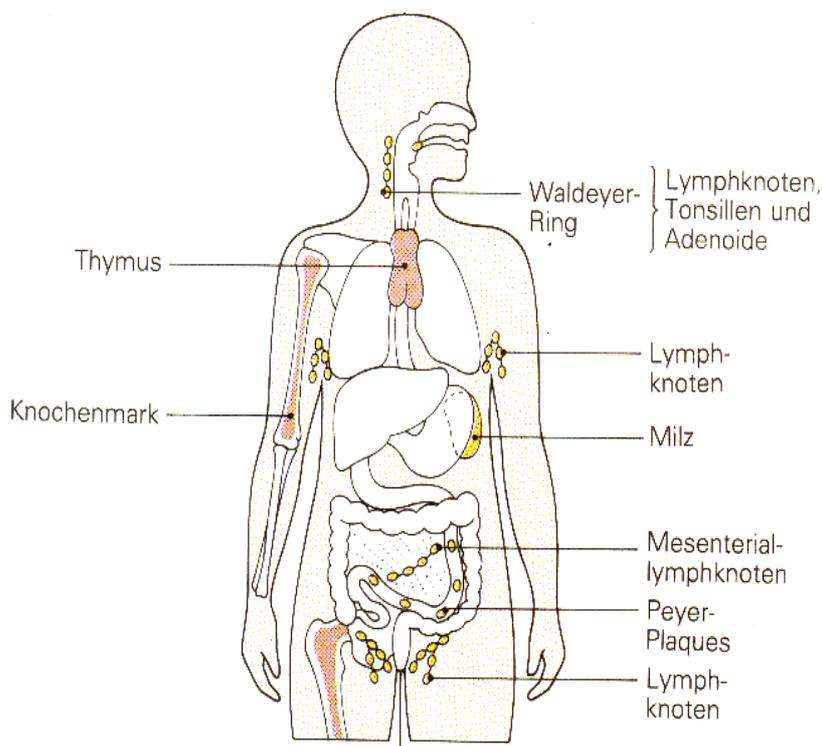


Abbildung 1: Lymphatisches Gewebe in der Übersicht. Die größte Menge lymphatischen Gewebes findet sich im Darm. Als primäre lymphatische Gewebe werden die Organe der Bildung bzw. Prägung von Lymphozyten bezeichnet, dies sind das Knochenmark und der Thymus. (Abbildung aus: I.M. Roitt, J. Brostoff, D.K. Male: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Deutsche Übersetzung I. Harabacz. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1987.)

Die T-Zellen sind im Netzwerk des Immunsystems fest integriert und nehmen verschiedene Aufgaben wahr. Bei Kontakt mit Fremdeiweiß (Antigenen) wird das Immunsystem über APC aktiviert. Bei der Steuerung der Immunantwort kommt den T-Zellen ebenfalls eine zentrale Bedeutung zu.

Steuerungsfunktion übernehmen T-Zellen auch im Falle der Erkennung von Selbst und Nicht-Selbst (Blackman 1990, Cohen 1991). Diese Unterscheidung muss täglich, zu jeder Sekunde, ein Leben lang erfolgen, um den Organismus vor Fremdeiweiß zu schützen. Bei Fehlern der Selbsterkennung kann es zu autoaggressiven Störungen kommen, ein Konzept das verschiedene Autoimmunerkrankungen erklären könnte (Rennie 91).

Damit die Zellen untereinander interagieren können und die Immunantwort bzw. die Selbsttoleranz möglich ist, werden an der Oberfläche der T-Zellen Proteine exprimiert, die in der Lage sind, Signalmoleküle zu erkennen. Entsprechende Signale werden über „Second Messenger“- Systeme weitergeleitet und führen intrazellulär zu Veränderungen des Zellstoffwechsel z.B. Zellproliferation (Gallagher 90). Ein für T-Zellen besonders charakteristisches Membranprotein ist der T-Zellrezeptor (TCR) (Hood 85). Auch das RT6 ist zunächst ein Membranprotein der T-Zellen, dem unterschiedliche Funktionen zukommen.

#### 1.1.3 RT6-Gen Struktur und Charakterisierung

Nach der Entdeckung des RT6 T-Zell Markers wurde dieser zunächst mit verschiedenen Bezeichnungen belegt (Thiele 79). Anfang der achtziger Jahre einigte man sich auf die Kurzform RT6 (Lubaroff 83). Das T-Zell Alloantigen System RT6 gliedert sich in die zwei Allotypen RT6.1 und RT6.2 mit den korrespondierenden Allelen RT6<sup>a</sup> und RT6<sup>b</sup> (Wonigeit 79). Es liegt eine enge Kopplung zu den Genloci Albinismus und Hämoglobin- $\beta$  vor, die die Erstellung einer Genkarte erleichterte (Greiner 82). Es besteht eine hohe Kopplungshomologie dieser Region zu einer entsprechenden Region des Chromosom 7 der Maus und dem kurzen Arm des humanen Chromosom 11 (Lalley 1989).

Die Aufklärung der Primärstruktur des RT6 der Ratte wurde durch die Klonierung des Phagenvektors Lambda gt11 ( $\lambda$  gt11) mit cDNA eines RT6 exprimierenden TT-Hybridoms ermöglicht. Die Ergebnisse der sich daran anschließenden Nucleotidsequenzierung ergaben ein Fehlen von Glykosylierungsstellen und die für eine Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol Verankerung typische Nucleotidsequenz s.a. 1.1.5 (Koch 90a).

Nach der erfolgreichen Sequenzierung des Ratten RT6 gelang mit Hilfe von Nucleotidsonden auch die Ableitung des Maus Homologs, das mRt6 (Koch 90b).

#### 1.1.4 RT6 und Autoimmunität

Es konnte gezeigt werden, dass es bei bestimmten Ratten einen angeborenem RT6 Expressionsdefekt mit Ausbildung eines Diabetes mellitus gibt (Greiner 86). Die sogenannten dpBB (diabetes prone Bio-Breeding) Ratten entwickeln in 80% der Fälle einen adulten insulinpflichtigen Diabetes mellitus aufgrund einer Insulitis mit lymphozytärer Infiltration.

Die auftretende chronische Insulinitis mit Destruktion der  $\beta$ -Zellen wird als Ausdruck einer immunologischen Autoaggression gewertet (Leiter 87). Bei Bestrahlung des vorhandenen Lymphgewebes tritt dieser IDDM (insulin dependent diabetes mellitus) nicht auf (Rossini 84). Die dpBB Ratten stellen ein Tiermodell für den juvenilen Diabetes mellitus dar. Die T-Zell Entwicklung dieser Ratten ist gestört, und es kommt neben dem Diabetes zu weiteren Immundefekten (Bellgrau 90).

#### 1.1.5 RT6 nur ein T-Zell Differenzierungsmarker?

Die peripheren, nicht aktiven T-Zellen der Ratte exprimieren RT6, nicht aber die T-Zellen des Thymus, so dass eine spätere Aktivierung erfolgt. So scheinen sich die T-Zell Marker Thy-1 und RT6 reziprok zu verhalten (Thiele 87).

In verschiedenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich das Molekül mit Detergenzien nur schwer von der Zellmembran lösen lässt. Durch den Einsatz von bestimmten Enzymen, der Phosphatidyl-Inositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) gelang jedoch die Abspaltung (Thiele 86, Koch 86). Die Bedeutung dieser Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol Verankerung (gPI-Anker) ist noch ungeklärt (Koch 87). Möglicherweise hängt diese mit einer nach Abschluss dieser Dissertation entdeckten, interessanten Eigenschaft des RT6 zusammen, der enzymatischen Aktivität (Takada 94). Untersuchungen an T-T-Hybridomzellen zeigen, dass beide RT6 Formen NAD-Glykohydrolase-Aktivität aufweisen und RT6.2 auch zur Auto-ADP-Ribosylierung fähig ist (Haag 95).

Biochemische Analysen zeigten, dass die beiden RT6 Formen unterschiedlich glykosyliert sind. Dabei ist RT6.2 nicht glykosyliert, RT6.1 ist sowohl nicht als auch einfach glykosyliert (Thiele 83, 86).

Eine Verlangsamung im Auftrennungsverhalten von Zellsolubilisaten in der SDS-PAGE bei Zugabe von reduzierenden Chemikalien (DTT) lässt auf intramolekulare Disulfidbrücken schließen. Bei einer Spaltung dieser Bindungen verändert sich das scheinbare Molekulargewicht (Thiele 79, 86).

Um Zellen verschiedener Funktion aber gleicher licht- und elektronenmikroskopischer Gestalt voneinander unterscheiden zu können, bedient man sich u.a. der CD-Klassifikation. CD bedeutet cluster of differentiation und gibt die für verschiedene Zellen typischen Oberflächenantigene an. So lassen sich auch die T-Zellen in unterschiedliche Subpopulationen einteilen, von denen hier nur die T-Helfer-Zellen (Th) und die zytotoxischen-T-Zellen (Tc) erwähnt werden. Die Th besitzen den Differenzierungsmarker CD4, während die Tc den Marker CD8 exprimieren (Abbas 94). Da diese Membranstrukturen sehr spezifisch sind, lässt sich dieser Umstand für die biochemische Charakterisierung von Zellen nutzen. Durch die Entwicklung von auf Differenzierungsantigene gerichtete Antikörper lassen sich Aussagen über Funktion und Aufbau der betreffenden Markerproteine

machen. RT6 spezifische monoklonale und polyklonale Antikörper werden als wertvolle Werkzeuge in der weiteren biochemischen Charakterisierung des RT6 eingesetzt.

## 1.2 Ziele der Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit standen drei Kaninchen- und drei Entenseren gegen SDS denaturiertes  $\beta$ -Galaktosidase-RT6 Fusionsprotein zur Verfügung. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass diese Antiseren hohe Titer gegen SDS denaturiertes  $\beta$ -Gal-RT6 Fusionsprotein aufwiesen.

Ausgangspunkt für die Arbeit war zunächst die Gewinnung dieser polyklonalen Seren aus einer Immunisierungsserie, die im Oktober 1987 begonnen wurde (s. Abb. 3) und durch zwei Booster Injektionen abgeschlossen werden sollte. Nach diesen Injektionen sollten die Seren durch Entbluten gewonnen, aufgereinigt und dauerhaft gelagert werden.

Die Seren aus Kaninchen und Ente sollten für die weitere Charakterisierung des T-Zell Markers RT6 eingesetzt werden. Erste Untersuchungen dieser Seren hinsichtlich Spezifität für  $\beta$ -Galaktosidase und RT6, sollten den Immunisierungserfolg dokumentieren.

Anschließend sollten für die eingesetzten Seren optimierte Titerstufen und im Zusammenhang mit den Detektionssystemen optimale Arbeitsbereiche festgelegt werden.

Da nach Vorversuchen die Vermutung bestand, dass beide Anteile des rekombinanten Fusionsproteins, beta-Galaktosidase und RT6, antigen wirkten, sollten die Antiseren über negative und positive affinitätschromatografische Selektionsverfahren so aufgereinigt werden, dass die  $\beta$ -Galaktosidase erkennenden Epitope als Unspezifitäten möglichst eliminiert würden.

Die gereinigten RT6 spezifischen Antikörper sollten danach im Western Blot für die Analyse von T-Zellextrakten aus Ratte, Maus und Mensch eingesetzt werden.

Die für diese Arbeit wesentlichen Verfahren sollten neben den Basisverfahren wie SDS-PAGE und Western Blot insbesondere die verschiedenen Formen der affinitätschromatografischen Aufreinigung von Antikörpern in der Säulenaffinitätschromatografie und Epitopselektion sein.

## 2. Abkürzungsverzeichnis und Anglizismen

### Abkürzungen:

Abb.	= Abbildung
ADP	= Adenosin-Di-Phosphat
AgNO <sub>3</sub>	= Silbernitrat
AIDS	= Erworbene Immunschwäche, Acquired Immunodeficiency Syndrom
AP	= Alkalische Phosphatase

APC	= antigen presenting cell, Antigen präsentierende Zelle
APS	= Ammonium Persulfat
BB	= Bio Breeding
BCIP	= 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-Phosphat
β-Gal	= Beta-Galaktosidase
BPB	= Bromphenolblau
BSA	= Bovine Serum Albumin
B-Zellen	= Lymphozyten, die im frühen Stadium im Knochenmark geprägt werden und in Lage sind Antikörper zu sezernieren
CD	= cluster of differentiation
dp	= diabetes prone
DPD	= Dimethylpimelidat-Dihydrochlorid
DTT	= Dithiothreitol
EDTA	= Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	= Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EP	= Elektrophoresepuffer
EpD3	= Name einer Zelllinie, eines T-T Hybridoms
FACS	= Fluoreszenz Aktivierte Zellsortierung
FCS	= fetales Kälberserum
FITC	= Fluoresceinisothiocyanat
FP	= Fusionsprotein
g	= Gramm
g	= Zentrifugation, wird in Vielfaches der Erdbeschleunigung angegeben 9,81 m/sec <sup>2</sup>
gPI	= Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GST	= Glutathion-S-Transferase
HCL	= Salzsäure
HIV	= Humanes Immunschwäche Virus, Überträger einer AIDS Infektion
H <sub>2</sub> O	= Wasser unterschiedlicher Güte
IDDM	= insulinpflichtiger Diabetes mellitus, insulin dependent diabetes mellitus
Ig	= Immunglobulin, Antikörper
kd	= kilo Dalton
M	= molar, auf ein Mol einer bestimmen Substanz bezogen
mAK	= monoklonaler Antikörper
MG	= Molekulargewicht
MgCl	= Magnesiumchlorid
NaCl	= Natriumchlorid
NAD	= Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NBT	= Nitro Blue Tetrazolium

NC	= Nitrocellulose
pH	= Maßzahl für Konzentration von Wasserstoffionen in einer Lösung
PI-PLC	= Phosphatidyl-Inositol-spezifische Phospholipase C
RPMI	= Stammnährlösung für die Zellkultur, die vor dem Einsatz noch mit unterschiedlichen Bausteinen supplementiert wurde
RT	= Raumtemperatur
PBS	= Phosphate buffered saline
PMSF	= Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	= Membranmaterial für Western Blots, polyvinylidene difluoride
rpm	= rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
SDS	= Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	= SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	= Sekunde
SPB	= Sample Probe Buffer, Probenpuffer zum Einsatz in der SDS-PAGE
TBS	= Tris-buffered saline
TBSF	= Blocklösung, TBS mit FCS
TBSM	= Blocklösung, TBS mit Trockenmilch
TBST	= Tris-buffered saline mit Tween 20
TCA	= Trichloressigsäure
TCR	= T-Zellrezeptor
Tc	= CD8 <sup>+</sup> cytotoxische T-Zelle
TEMED	= N, N, N, N - Tetramethylethylendiamin
Th	= CD4 <sup>+</sup> T-Helfer-Zelle
Tris	= Trishydroxymethylaminomethan
T-T	= T-Zellhybridom
T-Zellen	= Lymphozyten, die im Thymus geprägt werden
ü.n.	= über Nacht
z.B.	= zum Beispiel

### **Anglizismen:**

Batch	= Fertigungsmenge
Blot	= Membran mit aus NC oder PVDF mit transferiertem Material z. B. Protein
Blotting	= Transfer auf eine Membran
Bucket	= Eimer
Butterfly	= Blutentnahmesystem mit Nadel und sehr dünner Zuleitung
Crystal Tip	= spezielle Pipettenspitze für sehr kleine Volumina
Medium	= Zellkulturmedium, Nährlösung für Zellkulturen unterschiedlicher Zusammensetzung

Panning	= Adsorption von Zellen auf mit Antikörpern beschichteten Petrischalen,
z.B.	zum Zweck der Aufreinigung von Zelllinien
pH-shift	= Veränderung des Milieus durch Einsatz von eluierenden Pufferlösungen
Western Blot	= Transfer von Proteinen
Secd. Messenger	= intrazelluläres System zur Weiterleitung von Signalen der Zellmembran
Semi-dry	= Transfertechnik beim Western Blot
Spacer	= Abstandhalter für die Glasplatten bei der SDS-PAGE
Tubes	= Bezeichnung für Zentrifugenröhrchen unterschiedlicher Größe, z.B. Greiner Tubes 50 ml
Well	= Bezeichnung für Einkerbung in Kulturschalen, Wanne, Rinne

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Verbrauchsmaterial**

**CO<sub>2</sub>-Flaschen**, Fa. Air Liquide

**Drägerröhrchen**, Fa. Dräger

**Einschweißfolie**, Fa. Karstadt

**Frischhaltefolie**, Fa. Karstadt

**Indikatorpapier**, Fa. Merck

**Gefrierbeutel**, versch. Größen, Fa. Karstadt

**Kanülen**, Fa. Braun

**Klebefilm**, Fa. Scotch

**Klebstoff**, Fa. Henkel

**Kosmetiktücher**, Fa. Karstadt

**Küchentücher**, Fa. Karstadt

**Laborbuch, Ergebnisbuch**, Fa. Ekaha

**Löschpapier**, Fa. Schleicher & Schüll

**Nitrocellulose-Membran**, Fa. Schleicher & Schüll

**Ordner**, Fa. Leitz

**Parafilm**

**Petrischalen**

**Pipettenspitzen**, Fa. Sarstedt

**Pipettenspitzen ausgezogen**, Fa. Costar

**Protein Images™**, USB, Set für die Durchführung der Immunodetektion mit Chemilumineszenz

**PVDF-Membran Pro Blott™**, Applied Biosystems

**Reagenzgefäße versch. Größen**, Fa. Nunc, Fa. Greiner, Fa. Eppendorf

**Röntgenfilm**, Fa. Kodak

**Silikonschlauch**

**Spritzen versch. Größen**, Fa. Braun

**Sterilfilter versch. Größen**, Fa. Eppendorf

**Zentrifugenröhrchen**, Fa. Nalge, Fa. Greiner, Fa. Eppendorf

**Zellbuch, Zellkulturbuch**, Fa. Karstadt

**Zellkulturflaschen**, Fa. Nunc

**Zellkulturschalen**, Fa. Nunc

3.1.2            Geräte

**Abzug**

**Autoklav**

**Bechergläser versch. Größen**

**Bio-Arbeitsbank**

**Brutschrank, Zellkulturschrank**

**Elektrophoresekammer**

Protean™, Fa. Bio-Rad

Prot-Resolv™, Fa. Phase

S & S Profile™, Fa. Schleicher & Schüll

**Erlenmeyer Seitenarmflasche**

**Gelmesser**

**Glaspipetten versch. Größen**

**Glasstäbe versch. Größen**

**Heizblock**

**Immunodetektionsschalen**

**Kühlraum 4°C**

**Kühlschrank 4°C**

**Kühlschrank -20°C**

**Kühltruhe -80°C**

**Lineal versch. Größen**

**Magnetrührer**

**Messzylinder**

**Mikroskop**  
Lichtmikroskop, Fa. Zeiss  
Fluoreszenzmikroskop, Fa. Zeiss

**Neubauer-Zählkammer**

**Pinzetten versch. Größen und Arten**

**Pipetten versch. Größen**

**Pipetus**

**Power-Supply**

**Reagenzflaschen versch. Größen**

**Reagenzgläser**

**Röntgenkassette (18 x 24 cm)**

**Rollmischer**

**Schalen**

**Scheren**

**Schüttler**

**Skalpell**

**Sprühflasche**

**Stickstoffkühlung**

**Tabletts, versch. Größen**

**Teflonkämme versch. Größen**

**Trichter versch. Größen**

**Vortex-Mischer**

**Waagen versch. Arten z. B. Feinwaage**

**Waschbürsten**

**Waschschwämme**

**Wasserbad-Schüttler**

**Wasserstrahlpumpe**

**Wecker**

**Western-Blot-Kammer**

Trans-Blot™, Fa. BioRad

Pegasus™, Fa. Phase

**Zellsieb**

**Zentrifuge, Fa. Beckmann, Fa. Eppendorf**

3.1.3            Lösungen, Reagenzien

**Acrylamid, Fa. Bio-Rad**

**Acrylamid/bis-Acrylamid 30%, Fa. Bio-Rad**

**Ammonium Persulfat (APS), Fa. Bio-Rad**

**Antiseren**

Es wurden polyklonale Seren aus gegen RT6 immunisierten Kaninchen und Enten hergestellt.

**AP-Puffer**, Alkalische Phosphatase Puffer

100 mM Tris pH 9,5/ 100 mM NaCl/ 5 mM MgCl<sub>2</sub> in Aqua dest. lösen, den pH auf 9,5 justieren und bei RT lagern.

**Aqua ad iniectabilia**, Fa. Braun

**Aqua bidest.**, Aufbereitung im Labor

**Aqua deionisiert**, Aufbereitung im Labor

**Äthanol**, Apotheke Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf

**Äther**, Fa. Merck

**BCIP**, Fa. Sigma

**beta-Galactosidase**, Fa. Sigma

**bis-Acrylamid**, Fa. Bio-Rad

**Blotpuffer**

1 L Gesamtvolumen: 5,8 g Tris Base / 2,9 g Glycin / 37 mg SDS / 200 ml Methanol mit Magnetrührer vermischen und mit aqua bidest auf 1 L ergänzen [Maniatis 82].

**Borat-Puffer**, Fa. Merck

Herstellung von 1 L Lösung: 6,18 g Borat werden in 900 ml Aqua ad inj. gelöst, der pH auf 8,2 eingestellt und die Lösung auf 1 L ergänzt und steril filtriert.

**Bromphenol**, Fa. Sigma

**Calziumhydroxid**, Fa. Sigma

**Citronensäure**, Citrat, Fa. Merck

**Coomassieblue**, Fa. Sigma

Coomassie Färbung von SDS Gelen: Färben der Gele auf dem Schüttler unter dem Abzug für 1 min. in 0,1% Coomassie/ 40% Äthanol/ 10% Essigsäure, danach überführen des Gels in die Entfärbelösung für 30 min. 40%Ethanol/ 10%Essigsäure und abschließend eine Waschung in Aqua dest. für 10 min.

**Diethylamin**, Fa. Merck

**Dimethylpimelidat-Dihydrochlorid**, Fa. Pierce

20 mM DPD in 0,2 M Triethanolamin pH 8,2

**DTT (Dithiothreitol)**, Fa. Merck

Stammlösung 1 M: 309 mg DTT mit Feinwaage abmessen und in 2 ml Natriumacetat 0,01 M lösen und mischen. Aliquots von 200µl bei -20°C einfrieren.

**Dynabeads**, Fa. Dynal

Dynabeads M-450 überzogen mit Sheep anti-Mouse IgG Fc-specific  
Dynabeads M-450 überzogen mit IgG mAK gegen CD 2  
Dynabeads M-280 überzogen mit Sheep anti-Mouse IgG  
Dynabeads M-450 überzogen mit Sheep anti-Rat IgG

**EDTA** (Ethylendiamintetraacid), Fa. Sigma

**Elektrophoresepuffer**

5x EP: Tris Base 45 g / Glycine 216 g / SDS 15 g mit 3 L aqua dest. Mit Magnetrührer mischen und den pH auf 8,6 justieren, die Lösung kühl lagern und vor Gebrauch mit entsprechender Menge aqua dest. verdünnen [Laemmli 70].

**Eisessig**, Fa. Merck

**Elutionspuffer** (Western Blot Immunodetektion)

Herstellen von 40 ml Lösung: 200 mM Glycin 2 ml/ 4 M NaCl 1,3 ml/ 2% BSA 2 ml/ 34,7 ml Aqua ad inj./ 1 M HCl 200 µl zusammenpipettieren und den pH auf den gewünschten Wert von 2,5 einstellen.

**Elutionspuffer** (Säulenaffinitätschromatografie)

Herstellung von 20 ml Elutionspuffer: 8,87 M Diethylamin pH 11,5 113 µl/ 0,1% Triton X-100 200 µl/ 0,1% BSA 20 µl zusammenpipettieren und mit Aqua ad inj. auf 20 ml ergänzen.

**Ethanolamin**, Fa. Merck

100 ml Aqua ad inj. mit 100 µl Ethanolamin 0,02 M pH 8,2 mischen und steril filtrieren.

**FCS (fetal calf serum)**, Fa. Gibco

**Glutamat**, Fa. Merck

**Glutaraldehyd**, Fa. Merck

**Glycerin**, Fa. Merck

**Glycin**, Fa. Merck

**Immunomatrix**

500 µl der Stammlösung Protein A Sepharose Cl-4B wurden mit 750 µl Rabbit anti Rat Fc Fragment specific (entsprechend 1,5 mg) für 1 h auf dem Rollenmischer inkubiert.

**Isobutanol**, Fa. Merck

**Isopropanol**, Apotheke Universitätskrankhaus Hamburg-Eppendorf

**Kulturmedium**, RPMI 1640, Fa. Gibco

Lagerung des fertigen Mediums bei 4°C für einige Tage möglich, aber Medium wöchentlich neu ansetzen: 500 ml RPMI/ 50 ml FCS/ 5,5 ml Glutamat/ 5,5 ml

Pyruvat/ 5,5 ml Penicillin und Streptomycin mischen. Vor Verwendung wurde das FCS 45 min. bei 56°C inaktiviert. Glutamat, FCS, Pyruvat und die Antibiotika wurden vor Zugabe steril filtriert.

**Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)**, Fa. Merck

**Methanol**, Fa. Merck

**Metrizamid**, Fa. Sigma

Zum Aufreinigen von Zellsuspensionen, optimale Verdünnung 1 x 10<sup>7</sup> Zellen pro Milliliter Metrizamid. 18g Metrizamid/ 36 ml PRMI/ 10 ml FCS werden ergänzt auf 100 ml mit Aqua ad inj., gut gemischt und 10 min. bei 2000 rpm zentrifugiert.

**Molekulargewichtsmarker**

für die SDS-PAGE mit vorgefärbten Referenzproteinen, die eine Bandenbestimmung sowohl während der SDS-PAGE als auch nach Blotten auf eine Membran erlauben.

1. Rainbow Marker, Fa. Amersham

(Myosin 200 kd, Phosphorylase B 97 kd, Albumin 69 kd, Ovalbumin 46 kd, Karbonanhydrase 30 kd, Trypsinin Inhibitor 21 kd, Lysozm 14 kd)

2. SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Bio-Rad

(Myosin 200 kd, β-Galaktosidase 116 kd, Phosphorylase B 97 kd, Albumin 66 kd, Ovalbumin 45 kd, Karbonanhydrase 31 kd, Trypsin Inhibitor 21 kd, Lysozym 14 kd)

3. Low Range Marker, Fa. Bio-Rad

(w.o. mit folgenden Proteinen: Phosphorylase B, Albumin, Ovalbumin, Karbonanhydrase, Trypsin Inhibitor, Lysozym)

**Natriumacetat**, Fa. Merck

**Natriumcarbonat (NaCO<sub>3</sub>)**, Fa. Merck

**Natriumchlorid (NaCl)**, Fa. Merck

**Natriumcitrat**, Fa. Merck

**NBT**, Nitro blue tetrazolium, Fa. Merck

**NBT/BCIP**, Substratlösung für AP

**NBT und BCIP sind giftig** und sollten nur unter dem Abzug verwendet werden. 10 ml AP-Puffer/ 45 µl NBT/ 35 µl BCIP mischen und sofort verwenden, Substratlösung immer frisch ansetzen.

**Neutralisationspuffer**, Einsatz bei der Epitop Selektion

1 M Tris pH 8,0 wird so dosiert, dass die gewonnenen Eluatfraktionen neutralisiert werden.

**PBS (Phosphate buffered saline)**, Fa. Gibco

**Penicillin/Streptomycin**, Fa. Gibco

**PMSF**, Fa. Merck

**Ponceau S**, Fa. Sigma

Färbung von NC-Membranen, 0,2%ige Lösung in 3% TCA. Die trockene NC-Membran muss zunächst auf der Oberfläche einer Schale mit aqua dest. aufschwimmen und sich durch Kapillarkräfte vollsaugen. Danach wird die Membran für 5 Minuten in die Ponceau-S-Lösung gelegt und sofort wieder in mehreren Waschzyklen mit Aqua bidest. entfärbt. Die Proteinbanden werden sichtbar und interessierende Banden können anhand der Markerproteine identifiziert werden.

**Protein A Sepharose Cl-4B**, Fa. Pharmacia

Ausgangsmaterial für die Säulenaффinitätschromatografie, Herstellung einer 5%igen Stammlösung von 1 ml: Protein A Sepharose Cl-4B wurde bis zur 1 ml Markierung in ein Falcon Polypropylen Reagenzglas (No. 2059) gefüllt und 5 ml Borat Puffer zugegeben, danach 40 min. auf Rollmischer und anschließend wurden 800 µl Borat Puffer und 10 µl Natriumazid ergänzt.

**Pyruvat**, Fa. Sigma

**Salzsäure**, Fa. Merck

**Sammelgel**

4%ig für zwei Gele mit 10 ml Gesamtvolumen: 6,1 ml H<sub>2</sub>O (Aqua ad inj.) / 2,5 ml Tris-HCl pH 6,8 / 1,3 ml Acrylamid/ bis-Acrylamid / 10 µl TEMED unter dem Abzug in Erlenmeyer Seitenarmflasche pipettieren und für zehn Minuten entgasen. Danach 100 µl SDS 10% und 50 µl APS ergänzen. Zum Polymerisieren vorsichtig schwenken und sofort benutzen [mod. n. Laemmli 70].

**SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat, 10%, 20%)**, Fa. Merck

**Silbernitrat**, AgNO<sub>3</sub>, Fa. Merck

**Solubilisierungspuffer**

10 mM Tris pH 8,1 1 ml/ 150 mM NaCl 3 ml/ 0,5% Triton x-100 5 ml/ 1 mM EDTA 0,2 ml/ 1 mM PMSF 1 ml bis 100 ml ergänzen mit Aqua ad inj. Triton X-100 als Detergenz löst die Zellmembranen auf. PMSF wirkt als Proteaseninhibitor. EDTA ist Komplexbildner für Ca.

**Spülmittel**

**Stop-Puffer**

um die Alkalische Phosphatase Reaktion im ELISA zu beenden. 5mM EDTA/ 20 mM Tris pH 8,0 mischen und auf pH 8,0 einstellen. Danach bei RT lagern.

**SPB**, Sample Probe Buffer zum Einsatz in der SDS-PAGE

Herstellung von 1 ml SPB: 20% SDS 100 µl/ DTT 100 µl/ 0,5 M Tris pH 6,8 100 µl/ Aqua dest. 500 µl/ BPB 100 µl/ Glycerin 100 µl in Eppendorfröhrchen

pipettieren und 1 min. vortexen, danach bei -20°C einfrieren oder sofort verwenden.

**TBS**, Tris Puffer und NaCl

10 mM Tris-HCL pH 8,0 / 150 mM NaCl

**TBSF**, Tris Puffer und FCS

100 ml Gesamtvolumen: 90 ml TBS / 10 ml FCS 10%, pH justieren auf 7,6

**TBSM**, Tris Puffer und Trockenmilch

100 ml Volumen: 98 ml TBS / 2 ml Trockenmilch 2%, pH justieren auf 7,6

**TBST**, Tris Puffer und Tween

1 ml 10 mM Tris pH 8/ 3 ml 140 mM NaCl/ 250 µl 100% Tween 20 mischen mit Aqua dest. auf 100 ml ergänzen und auf pH 7,6 justieren

**TBSTF**, Tris Puffer mit Tween und FCS, Antikörperverdünnungslösung

10 ml FCS 10%/ 100 µl Tween 0,05%/ 90 ml TBS mischen und auf pH 7,6 justieren

**TEMED (N,N,N,N,-tetramethylethylendiamin)**, Fa. Bio-Rad

**Trenngel**

7,5%ig für zwei Gele mit 25 ml Gesamtvolumen: 24 ml H<sub>2</sub>O (Aqua ad inj.) / 12 ml 1,5 M Tris- HCL pH 6,8 / 12 ml 30% Acrylamid/bis-Acrylamid / 50 µl TEMED in Erlenmeyer-Seitenarmflasche pipettieren und 15 Minuten entlüften. Danach mit 500 µl SDS 10% und 250 µl APS ergänzen.

**Triethanolamin**, Fa. Merck

100 ml Lösung: 50 ml Aqua ad inj./ 2,7 ml Triethanolamin 0,2 M pH 8,2/ pH auf gewünschten Wert einstellen und auf 100 ml mit Aqua ad inj. ergänzen, danach steril filtrieren.

**Tris-base**, Fa. Merck

**Triton X-100**, Fa. Merck

**Trypsin**, Fa. Gibco

500 µg/ml in PBS wurden in Kulturflaschen nach Abernten der Zellen und einmaliger Spülung mit PBS gegeben. Das Ablösen der anhaftenden Zellen wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Die Zellen runden sich ab und lösen sich anschließend vom Boden der Kulturflasche. Der Vorgang kann durch kräftiges Beklopfen der Flasche beschleunigt werden. Die Trypsinierung wird durch Zugabe einer gleichen Menge Medium beendet, da das enthaltene FCS das Enzym inaktiviert.

**Tween 20**, Fa. USB

**Waschpuffer A**

0,15 M NaCl 3 ml/ 0,05 M Tris pH 8,2 10 ml/ 0,5% Triton X-100 5 ml/ 0,1 g BSA mischen und auf 100 ml mit Aqua ad inj. ergänzen.

## **Waschpuffer B**

0,15 M NaCl 3 ml/ 0,5% Triton X-100 5 ml/ 0,1 g BSA mischen und auf 100 ml mit Aqua ad inj. ergänzen.

3.1.4 Antikörper, Bakterienstämme, Versuchstiere, Zellen

### **Antikörper**

AP markierter Antikörper Ziege anti Ente, affinitätsgereinigt, Fa. Dunn

AP markierter Antikörper Ziege anti Kaninchen, affinitätsgereinigt, Fa. Sigma

AP markiertes Streptavidin, Fa. Dunn

Biotin markierter Ziege anti Kaninchen Antikörper, affinitätsgereinigt, Fa. Dunn

Gy 1/12 Hybridomüberstand, Hybridom aus dem Labor von G.W. Butcher, Cambridge

Gy 1/12 biotinyliert, Hybridomüberstand biotinyliert

FITC markierter Maus anti Ratte IgG, affinitätsgereinigt, Fa. Amersham

Rabbit anti Rat IgG, Fc Fragment specific, Affini pure, Fa. Dianova

mAK W 3/13 aus einer Maus Hybridomzelllinie von A.F. Williams, MRC Cellular Immunology Unit, Oxford U.K. W 3/13 bindet an ein 90 kd Glykoprotein, das an der Oberfläche aller peripheren Ratten T-Zellen exprimiert wird, ein sogenannter Pan-T-Zellmarker.

mAK OX 19 aus einer Maus Hybridomzelllinie von A.F. Williams, MRC Cellular Immunology Unit, Oxford U.K. OX 19 bindet an ein 70 kd Glykoprotein, das von allen peripheren T-Zellen und Thymozyten der Ratte exprimiert wird.

### **Bakterienstämme**

#### **Y 1089:**

FP haltige E. coli Bakterien, die durch den hocheffizienten Expressionsvektor lambda gt11 infiziert wurden. Sie produzieren ein rekombinantes Fusionsprotein aus beta-Galaktosidase und RT6. Weder die Verpackungseffizienz noch die Replikation des Phagen innerhalb der Wirtszelle werden beeinflusst. Die Enzymaktivität der beta-Galaktosidase wird durch die in das Gen insertierte DNA zerstört. Da die cDNA-Insertion im gleichen Leseraster und der richtigen Orientierung in das beta-Galaktosidase Gen eingebaut wurde, führte die Expression des Hybridgens zur Produktion des rekombinanten Fusionsproteins. Das FP besteht aus einem N-terminalen ca. 100 kd großen beta-Galaktosidase Anteil und einem C-terminal kodierten RT6 Rest. Nach Induktion des lysogenen Zyklus bei Y1089 wird innerhalb kurzer Zeit viel FP produziert (50 - 500 µg/ 20 ml Kultur) und kann durch Solubilisierung der Bakterienzellen gewonnen werden.

Da E. coli nur wenige Proteine dieser Größe produziert und durch den Phagen diese Produktion erhöht wird, lässt sich das rekombinante FP in der SDS-PAGE gut darstellen.

**Y 1090:**

E. coli Stamm, der nicht transformiert wurde und als Kontrolllysate eingesetzt wurde. Bei Einsatz in der SDS-PAGE wurden also nur E. coli Proteine aufgetrennt.

**2/5:**

E. coli Stamm der das Fusionsprotein GST-mRt6.2 produziert. Das Fusionsprotein wurde nach Induktion des lysogenen Zyklus wie bei Y 1089 beschrieben gewonnen.

**Versuchstiere**

Lewis a Ratten: congener Rattenstamm der von der Abteilung für Versuchstierhaltung gezüchtet wurde und RT6.1 auf den T-Zellen exprimiert

Lewis b Ratten: w. o., es wird bei diesen Ratten RT6.2 exprimiert

BALB/c Mäuse: Zucht des Instituts für Immunologie und Allergologie der Medizinischen Universitätsklinik und Universitätspoliklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf. Die Mäuse exprimieren beide RT6 Varianten, Rt6.1 und Rt6.2

**Zellen**

EpD3: Ein T-T Hybridom aus T-Zellen der Ratte fusioniert mit einem Mauslymphom und danach auf eine RT6 Expression gescreent. Der EpD3 Klon wurde eingesetzt, um große Mengen RT6 zu gewinnen.

Gy1-12: Ein Hybridom, das den monoklonalen Antikörper Gy1-12 sezerniert, der für die Säulenaffinitätschromatografie eingesetzt wurde.

## **3.2 Gewinnung polyklonaler anti RT6 Immunsereen**

### **3.2.1 Immunisierung von Kaninchen und Ente**

Nach dem Zellsolubilisate mit  $\beta$ -Gal-FP aus E. coli Y1089 durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine NC-Membran geblottet waren (s. 3.5.1 u. 3.6.1) konnte die Weiterverarbeitung erfolgen. Zuerst wurde eine Ponceau-S-Färbung durchgeführt, um die gesuchte Proteinbande zu identifizieren. Da die NC-Membran brüchig war, musste sie sehr vorsichtig behandelt werden. Um unnötige Verunreinigungen zu vermeiden, wurde mit Handschuhen gearbeitet und die NC-Membran möglichst nur an den Ecken oder mit Pinzette gefasst. Die  $\beta$ -Gal-FP Bande wurde mit einem Skalpell aus der Membran herausgeschnitten und danach in zwei gleiche Hälften geteilt. Die beiden Hälften wurden für Kaninchen und Ente getrennt verarbeitet. Die Streifen wurden mit dem Skalpell in einem Mörser weiter in kleine Stücke zerteilt. Nach Zugabe von 400  $\mu$ l PBS wurden die Bruchstücke weiter mit der Pestille verflüssigt. Die Lösung wurde in 500  $\mu$ l PBS in einem Eppendorf Röhrchen suspendiert und sollte sich nicht absetzen. Die Suspension wurde eine Minute im Vortexer gemischt und nochmals kontrolliert. Die Lösung konnte anschließend in eine 2 ml Spritze aufgenommen werden und wurde in das doppelte Volumen Freund's Adjuvans gespritzt. Bei diesem Vorgang wurde die wässrige Phase in die Öl Phase gespritzt. Abschließend wurden die Spritzen durch einen Konnektor miteinander verbunden und durch wiederholtes Vor- und Zurückspritzen eine homogene Wasser in Öl Emulsion hergestellt. Die Qualität der Emulsion ließ sich durch einen Tropfen auf Wasser testen. Danach wurde die antigene Lösung gekühlt und bei Kaninchen i.m., in den Oberschenkel und bei der Ente s.c., unter das Brustgefieder injiziert. Das Vorgehen veranschaulicht die Abbildung 2. Für die Nachinjektionen wurde inkomplettes Freund's Adjuvans eingesetzt. Abbildung 3 veranschaulicht das vom Institut für Immunologie des Universitätskrankenhauses in diesem Fall eingesetzte Immunisierungsschema.

**Abbildung 2 Antigenherstellung für die Immunisierung von Kaninchen und Ente zur Induktion von RT6 spezifischen Antikörpern**

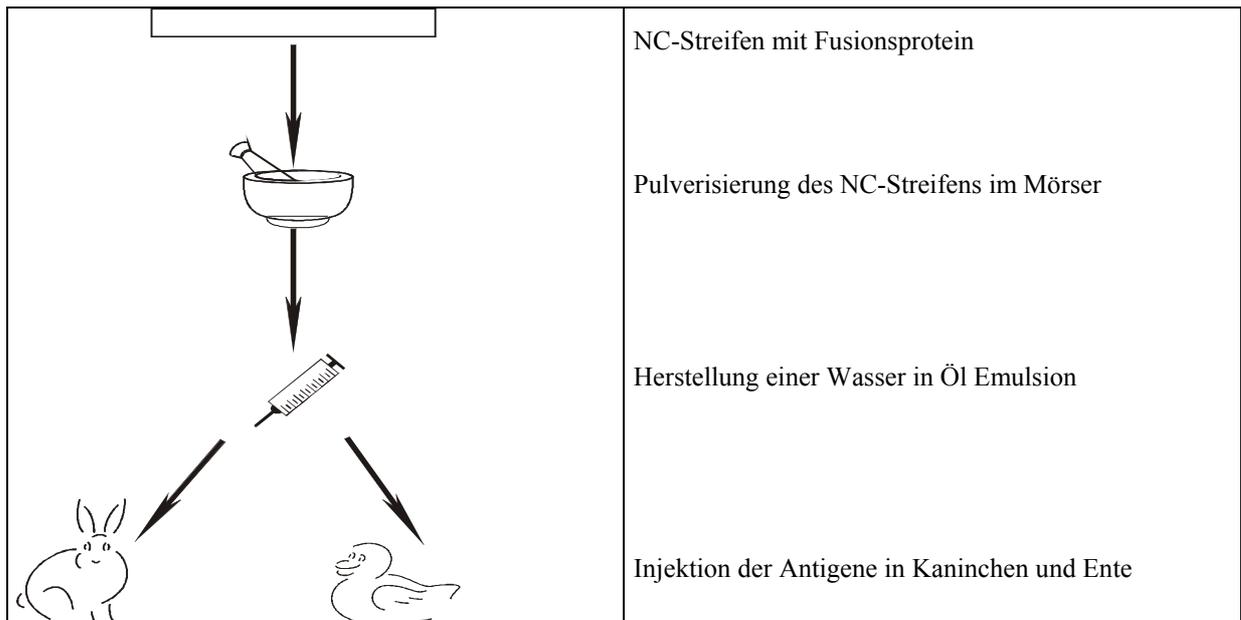


Abbildung 2: Schema der Antigenherstellung für die Immunisierung von Kaninchen und Enten mit rekombinantem Fusionsprotein ( $\beta$ -Gal-RT6). Das Ausgangsmaterial für die Grundimmunisierung und die Booster Injektionen waren Nitrocellulose Streifen präparativer SDS-PAGE mit Y1089 Zellysaten. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose geblottet. Nach Identifizierung der interessierenden Bande durch Färben der Nitrocellulose in Ponceau-S wurde diese mit einem Skalpell aus dem Gesamtblot herausgeschnitten und in einem Mörser mit der Pestille zu sehr feinem Puder zerrieben. Das Pulver wurde in PBS und Freund's Adjuvans gelöst. Für die Immunisierungen stand dadurch eine Wasser in Öl Emulsion zur Verfügung. Die Injektionen erfolgten beim Kaninchen i.m. in den Oberschenkel und bei der Ente s.c. unter das Brustgefieder.

### **Abbildung 3    Immunisierungsschema für die Induktion von RT6 spezifischen Antikörpern in Kaninchen und Ente**

Die Vorbereitung der Proben erfolgte wie in Abbildung 2 dargestellt und im Text beschrieben. Die Grundimmunisierung mit Freund's Adjuvans wurde im Oktober 1987 durchgeführt. Für die Grundimmunisierung und Booster Injektionen wurden Aliquots der Lysate des Bakterienstamms Y 1089 eingesetzt. Es wurde ebenfalls Blut entnommen (Prä-Immunsierung), das später als Kontrolle für die Immunodetektion eingesetzt wurde. Die Immunisierung erfolgte bei den Kaninchen intramuskulär und subkutan bei den Enten nur subkutan.



Zwei Monate später erfolgte eine Booster Injektion.



Im Juni 1989 erfolgte die zweite Booster Injektion, sowie eine Blutentnahme für eine spätere Titerkontrolle.



Zwei letzte Booster Injektionen fanden im Dezember 1989 und Januar 1990 statt.



Die Tiere wurden am 29.01.90 durch den Veterinärmediziner der Tierversuchsanstalt des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf narkotisiert und entblutet.

Das gewonnene Blut wurde entsert und tiefgefroren.

Die Dauer der gesamten Immunisierung betrug zweieinhalb Jahre und kann daher als ausreichende Stimulation des Immunsystems angesehen werden.

### 3.2.2                   Aufbereitung der Immunsereen aus Kaninchen und Ente

Zehn Tage nach der letzten Booster Injektion wurden alle Tiere in Narkose vom Veterinärmediziner der Versuchstierhaltung des Universitätskrankenhauses Eppendorf durch Herzpunktion entblutet. Das Blut wurde getrennt in 50 ml Tubes aufgefangen, beschriftet und im Labor sofort weiterverarbeitet. Die Arbeiten fanden unter der Bio-Arbeitsbank statt, um Verunreinigungen zu vermeiden und eine Kontamination zu verhindern.

Die Gerinnung wurde durch vorsichtiges Rühren der Seren bei Raumtemperatur mit einem Glasstab unterstützt, ohne durch die mechanische Einwirkung eine Hämolyse auszulösen. Die Fibrinbildung wurde 1,5 h abgewartet und die Röhrrchen anschließend bei 2500 rpm zentrifugiert und bei 4°C gekühlt. Der Überstand mit den interessierenden Antikörpern wurde vorsichtig mit einer Spritze aspiriert und durch einen Sterilfilter in ein steriles Röhrrchen gegeben, verschlossen und bei –80°C gelagert.

## 3.3                        **Präparation lymphatischen Gewebes aus Ratte und Maus**

### 3.3.1                    Präparation und Verarbeitung von Lymphknoten der Ratte

Es wurden Lewis a und Lewis b Ratten für die Versuche eingesetzt. Die beiden congenen Rattenstämme unterscheiden sich in ihrem RT6 Genlocus. Die Ratten wurden von der Tieraufzuchtanstalt des Universitätskrankenhauses Eppendorf in Transportbehältern abgeholt, im Labor durch eine Äthernarkose betäubt und durch Herzpunktion entblutet. Danach wurde das Tier in Rückenlage auf einem Sezierbrett mit Nadeln fixiert [Hebel 1971]. Die Bauchhaut und die Haut an den Extremitäten wurden aufgeschnitten, stumpf abgetrennt und ebenfalls mit Nadeln auf dem Sezierbrett fixiert. Am Hals wurden die Lymphknotenstationen ausgeräumt, danach die axillären und inguinalen Lymphknoten entfernt. Nach Durchtrennen der Bauchfaszie wurden die paraaortalen und die reichlich vorhandenen intestinalen Lymphknoten entfernt. Der Kadaver wurde anschließend getrennt in einer Plastiktüte in einer Tonne bei

–20°C entsorgt und die Verwendung des Tieres für Versuchszwecke in einem Verzeichnis dokumentiert. Die präparierten Lymphknoten wurden in Medium (RPMI) eingelegt. Nach Abschluss der Sektion wurden die Lymphknoten inspiziert, von anhängendem Fettgewebe befreit, vorsichtig zerzupft und mit einem Spritzenkolben durch ein Sieb gerieben. Das Sieb wurde abschließend mit 10 ml PBS gespült. Die Suspension wurde 10 min zum Sedimentieren größerer Gewebebrocken stehengelassen. Danach befand sich eine Fettschicht an der Oberfläche und feste Teile waren am Boden sedimentiert, die zellenhaltige Interphase wurde nun vorsichtig abpipettiert. Die Zellen wurden zweimal 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und erneut in PBS resuspendiert. Zum Abschluss wurde eine Zellzählung mit der Neubauer Kammer vorgenommen, um die Zellmenge zu bestimmen.

Die präparierten Zellen wurden im Dynabead Verfahren von den B-Zellen getrennt s. 3.9.

### 3.3.2 Verarbeitung von Milzen der Maus

Für die Lymphozytenpräparation der Maus wurden Maus-Milzen eingesetzt. Fett und Adnexgebilde wurden vorsichtig von den Milzen entfernt. Die Milzen wurden mit einer großlumigen Kanüle angestochen und die Zellen mit einer Pinzette ausgestrichen. Danach wurden die Milzen zweimal mit RPMI durchgespült, zerzupft und durch ein Sieb gerieben. Der Ansatz wurde für 30 min zum Sedimentieren größerer Gewebeteile stehengelassen. Danach wurde die Interphase zwischen an der Oberfläche schwimmender Fettschicht und Sediment vorsichtig abgesaugt und der Ansatz zweimal 10 min. bei 1200 rpm zentrifugiert und in PBS resuspendiert. Abschließend erfolgte eine Zellzählung und der Ansatz wurde mit Dynabeads Sheep anti Mouse IgG für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die T-Zellseparation mittels Magneten (s. 3.9), ein zweimaliger Waschzyklus in RPMI und die Lysierung des Ansatzes mit Solubilisierungspuffer.

### 3.3.3 Verarbeitung von Milzen der Ratte

Die Milzen wurden während einer Präparation wie unter 3.3.1 beschrieben entfernt und analog dem Rezept in 3.3.2 verarbeitet.

## 3.4 Zellkultur

Das in der eigenen Abteilung durch Fusion von Lymphknotenzellen einer DA Ratte mit der HAT sensiblen C58NT Thymomzelllinie hergestellte T-T Hybridom EpD3 [Koch 1988] exprimiert das Oberflächenprotein RT6. Die EpD3 Zellen wachsen in der Kultur in dichten Zellhaufen (s. Abb. 4). EpD3 Zellen exprimieren neben RT6 noch die Oberflächenmarker: W 3/25, OX 26, OX 18, ER 18, W 3/13 und OX 19 in unterschiedlicher Ausprägung. Eine weitere Voraussetzung war die Gewinnung des monoklonalen RT6.2 spezifischen Antikörpers GY1/12. Der RT6 spezifische Antikörper erkennt das allogene Epitop RT6.2. Die produzierende B-Zell Hybridoma Zelllinie Gy1/12 stammte aus dem Labor von G.W. Butcher, Cambridge. Die Gy 1/12 produzierenden Zellen wachsen pflastersteinartig, lose haftend an den Kulturschalen (s. Abb. 5).

#### **Abbildung 4 Zellkultur EpD3 Zellen**

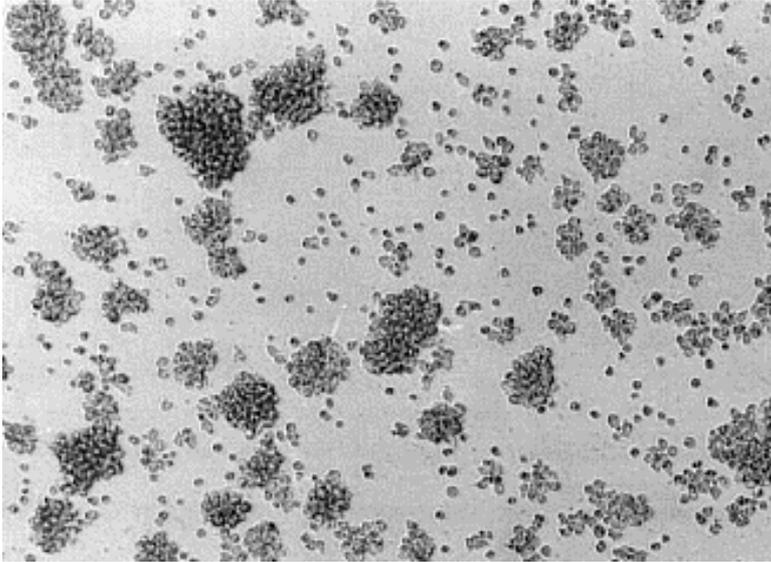


Abbildung 4: Es handelt sich um die RT6.2 exprimierende T-T Hybridom Zelllinie EpD3, die sich charakteristischerweise in Haufen (kokkenartig) in der Nährlösung befindet.

#### **Abbildung 5 Zellkultur GY 1/12 Zellen**

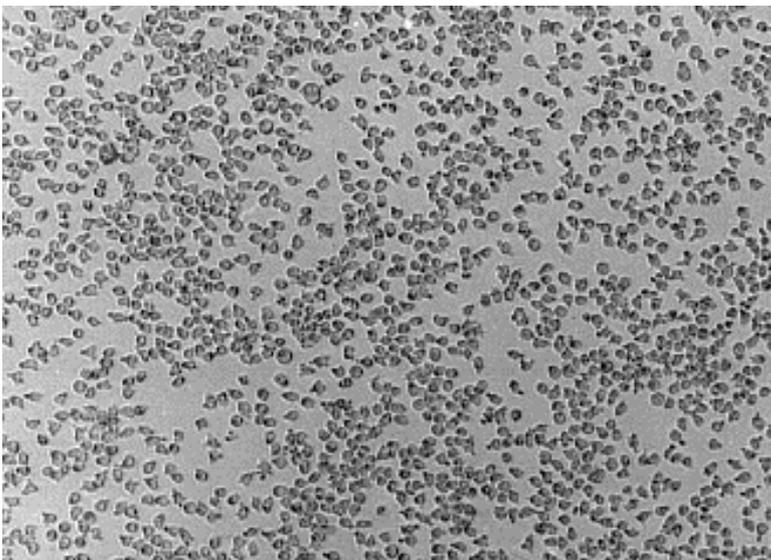


Abbildung 5: Hybridom Zellen, die den RT6 spezifischen monoklonalen Antikörper GY 1/12 produzieren. GY 1/12 erkennt das allogene Epitop RT6.2. Die Zellen haften lose am Boden einer Petrischale und wirken optisch wie ein Pflastersteinrelief.

Alle Arbeiten mit den Zellen fanden unter Verwendung der Bio-Arbeitsbank statt, die sich direkt neben dem Zellkulturschrank befand. Diese Anordnung ermöglichte kurze Wege und sollte die Kontamination der Zellkulturen verhindern.

In Ergänzung zum Laborbuch und dem Ergebnisbuch wurde für die Arbeiten mit Zellkulturen ein Kulturbuch für die tägliche Inspektion, Beurteilung von Wachstumsverhalten und der durchgeführten Arbeiten angelegt. Es wurde ebenfalls festgehalten, welche Zellen aufgetaut, eingefroren und in ELISA Tests untersucht wurden. Da das im Medium befindliche FCS ebenfalls entscheidenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen hat, unter anderem durch eine nicht immer konstante Fraktion an Fibronectin, wurden die eingesetzten Batch Nummern ebenfalls dokumentiert.

Für die angesetzten Zellkulturen waren stabile Temperaturverhältnisse und Wachstumsbedingungen bei einem Kohlendioxidgehalt von 5% nötig. Es wurde eine wöchentliche Kontrolle mit Dräger-Röhrchen durchgeführt. Die tägliche Kontrolle wurde am Kulturschrank selbst durchgeführt.

#### 3.4.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Das Revitalisieren von Zellen nach Lagerung bei  $-180^{\circ}\text{C}$  in Stickstoff wurde schnell durchgeführt, da die Zellen durch Proteasenaktivität in ihrer Lebensfähigkeit gefährdet waren. Die Eppendorfhütchen mit dem Zellmaterial wurde in der Hand und im Warmwasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  kurz erwärmt bis sich das Zellmaterial (Zellcluster) von der Gefäßwand löste. Danach wurde das Röhrchen kurz mit Ethanol gereinigt und der Zellklumpen in eine Petrischale mit angewärmten Medium gegeben. Dabei wurden 1 ml Zellen in 13 ml warmem Medium gelöst, und die Schale dabei vorsichtig bewegt. Nach Auflösung des Zellklumpens und Verteilung der Zellen in dem Medium wurde eine Verdünnungsreihe (1:1 bis 1:32) in einer 6 well Schale durchgeführt.

Beim Einfrieren wurden die Zellen ( $10^7/\text{ml}$  in RPMI mit 20% FCS) mit 1/10 Volumen DMSO versetzt in einem Eisbucket übernacht langsam gekühlt und dann in 0,8 ml Aliquots in einen Stickstofflagertank bei  $-180^{\circ}\text{C}$  überführt.

#### 3.4.2 Prävention von Kontamination

Entscheidend für die Arbeit mit Zellkulturen war der aseptische Umgang mit den verwendeten Materialien und die Sterilität der Lösungen. Bei Verwendung von Reagenzflaschen wurden diese vorher autoklaviert. Die Arbeitsbank wurde vor Gebrauch gereinigt und nach Beendigung der Experimente erneut gereinigt und desinfiziert. Es wurde darauf geachtet die Zellen nur kurze Zeit außerhalb des Kulturschranks zu halten. Wege zur Bio-Arbeitsbank wurden bewusst kurz gestaltet.

#### 3.4.3 Neubauer Kammer

Die Wachstumskontrolle erfolgte täglich mit Hilfe der Neubauer Kammer und durch optische Inspektion der angesetzten Kulturschalen und Kulturflaschen. Vor Benutzung wurde die Kammer mit Ethanol gereinigt und mit Kosmetiktüchern getrocknet. Beim Auflegen des Deckglases wurde auf die Ausbildung von Newton'schen Ringen geachtet. Anschließend wurde mit einer Pipette ein Aliquot der Zellkultur an den Rand des Deckglases gegeben, und verteilte sich von dort mittels Kapillarwirkung in der Kammer. Es wurden danach vier Felder mit 16 Quadraten ausgezählt und so die Zellzahl pro Milliliter Zellkultur bestimmt:

$N \text{ Zellen} \div 4 = \text{Zellzahl} \times 10^4 \text{ pro Milliliter Kultur.}$

#### 3.4.4 Zellernte

Bei optimalen Wachstumsbedingungen verdoppelten sich die Zellzahlen etwa alle 14 h und wurden bei einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Zellkultur geerntet. Es wurde eine Gesamtzellzahl von  $1 \times 10^9$  Zellen für jede Zellernte angestrebt.

Vor der Verteilung auf Zentrifugenröhrchen wurde die Zellkultur mit dem Pipetus mehrfach auf und ab pipettiert, um die Zellen von den Schalen zu lösen und Zellhaufen aufzutrennen.

Danach wurden die Zellen 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand zum Deaktivieren in eine Abfallflasche mit gelöstem Natriumhydroxid gegeben. Das entstandene Pellet enthielt die geernteten Zellen.

#### 3.4.5 Zellreinigung

Zellernten wurden zur Herstellung von Solubilisaten (s. 3.4.6) oder zur Reinigung der bestehenden Kultur durchgeführt. Das unter Zellernte (s. 3.4.4) entstandene Pellet wurde durch Beklopfen des Zentrifugenröhrchens gelöst und in 8 ml Medium durch auf und ab pipettieren resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (roter Deckel, Fa. Greiner) mit 2 ml Metrizamid vorsichtig an der Wand entlang pipettiert. Das im Röhrchen befindliche Metrizamid wurde so überschichtet, dass die zwei Phasen deutlich voneinander getrennt blieben. Es schloss sich ein Zentrifugationszyklus 10 min bei 2000 rpm an. Die bei der Zentrifugation entstandene Interphase zwischen Medium und Metrizamid enthielt die vitalen Zellen, die Zelltrümmer waren durch die Metrizamidschicht am Boden des Zentrifugenröhrchens pelletiert. Nur die Interphase wurde vorsichtig abgesaugt und zweimal in Medium gewaschen. Danach wurde das Pellet in neuem Medium resuspendiert und wie unter 3.4.1 beschrieben behandelt.

#### 3.4.6 Zellsolubilisierung

Das unter 3.4.4 entstandene Pellet wurde in 10% des Ursprungsvolumens PBS gelöst und 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die beschriebene Waschung zweimal wiederholt. Danach erfolgte die Lösung im Solubilisierungspuffer. Der Puffer wurde so dosiert, dass  $1 \times 10^7$  Zellen pro Milliliter Solubilisierungspuffer gelöst wurden. Die Solubilisierung erfolgte bei 37°C im Wasserbad für mindestens 30 min, dabei wurden die Röhrchen geschwenkt. Anschließend erfolgte das Pelletieren der Kerne durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 15 min. Die entstehenden Überstände wurden genau austitrierend auf zwei Röhrchen für die MSE Zentrifuge verteilt und bei 18000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in blaue Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner, 50 ml) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

#### 3.4.7 Kontrolle der Proteinexpression

Um die Stabilität der RT6 Expression zu verifizieren, wurden in festen Intervallen neben den Zellvisiten Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Das Zellmaterial wurde wie in 3.4.4 beschrieben geerntet und pro Ansatz wurden zwischen  $2-5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Die Ansätze wurden mit einem ersten Antikörper Gy 1/12 für 1 h im Eisbucket inkubiert, danach dreimal mit 2 ml Medium gewaschen und mit dem Zweitantikörper FITC konjugierter IgG anti-Ratte ebenfalls 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit Medium gewaschen und das Pellet in 50 µl PBS, 2% Paraformaldehyd gelöst und die Fluoreszenz im Mikroskop untersucht. Bei guter RT6 Expression ist der Zellrand deutlich durch grünfluoreszierende Lichtsignale markiert und die Zellen lassen sich als kugelige Raumstruktur in der Ebene durchleuchten.

Ein Zellansatz wurde im Vergleich mit Ratten B- und T-Lymphozyten einer FACS-Analyse (FACS-Scan, Becton Dickinson) unterzogen. So konnte selbst nach 30 Zellteilungen noch eine stabile RT6 Expression dokumentiert werden.

### 3.5 Auftrennung und Nachweis von Zellproteinen

#### 3.5.1 Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Current Protocols 87)

Es kamen unterschiedliche Gelpräparationen zum Einsatz (s. 3.1.3). Gele für die Auftrennung großer Mengen Bakterienlysat, sogenannte präparative Gele wurden nach dem Rezept von Laemmli als 7,5% Gele gegossen (Laemmli 70). Detektionsgele, die für den Einsatz in der Immunodetektion vorgesehen waren, wurden als 12% Gele gefertigt (Asubel 88). Die Arbeiten wurden ausschließlich auf der Arbeitsbank unter dem Abzug durchgeführt.

Monomeres Acrylamid ist neurotoxisch und SDS als Detergenz mit oberflächenspreizender Aktivität sollte nicht eingeatmet werden.

Vor dem Zusammenbau der Anlage wurden die Glasplatten gründlich mit Wasser und handelsüblichem Spülmittel grob gereinigt und mit Aqua bidest abgespült. Danach wurden die Glasplatten mit Küchentüchern getrocknet und die Gelkontaktseiten mehrfach mit Äthanol 70% und abschließend mit Isopropanol behandelt. Die Glasplatten wurden mit einem Spacer der gewünschten Dicke 1mm oder 0,75 mm versehen und mit Klammern fixiert. Danach wurden die gefertigten Kassetten in die dafür vorgesehene Halterung mit einem untergelegten Gummi zum Verhindern des Gelaustritts gestellt. Das vorbereitete Trenngel wurde mit einer

20 ml Pipette vorsichtig an einer Glasplatte entlang einpipettiert ohne starke Wirbel auszulösen oder Luftblasen zu erzeugen. Die Geloberfläche verlief bei 2/3 der Plattenhöhe und wurde sofort mit Isobutanol überschichtet, um die Polymerisation unter Luftabschluss zu ermöglichen. Wurden die Gele nicht sofort verarbeitet wurde das Isobutanol nach einer Stunde abgegossen und die Gele zum Schutz vor Austrocknung mit Tris Puffer überschichtet. Vor dem Gießen des Sammelgels wurde die Überschichtung entfernt, die Oberfläche zweimal mit Aqua bidest gewaschen und die Platten ohne Berührung des Trenngels mit Saugpapier getrocknet. Das Sammelgel wurde nach dem Gießen mit Tris Puffer überschichtet. Die Platten wurden in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und dabei entstehende Luftblasen entfernt. Vor dem Beginn der Auftrennung wurden Taschen mit Silikonschläuchen abgesteckt oder ein Kamm mit vorgefertigten Taschen in das Sammelgel gesteckt. Nach erfolgter Polymerisation wurden der Kamm und der Tris Puffer entfernt, und die Taschen mit Proben geladen. Zu Beginn der Elektrophorese lagen 25 mA bei 100 V an, bei Erreichen des Trenngels wurde dies auf 35 mA/ 200 V erhöht. Entscheidend für diese Änderung war der Übertritt der Bromphenolfront in das Trenngel. Die Güte der Auftrennung konnte bereits am Wanderungsverhalten der Bromphenolbande und der Proteinmarkerauftrennung verfolgt werden.

Nachdem die Bromphenolbande die untere Seite des Trenngels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet, und das Gel vorsichtig zwischen den Glasplatten herausgelöst. Das Sammelgel wurde vom Trenngel mit einem Gelmesser abgeschnitten und die obere Kante durch Abtrennen einer Ecke markiert. Anschließend wurde das Gel in Blotpuffer äquilibriert.

### 3.5.2                   Aufbereitung der Proben für die SDS-PAGE

Für die Anfertigung präparativer Gele zum Einsatz in der affinitätschromatografischen Aufreinigung von Antikörpern oder der Immunisierung wurden große Mengen Bakterienlysate auf einer breiten Tasche im Gel geladen. Zu beiden Seiten liefen Markerproteine als Kontrolle mit.

Die Bakterienlysate mit Fusionsprotein aus E. coli Y1089, eine komplexe Proteinmischung mit dem interessierenden  $\beta$ -Gal-RT6 rekombinanten Fusionsprotein, wurden durch Zusatz

von SDS denaturiert, mit Tris Puffer eingestellt, durch Zugabe von DTT intramolekulare Disulfidbrücken gespalten und die Probe reduziert.

Danach erfolgte die mechanische Zerkleinerung der hochmolekularen DNA mittels einer Kanüle und die Zugabe von Glycerin und Bromphenol. Der Glycerinzusatz bewirkte ein Sammeln der geladenen Probe am Boden der Tasche und das Bromphenol ermöglichte das Beobachten der Proteinfrent bei der elektrophoretischen Auftrennung (Maniatis 82).

Rezept für ein präparatives Gel: 250 µl / 130 µl SDS 15% / 65 µl 0,5 M Tris-HCL pH 6,8 / 65 µl 1 M DTT zusammenpipettieren und mit einer Kanüle zerkleinern, danach 65 µl Glycerin / 65 µl Bromphenol 0,5% ergänzen. Die Probe bei 70°C für 10 Minuten vortexen.

### 3.5.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde unter dem Abzug auf einem Schüttler durchgeführt, so dass die Gele die gesamte Färbezeit in Bewegung waren, um Kristallisation und Überfärbung zu vermeiden [modif. Sammons 81, Biel 86]. Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die Gele für 2 h in ein 10% Essigsäure/ 40% Äthanol Gemisch gelegt und anschließend in ein 7% Essigsäure/ 5% Äthanol Gemisch für 3 h überführt. Danach erfolgte die Fixierung in Glutaraldehyd für 30 min und die Reduktion in DTT für ebenfalls 30 min. Die Färbung erfolgte mit 0,1% Silbernitrat und wurde durch eine kurze Waschung in Aqua dest beendet. Die Entwicklung wurde in drei hintereinander folgenden Bädern mit 3% Natriumkarbonat/ 37% Formaldehyd durchgeführt und sofort nach Erkennung von Banden mit Zitronensäure beendet. Abschließend wurde das Gel in Aqua dest/ 5% Glycerin fixiert, in Cellophan verpackt und mit Klammern auf einen Glasrahmen gespannt.

## 3.6 Übertragung und Fixierung von Zellproteinen

### 3.6.1 Western-Blot Techniken (Towbin 79, 84, Beisiegel 86)

Zu Beginn der Versuche stand die Trans-Blot™ Kammer der Fa. Bio-Rad zur Verfügung, so dass zunächst das Vorgehen für diese beschrieben wird (Bio-Rad 87, Asubel 88). Später wurde dann ein schnelleres und auch leistungsstärkeres Gerät für semi-dry Transfers (Pegasus™, Fa. Phase) benutzt.

Der Zusammenbau des sogenannten Blot-Sandwich erfolgte in einer Schale mit Blotpuffer, damit keine Trocknung der eingesetzten Membranen auftrat. Bei der Verwendung von Membranen wurden Handschuhe getragen und die Membranen selbst nur an Stellen berührt, an denen keine Proteine zu erwarten waren bzw. nur mit einer Pinzette. Der Einbau wurde von der Kathode zur Anode durchgeführt, damit keine Verwechslungen entstehen konnten. Sicherheitshalber wurde auf beiden Seiten des Gels eine NC-Membran platziert, um einen Verlust der Proteine bei Verwechslung zu vermeiden. Drei Filterpapiere wurden auf die

Größe des Gels zugeschnitten, in Blotpuffer eingeweicht und auf einen Schwamm (Scotch-Brite™) gelegt. Das ebenfalls in Blotpuffer äquilibrierte Gel wurde luftblasenfrei auf die Filterpapiere gelegt, gefolgt von der NC-Membran. Danach wurden gründlich die eingeschlossenen Luftblasen entfernt. Vor Verwendung wurde die NC-Membran äußerlich auf Schäden geprüft, in Aqua bidest gut gewässert und in Blotpuffer äquilibriert. Den Abschluss bildete eine erneute Lage Filterpapier und ein Schwamm.

Das Sandwich wurde dann in die Blotkammer eingehängt und der Tank mit reichlich Blotpuffer gefüllt. Nach dem Zusammenbau wurde die Apparatur erneut überprüft und erst danach die Spannung angelegt. Das Blotten erfolgte bei diesem Modus über Nacht bei 4°C und 14 V.

Nach Beenden des Blotvorgangs wurde die NC-Membran entfernt und an einer immer wieder gleichen Stelle markiert (links unten), um sowohl die Proteinseite als auch die Orientierung des Blots nicht zu verlieren. Anschließend wurde die Membran kurz in Ponceau-S gefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Damit freie Bindungsstellen die Immunodetektion nicht beeinträchtigten, wurde die NC-Membran mit FCS in TBS für 1 h bei 4°C geblockt. Danach wurde die NC-Membran getrocknet und weiter verarbeitet oder in eine Folie eingeschweißt und gelagert. Wichtig war beim Lagern der Membranen Druck und Verunreinigungen zu vermeiden, da diese eine Signalgebung in der Immunodetektion verhindern konnten. Der Einsatz der Blots erfolgte in der Immunodetektion und der Immunisierung.

### **3.7 Immunodetektion**

Für die Immunodetektion wurden Membranen aus Nitrocellulose und nach verschiedenen Modifikationen im Versuchsprotokoll aus PVDF eingesetzt. Nachdem Transfer der durch SDS-PAGE (s. 3.4) aufgetrennten Proteine im Western Blot Verfahren (s.3.6) wurden die Blots zunächst getrocknet und danach vorsichtig in kleine ca. 3 mm breite Streifen geschnitten, diese wurden dann nummeriert. Es wurden auch ganze Blots eingesetzt, die sofort in Gefrierbeutel eingeschweißt und mit TBSF geblockt wurden. Die Streifen und Blots wurden dabei möglichst nicht berührt um Verunreinigungen zu vermeiden und nur an den Enden mit Pinzetten gefasst. Das Zerteilen erfolgte auf gereinigten Tablett mit einem Skalpell. Vor der weiteren Arbeit mit den Streifen wurden diese aktiviert, das heißt die Membranen wurden durch Wirkung von Kapillarkräften erneut angefeuchtet. NC-Streifen wurden vorsichtig auf die Oberfläche von Schalen mit Aqua dest gelegt und PVDF-Streifen auf die Oberfläche von Methanol. Der Vorgang dauerte etwa 30 Sekunden. Nach Aktivierung der Streifen durften diese nicht wieder trocknen, da die Entwicklung im Alkalische-Phosphatase System dadurch beeinträchtigt wurde. Danach erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit der Blocklösung TBSF (s. 3.1.3) für 2 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Anschließend wurde die

Blocklösung mit der Wasserstrahlpumpe und einer Pasteur Pipette abgesaugt und es folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit TBST (s. 3.1.3). Jeder Waschvorgang dauerte 2 Minuten auf dem Schüttler bevor die Waschlösung wieder mit der Pasteur Pipette abgesaugt wurde.

Danach erfolgte die Inkubation mit einem Primärantikörper z. B. einer Antikörperverdünnung in TBSF eines der polyklonalen Seren aus Kaninchen oder Ente für zwei Stunden oder über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Die Inkubation wurde durch Absaugen der Lösung und einen dreimaligen Waschvorgang wie oben beschrieben beendet.

Die Inkubation wurde mit unterschiedlichen Systemen von Zweitantikörpern und entsprechenden Entwicklungsverfahren durchgeführt. Als Standard für die beschriebenen Versuche wurde schließlich das System mit an Alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörpern etabliert.

### 3.7.1 Alkalische Phosphatase

Es wurden an Alkalische Phosphatase gekoppelte Zweitantikörper aus verschiedenen Tierspezies eingesetzt. Die wie unter 3.7 beschrieben vorbehandelten Streifen oder ganze Blots wurden mit an AP-gekoppelte Ziege anti Ente IgG, Ziege anti Kaninchen IgG oder Ziege anti Ratte IgG (s. 3.1.4) für 1 h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Zu diesem Zweck wurden ebenfalls definierte Antikörperverdünnungslösungen mit TBSTF (s. 3.1.3) untersucht und für die eingesetzten Seren aus Ente und Kaninchen ein Optimum für das jeweilige Detektionssystem entwickelt. Danach erfolgte ein Waschvorgang w.o. beschrieben und die Äquilibrierung in einem Alkalische Phosphatase Puffer für 10 Minuten. Nach Absaugen des AP-Puffers wurden die Streifen bis zu 30 Minuten in Substratlösung NBT/BCIP im Dunkeln entwickelt und die Färbung alle 5 Minuten kontrolliert. Der Vorgang wurde durch Entfernen der Substratlösung und dreimaligem Waschen mit Stop Puffer beendet. Zum Abschluss wurden die Streifen oder Blots in Aqua dest gewaschen und auf Löschpapier getrocknet. Für die Archivierung wurden die Streifen oder Blots mit Klebestreifen auf festes Löschpapier geklebt und in Briefumschläge gelegt, um sie vor Licht zu schützen. So ist es möglich diese Ergebnisse auch noch 10 Jahre später zu beurteilen!

### 3.7.2 Chemilumineszenz

Neben der Immunodetektion mit Alkalischer Phosphatase wurde auch ein Versuch unternommen, die Sensitivität mit Hilfe von Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen zu verbessern. Aus diesem Grund wurde ein „Protein Images“ Set der Firma USB in den USA bestellt. Das Paket musste persönlich vom Zoll nach Öffnung und Durchsuchung abgeholt werden.

Der Ablauf der Chemilumineszenz Experimente erfolgte wie unter 3.7.1 beschrieben und der AP-gekoppelte Zweitantikörper wurde nach der Inkubation entfernt. Es folgten zwei Waschzyklen in TBST und ein Waschzyklus in TBS. Zu diesem Zweck wurde der Blot in eine Schale gelegt und mit Waschlösung für 5 min auf dem Schüttler belassen. Der Blot

wurde anschließend vorsichtig mit einer Pinzette aus der Lösung genommen und auf eine vorgeblockte Plastikeinmachfolie gelegt. Dann wurde der Blot mit Lumi-Phos besprüht und eingeschweißt. Die Dosierung betrug ein Hub pro 14 cm<sup>2</sup>. Nach 5 min. wurde alle 15 min. eine Entwicklung mit einem Kodak Röntgenfilm durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit den Signalen auf NC und PVDF Basis verglichen. Preis und Leistung standen bei diesem Set in keinem guten Verhältnis, da es nicht sensitiver als das bis zu dem Zeitpunkt etablierte Standardverfahren war.

### 3.7.3 Streptavidin-Alkalische Phosphatase

Das Rezept wurde wie unter 3.7.1 beschrieben durchgeführt. Als Zweitantikörper wurde jedoch ein biotinylierter Antikörper (biotinkonjugierter Goat anti Rabbit IgG) eingesetzt und für 1 h auf dem Rollschüttler bei 4°C inkubiert. Dieser Zweitantikörper war als Verstärker der Farbentwicklung und Brückenantikörper gedacht. Es folgten drei Waschzyklen mit TBST und die Inkubation mit einem Streptavidin-Alkalische Phosphatase Komplex ebenfalls für 1 h bei 4°C auf dem Rollschüttler. Die Entwicklung wurde danach wie unter 3.7.1 beschrieben vorgenommen.

## 3.8 Affinitätschromatografie

### 3.8.1 Aufreinigung großer Zellsolubilisatmengen im Säulenverfahren

Staphylococcus aureus produziert Protein A, das mit hoher Affinität und Spezifität Immunglobulin bindet (1,5 g Trockensubstanz ergeben 5 ml Gel und können 110 mg IgG binden) [Goding 1986]. Die Bindungskapazität für den Ratten mAK Gy1/12 ist jedoch deutlich geringer und beträgt etwa 10% des o.g. Wertes [Kashan 1989]. Das Verfahren der Säulenaffinitätschromatografie wurde gewählt, um große Mengen RT6 Solubilisat aufzureinigen [Bazin 84]. Zu diesem Zweck wurde eine Affinitätschromatographiesäule im Labor modifiziert [Schneider 82]. Es wurde eine gelbe Pipettenspitze mit einer Perfusorspritze verbunden (s. Abb. 6). Eine Spezialpipettenspitze „Crystal Tip“ wurde mit einer 2x2 mm großen Fritte präpariert und mit der Immunomatrix Protein A Sepharose Cl-4B gefüllt. Danach wurden 200 ml Gy1/12 Hybridomüberstand im Überschuss langsam durch die Säule gegeben, dabei begrenzte ein Drei-Wege Hahn die Flussgeschwindigkeit auf 1 ml/min. Die Säule wurde anschließend zweimal mit Borat Puffer und einmal mit Triethanolamin gewaschen.

**Abbildung 6** Schema des Säulenaufbaus für die Affinitätschromatografie

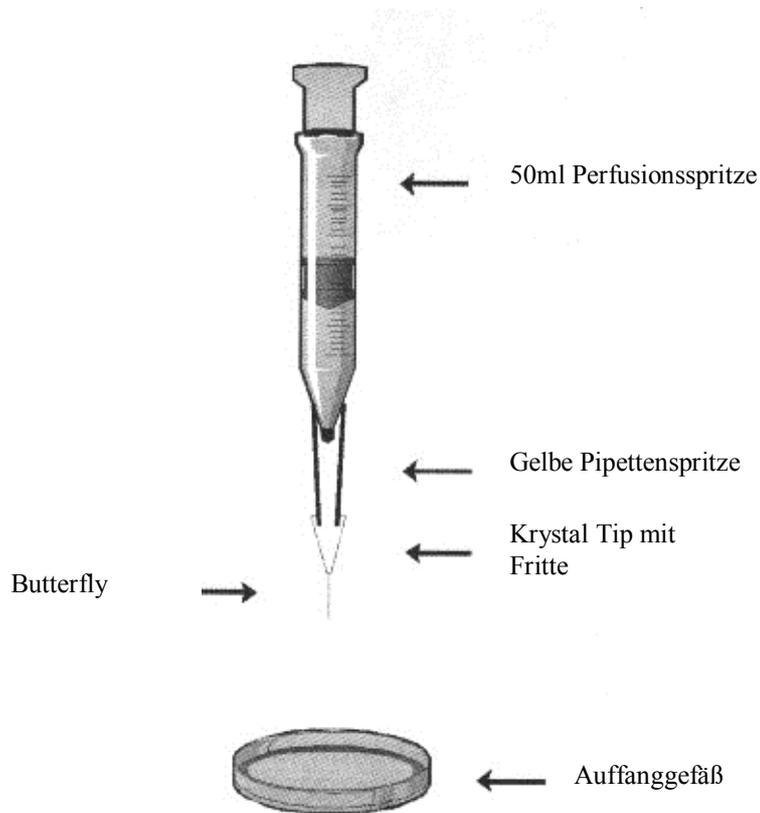


Abbildung 6: Durch Crosslinking von RT6 spezifischen Antikörpern GY1/12 an Sepharose gelang die Herstellung einer Affinitäts-Matrix, an der RT6 aus Zell Solubilisaten nicht kovalent gebunden und durch niedrig pH-Puffer wieder eluiert wurde. Der Versuch diente der Gewinnung von aufgereinigtem RT6 aus solubilierten EpD3 Zellen.

Um ein Crosslinking der Antikörper zu erreichen wurde die Immunomatrix in ein Eppendorfröhrchen überführt und 60 min mit Dimethylpimelidat-Dihydrochlorid (DPD) in Triethanolamin auf dem Rollenmischer bei RT inkubiert. Die Immunomatrix wurde 1 min. mit 1000 rpm zentrifugiert und einmal mit Ethanolamin sowie dreimal mit Boratpuffer gewaschen. Die Säule wurde wie oben dargestellt im Kühlraum aufgebaut und Zellsolubilisate (s. 3.4.6) langsam über die Säule gegeben. Der Fluss wurde durch die an der „Crystal Tip“ befindlichen Butterfly-Spitze auf 1 ml/min begrenzt. Die nicht gebundenen Proteine wurden anschließend durch Waschung mit einem Waschpuffer A (0,15 M NaCl/ 0,05 M Tris pH 8,2/ 0,5% Triton X-100/ 0,1g BSA) sowie Waschpuffer B (0,15 M NaCl/ 0,5% Triton X-100/ 0,1g BSA) entfernt. Durch Spülung mit niedrig pH-Elutionspuffer wurde das gebundene RT6 gewonnen und die Proteinfractionen gemessen. Der Elutionspuffer wurde so bemessen, dass er zusammen mit einer in einem Eppendorfröhrchen vorpipettierten Menge Tris-HCl neutralisiert wurde.

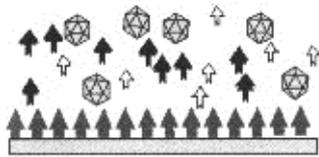
### 3.8.2 Gewinnung aufgereinigter Antikörper durch Epitopselektion

Eines der Ziele der Arbeit war die Gewinnung aufgereinigter RT6 spezifischer Antikörper aus den polyklonalen Seren zum Einsatz für weitere Immunodetektionsversuche z. B. für Präparationen aus Zellen der Maus oder des Menschen. Es wurde ein kombiniertes Verfahren aus positiver und negativer Epitopselektion etabliert, mit dem es möglich war, die polyklonalen Seren von Antikörpern gegen beta-Galaktosidase und RT6 zu trennen [Smith 1984]. Das Verfahren ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Nitrocellulose Streifen, die gebundenes Antigen (RT6-beta-Galaktosidase Fusionsprotein oder beta-Galaktosidase) auf ihrer Oberfläche trugen, wurden gemeinsam mit den polyklonalen Antiseren inkubiert und in weiteren Schritten die gebundenen Antikörper eluiert. Die gewonnenen Antikörper konnten danach in unterschiedlichen Verfahren der Positiv- und Negativselektion weiter aufgereinigt werden.

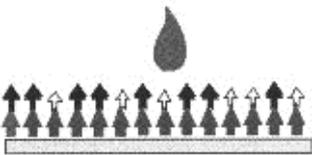
## Abbildung 7    Übersichts-Schema der Epitop-Selektion



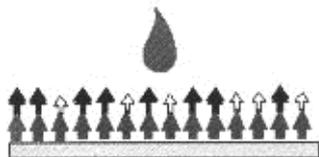
Auf Nitrocellulose geblottetes RT6- $\beta$ -Galaktosidase Fusionsprotein



Inkubation mit polyvalenten Seren aus Ente und Kaninchen



Mehrfaches Waschen und Entfernen der nicht gebundenen Antikörper



Gewinnung der gebundenen Antikörper mit Elutionspuffer

-  Nicht gebundene unspezifische Antikörper
-  Antikörper mit Beta-Galaktosidase Spezifität
-  Antikörper mit Rt6 Spezifität

Abbildung 7: Das dargestellte Verfahren der positiven Epitop-Selektion wurde für die Aufreinigung der durch Immunisierung gewonnenen polyvalenten Antisera aus Kaninchen und Ente eingesetzt.

### **Positiv Selektion**

Nitrocellulose aus präparativen, reichlich Bakterienlysat enthaltenden SDS-PAGE Gelen wurde mit Ponceau S gefärbt (s.3.1.3). Die auch mittels Molekulargewichtsmarker identifizierte Proteinbande konnte somit markiert und herausgeschnitten werden. Die markierte Bande lag im 120 kd Bereich und enthielt das rekombinante FP.

Die Streifen wurden mit Aqua dest entfärbt und bei Raumtemperatur eine Stunde mit TBSF in Eppendorfröhrchen geblockt (s. 3.1.3). Die einzelnen Röhrchen sollten reichlich mit Blocklösung gefüllt sein, damit ein Antikörperverlust durch unspezifische Bindungen verhindert wurde. Die Blocklösung wurde mittels Pasteurpipette abgesaugt und die Streifen einmal mit TBST gewaschen (s. 3.1.3).

Über Nacht wurden die Nitrocellulosestreifen bei 4°C mit dem polyklonalen Antiserum (0,5 ml) auf dem Schüttler inkubiert. Die Streifen wurden aus den Eppendorfröhrchen entfernt und das verbliebene Serum als "Ü1" markiert. Dieses wurde später als Kontrolle bei der Immunodetektion eingesetzt. Ü1 enthielt eine reduzierte Fraktion RT6 und  $\beta$ -Galaktosidase Antikörper. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Streifen viermal mit TBST in Immunodetektionswannen gewaschen.

Danach wurden die Streifen zum Trocknen auf einem Filterpapier (Whatman 3M Filterpapier) vorsichtig gewendet. Zum Eluieren wurden die Streifen auf ein kleines Stück Parafilm (nach allen Seiten ca. 0,5 cm größer als der Streifen) in eine kleine Petrischale gelegt und die gebundenen Antikörper mittels pH-shift durch Eluatpuffer (3x0,2 ml) bei einem pH von 2,5 eluiert. Dabei wurden die Streifen 1 min lang wiederholt, forciert mit dem Elutionspuffer durch Pipettieren gespült. Anschließend wurde die Antikörperlösung sofort in ein Röhrchen mit vorpipettiertem Tris Puffer zum Neutralisieren überführt, um die eluierten Antikörper vor Denaturierung zu schützen. Die Portionen wurden gesammelt und bildeten die "E1" Fraktion. Die E1 Fraktion enthielt sowohl gegen RT6 als auch beta-Galaktosidase gerichtete Antikörper.

### **Negativ Selektion**

Um die RT6-spezifischen Antikörper von den  $\beta$ -Galaktosidase Antikörpern zu trennen, wurden die eluierten Antikörper der E1 Fraktion zweimal mit einem  $\beta$ -Galaktosidase Streifen inkubiert. Für diesen Versuchsteil wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase Streifen aus einem präparativen SDS-PAGE eine Stunde bei RT mit TBSF geblockt und dreimal mit TBST gewaschen s.o. Danach wurde der vorbehandelte Streifen eine Stunde bei 4°C in E1 inkubiert. Die Streifen wurden aus dem Serum entfernt, das die "Ü2" Fraktion (RT6 Antikörper mit einem reduzierten Anteil beta-Galaktosidase Antikörper) bildete. Anschließend wurde der Streifen erneut viermal mit TBST gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden w.o. beschrieben eluiert und ergaben die E2 Fraktion (eluierte  $\beta$ -Galaktosidase Antikörper). Das beschriebene Verfahren wurde mit einer Inkubation über Nacht wiederholt. Danach enthielt das Serum "Ü3" RT6 Antikörper und eine deutlich reduzierte Konzentration an  $\beta$ -Galaktosidase

Antikörpern durch zweimalige Inkubation mit einem  $\beta$ -Galaktosidase-NC-Streifen. Es wurden von den NC Streifen nochmals  $\beta$ -Galaktosidase Antikörper eluiert. Diese Fraktion wurde als "E3" bezeichnet und enthielt wieder gegen beta-Galaktosidase gerichtete Antikörper.

E1: Eluat von  $\beta$ -Gal/RT6 rFP, mit einer Mischung aus Antikörpern gegen RT6 und beta-Galaktosidase

E2: Eluat vom ersten  $\beta$ -Gal Streifen, mit gegen beta-Galaktosidase gerichteten Antikörpern

E3: Eluat von zweiter Inkubation mit  $\beta$ -Gal Streifen

Ü1: Überstand des Originalserums nach Inkubation mit  $\beta$ -Gal/RT6 rFP, vermindert um die bei der Inkubation an unterschiedlichen Epitopen gebundenen Antikörper gegen RT6 und beta-Galaktosidase

Ü2: E1 Fraktion nach der ersten Inkubation mit beta-Galaktosidase Streifen

Ü3: Überstand nach zweimaliger Inkubation mit  $\beta$ -Gal Streifen

Das beschriebene Rezept wurde nach Austestung verschiedener PVDF Membranen mit diesen weitergeführt, da sie nicht so empfindlich waren und die quantitative Ausbeute der Antikörper stabiler war. Es wurde nur die Aktivierung mit Methanol und das Färben des Blots mit Coomassie angeglichen.

### **3.9 Zellseparationsverfahren**

#### **3.9.1 Zelltrennung von B- und T-Zellen der Ratte mit Dynabeads**

Voraussetzung für die Zellseparation waren gut präparierte Lymphknoten und eine Zellzahlbestimmung wie unter 3.4.3 beschrieben. Nach der Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde von 50% T-Zellen ausgegangen. Diese Zahl diente als interne Kontrolle für die Qualität der Zellseparation. Mit den Dynabeads wurde eine positive T-Zell Selektion mit Hilfe von Antikörpern durchgeführt [Vartdal 86]. Die präparierten und in RPMI gewaschenen Zellen wurden mit zwei Erstantikörpern für 1 h bei 4°C inkubiert. Es standen zwei T-Zelloberflächenmarker aus Maus-Hybridomüberständen zur Verfügung. W 3/13 und OX 19 werden auf allen T-Zellen in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Die Inkubation wurde mit zwei Waschzyklen in RPMI und anschließender Zentrifugation für 10 min. bei 1200 rpm beendet. Als Zweitantikörper wurden Dynabeads M 450 Sheep anti Mouse IgG Fc-specific in einer dreifachen T-Zellmenge eingesetzt. Die Inkubation wurde für 30 min. bei 4°C durchgeführt. Die eigentliche Zellseparation wurde mit einem Magneten und nach Zusatz von RPMI in einer Gesamtmenge von 5 ml durchgeführt. Es bildeten sich unter der Inkubation cluster, die mit dem Magneten im Röhrchen gehalten wurden. Der Überstand wurde dekantiert und dieser Vorgang zweimal mit RPMI wiederholt. Zum Schluss wurden die Zellen solubilisiert wie unter 3.4.6 beschrieben. Die DNA fiel aus durch Ausbildung eines

dunklen Schleims. Das Solubilisat wurde 10 min. bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand in SPB aufgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.9.2 Zellseparation aus humanen Leukozytenkonzentraten

Es wurden aus dem Blutdepot der Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf zwei Leukozytenkonzentrate zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde mit der Neubauer Kammer (s. 3.4.3) die Zellzahl pro Milliliter Konzentrat bestimmt. Die Zellzahl war ausschlaggebend für die Menge der einzusetzenden Dynabeads. Anschließend wurde das Konzentrat auf Zentrifugenröhrchen (50 ml Greiner) im Verhältnis 25 ml Zellkonzentrat mit 25 ml PBS aufgeteilt und vermischt. Die Inkubation mit Dynabeads wurde im Verhältnis 10 Zellen pro Dynabead (10 : 1) durchgeführt, so dass pro Röhrchen etwa  $5 \times 10^7$  beads ergänzt wurden. Eingesetzt wurde der Pan-T-Zellmarker CD 2 [Gaudernack 86]. Nach 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf dem Rollmischer wurde die Inkubation durch eine Sedimentationsphase für 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  beendet. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment 2x mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in PBS aufgenommen und die Zellseparation mit dem Magneten w. o. beschrieben durchgeführt. Anschließend erfolgte die Solubilisation (s. 3.4.6).

## 4

## Ergebnisse

Die Ergebnisse werden im Folgenden in zwei Abschnitten präsentiert. Die Darstellung beginnt mit den Ergebnissen der Versuche mit rekombinanten Fusionsproteinen und überträgt die gewonnenen Erkenntnisse danach auf die Versuche mit Zellen von Ratte, Maus und Mensch.

Zunächst wurde eine Überprüfung der Immunreaktivität der gewonnenen Antiseren mittels Immunoblot-Analysen von Lysaten aus mit RT6- $\beta$ -Galaktosidase transformierten E.coli Bakterienzellen durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die weitere Charakterisierung der Antiseren durch Titrierung von Primär- und Sekundärantikörpern zur Ermittlung optimaler Arbeitsbereiche.

Die Affinitätsreinigung RT6-spezifischer Antikörper aus den vorhandenen Antiseren mittels positiver und negativer Epitopselektion an immobilisierten rekombinanten Proteinen (RT6- $\beta$ -Gal Fusionsprotein), bzw. des Proteins Beta-Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) allein, führte zur Gewinnung sensitiver Werkzeuge für weitere Versuche an nativen Proteinen.

Im zweiten Teil werden die Untersuchungen zum Nachweis des nativen RT6 aus T-Zellen der Ratte bzw. der Ratten T-T Hybridomzelllinie EpD3 beschrieben. Zunächst erfolgten eine vergleichende FACS-Analyse des Expressionsniveaus mit Hilfe des monoklonalen RT6.2 spezifischen Antikörpers Gy 1/12. Durch Affinitätsreinigung von RT6.2 aus lysierten EpD3 Zellen an immobilisiertem Gy1/12 mAk im Säulenverfahren konnte natives Material für die weiteren Versuche gewonnen werden. Es schlossen sich Untersuchungen zur Reaktivität der gewonnen Antiseren mit aufgereinigtem RT6 und zur Detektion von RT6 in EpD3 und T-Zell Gesamtzelllysaten an. Den Abschluss bildeten Versuche, die vermuteten RT6 homologen Proteine in Lysaten aus Maus und Human T-Zellen nachzuweisen.

### 4.1 Charakterisierung der durch Immunisierung mit beta-Galaktosidase-RT6 rekombinanten Fusionsprotein gewonnenen Antiseren

#### 4.1.1 Testung der Immunreaktivität der gewonnenen Antiseren an mit RT6- $\beta$ -Galaktosidase Fusionsprotein transformierten Escherichia coli Lysaten

Die mit  $\beta$ -Galactosidase-Fusionsprotein immunisierten Enten und Kaninchen wurden vom Veterinärmediziner der Abteilung für Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf narkotisiert und danach entblutet. Das Serum der einzelnen Tiere wurde in Kaninchen (K4, K5, K6) und Enten (E2, E3, E4) Fraktionen getrennt bearbeitet und danach bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

In einem ersten Schritt sollte getestet werden, in welchem Maße es bei den Tieren zu einer Antikörperbildung gekommen war. Dies sollte durch Anfertigen von Immunoblots erfolgen. Nach Auftrennung von RT6- $\beta$ -Gal Fusionsprotein haltigem Bakterienlysat Y 1089 mittels SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese), wurden Western Blots für den Einsatz in der

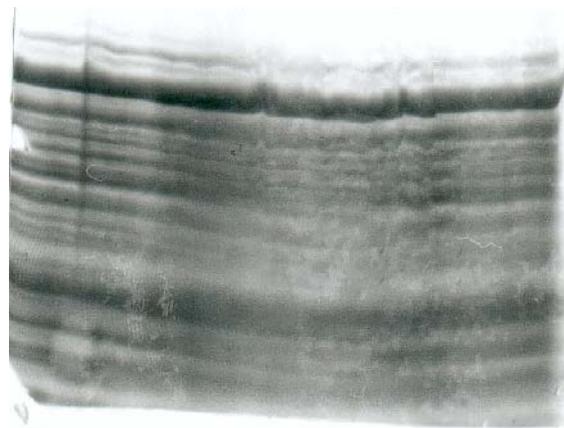
Immunodetektion angefertigt. Um eine Orientierung der Proteinbanden sicherzustellen wurden auf beiden Seiten des Gels zwei kleine Taschen für Proteinmarker abgesteckt, die später eine Zuordnung der Bande mit dem entsprechenden Molekulargewicht ermöglichte. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die größenfraktionierten Proteine auf Nitrocellulose geblottet und der Blottvorgang anschließend durch Färbung mit Ponceau S geprüft (Abb. 8a). Für den weiteren Einsatz in der Immunodetektion wurden die Blots in zwei Millimeter breite Streifen geschnitten und diese anschließend mit Kugelschreiber nummeriert, um ein Löschen der Markierung im Verlauf der weiteren Arbeitsgänge zu verhindern. Die Markierung wurde entgegengesetzt des geblotteten Proteins aufgebracht, um Schäden an der Nitrocellulose zu vermeiden und eine gleichförmige Ausrichtung im Verlauf der weiteren Versuche zu gewährleisten.

Die Hauptproteinbande wurde in der Ponceau-S-Färbung mit 120 kd identifiziert, was dem Molekulargewicht des gesuchten Fusionsproteins entsprach. Gleichzeitig war dies auch eine breite, prominente Bande, so dass auf eine hohe Proteinsyntheserate durch Induktion der lysogenisierten *E. coli* Wirtszellen geschlossen wurde. In der Abbildung 8a ist diese Bande markiert. Das eingesetzte Prä-Immuneserum des Kaninchens K5, das vor der Immunisierung entnommen worden war, zeigte keine Immunreaktivität mit den geblotteten Proteinen. Die nach erfolgter Grundimmunisierung mit zwei Boosterinjektionen gewonnene Serumprobe des Kaninchens K4 zeigte eine diffuse Reaktion des gesamten Streifens (Abb. 8b, Spur 2). Die Seren K5 und K6 nach kompletter Immunisierung und Gewinnung wie oben beschrieben (s. Kap. 3.2), sind deutlich immunreaktiv im Bereich der Fusionsproteinbande. Die Reaktivität der Immuneseren wird besonders im Vergleich der Streifen 1 und 5 deutlich (K5 Prä-Immuneserum, Abb. 8b).

Entsprechend den gemachten Ausführungen zu den Kaninchenseren wurden auch die Entenseren untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 zusammengefasst. Das Entenserum E3 zeigte, ähnlich wie das Kaninchenserum K3 (Abb. 8b) eine Reaktivität mit dem gesamten Streifen. Bei E2 war es zu einer deutlichen Reaktion mit dem Fusionsprotein gekommen und auch E4 war, wenn auch schwächer, reaktiv.

**Abbildung 8** Analyse der Reaktivitäten der Immunsereen von mit RT6- $\beta$ -Galaktosidase Fusionsprotein immunisierten Kaninchen K4, K5 und K6 in einer Gesamtblotfärbung (Abb. 8a) und Immunoblotanalyse (Abb. 8b)

Abbildung 8a Gesamtblotfärbung



← 120 kd Bande des RT6- $\beta$ -Galaktosidase Fusionsproteins

Abbildung 8a: In transformierten *E. coli* Zellen wurde der lysogene Zyklus zur Produktion des rekombinanten Fusionsproteins RT6- $\beta$ -Galaktosidase induziert. Die in den Lysaten enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert. Nach elektrophoretischem Transfer auf Nitrocellulose wurden die Proteine reversibel mit Ponceau S ge- und entfärbt (Gesamtblotfärbung). Anhand der im Gel mitlaufenden Molekulargewichtsmarker und der durch die Färbung mit Ponceau S dargestellten Proteinbanden wurde der interessierende Molekulargewichtsbereich und die korrespondierende Bande identifiziert (s. Pfeil in Abb. 8a).

## Abbildung 8b Immunoblotanalyse

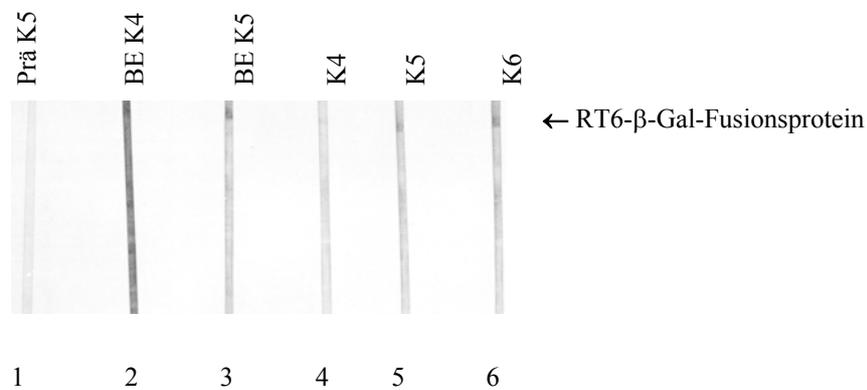


Abbildung 8b: Nach Entfärbung der NC-Membran (s. Abb. 8a), wurde diese in Streifen geschnitten und übernacht mit TBSF geblockt. Am nächsten Tag wurden die NC-Streifen dreimal mit TBST gewaschen und mit dem ersten Antikörper (Kaninchenserum, 1:500 in TBST) inkubiert. Als Kontrolle diente ein Serum, das vor Beginn der Immunisierung gewonnen wurde (Prä K5).

Für die Immunodetektion wurden folgende Antiseren eingesetzt:

Spur 1	Prä-Immuneserum K5
2	Blutentnahme K4 30.08. 1989 (nach Grundimmunisierung und zwei Booster Injektionen)
3	Blutentnahme K5 30.08. 1989 (wie K4)
4	Immuneserum K4 29.01. 1990 nach 5 Booster Injektionen
5	Immuneserum K5 29.01. 1990 nach 5 Booster Injektionen
6	Immuneserum K6 29.01. 1990 nach 5 Booster Injektionen

Die NC-Streifen wurden in kleinen Inkubationswannen mit 500µl Antiserum für 1h bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschzyklus wurden die Streifen mit dem zweiten Antikörper (Ziege anti Kaninchen IgG, 1:500) an Alkalische Phosphatase gekoppelt auf gleiche Weise inkubiert. Nach einem weiteren Waschzyklus, der mit Alkalischem Phosphatasepuffer beendet wurde, erfolgte die Entwicklung des Signals mit der Substratlösung für Alkalische Phosphatase über 1h in der Dunkelkammer. Die Entwicklung wurde mit mehreren Spülgängen Stop-Puffer beendet.

**Abbildung 9 Immunoblotanalyse der Reaktivitäten der Immenseren von mit RT6- $\beta$ -Gal Fusionsprotein immunisierten Enten E2, E3 und E4**

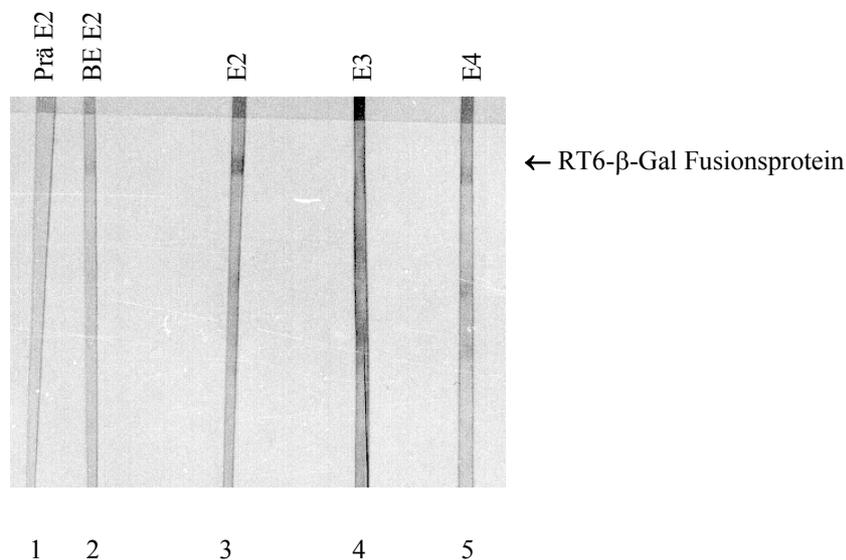


Abbildung 9: Ein wie in Abb. 8 angefertigter Western-Blot eines präparativen SDS-PAGE Gels wurde in Streifen geschnitten und mit Entenserum (1:100 in TBST) 1h bei 4°C inkubiert. Gebundene Antikörper wurden durch Entwicklung mit einem geeigneten Sekundärantikörper (Ziege anti Ente IgG, 1:200 in TBST), an Alkalische Phosphatase konjugiert, detektiert. Folgende Seren wurden als erster Antikörper eingesetzt.

Erster Antikörper 1:100:

Spur 1	Prä-Immuneserum E2
2	Blutentnahme E2 30.08. 1989 (nach Grundimmunisierung und zwei Booster Injektionen)
3	Immuneserum E2 29.01. 1990 nach 5 Booster Injektionen
4	Immuneserum E3 29.01. 1990 nach 2 Booster Injektionen, ohne Grundimmunisierung
5	Immuneserum E4 29.01. 1990 nach 5 Booster Injektionen

Die NC-Streifen wurden in kleinen Inkubationswannen mit 500 $\mu$ l Antiserum für 1h bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschzyklus wurden die Streifen mit dem zweiten Antikörper Ziege anti Ente IgG an Alkalische Phosphatase gekoppelt auf gleiche Weise inkubiert. Nach einem weiteren Waschzyklus, der mit Alkalischem Phosphatasepuffer beendet wurde, erfolgte die Entwicklung des Signals mit der Substratlösung für Alkalische Phosphatase über 1h in der Dunkelkammer. Die Entwicklung wurde mit mehreren Spülgängen Stop-Puffer beendet.

#### 4.1.2 Titrierung der Antiseren und Sekundärantikörper zur Entwicklung optimaler Arbeitsbereiche

Nach den ersten Versuchen wurde klar, dass die Reaktivität der einzelnen polyklonalen Seren aus Kaninchen und Ente unterschiedlich war. Um ein bestmögliches Ergebnis zu erhalten und das Verhältnis von spezifischem Signal zum Hintergrund den sogenannten „noise to signal“ Quotienten für die weiteren Versuche zu optimieren, wurden Titrierungsversuche unternommen und sowohl der erste als auch der zweite Antikörper für die einzelnen Seren in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt.

Ausgangspunkt für die Versuche waren SDS-PAGE Gelelektrophoresen mit Y1089 Bakterienlysaten, die nach ihrer Größenfraktionierten Auftrennung auf Nitrocellulose Membranen geblottet wurden. Die Qualität des Blots wurde durch Anfärben in Ponceau S getestet (s. Abb. 8a) und die interessierende RT6- $\beta$ -Gal-FP Bande durch die Auftrennung von ebenfalls geladenen Molekulargewichtsmarkern identifiziert. Anschließend wurde der Blot beschriftet und in zwei Millimeter breite Streifen geschnitten.

Das Titrieren der Antiseren erfolgte im Western Blot Immunodetektionsverfahren. Mögliche freie Bindungsstellen wurden durch Kälberserum (FCS) geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Antiserum aus Kaninchen oder Ente in unterschiedlichen, aufsteigenden Titrationsstufen, dabei wurde bei der Herstellung der einzelnen Verdünnungsstufen auf Erfahrungen aus Vorversuchen zurückgegriffen. Nach einem Waschzyklus erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper, der ebenfalls in unterschiedlicher Verdünnung eingesetzt wurde. In der sich anschließenden Entwicklung wurde die optimale Verdünnung von beiden Antikörpern für das jeweilige Antikörpersystem anhand der qualitativen Bandenentwicklung bestimmt.

Abbildung 10 gibt die Ergebnisse der Antikörpertitrierung für die Kaninchenserum K4, K5 und K6 wieder. In den Vorversuchen, als es um die Feststellung der Reaktivität der Antiseren ging, zeigte sich bereits, dass K4 kein ausgeprägtes Antikörperprofil gegen das Fusionsprotein besaß. Die Titrierung bei 1:250 und 1:500 zeigte nur ein schwaches Signal im Bereich der RT6- $\beta$ -Gal-FP Bande aber eine deutliche, unspezifische Anfärbung des gesamten Nitrocellulosestreifens.

Bei K5 konnte in den Verdünnungsstufen 1:2000 und 1:4000 das Optimum der Reaktion auf die Fusionsproteinbande und das optimale Verhältnis zwischen Signal und unspezifischer Anfärbung detektiert werden. Bei K6 war die Verdünnung bis zu den Titerstufen 1:4000 und 1:8000 möglich, so dass dieses Serum die beste Immunantwort auf denaturiertes RT6- $\beta$ -Gal-FP gebildet hatte. Beide Seren wurden für die weiteren Versuche eingesetzt.

Bei den kleinen Banden im 75 kd Bereich handelt es sich vermutlich um ein nicht näher identifiziertes E. coli Wirtsprotein oder ein proteolytisches Spaltprodukt des RT6- $\beta$ -Gal Fusionsproteins.

**Abbildung 10 Titrierung der Kaninchenimmunsereen K4, K5 und K6 mittels Immunoblot-Analysen von RT6- $\beta$ -Gal Fusionsprotein**

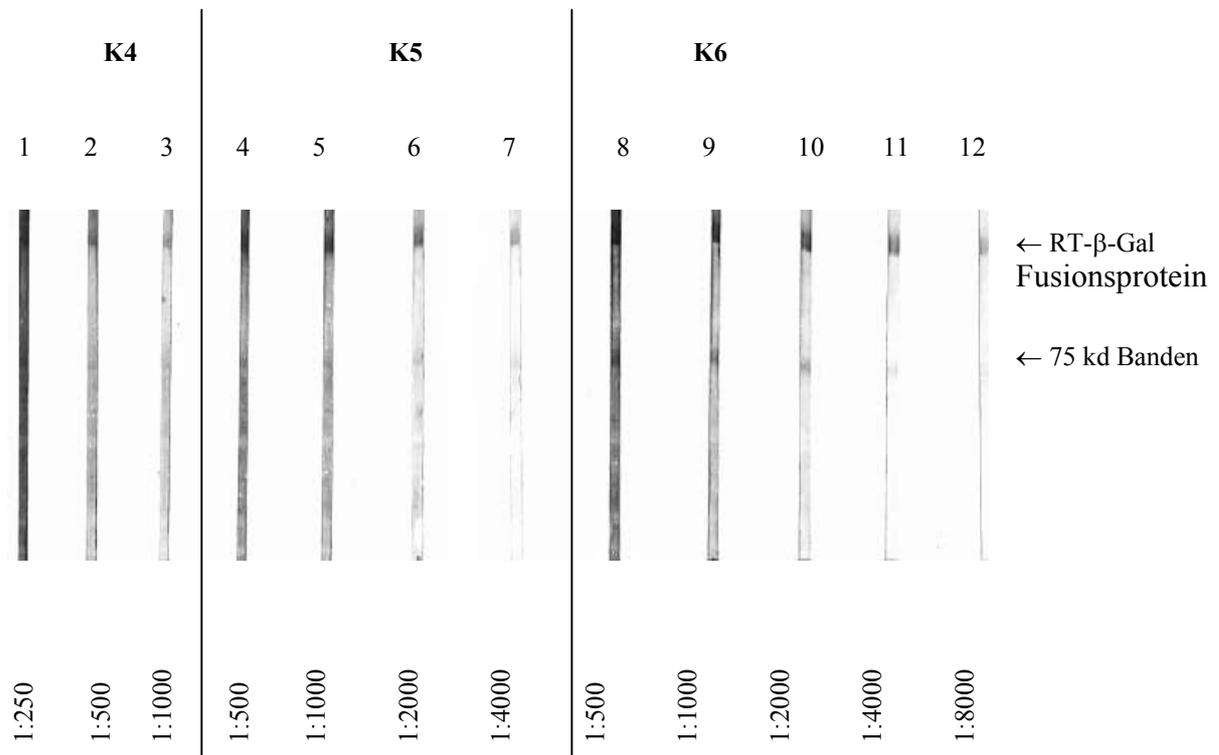


Abbildung 10: Ein wie in Abb. 8 angefertigter Immunoblot von RT6- $\beta$ -Gal Fusionsprotein haltigen E. coli Lysaten wurde durch SDS-PAGE größenfraktioniert, in Streifen geschnitten und mit folgenden Primärantikörpern (unterschiedlicher Verdünnung in TBST) nach Blockung freier Bindungsstellen mit FCS inkubiert:

Spur 1	K4 1:250	Spur 8	K6 1:500
2	K4 1:500	9	K6 1:1000
3	K4 1:1000	10	K6 1:2000
4	K5 1:500	11	K6 1:4000
5	K5 1:1000	12	K6 1:8000
6	K5 1:2000		
7	K5 1:4000		

Die NC Streifen 1-3 wurden mit K4, die Streifen 4-7 mit K5 und die Streifen 8-12 mit K6 in unterschiedlichen Verdünnungen getestet. Der zweite Antikörper war ein Ziege anti Kaninchen IgG (1:200 in TBST) an Alkalische Phosphatase gekoppelt. Die Entwicklung erfolgte mit Alkalischer Phosphatase Substratlösung.

**Abbildung 11 Titrierung des Entenimmunserums E4 (Abb. 11a) und des Sekundärantikörpers (Abb. 11b) mittels Immunoblot-Analyse an RT6-β-Gal Fusionsprotein**

Abbildung 11a Verdünnungsstufen des Primärantikörpers

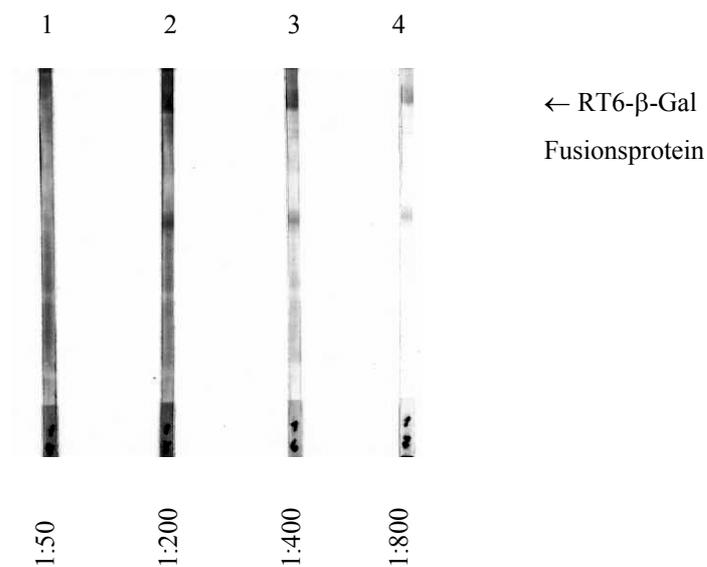


Abbildung 11a: Ein wie in Abb. 8 angefertigter Immunoblot mit SDS-PAGE größenfraktionierten, RT6-β-Gal haltigen *E. coli* Bakterienlysaten wurde in Streifen geschnitten und mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen des eingesetzten Primärantikörpers, dem Immunserum E4 inkubiert. Die Detektion erfolgte wie unter Abb. 9 dargestellt mit einem Ziege anti Ente IgG an Alkalische Phosphatase konjugiertem Zweitantikörper (1:200 in TBST).

Primärantikörper:

Spur 1	Prä-Immunserum 1:50
2	E4 1:200
3	E4 1:400
4	E4 1:800

Abbildung 11b Verdünnungsstufen des Sekundärantikörpers

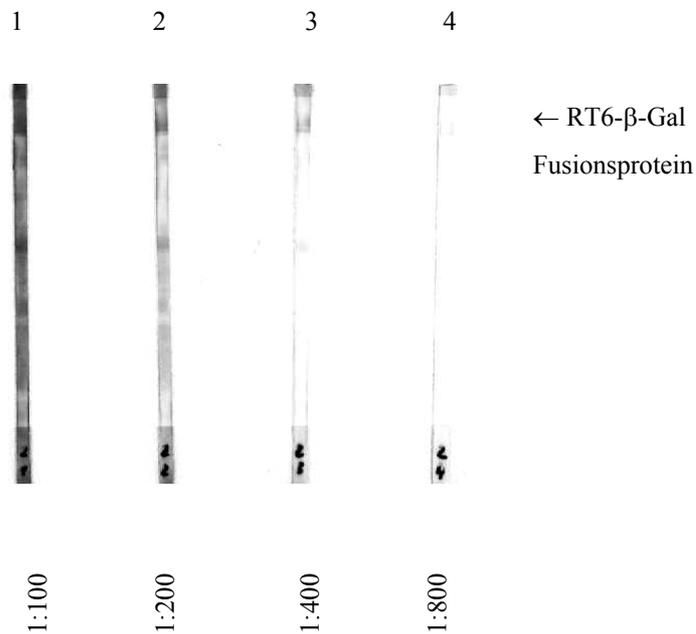


Abbildung 11: Ein wie in Abb. 8 angefertigter Immunoblot mit SDS-PAGE größenfraktionierten, RT6-β-Gal Fusionsprotein haltigen E. coli Bakterienlysaten wurde in Streifen geschnitten und mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen des eingesetzten Sekundärantikörpers, einem Ziege anti Ente IgG an Alkalische Phosphatase konjugiertem Antikörper, inkubiert. Die Detektion erfolgte wie unter Abb. 9 dargestellt. Als Primärantikörper wurde das Immuneserum E4 (1:200 in TBST) eingesetzt.

Sekundärantikörper:

- |        |                       |
|--------|-----------------------|
| Spur 1 | Ziege anti Ente 1:100 |
| 2      | Ziege anti Ente 1:200 |
| 3      | Ziege anti Ente 1:400 |
| 4      | Ziege anti Ente 1:800 |

Mit den Entenseren wurde analog den Versuchen für die Kaninchenseren verfahren. Dabei wurde auf den Einsatz des Serums E3 verzichtet, da es nachweislich keine Immunantwort gegen das eingesetzte Fusionsprotein entwickelt hatte (s. Abb. 9). Das Entenserum E4 zeigte bei den Titerstufen 1:400 und 1:800 optimale Ergebnisse.

Der zweite Antikörper wurde bei einer Verdünnung von 1:400 mit guter Sensitivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 zusammengefasst. Als Vergleich diente in diesen Versuchen wieder ein Prä-Immuneserum, das aus einer Blutentnahme vor Beginn der Immunisierungsreihe stammte.

In Abbildung 12 ist die Titrierung für den zweiten Antikörper im Kaninchensystem mit dem Immuneserum K5 dargestellt. Ein Signaloptimum ergab sich bei einer Verdünnung von 1:800. Die Versuche zeigten aber auch die weiter vorhandene Reaktion mit anderen auf den Nitrocellulose Streifen geblotteten Proteinen. Diese Reaktion sollte in weiteren Versuchen möglichst eliminiert werden.

Dazu wurde in einem nächsten Schritt die Selektion der gegen RT6 gebildeten Antikörper angestrebt.

**Abbildung 12 Titrierung des Anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörpers mittels Immunoblot-Analyse an RT6-β-Gal Fusionsprotein**

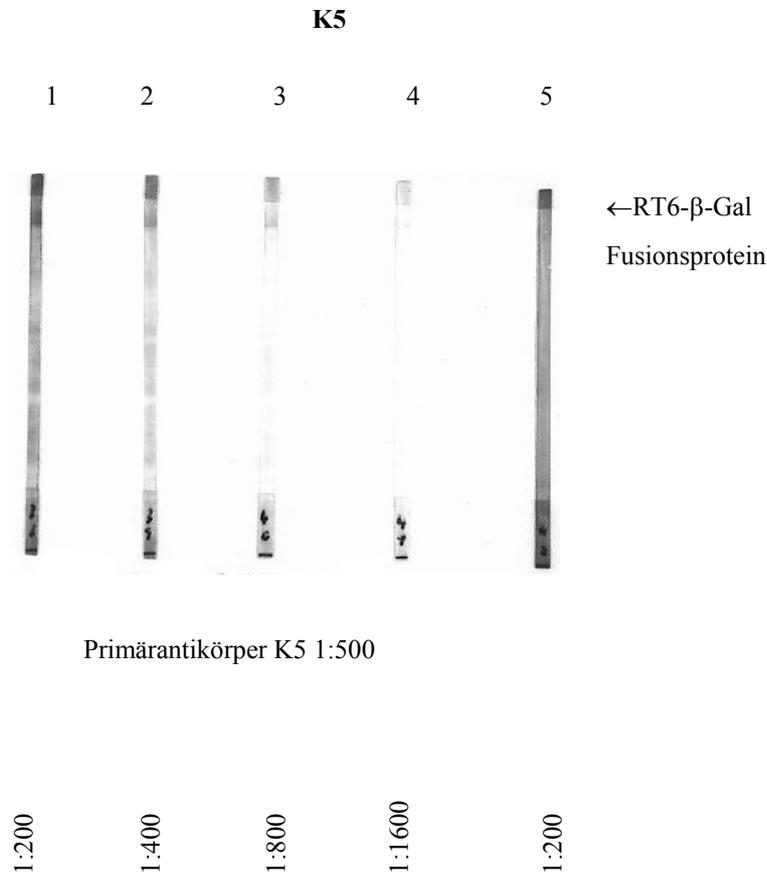


Abbildung 12: Ein wie in Abb. 8 angefertigter Immunoblot von RT6-β-Gal haltigen E. coli Lysaten wurde in Streifen geschnitten und mit Kaninchenimmenserum K5 (1:500 in TBST) inkubiert.

Als Kontrolle diente ein NC-Streifen der mit Prä-Immuserum 1:50 aus einer Blutentnahme vor Immunisierung behandelt wurde. Der zweite Antikörper ein Ziege anti Kaninchen IgG an Alkalische Phosphatase gekoppelt wurde in unterschiedlichen Verdünnungen (in TBST) eingesetzt und mit Substratlösung entwickelt.

Sekundärantikörper:

- |      |   |                                 |
|------|---|---------------------------------|
| Spur | 1 | Ziege anti Kaninchen IgG 1:200  |
|      | 2 | Ziege anti Kaninchen IgG 1:400  |
|      | 3 | Ziege anti Kaninchen IgG 1:800  |
|      | 4 | Ziege anti Kaninchen IgG 1:1600 |
|      | 5 | Ziege anti Kaninchen IgG 1:200  |

#### 4.1.3 Affinitätsreinigung RT6-spezifischer Antikörper an immobilisierten RT6- $\beta$ -Galaktosidase Fusionsproteinen

Die untersuchten Antiseren konnten im Prinzip sowohl Antikörper, die gegen Epitope der  $\beta$ -Galaktosidase gerichtet waren, als auch Antikörper, die mit RT6 Epitopen reagierten enthalten. Bislang war die Reaktion auf das in der SDS-PAGE denaturierte Fusionsprotein untersucht worden. Aus dem eingesetzten Antikörperpool des Serums von Kaninchen und Enten reagierten die entsprechenden Antikörper mit den immobilisierten Antigenen auf der Nitrocellulosemembran. Da die Immunisierung der Tiere mit der denaturierten Form des Fusionsproteins erfolgt war, konnte ein Reaktionssignal erwartet werden. Es war jedoch nicht klar, ob die Reaktivität auf die  $\beta$ -Galaktosidase Entität oder den damit fusionierten RT6 Anteil zurückzuführen war. Aus diesem Grund wurde ein Verfahren zur Entfernung der vorhandenen  $\beta$ -Galaktosidase Reaktivität im Serum entwickelt. Das Verfahren der Affinitätsreinigung setzte sich aus einem kombinierten Verfahren der Positiv- und Negativselektion zusammen. Eine zusammenfassende Darstellung der Verfahrensschritte gibt Abbildung 13 sowie die Darstellung in 3.8.2.

### **Abbildung 13 Schematische Darstellung der Affinitätsreinigung von Antikörpern aus Immuseren an immobilisiertem RT6- $\beta$ -Galaktosidase Fusionsprotein und immobilisierter $\beta$ -Galaktosidase**

Die Affinitätsreinigung fand in zwei Teilprozessen statt. In einem ersten Abschnitt wurden RT6- $\beta$ -Gal NC-Streifen mit Immuserum inkubiert – dieser Prozess wurde als Positivselektion bezeichnet. Die gebundenen Antikörper wurde eluiert und anschließend erfolgte in verschiedenen Schritten die Entfernung  $\beta$ -Galaktosidase spezifischer Antikörper – dieser Schritt wurde als Negativselektion bezeichnet.

Schritt 1: Immuserum K6 1:100 wurde in einem vorher mit FCS geblockten Eppendorf Hütchen 1h bei 4°C mit einem Immunoblotstreifen RT6- $\beta$ -Gal Fusionsprotein inkubiert



Schritt 2: Der Überstand wurde abgesogen und als Ü1 bei 4°C gelagert. In Ü1 befanden sich alle nicht an RT6- $\beta$ -Gal gebundenen Antikörper. Nach drei Waschzyklen mit TBST wurde der Immunoblotstreifen auf Filterpapier getrocknet und auf eine 3 x 3 cm große Parafinfolie gelegt.



Schritt 3: Der Immunoblotstreifen wurde dreimal mit jeweils 200  $\mu$ l Elutionspuffer (s. 3.1.3) pH 2,5 eluiert. Jeder Elutionsvorgang dauert 20 sec., dabei wurde der Elutionspuffer zügig mit einer Pipette auf dem NC-Streifen auf- und abpipettiert und anschließend in einem vorgeblockten Eppendorf Hütchen mit Tris Puffer pH 8 neutralisiert. Das gewonnene Eluat 1 enthält alle gegen RT6 und  $\beta$ -Gal gerichteten Antikörperspezifitäten. Die Schritte 1 bis 3 stellten die Positivselektion der mit RT6 und  $\beta$ -Galaktosidase reagierenden Antikörper dar.



Schritt 4: Das Eluat 1 wurde w.o. beschrieben in einem Eppendorf Hütchen mit an Nitrocellulose immobilisierter  $\beta$ -Galaktosidase inkubiert und die Elution wie beschrieben durchgeführt. Der Überstand wurde abgesogen und als Ü2 weitergenutzt. Das bei der Elution entstandene Eluat 2 wurde bei 4°C gelagert.

Ü2: RT6 Antikörperlösung teilweise aufgereinigt mit geringerer  $\beta$ -Gal Reaktivität

E2: Eluierte  $\beta$ -Gal Antikörper



Schritt 5: Die in Schritt 4 genannten Arbeitsschritte wurden an einem weiteren  $\beta$ -Galaktosidase Streifen wiederholt.

Ü3: RT6 Antikörper nach zweimaliger Entfernung von  $\beta$ -Gal spezifischen Antikörpern

E3: noch durch Elution gewonnene Antikörper gegen  $\beta$ -Galaktosidase

Ausgangspunkt war ein präparatives SDS-Gel (1,5 mm) mit Lysat aus RT6- $\beta$ -Gal transformierten E.coli Y1089. Nach erfolgter Auftrennung der Proteine in der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulose geblottet und die  $\beta$ -Gal-FP Bande mit Hilfe der Ponceau-S-Färbung identifiziert. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Verarbeitungsschritten wurde die Bande in ihrer gesamten Länge und Ausdehnung markiert und danach vorsichtig aus dem Blot herausgetrennt. Der entstandene Nitrocellulose Streifen wurde anschließend in kurze Streifen von ca. 3 cm Länge zerteilt und freie Bindungsstellen mit Kälberserum geblockt. Die Streifen wurden für Kaninchen und Entenserum getrennt bearbeitet und gelagert.

Im nächsten Schritt fand die Inkubation der NC Streifen in Entenserum und Kaninchenserum statt. Da die großen NC Streifen der präparativen Gele im Vergleich zu den kleinen NC Streifen der analytischen Gele viel mehr rekombinantes Protein enthielten, wurden auch die Seren konzentrierter eingesetzt, um möglichst viele Antikörper zu binden, so dass das Entenserum 1:20 und das Kaninchenserum 1:100 verdünnt wurden.

Nach Inkubation und Waschzyklus wurden die gebundenen Antikörper durch pH shift eluiert. Die Elution fand unter relativ milden Bedingungen bei einem pH von 2,5 statt. Nach der Elution wurden die Antikörper sofort mit Tris-Puffer neutralisiert und in neutralem Milieu gelagert.

Bei den Antikörpern handelte es sich um eine Mischung aus gegen RT6 und gegen  $\beta$ -Galaktosidase gerichteten Antikörpern.

In einem nächsten Schritt sollte die Antikörpermischung um die Fraktion der gegen  $\beta$ -Galaktosidase gerichteten Antikörper depletiert werden. Aus diesem Grund wurde das Eluat zweimal nacheinander mit einem Nitrocellulose Streifen inkubiert, auf dem sich immobilisierte  $\beta$ -Galaktosidase befand. Die ursprünglich eluierten und gegen unterschiedlichste Epitope gerichteten Antikörper wurden durch dieses Verfahren der Negativ-Selektion um die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität verringert. Gleichzeitig sollten nach den Selektionsschritten überwiegend Antikörper mit anti-RT6-Aktivität verblieben sein.

Das aufgereinigte Eluat wurde in der Western Blot Immunodetektion an Nitrocellulose Streifen mit Lysaten aus RT6- $\beta$ -Gal transformierten E. coli im Vergleich mit Lysaten aus nichttransformierten E. coli bzw. mit Lysaten aus  $\beta$ -Galaktosidase transformierten E. coli getestet. Abbildung 14 gibt die Ergebnisse der durchgeführten Immunodetektion wieder. Als Kontrolle dienten die Streifen 1 bis 6. Die Streifen 1 und 3 waren mit Fusionsprotein geblottet und als erster Antikörper wurde das Originalserum von K6 (Ori) in zwei Verdünnungsstufen eingesetzt. Man beachte die Reaktivität des Serums noch bei einer Verdünnung von 1:20.000. Das eingesetzte Bakterienlysate war der etablierte E. coli Stamm Y1090 in diesem Falle ohne Induktion des lysogenen Zyklus. Im Vergleich zum Fusionsprotein aus dem gleichen

Bakterienstamm wurde die reichliche Produktion des Fusionsproteins nach Induktion der Produktion des eingeschleusten Fremdproteins deutlich.

Ü1 stellte die Serumfraktion nach Entfernung der RT6 spezifischen Antikörper und der gegen  $\beta$ -Galaktosidase gerichteten Antikörper dar. Erwartet wurde in diesem Fall noch eine Restreaktivität bei einem angenommenen Antikörperüberschuss. Möglicherweise war die Verdünnungsstufe mit 1:1000 zu hoch gewählt, da sich keine Anfärbbarkeit ergab.

In E1 befanden sich alle nach pH-shift eluierten Antikörper gegen beide antigenen Spezifitäten. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden jeweils gleiche Verdünnungen gewählt. Es zeigte sich die deutliche Reaktivität im Bereich des Fusionsproteins aber auch die bekannte unspezifische Reaktivität mit verschiedenen Proteinen auf dem NC-Streifen.

Die Fraktionen E2 und E3 enthielten eluierte Antikörper gegen  $\beta$ -Galaktosidase. Sie entstanden durch Inkubation von E1 mit auf NC-Streifen gebundener  $\beta$ -Galaktosidase. In diesen beiden Schritten sollten die im Serum befindlichen Antikörper gegen den Fusionspartner des RT6 eliminiert werden.

Besonders interessant war die verminderte Reaktion der Antikörper mit den Streifen 14 und 16, sowie die deutliche Reaktion mit Fusionsprotein auf den Streifen 13 und 15. Die Aufreinigung von RT6 spezifischen Antikörpern mit Hilfe der Affinitätsreinigung an NC-Streifen war gelungen. Dies gelang nahezu komplett wie die letzten vier Streifen demonstrieren. Die Streifen 14 und 16 sind mit  $\beta$ -Galaktosidase geblottet. Es zeigte sich keine Reaktion mehr im Bereich der Bande für das Protein der  $\beta$ -Galaktosidase im Vergleich zu den übrigen Streifen. Erfreulich war die deutliche Reaktion und im Vergleich mit der E1 Fraktion das ähnliche Anfärbverhalten der Streifen 13 und 15, mit den aufgereinigten RT6 spezifischen Antikörpern.

**Abbildung 14** Testung der aus Kaninchenserum K6 affinitätsgereinigten Antikörper mittels Immunoblot-Analysen an  $\beta$ -Gal und RT6- $\beta$ -Gal haltigen E. coli Lysaten

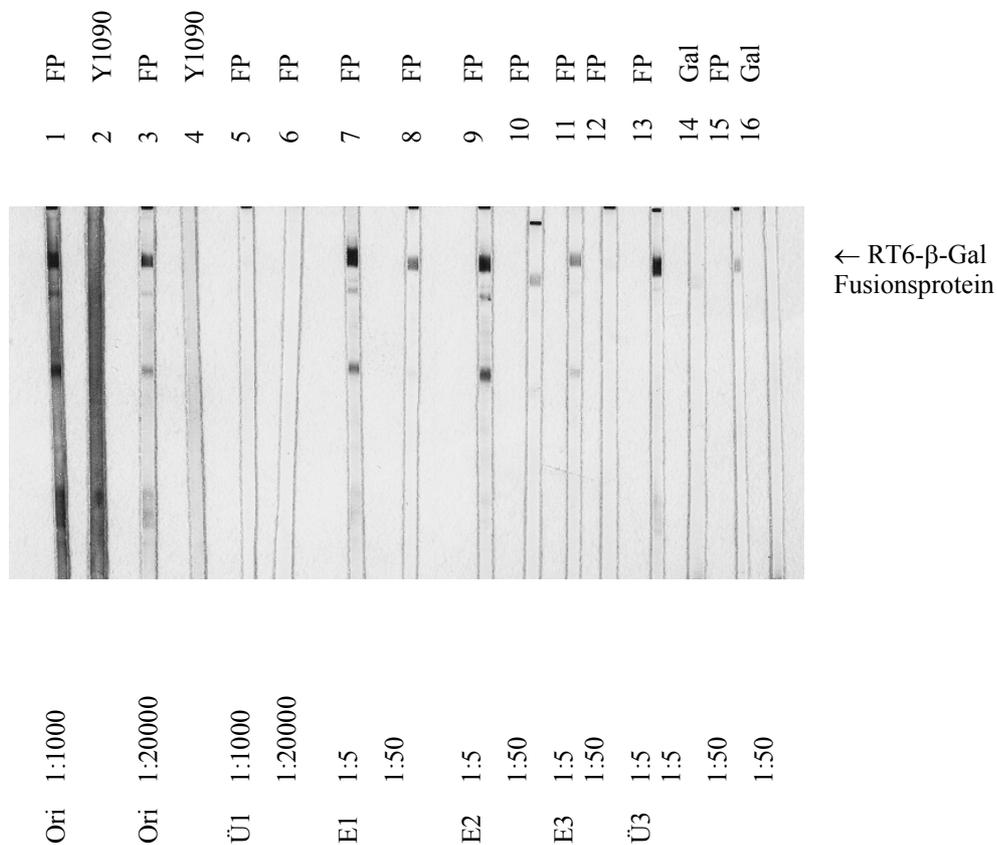


Abbildung 14: Ein Immunoblot (Vorgehen wie unter Abb. 8 beschrieben) mit RT6- $\beta$ -Gal Fusionsprotein (FP) haltigen E. coli Lysaten wurde in Streifen geschnitten und mit Kaninchenserum K6 (Ori) bzw. mit den affinitätsgereinigten Antikörpern (s. Abb. 13: Ü1, E1, E2, E3, Ü3) inkubiert. Als Kontrolle wurden jeweils nichtgebundene sowie von Streifen eluierte Antikörper vergleichend untersucht. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte wie unter Abb. 8 mit an Alkalische Phosphatase gekoppelten Ziege anti Kaninchen IgG. Für Vergleichszwecke wurden die Antikörper haltigen Fraktionen an NC-Streifen von nicht transformierten Wildtyp E. coli (Y 1090) und nur mit  $\beta$ -Galaktosidase transformierten E. coli (Gal) getestet. Als erster Antikörper wurden durch Affinitätsreinigung gewonnene Antikörper des polyvalenten Kaninchenserums K6 in unterschiedlichen Verdünnungen und aus unterschiedlichen Aufreinigungsschritten (s. Abb. 13) eingesetzt.

Primärantikörper:

Spur 1/2	Immuserum K6 1:1000	11	E3 1:5
3/4	Immuserum K6 1:2000	12	E3 1:50
5	Ü1 1:1000	13/14	Ü3 1:5
6	Ü1 1:2000	15/16	Ü3 1:50
7	E1 1:5		
8	E1 1:50		
9	E2 1:5		
10	E2 1:50		

(Ori: eingesetztes Originalserum K6 in verschiedenen Verdünnungen, Ü1 Serum nach erfolgter Inkubation an  $\beta$ -Gal, E2 bis E3 Eluate der Affinitätsreinigung in verschiedenen Verdünnungen, Ü3 aufgereinigter Anti-RT6 Antikörper)

Mit dem Immuserum K5 wurde ebenfalls eine Affinitätsreinigung nach dem in Abbildung 13 dargestellten Schema durchgeführt (s. Abb. 15). Das Immuserum wurde in einer Ausgangsverdünnung von 1:100 eingesetzt. In dem Überstand nach der Erstinkubation mit dem RT6- $\beta$ -Gal haltigen NC Streifen war ein deutlicher Signlrückgang nachweisbar (Spuren 5-8), was für eine Bindung der Antikörper an den NC-Streifen spricht. Tatsächlich zeigten die vom NC-Streifen eluierten Antikörper eine deutliche Reaktivität sowohl mit der reinen  $\beta$ -Galaktosidase (Spur 9) als auch mit dem RT6- $\beta$ -Gal Fusionsprotein (Spur 10). Während in dem Überstand Ü2 (nach Selektion an NC Streifen mit reiner  $\beta$ -Galaktosidase) noch eine deutliche Reaktivität des  $\beta$ -Gal Streifens sichtbar war (Spur 13), war diese nach einem weiteren Schritt der Negativselektion kaum noch nachweisbar in Ü3 (Spur 17). Es blieb aber weiterhin eine Rest-Reaktivität mit dem RT6- $\beta$ -Galaktosidase Fusionsprotein (Spur 18) bestehen.

**Abbildung 15** Testung der aus Kaninchenserum K5 affinitätsgereinigten Antikörper mittels Immunoblot-Analysen an  $\beta$ -Gal und RT6- $\beta$ -Gal haltigen *E. coli* Lysaten

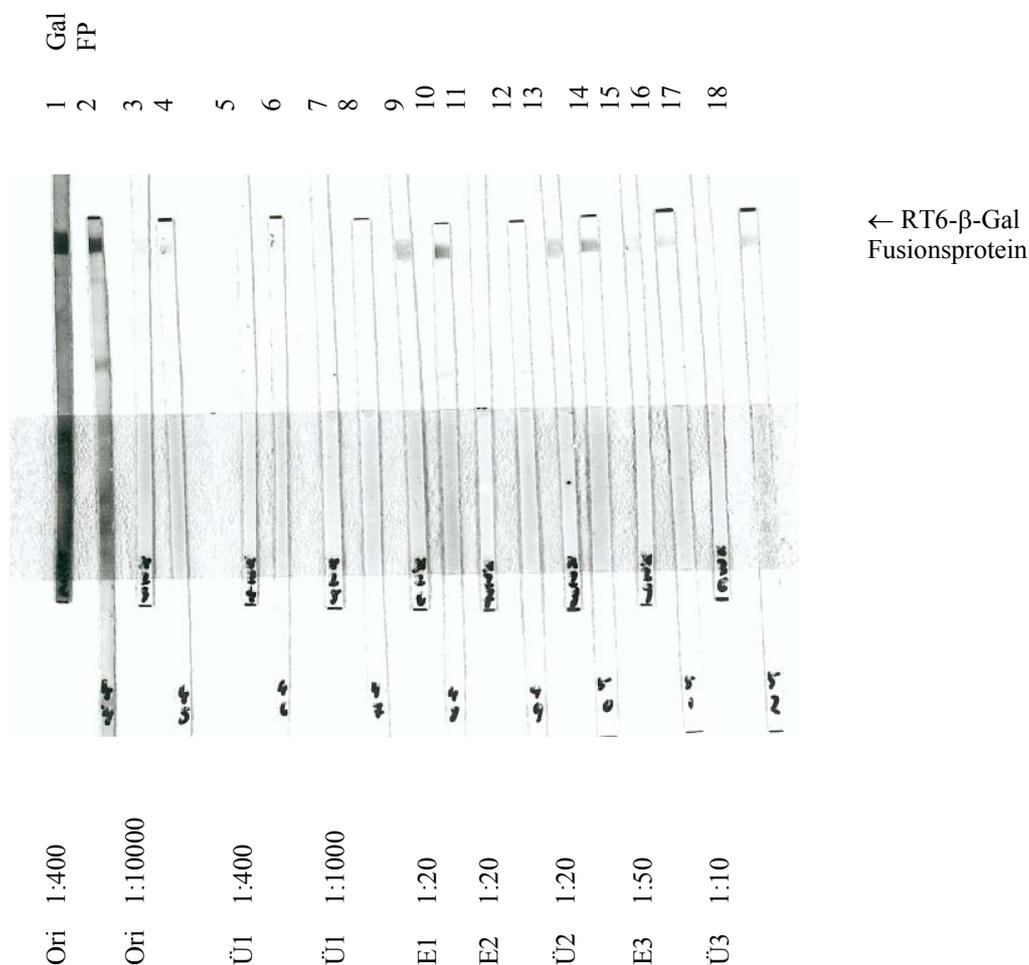


Abbildung 15: Je ein Immunoblot von einem  $\beta$ -Galaktosidase haltigen *E. coli* Lysat (Gal) und einem RT6- $\beta$ -Gal Fusionsprotein haltigen *E. coli* Lysat (FP) wurde in Streifen geschnitten und mit Kaninchenserum K5 (Ori) bzw. mit den aus diesem Serum affinitätsgereinigten Antikörpern (s. Abb. 13: Ü1, E1, E2, Ü2, E3, Ü3) inkubiert. Als Kontrolle wurden jeweils nichtgebundene sowie im Affinitätsverfahren in verschiedenen Schritten gewonnene Antikörper vergleichend untersucht. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem Ziege anti Kaninchen Alkalische Phosphatase konjugiertem IgG Antikörper.

Zum besseren Vergleich wurden die Streifen der Fusionsprotein haltigen Lysate (gerade Zahlen) etwas nach unten verschoben, so dass die Bande des Fusionsproteins (FP) etwa auf gleicher Höhe mit der Galaktosidase Bande zu sehen ist.

Erstantikörper:

Spur 1/2	Immunsereum K5 1:400
3/4	Immunsereum K5 1:10000
5/6	Ü1 1:400
7/8	Ü1 1:10000
9/10	E1 1:20
11/12	E2 1:20
13/14	Ü2 1:20
15/16	E3 1:20
17/18	Ü3 1:10

(Streifen mit ungeraden Zahlen 1-17 enthalten Galaktosidase, Streifen mit geraden Zahlen 2-18 enthalten RT6- $\beta$ -Gal Fusionsprotein)

Die dargestellten Versuche wurden mit ähnlichem Resultat auch für die Entenseren durchgeführt. Dort zeigte sich jedoch eine geringe Reaktivität in ÜIII, die den bereits in den Vorversuchen gefundenen Befund der geringeren Immunstimulation im Rahmen der Immunisierung unterstützte. Die Enten hatten nicht die hohen Antikörpertiter gegen das RT6 gebildet, wie sie bei den Kaninchen K5 und K6 gefunden wurden.

Die Immunsereen erwiesen sich als sehr gute Hilfsmittel für die Charakterisierung des RT6. Sie ließen sich nicht nur in hohen Verdünnungsstufen einsetzen, sondern es konnten auch durch Affinitätsreinigung RT6 spezifische Antikörper gewonnen werden. In weiteren Versuchen erfolgte die Aufreinigung größerer Mengen RT6 spezifischer Antikörper mit Hilfe der Säulenaffinitätschromatografie. Die dabei gewonnenen Antikörper wurden danach an verschiedenen T-Zellpräparationen eingesetzt.

## **4.2 Nachweis von nativem RT6 in T-Zellen und T-Zelllinien**

### **4.2.1 Vergleichende FACS-Analyse der RT6 Expression auf primären T-Zellen der Ratte und auf der Ratten T-T Hybridomzelllinie EpD3 mit dem monoklonalen Antikörper Gy1/12**

Der zweite Abschnitt des Ergebnisteils beschreibt die Untersuchungen zum Nachweis des nativen RT6 aus T-Zellen der Ratte bzw. der Ratten T-T Hybridomzelllinie EpD3. Es wurden zunächst vergleichende FACS-Analysen des Expressionsniveaus durchgeführt. Mit Hilfe des immobilisierten RT6.2 spezifischen Antikörpers Gy 1/12 wurden große Mengen RT6.2 aus solubilisierten EpD3 Zellen gewonnen. Das affinitätsgereinigte RT6.2 wurde zur Untersuchung der Reaktivität der Immunsereen von Kaninchen und Ente eingesetzt. Den

Abschluss bildete eine Versuchsreihe, das RT6 homologe Protein in Lysaten aus Maus und humanen T-Zellen nachzuweisen.

Zunächst wurde natives RT6.2 auf T-Zellen von Ratten unter Einsatz des RT6.2 spezifischen Antikörpers Gy 1/12 in der Fluoreszenzanalyse dargestellt. Es wurde ebenfalls ein Vergleich des Expressionsniveaus zwischen der Hybridomzelllinie EpD3 und natürlichen Lymphknotenzellen durchgeführt.

Ausgangspunkt für diese Versuche war die EpD3 Kultur, sie wurde auf ihr Wachstumsverhalten untersucht und ein Teil der Zellen mit dichtem Wachstum ( $2 \times 10^5$  Zellen/ml) in Kulturröhrchen überführt, zentrifugiert und mit Medium gewaschen. Pro Ansatz wurden für die Fluoreszenzanalyse  $7 \times 10^5$  EpD3-Zellen eingesetzt.

Die Lymphknotenzellen wurden durch Präparation einer LewB Ratte gewonnen (s. 3.3). Nach Durchführung einer Äthernarkose mit anschließendem Entbluten durch Herzpunktion wurde die Bauchhaut aufgetrennt, die Lymphknotenstationen abgesucht und die einzelnen Lymphknoten präpariert. Unter dem Mikroskop wurden die Lymphknoten zerzupft und gespült. Abschließend wurde die Zellzahl bestimmt und es wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz verwendet.

Neben den getrennt durchgeführten Untersuchungen von EpD3-Fluoreszenz und Lymphozyten-Fluoreszenz wurde auch ein Ansatz mit Mischung beider Zellpopulationen durchgeführt. Für diesen Ansatz wurden  $2 \times 10^5$  EpD3-Zellen und  $5 \times 10^5$  Lymphozyten eingesetzt.

Die Inkubation mit dem Erstantikörper wurde mit Gy1-12 entweder als unverdünntem Hybridomüberstand oder biotinyliert in einer Verdünnung 1:50 durchgeführt. Der biotinylierte Antikörper Gy1-12 wurde in unserem Labor hergestellt.

Als Zweitantikörper wurde Kaninchen anti Ratte IgG FITC markiert oder Streptavidin FITC markiert eingesetzt. Nach mehreren Waschzyklen wurden die Zellen in 2% Paraformaldehyd fixiert.

Die anschließende Auswertung fand sowohl mit dem Fluoreszenzmikroskop als auch mit dem Fluoreszenz Activated Cell Sorter (FACS, Becton Dickinson) statt. Die FACS Analysen der Versuche sind in Abbildung 16 dargestellt.

Es war gelungen, neben den B- und T- Zellen auch die EpD3 Zellen darzustellen. Dabei wiesen die Hybridomzellen eine deutlich stärkere Fluoreszenz als die natürlichen Lymphozyten auf. Die geringere Fluoreszenz der Lymphozyten entsprach der bekannten geringen Expression des RT6.

**Abbildung 16 FACS-Analyse der RT6 Expression auf primären T-Zellen der Ratte und auf der Ratten T-T Hybridomzelllinie EpD3 mit dem monoklonalen, RT6.2 spezifischen Antikörper Gy 1/12**

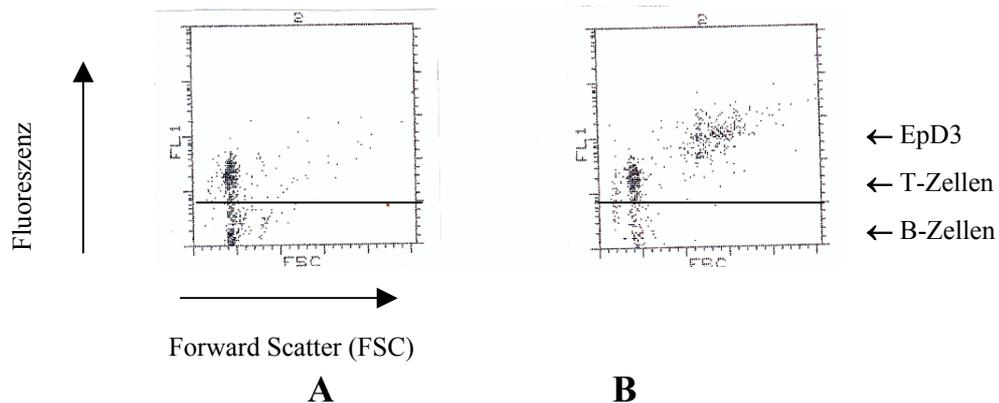


Abbildung 16: Primäre Lymphknoten Zellen der Ratte wurden entweder ohne (Abb. 16 A) oder gemeinsam mit EpD3 Zellen (106 Zellen/100 µl RPMI, Abb. 16 B) mit dem biotinylierten RT6.2 spezifischen, monoklonalen Antikörper Gy 1/12 (1 µg/ml) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mittels FITC konjugiertem Streptavidin detektiert und mit einem Durchflußzytometer (FACS-Scan) ausgewertet.

Dargestellt ist die Vorwärtsstreuung (FSC) als Maß der Zellgröße im Vergleich zur Fluoreszenz. Die durchgezogene Linie markiert die Trennung von nichtmarkierten und markierten Zellen. Die Lage der B-Zellen, T-Zellen und EpD3 Zellen ist durch Pfeile gekennzeichnet.

(Einstellungen: gates off, events 5000)

#### 4.2.2 Affinitätsreinigung von nativem RT6 aus EpD3 Zellsolubilisaten an immobilisiertem Gy 1/12 Antikörper im Säulenverfahren

Aus Voruntersuchungen (Abb. 16 und Thiele et al. 1986) war bekannt, dass die RT6 Expression nativer T-Zellen nicht sehr ausgeprägt war. Anders als beim Einsatz von Fusionsprotein, das in bestimmbarer Menge zur Verfügung stand, musste zum Nachweis des natürlichen RT6 einerseits eine möglichst große Menge RT6, andererseits eine möglichst reine Population RT6-spezifischer Antikörper eingesetzt werden, um ein Signal überhaupt nachweisen zu können. Aus diesem Grund sollte im Positivselektionsverfahren der affinitätschromatografischen Aufreinigung ein RT6 Antikörperpool aus den polyklonalen

Seren von Kaninchen und Ente hergestellt werden. Zweitens sollte versucht werden, die Nachweismethoden zu optimieren und möglicherweise andere Detektionssysteme neben der Alkalischen Phosphatasereaktion zu etablieren.

Zunächst wurden zwei mögliche Vorgehensweisen betrachtet, ausreichend Antigen (RT6) für die Aufreinigung der Antiseren zu gewinnen. Es war möglich Versuchstiere z.B. Ratten in großer Menge zu züchten und anschließend die Lymphknoten zu präparieren und das RT6 über T-Zellpräparationen, -Separation und Lysierung zu gewinnen. Das Problem bei diesem Vorgehen war die große Menge an Versuchstieren, die nötig gewesen wäre, um solch einen Ansatz zu verfolgen. Zu diesem Zeitpunkt lag die Ausbeute bei guter Präparation etwa bei  $1 \times 10^8$  T-Zellen pro Ratte, so dass von mindestens 100 Ratten ausgegangen werden musste. Eine weitere Möglichkeit bestand in der reichlichen Kultivierung einer RT6 exprimierenden Zelllinie. Das in unserem Labor entwickelte EpD3 T-T Hybridom (Koch 88 ) exprimiert RT6 in nachweisbarer Menge aber auch hier gab es ein Problem. Die Expression war nicht stabil und musste laufend kontrolliert werden. Dies konnte durch regelmäßige Fluoreszenzanalysen geschehen. Darüber hinaus mussten RT6 exprimierende Zellen durch regelmäßiges „Panning“ auf mit Antikörpern benetzten Petrischalen selektioniert werden.

Nach Abwägen beider Möglichkeiten entschied ich mich auch aus dem Grund für die Zellkultur das Ziel ohne den Einsatz vieler Versuchstiere zu erreichen.

Das EpD3 Hybridom war aus der Fusionierung von Lymphknotenzellen einer immunstimulierten DA Ratte mit C58NT Rattenthymomzellen entwickelt worden. (Koch 1985, Silva 1983) Nach dem Auftauen wurden die Zellen zunächst in eine six-well Schale in Verdünnungen von 1:2 bis 1:32 gegeben und am nächsten Tag mit Metrizamid gereinigt (Maniatis 82). Der Prozess des Auftauens wurde dabei so schnell wie möglich durchgeführt, um möglichst wenig Zellen durch intrazelluläre Proteasenaktivität zu verlieren. Die Reinigung mit Metrizamid wurde durch Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Sie diente der Trennung der lebenden von toten Zellen. Danach wurden die verbliebenen Zellen erneut in Petrischalen verteilt und im Zellkulturschrank inkubiert. Tägliche Zählungen mit Hilfe der Neubauer Kammer ergaben eine Teilungszeit von etwa 14 Stunden. Da große Zellmengen erforderlich waren, war das Kultivieren der Zellen in Petrischalen umständlich, daher entschloss ich mich Kulturflaschen zu verwenden, die ein wesentlich größeres Volumen fassten und zudem auch besser im Kulturschrank zu schichten waren. Bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter Kultur wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden mehrfach gewaschen und erneut zentrifugiert. Die entstehenden Pellets wurden in Solubilisierungspuffer (s. 3.1.3) aufgenommen, inkubiert und abschließend die Kerne durch Zentrifugation pelletiert. Pro Liter Kultur-Ansatz (20 Kulturflaschen) entstanden Solubilisate aus Zellequivalenten von  $1 \times 10^9$  Zellen, die bis zur weiteren Nutzung bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren wurden.

Voraussetzung war neben der erforderlichen Zellzahl auch die RT6 Expression. Die Kontrolle der RT6 Expression erfolgte durch regelmäßige Immunfluoreszenzanalysen, bei denen die

Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen/Ansatz) mit dem monoklonalen Antikörper Gy1-12 (Hybridomüberstand) inkubiert wurden. Danach wurde ein FITC markierter Zweitantikörper, in den meisten Fällen Maus anti-Ratte IgG FITC konjugiert, eingesetzt. Leider existiert keine Abbildung dieser Fluoreszenzanalysen, die aufgrund ihrer Farbgebung und Brillanz im Mikroskop sehr eindrucksvoll sind. Die EpD3 Zellen stellten sich in der Immunfluoreszenz als kugelige Zellen mit gelben Punkten dar, die sowohl eine gute Punkt- als auch Raumstruktur ergaben.

Durch wiederholte Zellernten war es gelungen, eine große Menge Zellsolubilisat herzustellen. In dem Solubilisat befand sich das interessierende Protein RT6. Zur Gewinnung des RT6 wurde die Säulenaffinitätschromatografie eingesetzt (s. Abb. 6). Als Säulenmatrix wurde Protein A Sepharose verwendet, das mit einem Kaninchen anti Ratte Antikörper, der Fc spezifisch war, vernetzt wurde. Der Zweitantikörper war der monoklonale Antikörper Gy 1-12, der als Hybridomüberstand in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Bei einer Dichte von  $20 \mu\text{g/ml}$  und einem reduzierten Bindungsverhalten für Gy1-12 (Kashan 1989) wurde der monoklonale Antikörper im Überschuss eingesetzt. Die gebundenen Antikörper wurden durch Behandlung der Säule mit dem crosslinker DPD kovalent kreuzvernetzt (s. 3.8.1). Vor jedem Schritt und nach jedem Schritt wurde ein Aliquot der Matrix für den Einsatz in der SDS-PAGE asserviert. Die erfolgte Vernetzung der einzelnen Proteine konnte so nachgewiesen werden.

Der Zusammenbau der Säule fand in einer Pipettenspitze (Crystal pipet tip™) statt (s. Abb. 6). Das Solubilisat der EpD3 Zellen wurde nach dem Auftauen langsam über die Säule gegeben und diese anschließend reichlich mit RPMI gewaschen. An den Waschzyklus schloss sich ein enzymatischer Abbau durch PI-PLC an. Dies sollte die bestehenden Verbindungen von RT6 mit seinem hydrophoben Glycosylphosphatidinositol-Membrananker lösen und somit die Löslichkeit von RT6 in detergezienfreien Puffern sicherstellen (Koch 1990).

Anschließend erfolgte die Elution mit pH-shift in einem alkalischen Milieu bei pH 11,5. Die Elution wurde durch Messung der eluierten Proteinfraction kontrolliert. Es wurden zu Beginn der Elution pro Probengefäß wenige Tropfen aufgefangen, um einen Hauptteil des RT6 in wenigen Fraktionen zu konzentrieren.

Der Nachweis des affinitätsgereinigten RT6 aus zwei Säulen wurde im Immunoblot Verfahren dokumentiert (Abb. 17). Auffällig war für beide Säulen, dass der Hauptteil des eluierten RT6 sich in der E2 Fraktion befand.

Durch die zwei internen Kontrollen der Proteinmessung und der im Anschluss an die Elution durchgeführten SDS-PAGE wurde die Hauptfraktion des RT6 bestimmt, um für die weiteren Versuche eingesetzt zu werden.

**Abbildung 17 Nachweis des affinitätsgereinigten nativen RT6 aus EpD3 Zelllysaten in einer Immunoblot Analyse mit Immunsersum K6**

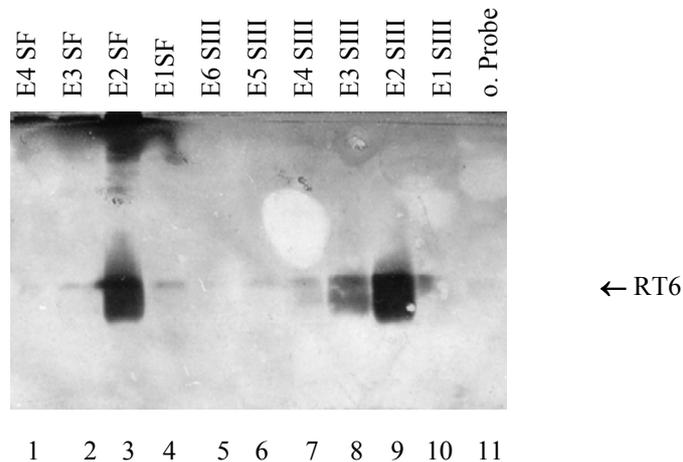


Abbildung 17: EpD3 Zellen wurden durch Inkubation in Solubilisierungspuffer (s. 3.1.3) für 20 min. bei 37°C solubilisiert. Zellkerne und andere nicht lösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt. Das Solubilisat von 10<sup>9</sup> Zellen (in 50 ml Solubilisierungspuffer) wurde über eine Affinitätssäule (s. Abb. 6) mit an Protein A Sepharose immobilisiertem RT6 spezifischen Antikörper Gy 1/12 gegeben. Um den GPI-Anker zu entfernen, wurde 100 µl PI-PLC haltiger Puffer auf die Säule gegeben. Für den PI-PLC Verdau wurde der Durchfluss unterbunden, und die Säule für 1h bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von Elutionspuffer (Diethylamin, pH 11,5) in sechs 100 µl Fraktionen eluiert und aufgefangen. Aliquots der Eluate wurden mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese größenfraktioniert, auf NC geblottet und mit Kaninchenserum K6 (1:5000) und Alkalische Phosphatase konjugiertem Zweitantikörper (Ziege anti Kaninchen IgG, 1:2000) immunodetektiert.

Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei Aufreinigungen an unterschiedlichen Säulen. Die Säule der Spuren 1-4 war bereits dreimal für Aufreinigungen verwendet worden (SF). Die Säule der Spuren 5-10 war frisch angefertigt worden (SIII).

#### 4.2.3 Nachweis RT6 spezifischer Antikörper aus affinitätschromatografisch aufgereinigten Immunsereen aus Kaninchen und Ente

Nachdem es gelungen war RT6 affinitätschromatografisch aufzureinigen, wurde dies in der Affinitätsreinigung der polyklonalen Immunsereen zur Gewinnung spezifischer anti RT6 Antikörper eingesetzt.

Ausgangspunkt war ein präparatives SDS-PAGE Gel mit aus EpD3 Zellen aufgereinigtem RT6 (SF E2, s. Abb. 17). Im Gel wurde eine große Tasche abgesteckt, die mit einem Probenvolumen von 300 µl (100 µl Eluat und 200 µl SPB) beladen wurde, zu beiden Seiten liefen Proteinmarker mit. Das Zellequivalent war 80% der eingesetzten Ausgangsmenge von  $1 \times 10^9$  Zellen entsprechend  $8 \times 10^8$  Zellen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im Prot Resolv™ Elektrophorese Apparat wurden die Proteine auf PVDF Membran geblottet und geblockt.

Nach Identifikation der Proteinbande durch eine Coomassie Färbung (analog der NC Färbung mit Ponceau S) wurde diese in toto aus der Membran herausgeschnitten und anschließend in gleiche etwa 2 cm lange Streifen geschnitten. Nach Blocken in TBST wurden die PVDF Streifen über Nacht in Immunsereum inkubiert. Nach Entfernung aus dem Serum wurden die Streifen mehrfach mit TBST gewaschen und die gebundenen Antikörper anschließend durch pH-shift mit Eluatpuffer eluiert. Bei diesen Antikörpern handelte es sich um spezifische nur das RT6 bindende Antikörper.

Die im positivem Epitopselektionsverfahren aufgereinigten Antikörper wurden im Immunoblot Verfahren wie in Abb. 17 beschrieben getestet. Ein Aliquot des aus EpD3 Zellen aufgereinigtem RT6 Säuleneluat (SIII E4, s. Abb. 17) wurde in der SDS-PAGE größenfraktioniert und im Semi-dry Verfahren auf eine PVDF Membran geblottet. Als erster Antikörper wurden sowohl die Originalseren aus Ente E2 (Spur 1) und Kaninchen K6 (Spur 10) als auch die aus diesen Seren affinitätschromatografisch aufgereinigten RT6 spezifischen Antikörper (E2 Spuren 2-4 und 8-9, K6 Spuren 26-28) eingesetzt, die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

Die affinitätsgereinigten Antikörper zeigten im Vergleich zu den Originalseren von Ente (E2) und Kaninchen (K6) keine unspezifischen Detektionssignale. Im Vergleich zu den Anfangsversuchen (Abb. 9 – 12) konnte eine deutliche Verbesserung der Signalintensität erreicht werden. Bestätigt wurde in diesem Versuch die geringe Reaktivität von K4 auf die erfolgte Immunisierung (Spuren 17-22), diese war bereits in den ersten Versuchen aufgefallen. Die Hauptfraktionen der Antikörper wurden bei E2 bereits bei pH 3 eluiert (Spur 2), bei K5 und K6 wurden deutlich mehr Antikörper bei pH 2,5 als bei pH 3,0 eluiert (vergleiche Spur 23 vs. 22 und Spur 26 vs. 25).

Mit K48 wurde ein neues Immunsereum eingesetzt, das im Verlaufe der Versuche gewonnen wurde. Dabei handelte es sich um ein Kaninchen, das mit einem an Ovalbumin gekoppelten Peptid immunisiert worden war. Das Peptid war die abgeleitete Aminosäuresequenz (AS 48-

60) des Maus Rt6, das in diesem Bereich nur in zwei Aminosäuren von der Sequenz des Ratten RT6.2 abweicht (s. Abb. 21, Koch et al. 1990), K48 zeigte in allen Elutionsstufen eine gute Reaktivität. Es konnte gezeigt werden, dass ein aus Maus Rt6.2 abgeleitetes Peptid in der Lage war eine Immunantwort mit Bildung Ratten-RT6 spezifischer Antikörper zu induzieren, die immobilisiertes auf PVDF Membran geblottetes RT6 detektieren konnten. Die Antikörper wurden bei der Affinitätsreinigung sowohl an neuen Streifen mit erster Selektion als auch an älteren Streifen (sechste Selektion) eingesetzt, und es konnte gezeigt werden, dass Qualität und Quantität der damit gewonnenen Antikörper nicht abnahmen. Daher wurden die Streifen nach dem Einsatz in der Affinitätsreinigung mehrfach mit TBST gewaschen und unspezifische Bindungsstellen geblockt. Abschließend wurden die Streifen getrocknet und in einem Röhrchen kühl gelagert.

**Abbildung 18 Nachweis RT6 spezifischer Antikörper aus affinitätsgereinigten Immunsereen von Kaninchen und Ente**

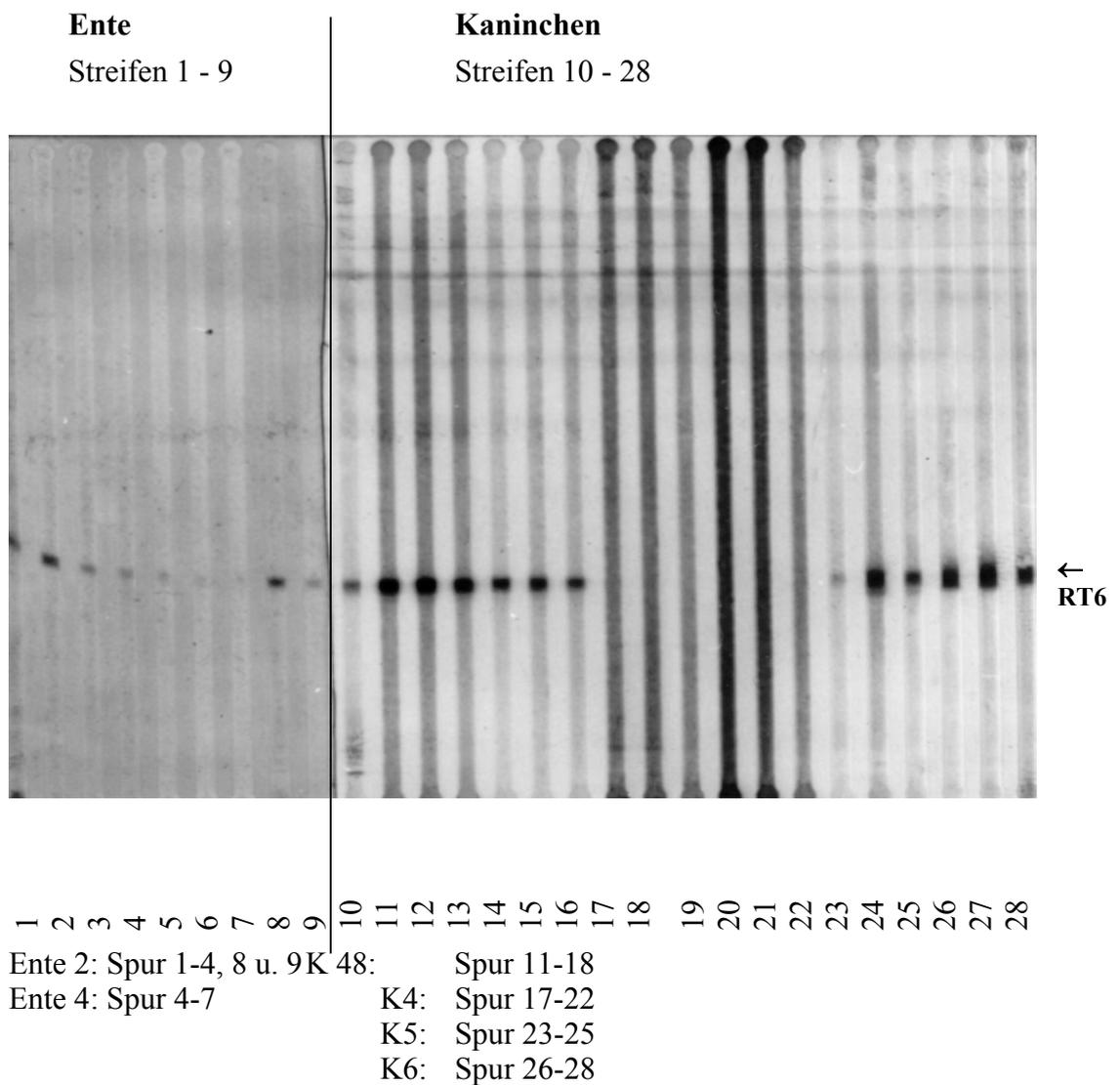


Abbildung 18: Natives RT6 wurde wie in Abb. 17 dargestellt aus EpD3 Zellsolubilisat aufgereinigt und in einer präparativen SDS-PAGE größenfraktioniert. Danach wurde es auf eine PVDF Membran geblottet (100 µl Eluat 4 entsprechen ca.  $1 \times 10^8$  Zellequivalenten). Die PVDF Membran wurde in eine Immunodetektionswanne gespannt, so dass einzelne „Wells“ für die getrennte Inkubation mit Ente und Kaninchen Erstantikörpern zur Verfügung standen (s. Legende). Als zweiter Antikörper wurde für die Enten ein Ziege anti Ente IgG an Alkalische Phosphatase gekoppelt (1:400 in TBST) eingesetzt. Für die Kaninchen wurde als Zweitantikörper ein Ziege anti Kaninchen IgG biotinyliert (1.4000 in TBST) verwendet.

Nach der Immunodetektion fiel bei dem Immunoblot ein „Smiling“ der Proteinbande auf, der die Immunodetektion nicht beeinflusste und wahrscheinlich auf ein ungleichmässiges Laufverhalten in der SDS-PAGE zurückzuführen war.

Die Immunodetektion erfolgte mit affinitätsgereinigten Antikörpern, die im Ein-Schritt-Verfahren in der sog. Positivselektion gewonnen wurden. Für die Immunodetektion wurden die von (aus EpD3 Zellen affinitätsgereinigten) RT6 eluierten Antikörper 1:50 (K4, K5, K6, K48) bzw. 1:20 (E2, E4) weiterverdünnt. Um die Güte der Aufreinigung beurteilen zu können, wurde als Kontrolle bei den Entenantikörpern ein Streifen mit verdünntem Originalserum inkubiert (1:200, Spur 1, E2). Das gleiche Vorgehen wurde für die Kaninchen gewählt (1:4000, Spur 10, K6).

Erster Antikörper:

Streifen	Erster Ak.	Verdg.	Elutionsmilieu (pH) u. Selektionshäufigkeit		Streifen	Erster Ak.	Verdg.	Elutionsmilieu
1	E2	1:200		1.	16	K48	1:50	2,0
2	E2	1:20	3,0	6.	17	K4	1:50	3,0
3	E2	1:20	2,5	6.	18	K4	1:50	2,5
4	E2	1:20	2,0	6.	19	K4	1:50	2,0
5	E4	1:20	3,0	6.	20	K4	1:50	3,0
6	E4	1:20	2,5	6.	21	K4	1:50	2,5
7	E4	1:20	2,0	6.	22	K4	1:50	2,0
8	E2	1:20	3,0	1.	23	K5	1:50	3,0
9	E2	1:20	3,0	6.	24	K5	1:50	2,5
10	K6	1:4000			25	K5	1:50	2,0
11	K48	1:50	3,0		26	K6	1:50	3,0
12	K48	1:50	2,5		27	K6	1:50	2,5
13	K48	1:50	2,0		28	K6	1:50	2,0
14	K48	1:50	3,0					
15	K48	1:50	2,5					

#### 4.2.4 Nachweis von RT6 in Gesamtzelllysaten aus EpD3 Hybridomzellen und primären T-Zellen der Ratte, der Maus und des Menschen

Die Affinität und Spezifität der eingesetzten Antikörper wurde an Lymphozytenpräparationen der Ratte, der Maus und des Menschen ausgetestet.

Es wurden dabei solubilisierete Zellen der Ratte, der Maus und des Menschen eingesetzt. Als Kontrollen dienten solubilisierete EpD3 Hybridomzellen und aus EpD3 Zellsolubilisat aufgereinigtes RT6 Säuleneluat.

Die eingesetzten T-Zellen der Ratte wurden wie unter 3.9.1 beschrieben, gewonnen und mit Dynabeads separiert. Nach Zählung der gewonnenen Zellen wurden diese solubilisieret und ein Zellequivalent von  $5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt.

Die EpD3 Zellen wurden ebenfalls wie unter 3.4.6 beschrieben geerntet, gezählt und anschließend solubilisieret. Das entstandene Solubilisat wurde mit  $5 \times 10^5$  Zellequivalenten eingesetzt.

Nach diversen Vorversuchen mit affinitätschromatografisch aufgereinigtem RT6 und anschließender elektrophoretischer Auftrennung in der SDS-PAGE wurde das Säuleneluat in einer Verdünnung von  $2 \times 10^6$  Zellequivalenten eingesetzt. Wie in der Abbildung 17 dargestellt lag diese Verdünnung ebenfalls im optimalen Arbeitsbereich und sollte für eine gute Sichtbarkeit des RT6 nach der Entwicklung sorgen.

Die eingesetzten menschlichen T-Zellen wurden im Dynabead Zellseparationsverfahren aus zwei menschlichen Leukozytenkonzentraten der Blutbank des Universitätskrankenhauses Eppendorf gewonnen. Durch Inkubation der Leukozytenkonzentrate mit anti-CD2 Pan-T-Dynabeads wurden die T-Zellen aus der Leukozytenfraktion separiert, mehrfach gewaschen und mit Solubilisierungspuffer solubilisieret. Da für das menschliche RT6 keine Nachweisgrenze bekannt war, wurde ein Überschuss mit  $6 \times 10^7$  Zellequivalenten eingesetzt. Die T-Zellen der Maus wurden nach Präparation von Maus Milzen ebenfalls mit Dynabeads von den übrigen Zellen separiert. Dabei gelangte aufgrund eines Versehens biotinylierter anti-TCR Antikörper in die Probe. Es wurden für den Versuch  $6 \times 10^6$  Zellequivalente eingesetzt, dies entsprach einem deutlichen Überschuss an nachzuweisendem RT6, sofern es der Expression der Ratte entsprach und sich überhaupt durch die eingesetzten Immunsereen nachweisen ließ.

Die Solubilisate wurden so auf ein 21 Taschen Gel geladen, dass vier gleiche Segmente entstanden. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine im semi-dry Blot Verfahren auf eine PVDF Membran geblottet. Die Membran wurde danach mehrfach in TBS gewaschen und freie Bindungsstellen mit Blocklösung gebunden.

**Abbildung 19 Nachweis von RT6 in Gesamtzelllysaten aus primären Lymphozyten der Ratte, der Maus und des Menschen und von EpD3 Zellen**

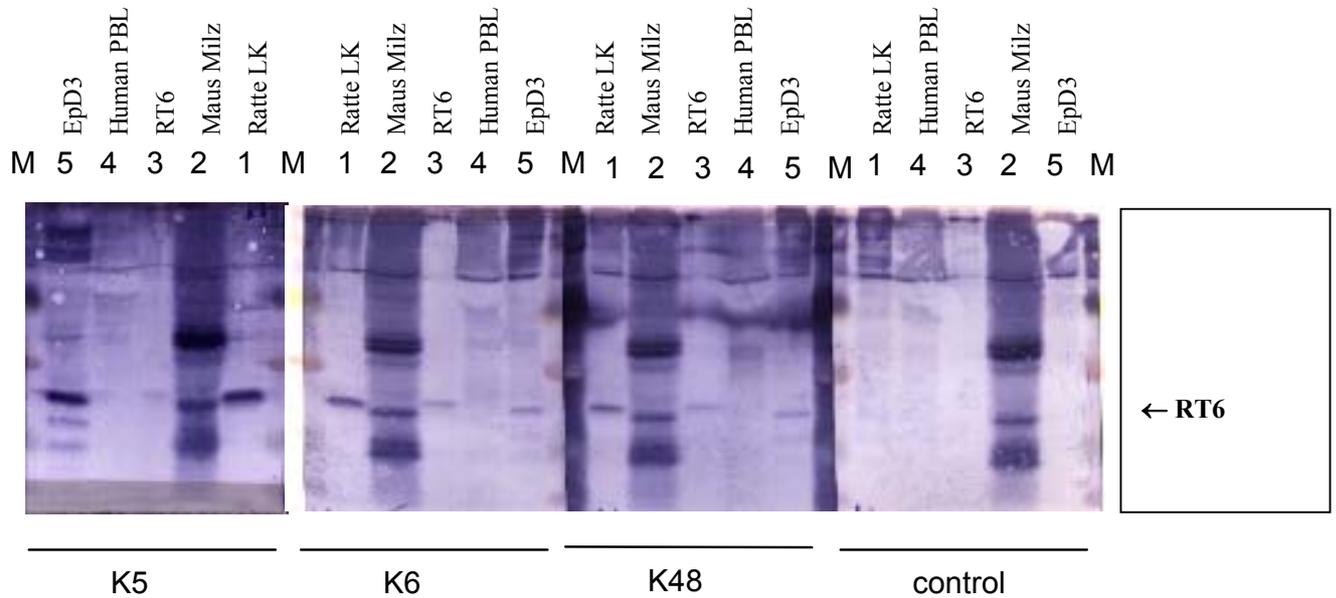


Abbildung 19: EpD3 T-T Hybridomzellen der Ratte (EpD3, Spuren 5), Lymphknoten Zellen der Ratte (Ratte LK, Spuren 1), Milzzellen der Maus (Maus Milz, Spuren 2), RT6 Eluat (RT6, Spuren 3) und periphere Leukozyten des Menschen (Human PBL, Spuren 4) wurden durch Inkubation in Lysepuffer für 20 min. bei 37°C lysiert. Zellkerne und andere nicht lösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt. Proteine aus den Zelllysaten wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf Nitrocellulose Membranen geblottet. Es wurden mehrere Aliquots der Lysate geladen. Zur Kontrolle wurde wie in Abb. 17 beschrieben affinitätsgereinigtes, PI-PLC behandeltes RT6 (RT6) geladen.

Der Blot wurde in vier Teile geschnitten und mit K5 Immunsereum 1:8000 (K5), K6 Immunsereum 1:6000 (K6), K48 Immunsereum, epitopselektioniert an affinitätsgereinigtem RT6, 1:2 (K48) und ohne ersten Antikörper (control) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden in zwei folgenden Schritten mit biotin-konjugiertem Sekundärantikörper Ziege anti Ratte IgG (1:15000) und Alkalische Phosphatase konjugiertem Streptavidin (1:1000) detektiert. Die Kontrolle ohne ersten Antikörper wurde nur mit dem Sekundärantikörper und Streptavidin inkubiert. Folgende Lysate wurden aufgetragen:

Zellequivalente je Spur:

- |                     |   |
|---------------------|---|
| 5 x 10 <sup>5</sup> | Ratte Lymphknotenzellen                               |
| 6 x 10 <sup>6</sup> | Maus Milzzellen (mit kontaminierendem Antikörper)     |
| 2 x 10 <sup>6</sup> | affinitätsgereinigtes RT6.2 (Eluat der Säule III)     |
| 6 x 10 <sup>7</sup> | Separierte T-Zellen aus Leukozytenkonzentrat (s. 3.9) |
| 5 x 10 <sup>5</sup> | Zellen des Ratten EpD3 T-T Hybridoms                  |

Die Ergebnisse gibt die Abbildung 19 wieder. RT6 ließ sich mit allen Antiseren, sowohl als aufgereinigtes Protein (Spur 3) als auch in Lysaten aus Ratten EpD3 T-T Hybridomzellen und aus Ratten Lymphknotenzellen gut darstellen. K5 reagierte in EpD3 Lysaten schwach mit einigen zusätzlichen Banden, die bei der RT6 Eluatspur nicht zu sehen waren, was auf die gelungene affinitätschromatografische Aufreinigung im Säulenverfahren schließen ließ. In der Teilabbildung der Kontrolle, die den Blot ohne ersten Antikörper darstellt, wurden durch die Entwicklung mit dem Zweitantikörper die Banden im RT6 Bereich bei 30 kd nicht mehr entwickelt. Dies war ein Zeichen für die Qualität der Immunsereen, die RT6 spezifische Antikörper enthielten, das RT6 zu detektieren und für die erfolgreiche affinitätschromatografische Aufreinigung.

Weder in den Spuren mit Lysaten aus menschlichen T-Zellen noch in den Lysaten aus Maus Milzzellen waren eindeutige Banden zu erkennen, die nicht auch in der Kontrollspur darstellbar waren, so dass die Darstellung des RT6 Homologs in menschlichen und Maus T-Zelllysaten nicht gelang.

Das Serum K48 zeigt eine starke Reaktivität mit der 46 kd Markerbande (Ovalbumin). Offensichtlich enthielt das Serum selbst nach seiner Epitoselektion an RT6 noch Antikörper gegen das für die Immunisierung eingesetzte Carrierprotein.

In den Versuchen war es zum einen gelungen, mit aufgereinigten, nativen Antikörpern von Kaninchen RT6 darzustellen und im Western Blot Immunodetektionsverfahren zu detektieren und zum anderen war es gelungen, die natürliche Reaktivität von RT6 an präparierten Lymphknotenzellen der Ratte zu zeigen.

Die bisher mit der Immunodetektion gemachten Erfahrungen und die gute Qualität der gewonnenen Antikörper wurden durch den Einsatz mit nativem RT6 unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen getestet. Zum Vergleich wurde aus EpD3 Zellen säulenchromatografisch aufgereinigtes RT6 und Lysate von *E. coli*, die mit einem für ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und Maus Rt6.2 (GST-mRt6) kodierenden Expressionsplasmids transformiert waren eingesetzt.

Es sollte eine mögliche Reaktivität mit GST-mRt6-Fusionsprotein, einem Fusionsprotein des Rt6 der Maus, detektiert werden.

Die EpD3 Zellen wurden wie beschrieben kultiviert und bei Erreichen der kritischen Grenze von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter geerntet, solubilisiert und aus dem Zellsolubilisat danach das RT6 durch Affinitätschromatografie gereinigt. Wie in den Vorversuchen gefunden, war die Hauptfraktion des RT6 in der Eluatfraktion E2. Diese enthielt etwa 80% der Gesamtzellausbeute von  $1 \times 10^9$  solubilisierten Zellen. Geladen wurden  $5 \times 10^7$

Zellequivalente des Eluats E2. Die Proben wurden sowohl nicht reduziert als auch unter Zugabe von DTT im reduzierten Zustand geladen. Die 2/5 E. coli Bakterien wurden mit  $1 \times 10^8$  Zellequivalenten pro Probe mit und ohne Zugabe von DTT geladen.

Die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden über Nacht auf eine PVDF Membran gebロットet und am darauf folgenden Tag wurden mit Blocklösung unspezifische Bindungsstellen geblockt. Der nächste Schritt war die Inkubation mit einem Primärantikörper. Zu diesem Zeitpunkt lagen bereits gute Ergebnisse mit den aufgereinigten Seren von Kaninchen und Ente vor, so dass die gesammelten und epitopselektierten Antikörper des Kaninchenserums K6 gepoolt wurden und zum Einsatz kamen. Diese Fraktion wurde mit „Ü3 Pool“ bezeichnet. Aus den Vorversuchen war bekannt, dass die Kreuzreaktivität im Vergleich zu den Originalseren deutlich geringer und die Spezifität dadurch erheblich zugenommen hatte (s. Abb. 18 und 19). Der Blot wurde mit den gepoolten Antikörpern inkubiert und anschließend gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper Ziege anti Kaninchen IgG an Alkalische Phosphatase gekoppelt und anschließend die Entwicklung mit Substratlösung.

Die Resultate dieser Versuchsreihe sind in der Abbildung 20 dargestellt.

**Abbildung 20 Nachweis von rekombinanten Maus Rt6.2-Gluthathion-S-Transferase Fusionsprotein im Immunoblot**

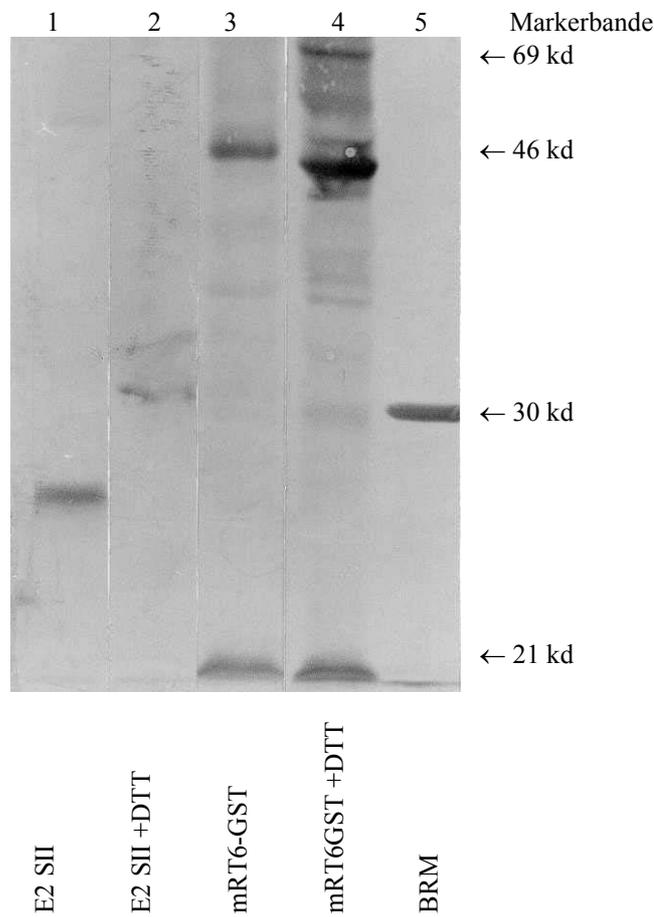


Abbildung 20: Proteine aus Lysaten von mit rekombinanten Maus RT6.2-GST Fusionsprotein transformierten E. coli (5  $\mu$ l E. coli Lysat) wurden in der SDS-PAGE gr $\ddot{o}$ Benfraktioniert und auf PVDF Membran geblottet. Zum Vergleich wurde wie in Abb. 19 affinit $\ddot{a}$ tsgereinigtes RT6.2 analysiert (5  $\mu$ l Eluat, E2). Je ein identisches Aliquot wurde mit dem Reduktionsmittel DTT versetzt. F $\ddot{u}$ r die Immunodetektion wurde ein Pool aus an RT6- $\beta$ -Gal Fusionsprotein affinit $\ddot{a}$ tsgereinigter Kaninchen Antik $\ddot{o}$ rper aus K5 und K6 eingesetzt. Gebundene Antik $\ddot{o}$ rper wurden mit Ziege-anti-Kaninchen IgG, Alkalische Phosphatase konjugiert detektiert

Zellequivalente:

E2 SII            1 x 10<sup>6</sup>  
 2/5                1 x 10<sup>7</sup>

Nach Zugabe von DTT zeigte sich das für RT6 typische Bandenmuster (Thiele et al. 1986). Auffallend war das verzögerte Wanderungsverhalten von RT6 nach Zugabe von DTT. Es gab unter reduzierenden Bedingungen eine Doppelbande des RT6, was auf intramolekulare Disulfidbrücken hinwies.

In den Spuren mit den Lysaten aus *E. coli* zeigte sich eine prominente Bande bei 46 kd, dem Molekulargewichtsbereich der für das Fusionsprotein vorhergesagt war. Nach Zugabe von DTT erschien die Bande etwas kleiner und deutlicher angefärbt. In weiteren Versuchen konnten andere Mitarbeiter bestätigen, dass es sich bei diesen Banden tatsächlich um eine spezifische Reaktion des K48 Antiserums mit dem rekombinanten GST-mRT6-Fusionsprotein handelte. Da weitere Versuche mit Zellsolubilisaten von Maus T-Zellen geplant waren, wurde dies als erstes positives Ergebnis für Versuche in diese Richtung gewertet.

Auffallend war die Reaktion mit der Bande für die Karboanhydrase des Rainbow Markers™ bei 30 kd. Die anderen Markerbanden des Rainbow Markers™ waren nicht reaktiv. Welche Bedeutung dieser besonderen Reaktivität der gepoolten RT6 Antikörper zukommt, war unklar. Weitere Versuche bestätigten dieses Verhalten.

Insgesamt zeigten die beiden letzten Versuchsreihen, deren Ergebnisse in den Abbildungen 19 und 20 wiedergegeben sind die Einsatzmöglichkeiten und Stärken der affinitätsgereinigten Antikörper. Neben der Detektion des RT6- $\beta$ -Gal Fusionsproteins, das Ausgangsprodukt der Immunisierungsreihe gewesen war, konnten die Antikörper auch natives RT6 von Ratten Lymphknotenzellen detektieren. Schließlich waren die ersten Versuche das Maus homologe Rt6 darzustellen für das immobilisierte GST-Rt6-Fusionsprotein vielversprechend.

## **5 Diskussion**

Die Entwicklung der letzten Jahre zeigte, dass erst nach intensiver Grundlagenforschung Ergebnisse zur Funktion des Moleküls RT6 als Adeno-Ribosyl-Transferase (ART) möglich waren (Koch-Nolte 1996). Die Ergebnisse meiner Arbeit stellten für diese Aufgaben wichtige experimentelle Werkzeuge zur weiteren Erforschung des T-Zell Differenzierungsmarkers RT6 bereit. Eine Voraussetzung für die weitere Erforschung des Moleküls war die Möglichkeit des Nachweises in verschiedenen Zellpopulationen. Die Grundlage für den Nachweis im System der Ratte und später in anderen Systemen wurde durch diese Arbeit gelegt. So war es im Verlauf der hier dargestellten Versuche möglich geworden, die durch Immunisierungsreihen in Ente und Kaninchen erzeugten Antikörper so aufzureinigen, dass die Antikörper als Werkzeug das Molekül RT6 detektieren konnten.

Weitere Immunisierungen auf Grundlage dieser Arbeit mit molekularbiologisch veränderten Proteinen ermöglichten auch die Darstellung des Maus Rt6 (Willer 96). Bei allen Versuchen musste die Frage der Funktion zunächst im Bereich des Spekultativen bleiben, aber durch die Versuche näherte man sich der Beantwortung dieser Frage.

An die Immunisierung schlossen sich die Aufreinigungsversuche an. Es sollten aus der „Antikörpersuppe“, dem polyklonalen Immuserum der Kaninchen und Enten mit den unterschiedlichsten Antikörperstrukturen, nur die gegen RT6 gerichteten Antikörper selektioniert werden. Es war zunächst nur möglich an Fusionsprotein bindende Antikörper zu selektionieren und diese in weiteren Schritten durch Negativ-Selektion an gereinigter  $\beta$ -Galaktosidase von Antikörpern mit dieser Spezifität zu trennen. Obwohl diese Versuche erfolgreich waren und eine Trennung durch verminderte Kreuzreaktivität nachgewiesen werden konnte, wurde im Verlauf der Laborarbeiten ein affinitätschromatografisches Verfahren der Positivselektion mit „Ein-Schritt-Selektion“ etabliert, dass nur die RT6 spezifischen Antikörper selektionierte.

Voraussetzung war die Gewinnung großer Mengen RT6. Dies wurde durch Solubilisierung von RT6.2 produzierenden EpD3 Zellen und Aufreinigung an einer Affinitätschromatografiesäule am RT6.2 spezifischen monoklonalen Antikörper Gy 1/12 gewonnen. Die affinitätsgereinigten Antikörper zeigten ein wesentlich besseres Signal zu Hintergrund Verhältnis (Abb. 18).

Es gelang der Nachweis, dass die Immunisierung von Kaninchen und Enten mit an Nitrocellulose Streifen immobilisierten RT6- $\beta$ -Galaktosidase Fusionsproteinen zur Produktion von RT6 spezifischen Antikörpern führte. Die Seren enthielten offensichtlich Antikörper gegen beide Spezifitäten des Fusionsproteins (RT6 und  $\beta$ -Gal). Die diffuse Anfärbung der Nitrocellulose Streifen deutete an, dass auch Antikörper gegen den Träger enthalten waren.

FACS-Analysen mit verfügbarem Gy1/12 monoklonalen Antikörper zeigten eine stärkere RT6 Expression auf der EpD3 T-T Zelllinie als auf primären Zellen (Abb. 16). Es gelang die Aufreinigung des RT6 an immobilisiertem Gy1/12 und folgend der Nachweis, dass sowohl Immuseren als auch die affinitätsgereinigten Antikörper natives RT6 im Immunoblot erkennen (Abb. 18 und 19).

Immunoblot Analysen mit Gesamtzelllysaten aus primären T-Zellen zeigten eine diffuse Bandendarstellung, was durch eine Reaktion mit den verwendeten Zweitantikörpern erklärt wurde. Dennoch war eindeutig eine RT6-spezifische Bande in Lysaten aus Ratten T-Zellen zu erkennen (Abb. 19). Eine Detektion von RT6 gelang nicht in Lysaten aus Maus oder Mensch T-Zellen. Dies könnte entweder an mangelnder Kreuzreaktivität der Antikörper mit den putativen RT6-homologen Proteinen aus Maus und Mensch oder an mangelndem Vorkommen der RT6-homologen Proteine in T-Zelllysaten dieser Spezies begründet sein.

Kurz vor Abschluss der Arbeit, war es der AG gelungen, eine RT6 homologe cDNA aus der Maus zu klonieren und ein Fusionsprotein aus Maus RT6.2 und Glutathion-S-Transferase in *E. coli* exprimieren. Eine Immunoblot-Analyse mit Lysaten aus *E. coli*, die mit einem Fusionskonstrukt aus Maus RT6.2 und Glutathion-S-Transferase transformiert waren, zeigte eine Bande auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts des Fusionsprotein, so dass von einer Kreuzreaktivität mit Maus RT6 ausgegangen werden kann.

### **Erkenntnisse seit Abschluss dieser Arbeit.**

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde 1991 abgeschlossen. Seit dem wurden wichtige neue Erkenntnisse gewonnen, die die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzen.

RT6 ist Mitglied einer Genfamilie, die evolutionsgeschichtlich mit ADP-ribosylierenden bakteriellen Toxinen verwandt ist. Diese Genfamilie erhielt die Bezeichnung ART für ADP-Ribosyltransferase (Koch-Nolte et al., 1996; Haag und Koch-Nolte, 1997)

Bei Säugetieren kommen fünf Genfamilienmitglieder vor (ART1-ART5) (Glowacki et al. 2002). ART1-ART4 kodieren für GPI-verankerte Proteine, ART5 für ein sezerniertes Protein.

RT6 wird seit Erkenntnis dieser Zusammenhänge als ART2 bezeichnet.

Bei der Ratte ist RT6/ART2 ein Einzelkopie-Gen. Die beiden serologisch unterscheidbaren RT6 Allotypen differieren in 10 Aminosäuren (Haag et al., 1990 und Abb. 21). Die in dieser Arbeit beschriebenen Antiseren erkennen in Immunoblot Analysen beide RT6 Allotypen.

Bei der Maus ist das ART2 Gen dupliziert, die Gene kodieren für ART2.1 und ART2.2. Bei dem seinerzeit als ersten klonierten Maus-Homologen handelt es sich um ART2.2 (Hollmann et al., 1995). Die in dieser Arbeit beschriebenen Antiseren erkennen in Immunoblot-Analysen beide Maus ART2 Homologe. Im Mausmodell unterdrückt ART2 die Funktion von T-Zellen, indem es andere Membranproteine wie den zytolytischen P2X7-Rezeptor ADP-ribosyliert (Seman et al. 2003, Ritter 2003).

Beim Menschen und anderen Primaten liegt das ART2 Gen als inaktives Pseudogen vor. Es kann folglich kein ART2 von menschlichen Zellen produziert werden (Haag et al. 1995). Dies erklärt die fehlenden Banden in humanen Zelllysaten in Abbildung 19.

Für die Inaktivierung des ART2 Gens bei Primaten gibt es bisher keine befriedigende Erklärung. Denkbar ist z.B., dass ART2 bei einem Vorfahren der heutigen Primaten als Rezeptor für ein hochpathogenes Virus fungierte und somit ein Selektionsvorteil für ART2-Defektmutanten bestand. Denkbar ist auch, dass eines der anderen ART-Gene bei Primaten die Funktion des ART2 übernommen hat.

**Abbildung 21 Aminosäuresequenzvergleich von Ratten RT6.2, RT6.1, Maus RT6.2 und Maus RT6.1**

1 MPSNICKFFL TWWLIQQVTG LTGPLMLDTA PNAFDDQYEG CVNKMEEKAP  
 1 MPSNICKFFL TWWLIQQVTG LTGPLMLDTA PNAFDDQYEG CVNKMEEKAP  
 1 MPSNNFKFFL TWWLTQQVTG LAVPFMLDMA PNAFDDQYEG CVEDMEKKAP  
 1 MTSNNFKFFL TWWLIQQVTG LAVPFMLDMA PNAFDDQYES CVEDMEKKAP

51 LLLQEDFNMN AKLKVAWEEA KKRWNNIKPS RSYPKGFNDF HGTALVAYTG  
 51 LLLKEDFNKS EKLKVAWEEA KKRWNNIKPS MSYPKGFNDF HGTALVAYTG  
 51 QLLQEDFNMN EELKLEWEKA EIKWKEIKNC MSYPAGFHDF HGTALVAYTG  
 51 QMLQEDFNMN EELKLEWEKA EINWKEIKNS TSYPAGFHDF HGTALVAYTG

\*

101 SIAVDFNRAV REFKENPGQF HYKAFHYILT RALQLLSNGD CHSVYRGTKT  
 101 SIGVDFNRAV REFKENPGQF HYKAFHYILT RALQLLSNGD CHSVYRGTKT  
 101 NIHRSLNEAT REFKINPGNF HYKAFHYILT RALQLLSDQG CRSVYRGTNV  
 101 NLAIDFNRAV RDFKKSPDNF HYKAFHYILT RAVQLLNDQG CSLVYRGTKV

151 RFHYTGAGSV RFGQFTSSSL SKKVAQSQEF FSDHGTLFII KTCLGVYIKE  
 151 RFHYTGAGSV RFGQFTSSSL SKTVAQSPEF FSDDGTLFII KTCLGVYIKE  
 151 RFRYTGKGSV RFGHFASSSL NRSVATSSPF FNGQGTLFII KTCLGAHIKH  
 151 MFEYTGKGSV RFGQFS SSSL TKRVALSSNF FSNHGTLFII RTCLGVNIKE

218 FSFRPDQEEV LIPGYEVYQ KVRTQG---YN EIFLDSPKRK KSNYNCLYS-  
 218 FSFYPDQEEV LIPGYEVYQ KVRTQG---YN EIFLDSPKRK KSNYNCLYS-  
 218 CSYYTHEEEV LIPGYEVFH KVKTQSEYI QISLDSPKRK KSNFNCFYSG  
 218 FSSFPREEEV LIPGYEVYH KVTAQNDRNGYN EIFLDSPERK KSNFNCFYND

264 ----- SAGARESCV SLFLVVLPSLL VQLLCLAEP.  
 264 ----- SAGTRESVCV SLFLVVLTSLL VQLLCLAEP.  
 276 STQAANVS-- SLGSRESCV PLFLVLLGLL VQQLTLAEP.  
 278 SAQTVNIDFS IGSRESCV SLFLVLLGLL VQQLTLAEL.

Abbildung 21:

rn RT6.2     rat ART2.2  
rn RT6.1     rat ART2.1  
mm RT6-I    mouse ART2.1  
mm RT6-II   mouse ART2.2

rote Buchstaben: N-terminaler Leader und C-terminales GPI-Verankerungssignal

gelb hervorgehoben: in allen ARTs konservierte Cysteine

grün hervorgehoben: konservierte Strukturen im aktiven Zentrum

blau hervorgehoben: potentielle N-gekoppelte Glykosylierungsstellen

pink hervorgehoben: Aminosäuredifferenzen zwischen rat ART2.1 und ART2.2

\* markiert die letzte Aminosäure des RT6.2, die in dem RT6-βGal Fusionsprotein noch enthalten ist

Für Maus ART2 konnten mittels DNA-Immunisierung monoklonale Antikörper hergestellt werden. Wie bei der Ratte wird auch Maus ART2 auf reifen T-Zellen exprimiert (Koch-Nolte et al. 1999).

Für das RT6 der Ratte gelang die Kristallisierung und die Aufklärung der 3D Struktur als Komplex mit dem Substrat NAD (Abb. 22). Die Ergebnisse der derzeitigen Forschungsansätze zeigen, dass RT6 in der Tat strukturell mit bakteriellen Toxinen verwandt ist. Die in dieser Arbeit charakterisierten Antiseren waren hergestellt worden nach Immunisierung mit einem Fusionsprotein aus den ersten 90 Aminosäuren des RT6.2 (s. Abb. 21, Markierung durch Asterisk) und der β-Galaktosidase aus E.coli. In der 3D Struktur ist zu erkennen, dass dieser Abschnitt des RT6 weitgehend aus alpha-helices besteht, die dem aktiven Zentrum vorgeschaltet sind. Es ist also davon auszugehen, dass die Antiseren mit einem oder mehreren Epitopen des in Abb. 22 grün dargestellten Abschnitts des RT6 Moleküls, das ausserhalb des aktiven Zentrums liegt, reagieren.

Abbildung 22 Die dreidimensionale Struktur des ART2.2 (RT6.2) mit NAD im aktiven Zentrum

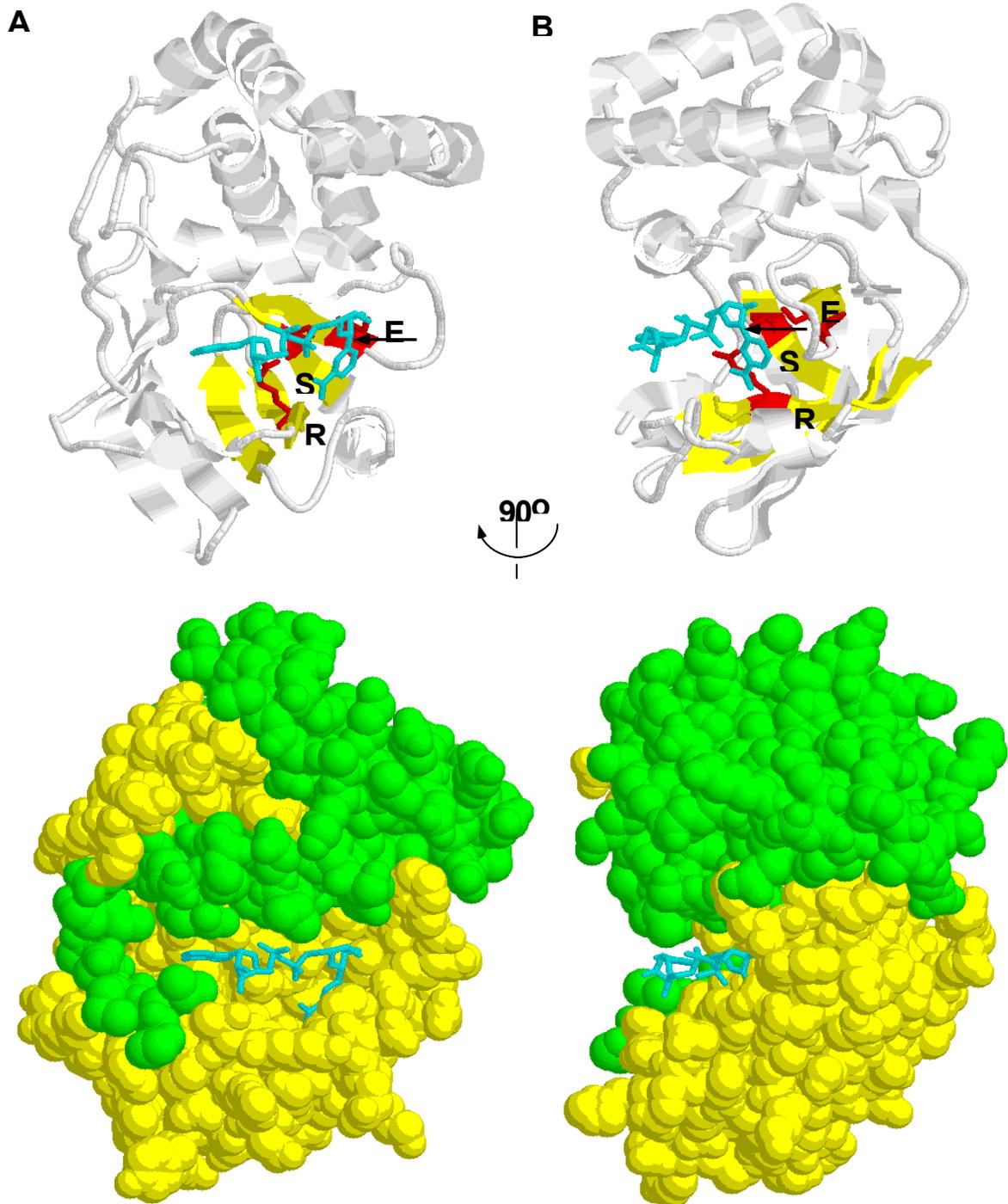


Abbildung 22 (modifiziert nach Seman et al. 2004): Die Darstellungen A und B variieren in der Ansicht durch eine 90° Drehung um die vertikale Achse (Richtung s. Pfeil in der Mitte). Der obere Teil der Abbildung gibt eine schematisierte Ansicht des Polypeptidgerüsts ohne Aminosäureseitenketten wieder. Die vier konservierten

$\beta$ -Stränge des aktiven Zentrums sind gelb, das gebundene NAD ist blau hervorgehoben. Im unteren Teil der Abbildung ist das Molekül in räumlicher Darstellung mit Aminosäureseitenketten und gebundenem NAD (blau) dargestellt. Grün hervorgehoben ist der N-terminale Anteil des RT6, der in den zur Immunisierung verwendeten RT6- $\beta$ -Gal Fusionsprotein enthalten ist, gelb der Molekülrest.

R, S, E: konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum.

Der Pfeil markiert die Verbindung im NAD, die von dem Enzym gespalten wird.

## 6 Zusammenfassung

Es ist gelungen mit Hilfe von Immunisierungen von Kaninchen und Enten mit einem Fusionsprotein aus RT6 und  $\beta$ -Galaktosidase eine Immunantwort auf das Targetprotein zu erzielen. Das zunächst polyklonale Antikörpergemisch wurde erfolgreich affinitätsgereinigt und mit den gewonnenen RT6-spezifischen Antikörpern gelang die Detektion des RT6 der Ratte. Für diese Versuche wurden Lymphknotenpräparationen durchgeführt und das gewonnene Zellmaterial nach Solubilisierung durch die SDS-PAGE größenfraktioniert. Der Nachweis des RT6 erfolgte mittels Western-Blot Immunodetektion an unterschiedlichen Membranen, es wurden sowohl Nitrocellulose als auch PVDF Membranen erfolgreich eingesetzt, und mit verschiedenen Immunoblotverfahren gelang die Etablierung eines Standards.

Im Verlauf dieser Dissertation wurde ein Verfahren der Aufreinigung der polyklonalen Seren etabliert, dass die Selektion hochspezifischer und affiner RT6 Antikörper auf der Basis der Affinitätschromatographie ermöglichte. Die so aufgereinigten Antikörper wurden für die Detektion von RT6 bei der Maus und dem Menschen eingesetzt. Tatsächlich reagierten die Antikörper mit einer Bande aus mit Maus RT6 transformierten E. coli. In späteren Versuchen konnte von anderen Mitarbeitern mit diesen Antikörpern auch bei T-Zellen der Maus zwei RT6-homologe Proteine nachgewiesen werden (Willer 96, Hollmann et al. 1996).

Beim Menschen konnte in späteren Versuchen gezeigt werden, dass das RT6 Oberflächenprotein nicht exprimiert wird und sich daher nur auf DNA Ebene nachweisen ließ (Haag 95).

Vor wenigen Jahren gelang es eine ADP-Ribosyltransferase im Skelettmuskels des Kaninchen nachzuweisen. Datenbankrecherchen ergaben eine hohe Homologie zum RT6. In verschiedenen Versuchen konnte inzwischen gezeigt werden, dass es sich dabei um extrazelluläre Proteine mit GPI-Anker handelt, so wie es in den bisherigen Versuchen auch gefunden wurde (Koch 86, Koch 90). Neuere Untersuchungen zeigen, dass ADP-Ribosylierungsreaktionen auf der T-Zelloberfläche die Ausbildung der immunologischen Synapse verhindern können (Liu 99) und eröffnen somit vielleicht für die Zukunft ein Ziel

pharmakologischer Beeinflussung durch gezielte Therapie mit Hilfe von Antikörpern (Haag 99).

## 7

## Literatur

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1994). Cellular and Molecular Immunology. Second Edition, W. B. Saunders, Philadelphia.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, Struhl K (1988). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons. New York.

Bazin H, Xhurdebise LM, Burtonboy G, Lebacq AM, De Clercq L, Cormont F (1984). Rat Monoclonal Antibodies. Rapid Purification from In Vitro Culture Supernatants. Journal of Immunological Meth. 66: 261-269.

Beisiegel U (1986). Protein Blotting. Electrophoresis 7: 1-18.

Bellgrau D, Legarde AC (1990). Cytotoxic T-cell precursors with low-level CD8 in the diabetes-prone Biobreeding rat: implications for generation of an autoimmune T-cell repertoire. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 313-317.

Biel HJ, Gronski P, Seiler FR (1986). Fast silver staining of polyacrylamide gels at elevated temperatures. Electrophoresis 7: 232-235.

Bio-Rad (1987). Addendum to Trans-Blot<sup>®</sup> Cell.

Blackman M, Kappler J, Marrack P (1990). The Role of the T Cell Receptor in Positive and Negative Selection of Developing T Cells. Science 248: 1335-1341.

Bluestone JA, Hodes RJ (1983). Cell-surface molecules involved in T-cell functions. Imm. Today 4: 256-259.

Cohen IR, Young DB (1991). Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. Imm. Today 12: 105-110.

Gallagher RB, Cambier JC (1990): Signal transmission pathways and lymphocyte function. Imm. Today 11: 187-189.

Gaudernack G, Leivestad T, Ugelstad J, Thorsby E (1986). Isolation of pure functionally active CD 8+ T cells. Positive selection with monoclonal antibodies directly conjugated to monosized magnetic microspheres. *J Immunol. Methods* 90: 179-187.

Glowacki G, Rickmer B, Firner K, Nissen M, Kühl M, Reche P, Bazan F, Cetkovic-Cvrlje M, Leiter E, Haag F, Koch-Nolte F (2002). The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Science* 11: 1657-1670.

Goding JW (1986). *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, London.

Greiner DL, Barton RW, Goldschneider I, Lubaroff DM (1982). Genetic linkage and cell distribution analysis of T cell alloantigens in the rat. *J. Immunogen.* 9: 43-50.

Greiner DL, Nakano K, Mordes JP, Rossini AA (1986). Absence of the RT6 T cell subset in diabetes-prone BB/W rats. *J. Immunol.* 136: 148-151.

Haag F, Andresen V, Karsten S, Koch-Nolte F, Thiele HG (1995). Both allelic forms of the rat T cell differentiation marker RT6 display nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-glycohydrolase activity, yet only RT6.2 is capable of automodification upon incubation with NAD. *Eur. J. Immunol.* 25:2355-2361.

Hebel R, Stromberg MW (1971). *Anatomy of the Laboratory Rat*. Nachdruck.

Hobom B (1991). Der Thymus – eine Schule für das Immunsystem. *FAZ* 13: N1

Hollmann C, Haag F, Schlott M, Damaske A, Bertuleit H, Matthes M, Kühl M, Thiele H-G, Koch-Nolte F (1996). Molecular Characterization of Mouse T-cell Ecto-ADP-Ribosyltransferase Tr6: Cloning of a Second Functional Gene and Identification of the Rt6 Gene Products. *Molecular Immunology*, Vol. 33, No. 9: 807-817.

Hood L, Kronenberg M, Hunkapiller T (1985). T-cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell* 40: 225-229.

Janeway CA (1989). Approaching the Asymptote? Evolution und Revolution in Immunology. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44: 1-13.

Jerne NK (1973). The Immune System. *Sci. Amer.* 7.

Kashan, A (1989). Anwendung immunologischer, molekularbiologischer und biochemischer Methoden zur Charakterisierung des Ratten T-Zell Markers RT6.2. Examensarbeit für das Aufbaustudium Molekularbiologie and der Universität Hamburg.

Koch F, Thiele HG (1985). Utilization of T-cell hybridomas to characterize the rat T-cell alloantigen RT-6. *Scand. J. Immunol.* 22: 447.

Koch F, Thiele HG, Low MG (1986). Release of the rat T-cell alloantigen RT-6.2 from cell membranes by Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C. *J. Exp. Med.* 164: 1338-1343.

Koch F, Thiele HG, Low MG (1987). Phosphatidylinositol is the membrane-anchoring domain of RT-6.2 and Thy-1. *Transpl. Proc.* 19: 3140-3143.

Koch F, Kashan A, Thiele HG (1988). Production of a rat T cell hybridoma that stably expresses the T cell differentiation marker RT6.2. *Hybridoma* 7: 341-353.

Koch F, Haag F, Kashan A, Thiele HG (1990a). Primary structure of rat RT6.2, a nonglycosylated phosphatidylinositol-linked surface marker of postthymic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci* 87: 964-967.

Koch F, Haag F, Thiele HG (1990b). Nucleotid and deduced amino acid sequence for the mouse homologue of the rat T-cell differentiation marker RT6. *Nucleic Acids Res.* 18: 3636.

Koch-Nolte F, Petersen D et al. (1996). Mouse T Cell Membrane Proteins Rt6-1 and Rt6-2 Are Arginine/Protein Mono(ADPriboseyl)transferases and Share Secondary Structure Motifs with ADP-ribosylating Bacterial Toxins. *J Biological Chem* 271, No. 13: 7686 – 7693.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-683.

Lalley PA, Davisson MT, Graves JAN, O'Brien SJ, Womack JE, Roderick TH. Report of the committee on comparative mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* 51: 503-532.

Leiter EH, Prochazka M, Coleman DL (1987). The non-obese diabetic (NOD) mouse. *Am. J. Pathol.* 128: 380-383.

Lubaroff DM, Butcher GW, DeWitt C, Gill T, Günther E, Howard J, Wonigeit K (1983). Standardized nomenclature for the rat T-cell alloantigens – report of the committee. *Transplant. Proc.* 15: 1683.

- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour.
- Rennie J (1991). Verlust der Selbst-Kontrolle. *S.d.W.* Februar: 84-94.
- Ritter H, Koch-Nolte F, Marquez VE, Schulz GE (2003). Substrate Binding and Catalysis of Ecto-ADP-ribosyltransferase 2.2 from Rat. *Biochemistry* Vol. 42, No. 34: 10155-10162.
- Roitt I, Brostoff J, Male D (1988). *Immunology*. Gower Medical Publ., London.
- Rossini AA, Slavin S, Woda BA, Geisberg M, Like AA, Mordes JP (1984). Total lymphoid irradiation prevents diabetes mellitus in the Bio-breeding/Worcester (BB/W) rat. *Diabetes* 33: 543-547.
- Sammons DW, Adams LD, Nishizawa EE (1981). Ultrasensitive Silver-based Color Staining of Polypeptides in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis* 2: 135-141.
- Schneider C, Newman RA, Sutherland R, Asser U, Greaves MF (1982). A One-step Purification of Membrane Proteins Using a High Efficiency Immunomatrix. *J. Biol. Chem.* 257: 10766-10769.
- Seman M, Adriouch S, Haag F, Koch-Nolte F (2004). Ecto-ADP-Ribosyltransferases (ARTs): Emerging Actors in Cell Communication and Signalling. *Curr. Med. Chem.* 11: 857-872.
- Seman M, Adriouch S, Scheupein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, Koch-Nolte F (2003). NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 19 (4): 571-582.
- Silva A, MacDonald HR, Conzelmann A, Cortesy P, Nabholz M (1983). Rat x Mouse T-cell hybrids with inducible specific cytolytic activity. *Immuno. Rev.* 76: 105-129.
- Smith D, Fisher P (1984). Application of an improved method for affinity purification of antibodies using polypeptides immobilized on nitrocellulose blots. *J. Cell Biology* 99: 20-28.
- Smith K (1984). Inside the Thymus. *Imm. Today* 5: 83-87.

Takada T, Iida K, Moss J (1994). Expression of NAD glycohydrolase activity by rat mammary adenocarcinoma cells transformed with rat T cell alloantigen RT6.2. *J. Biol. Chem.* 269: 9420-9423.

Thiele HG, Arndt R, Stark R, Wonigeit K (1979). Detection and partial molecular characterization of the rat T-lymphocyte surface protein L21 by allo- and xeno-sera. *Transplant. Proc.* 11: 1636.

Thiele HG, Arndt R, Wonigeit K (1983): RT6-2 is a nonglycosylated T-lymphocyte surface membrane antigen anchored to the cytoskeleton. *Transpl. Proc.* 15: 1635-1636.

Thiele HG, Koch F, Hamann A, Arndt R (1986). Biochemical characterization of the T-cell alloantigen RT-6.2. *Immunology* 59: 195-201.

Thiele HG, Koch F, Kashan A (1987). Postnatal distribution profiles of Thy-1<sup>+</sup> and RT6<sup>+</sup> cells in peripheral lymph nodes of DA-rats. *Transpl. Proc.* 15: 3140.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.

Towbin H, Gordon J (1984). Immunoblotting and Dot Immunoblotting – Current Status and Outlook. *J. Immunological Methods* 72: 313-340.

Vartdal F, Thorsby E (1986). HLA Class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation – a fast and reliable technique. *Tissue Antigens* 28: 301-312.

Willer T (1996). Nachweis und Charakterisierung des Rt6 der Maus in Überständen PI-PLC behandelte Zellen mit epitopselektionierten Antikörpern. Dissertation, Hamburg.

Wonigeit K (1979). Characterization of the RT-Ly-1 and RT-Ly-2 alloantigenic systems by congenic rat strains. *Transpl. Proc.* 11: 1631.



## 8 Danksagung

Eine Dissertation über diesen Zeitraum und auch mit einer solchen Zeitdauer im Labor kann nur gelingen, wenn viele Menschen diese unterstützen. An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir bei dieser Arbeit hilfreich zur Seite gestanden haben.

Insbesondere möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meine Frau Birgit und meine Kinder Stefan und Alke, mussten oft im Urlaub auf mich verzichten und tolerierten auch lange Wochenenden im Labor.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die Unterstützung während des Medizinstudiums, ich habe die Wahl dieser Studienrichtung nicht bereut.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Mentor und „Marathon-Doktorvater“ Professor Dr. med. Friedrich Nolte! Ohne ihn wäre die Arbeit nicht begonnen worden und nicht zu einem guten Ende gelangt. Er inspirierte die Semesterarbeit zum Thema Antikörpererkennung und Antikörperbindung, sowie Diversifikation, die später die praktische Fortführung in der Laborarbeit fand.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei dem emeritierten Direktor des Instituts für Immunologie und Allergologie, Herrn Prof. Dr. med. H.-G. Thiele, der neben vielen interessanten Diskussionen auch dafür sorgte, dass ich an einem FEBS Seminar in Griechenland teilnehmen konnte. Dort erhielt ich die Gelegenheit mit Susumu Tonegawa die Antikörpervielfalt und andere immunologische Themen diskutieren zu können.

Ein besonderer Dank geht auch an PD Dr. med. Friedrich Haag für die Ruhe, mit der er an die Versuche und deren Interpretation heranging, und die mir doch so oft fehlte.

Bei Frau D. Jablonski bedanke ich mich für die Präparation etlicher Maus Milzen.

Jedes Jahr fangen Doktoranden im Labor des Instituts für Immunologie mit ihrer Arbeit an, und dies wird in besonderer Weise von den ständigen Mitarbeitern gefördert und unterstützt, bei denen ich mich ebenfalls herzlich bedanken möchte.

# Lebenslauf

## Angaben zur Person

Name: Dietmar Kühn  
Wohnort: Heideweg 23b  
06886 Lutherstadt Wittenberg  
Tel./Fax: 03491 - 409107  
e-mail: kuehn.wb@t-online.de  
Geburtsdatum: 13.08.1963  
Geburtsort: Emden  
Familienstand: verheiratet mit Birgit Kühn, zwei Kinder (Stefan und Alke)

## Schulbildung

1970 - 1974 Grundschule Wolthusen, Emden  
1974 - 1984 Gymnasium am Treckfahrtstief, Emden  
1980 - 1981 Loyalsock Highschool, Wiliamsport, PA, USA

## Berufsausbildung

10.1984 - 09.1987 Ausbildung zum examinierten Krankenpfleger  
09.1988 - 02.1990 Ausbildung zum Rettungssanitäter  
04.1992 Anerkennung zum Rettungsassistenten  
04.1987 - 03.1997 Studium der Humanmedizin, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf  
04.1997 - 03.1998 Praktisches Jahr, Allgemeines Krankenhaus Hamburg-Harburg

## Berufliche Tätigkeiten

10.1987 - 12. 1990 Einsatz als Krankenpfleger im KKH Buxtehude in allen Fachbereichen  
04.1992 - 04. 1994 Unfallchirurgische Ambulanz und Notaufnahme sowie als  
Hauptnachtwache, Kreiskrankenhaus Buxtehude  
04.1994 - 01. 1995 Interdisziplinäre Notaufnahme, Krankenhaus Mariahilf, Hamburg-Harburg  
02.1995 - 03. 1998 Station für operative Intensivmedizin, Allgemeines Krankenhaus  
Hamburg-Harburg  
04.1998 – 06. 1999 Arzt im Praktikum in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie,  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
07.1999 – 10. 1999 Arzt im Praktikum in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,  
Allgemeines Krankenhaus Barmbek, Hamburg  
10. 1999 – 05. 2000 Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,  
Allgemeines Krankenhaus Barmbek, Hamburg

06. 2000 – 02. 2001	Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Herz-Zentrum Coswig
03. 2001 – 05. 2003	Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Krankenhauses der Paul-Gerhardt Stiftung, Lutherstadt Wittenberg
06. 2003 – 12. 2003	Facharzt für Anästhesiologie im Krankenhaus der Paul-Gerhardt Stiftung, Lutherstadt Wittenberg
seit 01. 2004	Facharzt für Anästhesiologie, Städtisches Klinikum Dessau
seit 12. 2000	Notarztstätigkeit im Landkreis Wittenberg
seit 08. 2002	Tätigkeit als Blutspendearzt
seit 10. 2003	Tätigkeit als Leitender Notarzt im Landkreis Wittenberg

#### **Nebentätigkeiten:**

1990 - 1995	Dozententätigkeit, Krankenpflegeschule Kreiskrankenhaus Buxtehude
1990 - 1996	Dozententätigkeit, Schulungszentrum für den Rettungsdienst, Nellinghof
1991 - 1997	Rettungsdienst, RKsH Emden
1988 - 1996	Malteser Hilfsdienst in verschiedenen Funktionen
04.1990 - 05.1990 u.	Wiss. Mitarbeiter für das Aufbaustudium
02.1991 - 04.1991	Molekularbiologie

#### **Doktorarbeit:**

1990 - 1991	Prof. Dr. F. Nolte, Institut f. Immunologie und Allergologie, Universitätskrankenhaus Hamburg Eppendorf
-------------	---

#### **Publikationen:**

2003	Anesthesia Management for Spine Surgery Using Spinal Navigation in Combination with Computed Tomography, Anesthesia Analgesia 2003, 97, 863- 866.
1998	Herausgeber des Lehrbuches “Rettungsdienst”. Kühn, Luxem, Runggaldier. Elsevier, 3. Auflage, München.
09. 1996	Tuberkulose die verkannte Gefahr, Rettungsmagazin 1: 54 - 61, Heft 5

#### **Sonstiges:**

2003 - 2004	Studium Krankenhausmanagement, Klinikum Nürnberg
08. 2002	Einwöchiger Einsatz auf dem SAR 31 während der Flutkatastrophe
09. 1991	14-tägiger Sanitätseinsatz in Kroatien während des Bürgerkriegs
08. 1990	FEBS Summer School on Immunology

Lutherstadt Wittenberg, 18.08. 2004

### **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.

Dietmar Kühn

### **Anlagen:**

1. Lebenslauf
2. Fünf Exemplare der Dissertation in gebundener Form
3. Antrag auf Zulassung zur Promotion
4. Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife
5. Zeugnis über die Ärztliche Prüfung
6. Approbationsurkunde
7. Facharzturkunde
8. Polizeiliches Führungszeugnis