

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig



**Herstellung monoklonaler Antikörper
gegen das von *Aspergillus fumigatus*
produzierte Gift *Gliotoxin***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

Der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von

Madeleine Zinser
aus Wien

Hamburg, den 04.06.2014

Referent:	Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig
Korreferent:	Prof. Dr. Joachim Morschhäuser
Dekan:	Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: Würzburg, 27.05.2014

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	8
2.1	Material	8
2.1.1	Zellen	8
2.1.1.1	Murine Zelllinien	8
2.1.1.2	Humane Zelllinien	8
2.1.2	Mono- und Polyklonale Antikörper	8
2.1.3	Serologische Reagenzien	8
2.1.4	Chemikalien	9
2.1.5	Standardlösungen, Puffer und Medien	10
2.1.6	Standards und Kits	12
2.1.7	Geräte und Gebrauchsmaterialien	13
2.2	Versuchstiere	13
2.3	Methoden	13
2.3.1	Zellkultivierung	13
2.3.2	Herstellung der Konjugate	14
2.3.3	Zellfusion	15
2.3.4	<i>Glilotoxin</i> ELISA (Enzyme-linked Immunosorption Assay)	18
2.3.5	Subklonierung der Hybridome	19
2.3.6	Isotypen-Test	19
2.3.7	Ficoll Trennung der PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation	20
2.3.8	Immunfluoreszenzfärbungen und Durchflusszytometrie	20
2.3.9	Herstellung von Fab-Fragmenten	22
2.3.10	Einsatz des Fc-Blocks in verschiedenen Zellfärbungen	23
2.3.11	<i>Glilotoxin</i> Preparation	24
2.3.12	Antikörperaufreinigung mittels Protein G Sepharose	24
2.3.13	Proteinbestimmung mittels Biorad TM -Proteinassay	25
2.3.14	Reinheitskontrolle der aufgereinigten Antikörper mittels PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese)	26
2.3.15	Biotinylierung monoklonaler Antikörper	26
2.3.16	Sandwich-ELISA	27
2.3.17	Herstellung mit Merrettichperoxidase konjugierter Antikörper	27

3 Ergebnisse	29
3.1 Zellfusionen	29
3.2 Screening	29
3.3 Subklonierung	31
3.4 Kontrolle der <i>Gliotoxin</i> -Spezifität der subklonierten Hybridome.....	33
3.5 Antikörperaufreinigung mittels Protein G Affinitätschromatographie....	34
3.6 Isotypen-Bestimmung.....	35
3.7 <i>Gliotoxin</i> -ELISA.....	37
3.7.1 Sensitivitätsbereich der Antikörper und Inhibitions-ELISA.....	37
3.7.2 Etablierung eines Sandwich-ELISA	40
3.7.3 Generierung von Fab-Fragmenten	47
3.7.4 Fab-ELISA.....	48
3.8 Affinitätsmessung der Antikörper.....	50
3.9 Charakterisierung der Eigenschaften der monoklonalen Antikörper in Zellkultur.....	52
3.9.1 Erhöhte Apoptoseraten bei gleichzeitiger Anwendung von <i>Gliotoxin</i> und monoklonalen Antikörpern bei PBMCs	52
3.9.2 Apoptoseraten der unterschiedlichen Subpopulationen der PBMCs	56
3.9.3 Apoptoseraten bei gleichzeitiger Anwendung von <i>Gliotoxin</i> , monoklonalen Antikörpern und Fc-Block bei C57BL/6 Thymozyten	57
3.9.4 Effekt von Fab-Fragmenten auf die <i>Gliotoxin</i> -induzierte Apoptose von C57BL/6Thymozyten.....	60
4 Diskussion	62
5 Zusammenfassung	66
6 Literaturverzeichnis	68
7 Abbildungsverzeichnis	72

1 Einleitung

Die Sporen des opportunistisch humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* finden sich weit verbreitet in unserer täglichen Umgebung, während der Pilz selbst im Boden und in biologischen Abbauprodukten wächst. Seine Sporen sind sehr klein und widerstandsfähig gegenüber verschiedensten Umweltbedingungen. Sie verteilen sich in der Luft und werden auch vom Menschen, der pro Tag etwa 10.000 l Luft einatmet, über den Respirationstrakt aufgenommen (Dagenais and Keller 2009). Dem angeborenen Immunsystem gelingt es normalerweise, diese potentiellen Krankheitserreger zu beseitigen. Dieses dient der ersten Reaktion des Organismus auf ein fremdes Agens und es funktioniert auch ohne vorherigen Kontakt zum Auslöser. Es besteht aus verschiedensten Komponenten, unter anderem physikalischen und epithelialen Barrieren, Zellen sowie löslichen Mediatoren. Wichtige Zellen der angeborenen Immunabwehr sind die neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und die natürlichen Killerzellen. Wichtige zirkulierende Effektorproteine sind das Komplementsystem und Zytokine wie TNF, IL-1 und IL-2 und IFN- γ . Ein wichtiger Bestandteil des natürlichen Immunsystems sind auch die Toll-like Rezeptoren, die auf vielen Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert werden, bestimmte Abschnitte auf pathogenen Mikroorganismen erkennen und bei deren Eliminierung die Hauptfunktion erfüllen (Futosi et al. 2013). Ist bereits eine dieser Komponenten gestört, kann es zu einem Wachstum und einer Ausbreitung des Pilzes im Lungengewebe kommen. Immunkompromittierte Patienten, beispielsweise Patienten nach Knochenmarkstransplantation, AIDS Patienten und Patienten unter immunsuppressiver Therapie, sind demnach besonders anfällig für pulmonale Mykosen (Balloy and Chignard 2009). Die von *Aspergillus* hervorgerufenen sogenannten Aspergillosen sind bezüglich ihres Erscheinungsbildes sehr unterschiedlich; sie reichen von Allergien, wie der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose über das Aspergillom, einer Einnistung und einem Wachstums des Pilzes in vorbestehenden Lungenkavernen bis hin zur invasiven pulmonalen Aspergillose, die vor allem bei immunsupprimierten Patienten vorkommt und oft tödlich verläuft (Tochigi et al. 2013).

Aspergillus fumigatus produziert während seines Wachstums verschiedene Mykotoxine. Diese sind niedermolekulare Stoffe, die verschiedene Zellfunktionen hemmen. Ihr

Nutzen für den Pilz ergibt sich aus dem Schutz vor anderen Mikroorganismen und aus der direkten Schädigung des Wirts (Abad et al. 2010). *Fumagillin* beispielsweise hemmt die Endothelzellproliferation und führt zur Ziliostase. *Fumitremorgin* hingegen ist ein neurotropes Toxin (Abad et al. 2010). *Gliotoxin* ist ein in großer Menge produziertes Toxin des Pilzes (Lewis et al. 2005) und gleichzeitig eines der Giftigsten (Kupfahl et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass *Gliotoxin* das potenteste Toxin ist, das *Aspergillus fumigatus* produziert (Kwon-Chung 2009). Über 95% aller *Aspergillus fumigatus* Stämme produzierten dieses Toxin (Abad et al. 2010). *Gliotoxin* gehört zu den Epipolythiodioxopiperazinen und besitzt ein breites Spektrum immunsuppressiver Wirkungen *in vivo* (Pahl et al. 1996) und *in vitro* (Kupfahl et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass *Gliotoxin* die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor κ B (NF- κ B) inhibiert (Pahl et al. 1996). NF- κ B gehört einer Familie von Transkriptionsfaktoren aus Homo- oder Heterodimeren homologer Proteine des Proteins c-Rel an (Perkins 2012). Diese Transkriptionsfaktoren sind wichtig für die Transkription vieler Gene der angeborenen und erworbenen Immunantwort. NF- κ B wird beispielsweise durch die Signalkaskade des T-Zell-Rezeptors aktiviert, wodurch daraufhin die Zytokinsynthese eingeleitet wird. Wenn die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors gehemmt wird, werden folglich auch die betreffenden Zytokine, wie z.B. IL-2 vermindert synthetisiert (Imose et al. 2004). IL-2 ist besonders wichtig für die Aktivierung von T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen. Somit wird die zelluläre Immunantwort durch *Gliotoxin* gehemmt. Der Transkriptionsfaktor wird überdies auch zur Transkription von Wachstumsfaktoren bzw. Zelladhäsionsmolekülen benötigt (Stanzani et al. 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass *Gliotoxin* die oxidative Aktivität der polymorphnukleären Leukozyten hemmt (Tsunawaki et al. 2004). Diese ist nötig, um phagozytierte Mikroben zu beseitigen. Die aktivierten Makrophagen und Neutrophilen wandeln molekularen Sauerstoff in Reactive Oxygen Species (ROS) um, welche die Mikroben durch ihre hohe oxidative Aktivität zerstören. Dies wird zum Beispiel zur Beseitigung eingedrungener und phagozytierter Sporen des Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* benötigt. Gleichzeitig hemmt das Gift die Phagozytose und bakterizide Aktivität der Phagozyten und polymorphnukleären Zellen (Stanzani et al. 2005), sowie dosisabhängig die Zytokinproduktion von Makrophagen und Enterozyten (Fitzpatrick et al. 2000) und die Antigenpräsentation. Weiterhin führt es zur Apoptoseeinleitung von Monozyten und zur auf der Hemmung der An-

tigenpräsentation beruhender Beeinträchtigung der T-Zellaktivierung (Stanzani et al. 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *Gliotoxin* grundlegend hemmende Effekte auf T-Zellfunktionen, wie zum Beispiel die Interferon-gamma Produktion durch CD4⁺-Lymphozyten (Wichmann et al. 2002) oder die Reifung der zytotoxischen T-Zellen hat (Yamada et al. 2000). Außerdem leitet *Gliotoxin* die Apoptose ein. Dies geschieht durch die Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bak, das zur Familie der Bcl-2 Proteine gehört (Pardo et al. 2006). Bak befindet sich im Zytoplasma und wird durch verschiedene Stimuli, wie DNA Schädigung über BH3-only Proteine aktiviert. Infolge der Aktivierung des Proteins Bak verändert sich dessen Konformation, es oligomerisiert und transloziert an die äußere Mitochondrienmembran (Tait and Green 2010). Dadurch wird die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ausgelöst, die die Integrität der mitochondrialen Zellmembran verändert, was die Freisetzung mitochondrialer proapoptotischer Faktoren, wie Cytochrom c und letztendlich eine Caspase Aktivierung hervorruft (Pardo et al. 2006). Caspasen sind Cysteinproteasen, die Proteine C-terminal von Aspartat spalten. Sie werden selbst durch Proteolyse aktiviert, da sie als Proenzyme in der Zelle vorliegen. Die enzymatische Kaskade mehrerer Caspasen führt letztendlich zur Apoptose, also dem programmierten Zelltod. Es gibt Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen. Caspase-3 spielt dabei eine wichtige Rolle als Effektorcaspase, die eine Nuklease zur DNA-Spaltung aktiviert, die Caspase-aktivierte DNase (CAD) (Larsen and Megeney 2010). Die Caspasen können über zwei Wege aktiviert werden, einerseits durch den bereits erwähnten intrinsischen, mitochondrialen Weg, andererseits durch auf der Zellmembran aktivierte Todesrezeptoren CD95, den sogenannten extrinsischen Weg. CD95 (Fas) gehört zur TNF Rezeptorfamilie und wird auf vielen Zellen exprimiert. Wenn der Rezeptor an seinen Liganden bindet, der wiederum auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, wird die Apoptose eingeleitet. Dies geschieht ebenfalls über die Aktivierung von Procaspasen und Caspasen (Bouillet and O'Reilly 2009). Bak^{-/-} Mäuse, die kein Bak besaßen, waren weit weniger anfällig für die *Gliotoxin* produzierenden Stämme des Schimmelpilzes, als Wildtyp Mäuse: Sie waren durch die verminderte Aktivierbarkeit ihres mitochondrialen Apoptoseweges nicht so empfindlich gegenüber der toxischen Wirkung des *Gliotoxins* (Pardo et al. 2006).

Die molekulare Struktur des Toxins ist wichtig für seine intrazelluläre Wirkung. *Gliotoxin* besitzt eine interne Disulfidbrücke, die als reaktive Gruppe des Moleküls fungiert

(siehe Abb.1). Sie bindet an Proteine, beispielsweise an die Alkoholdehydrogenase, die Creatinkinase oder wie beschrieben an den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Choi et al. 2007). Liegt das Molekül in seiner reduzierten Thiolform vor, kann es diese Funktion nicht mehr ausüben (Bernardo et al. 2003). Neben dieser kovalenten Form der Wirkungsübung des Toxins wurde auch über die Möglichkeit der oxidativen Schädigung bestimmter Proteine berichtet (Waring et al. 1995).

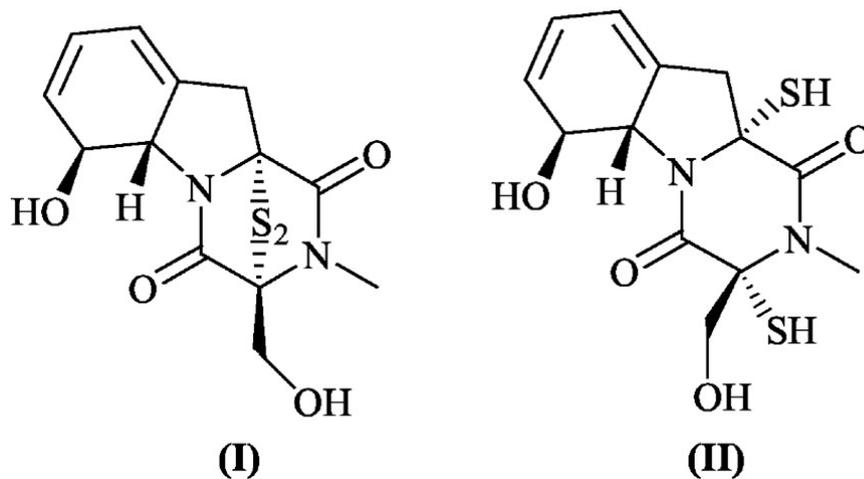


Abbildung 1: (I) Oxidierte Disulfidform des *Gliotoxins*, (II) Reduzierte Dithiolform des *Gliotoxins*. (Bernardo P H et al. J. Biol. Chem. 2003; 278:46549-46555)

Gliotoxin hemmt folglich biologisch essentielle Prozesse, die mit der Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion von Immunzellen im Zusammenhang stehen. Dies führt zu der Annahme, dass die *in situ* Produktion von *Gliotoxin* während des Wachstums der *Aspergillus fumigatus* Spezies bei der Immunevasion sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunantwort hilft und damit zur Pathogenese der invasiven Aspergillose beiträgt (Stanzani et al. 2005).

Die Immunevasion des Pilzes konnte unter anderem auch im Mausmodell bestätigt werden. Eine *ex vivo* Behandlung mit *Gliotoxin* vor der Knochenmarks- und auch Schilddrüsentransplantation führte zu verminderten Abstoßungsreaktionen (Sutton et al. 1995). Darüber hinaus konnte bei Mäusen mit induzierter invasiver Aspergillose *Gliotoxin* im Serum nachgewiesen werden (Lewis et al. 2005). *Gliotoxin* ließ sich auch aus Seren von an invasiver Aspergillose leidenden Patienten extrahieren (Kupfahl et al.

2008). Dabei bewegte sich die Konzentration des Toxins im Blut in einem Bereich von 166 – 785 ng/ml (Abad et al. 2010). Dies entspricht einer Molarität von 0,5 μ M bis 2,4 μ M. Diese Tatsache legt den Verdacht nahe, dass *Gliotoxin* ein wichtiger Virulenzfaktor ist (Lewis et al. 2005). Diesbezüglich wurde gezeigt, dass *Aspergillus fumigatus* Stämme, bei denen ein wichtiges Gen, das zur Biosynthese von *Gliotoxin* benötigt wird, entfernt wird, weit weniger virulent sind als *Gliotoxin*-produzierende Stämme. Dazu wurde das Gen *gliP*, das für die nicht-ribosomale Peptidsynthetase GliP kodiert, entfernt. GliP wird für den ersten Schritt der *Gliotoxin* Biosynthese benötigt. Mäuse, die sich nicht in der Neutropenie befanden, also eine normale Anzahl neutrophiler Granulozyten besaßen, hatten eine damit höhere Überlebensrate als die mit *Gliotoxin* produzierenden Stämmen infizierten Mäuse (Spikes et al. 2008). Außerdem überlebten die neutrophilen Granulozyten die Infektion mit *A. fumigatus* „Nichtproduzierern“ unbeschädigter, als die mit *Gliotoxin* in Kontakt getretenen Granulozyten. Deren Zellkerne waren weitaus weniger fragmentiert und größtenteils sogar noch intakt. Bei *in vitro* kultivierten Makrophagen oder T-Zelllinien zeigte sich ebenfalls ein reduzierter zytotoxischer Effekt, wenn *Gliotoxin* im Zellüberstand des Pilzes fehlte (Kupfahl et al. 2006). *Gliotoxin* zählt daher zu den wichtigen Pathogenitätsfaktoren von *Aspergillus*. Es wurde bereits gezeigt, dass *Gliotoxin* das potenteste Toxin ist, das *Aspergillus fumigatus* produziert (Abad et al. 2010). Gleichzeitig ist der Nachweis von *Gliotoxin* pathognomonisch für die invasive Aspergillose, da das Toxin nicht in Verbindung mit einer anderen Erkrankung klinisch relevanter Pilze nachgewiesen werden konnte (Fox et al. 2004). Daneben gibt es zwar zahlreiche weitere Virulenzfaktoren, die von *Aspergillus fumigatus* produziert werden, wie z.B. extrazelluläre Metalloproteasen, Serinproteasen, Katalasen, Phospholipasen oder auch das Zytotoxin ASPF1; jedoch konnte für keinen von ihnen gezeigt werden, dass er eine wichtige Rolle in der Pathogenese der invasiven Aspergillose spielt (Latge 2001).

Die Inzidenz der invasiven Aspergillose wird zu über neunzig Prozent von *Aspergillus fumigatus* ausgelöst (Pardo et al. 2006). Sie betrifft vor allem immunsupprimierte Patienten (Dagenais and Keller 2009). Die tatsächliche Zahl Erkrankter wird jedoch aufgrund der unzureichenden Diagnosemöglichkeiten unterschätzt (Fox et al. 2004). Diagnostiziert wird die Erkrankung meist durch positiven *Aspergillus* Antigennachweis aus Blut, Sputum, Bronchialsekret, Biopsiematerial oder auch aus dem Liquor. Dabei

werden Antigene der Zellwand des Pilzes, wie Mannan oder Galaktomannan nachgewiesen. Diese Methode besitzt allerdings nur geringe Sensitivität und Spezifität, was deren Einsatz im klinischen Alltag limitiert (Fox et al. 2004). Weiterhin besteht die Möglichkeit des histologischen Erregernachweises aus Biopsiematerial. Woo et al. haben zum Beispiel einen Antikörpernachweis gegen bestimmte *Aspergillus* Antigene entwickelt (Woo et al. 2002). Oft ist ein Antikörpernachweis bei immunsupprimierten Patienten jedoch eher unzuverlässig, da die Immunantwort und damit auch die Antikörperproduktion bei ihnen ohnehin eingeschränkt ist. *Gliotoxin* selbst kann durch die Gaschromatographie detektiert werden (Fox et al. 2004). Insgesamt sind die Detektionsmöglichkeiten allerdings begrenzt und häufig nicht aussagekräftig.

Die vorhandenen Therapiemöglichkeiten der invasiven Aspergillose aber auch anderer systemischer Pilzinfektionen beschränken sich auf eine geringe Anzahl an Medikamenten. Azole hemmen die Ergosterol Biosynthese über die Inhibierung der Lanosterol 14- α -Demethylase und sind Mittel der ersten Wahl bei der Behandlung der invasiven Aspergillose (Walsh et al. 2008). Ein weiterer Wirkstoff ist das Polyen-Makrolidantibiotikum Amphotericin B, das an Ergosterol bindet. Ergosterol ist das vorherrschende Sterol in der Zellmembran der meisten medizinisch relevanten Pilze. Durch die Interaktion verändert sich die Zellmembranpermeabilität und die Zelle stirbt ab (Walsh et al. 2008). Echinocandine inhibieren die Synthese von β -1,3-Glucanen und stören damit die Zellwandfunktion und -struktur. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass bei Anwendung von Caspofungin die *Gliotoxin*-Freisetzung sogar erhöht wird (Eshwika et al. 2013). Sie werden meist nur als Reservetherapie verwendet (Walsh et al. 2008). Meist sind die Antimykotika bei der Mehrheit der Patienten nur unzureichend wirksam. Beispielsweise wurde bei der Salvage Therapie mit Caspofungin bei invasiver Aspergillose gezeigt, dass diese nur bei 45 Prozent der Patienten wirksam ist (Maertens et al. 2004). Weiterhin sprachen nur 42 Prozent der Patienten mit invasiver Aspergillose auf die Therapie mit Amphotericin B an (Walsh et al. 1998). 54 Prozent einer Patientengruppe mit invasiven Pilzinfektionen erfuhren durch die Behandlung mit Voriconazol eine komplette oder partielle Remission (Chu et al. 2013). Die Therapie mit diesen Antimykotika der zweiten Generation zeigt also eher mäßigen Effekt und bleiben insgesamt inadäquat (Pardo et al. 2006). Nach Inhalation und Wachstum der Pilzsporen wird das Lungengewebe nach und nach zerstört. Der Pilz kann sich somit weiter über die

Blutbahn ausbreiten und so werden weitere Organe, wie zum Beispiel das Gehirn, das Herz oder die Nieren befallen. Die Mortalität liegt dann bei 80-95% (Fox et al. 2004). Die invasive Aspergillose ist damit mit die häufigste Todesursache bei immunsupprimierten Patienten (Stanzani et al. 2005).

Ziele der Arbeit

Da Aspergillosen zu den opportunistischen Infektionen gehören, die bei Immunschwäche bevorzugt auftreten, könnte eine Therapie, die nicht ausschließlich auf ein intaktes Immunsystem angewiesen ist, von Vorteil sein. Eine passive Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern gegen *Gliotoxin* als Alternative zur herkömmlichen meist unzureichenden antimykotischen Therapie wäre eine interessante Alternative.

Daher war das Ziel #1 dieser Arbeit, murine monoklonale Antikörper gegen *Gliotoxin* herzustellen und ihre Eigenschaften *in vitro* und in Zellkultur zu untersuchen.

Ziel #2: Einsetzen der Antikörper zusammen mit dem Toxin, um ihren Neutralisierungseffekt hinsichtlich der Apoptose von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Maus-Thymozyten zu überprüfen.

Ziel #3: Entwicklung eines diagnostischen ELISA Tests, der mithilfe der monoklonalen Antikörper *Gliotoxin* detektieren kann. So könnten in Zukunft Patientenserum auf das Vorkommen von *Gliotoxin* im peripheren Blut untersucht werden und damit eventuelle Veränderungen in den Therapiestrategien vorgenommen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

2.1.1.1 Murine Zelllinien

AgX Myelomzellen (X63.Ag8.653)

BALB/c Milzzellen Hauszucht und Charles River, Sulzfeld

C57BL/6 Thymozyten Hauszucht

2.1.1.2 Humane Zelllinien

Jurkatzellen (T- Leukämiezelllinie)

Humane PBMCs (Periphere mononukleäre Zellen des Blutes verschiedener Spender, bezogen aus der Blutbank des ZIM, Würzburg)

2.1.2 Mono-und Polyklonale Antikörper

Antikörper	Spezifität	Hersteller
Rat-Anti-Mouse IgG Heavy Chain; Biotinylated	IgG Heavy Chain, polyclonal	AbD Serotec, Düsseldorf
Human Fc Receptor Binding Inhibitor Functional Grade ® Purified	Fc Receptor, polyclonal	eBioscience®, Frankfurt
Purified Rat-Anti-Mouse CD16/CD3 BD Fc-Block™	Mouse CD16/CD32	BDPharmingen™, Heidelberg
Goat Anti-Mouse IgG (Fab specific)–Biotin antibody	Mouse Fab-specific	Sigma, Deisenhofen

2.1.3 Serologische Reagenzien

Fetales Calfserum (FCS) Gibco BRL, Eggenstein

Synthetic complete medium (SC) Gibco BRL, Eggenstein

2.1.4 Chemikalien

Substratlösungen A und B für ELISA	BD Biosciences, Heidelberg
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumsulfat	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat 10% (APS)	AppliChem, Darmstadt
Avidin-Meerrettichperoxidase (AV-HRP)	BD Pharmingen™, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
BSA- <i>Gliotoxin</i> Konjugat	freundlicherweise hergestellt von Stefan Saremba, Institut für Botanik I, Würzburg
Comassie-Lösung	AppliChem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth®, Karlsruhe
<i>Gliotoxin</i> 5 mg	AppliChem, Darmstadt
0,1 M Glycinlösung	AppliChem, Darmstadt
HAT Media Supplement 50X Hybri-Max	Sigma, Deisenhofen
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	AppliChem, Darmstadt
HT Media Supplement 50X Hybri-Max	Sigma, Deisenhofen
H ₃ PO ₄	AppliChem, Darmstadt
Maus IL-6	NatuTec, Frankfurt
Natriumazid (NaN ₃)	AppliChem, Darmstadt
(Na) ₂ CO ₃	AppliChem, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol 1500 (PEG)	Roche, Mannheim

Protein G Sepharose	GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala
RPMI 1640	Gibco®, Invitrogen™, Auckland
EZ Link® Sulfo-N-Hydroxysuccinimid-LC-Biotin	Thermo Scientific®, Schwerte
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth®, Karlsruhe
Thyroglobulin- <i>Glilotoxin</i> Konjugat	freundlicherweise hergestellt von Stefan Saremba, Botanik, Würzburg
TiterMax®	Alexis, Grünberg
TMB Substrate Reagent Set (Tetramethylbenzidin)	BD Biosciences, Heidelberg
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	AppliChem, Darmstadt

2.1.5 Standardlösungen, Puffer, Medien und Plastikwaren

AB-positives hitzeinaktiviertes Humanse- rum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Öster- reich
AB Medium	RPMI 1640, L-Glutamine, nicht-essentielle Aminosäuren, HEPES, β-Mercaptoethanol, Natriumpyruvat, Penicillin/Streptomycin und 10% AB-positives hitzeinaktiviertes Humanserum (AB Serum)
Beschichtungspuffer	0,84 g NaHCO ₃ , 0,356 g NaCO ₃ ad 100 ml H ₂ O; pH=9,5
Bicarbonatpuffer 0,1 M	pH 9,5
Blockierungspuffer	3% FCS in PBS

BSS
(Balanced Salt Solution)

BSS I

BSS II

50 g	Glukose	9,25 g	CaCl ₂
3 g	KH ₂ PO ₄	20 g	KCl
11,9 g	Na ₂ HPO ₄	320 g	NaCl
0,5 g	Phenolrot	10 g	MgCl ₂
ad 5 l H ₂ O bidest		10 g	MgSO ₄
			ad 5 l H ₂ O bidest

→ 125 ml BSS I und 125 ml BSS II und 1000 ml H₂O

BSS/BSA

0,2% BSA in BSS

Bulk Fusion Medium

47,5 ml RPMI 1640, 2,5 ml SC und 2,5 ml FCS, supplementiert mit 5 µl Maus IL-6

Einfriermedium für Zellkulturen

50% FCS, 40% RPMI⁺, 10% DMSO

Entfärbelösung

100 ml CH₃COOH 100%, 300 ml CH₃OH
ad 1 l H₂O

PBS
(Phosphate Buffered Saline)

0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 0,05 g MgCl₂,
8 g NaCl, 1,15 g Na₂HPO₄ ad 1000 ml H₂O
bidest

PBS/Azid

0,001% NaN₃ in PBS

PBS/BSA/Azid

0,2% BSA, 0,02% NaN₃ in PBS

PBS/Tween

0,1% Tween in PBS

Plastikwaren für Zellkultur

handelsübliche Artikel

Probeverdünnungspuffer

1% FCS in PBS

Probepuffer: Bromphenolblau

Sigma, Deisenhofen

RPMI⁻

RPMI 1640, Gibco BRL, Eggenstein

RPMI⁺

RPMI⁻, je 100 ml mit 5 ml FCS, 1 ml Natriumpyruvat, 1 ml nicht-essentielle Aminosäuren, 1 ml Penicillin-Streptomycin (je 100x, Gibco BRL, Eggenstein), 2 ml 2-Mercaptoethanol, 29,2 mg Glutamin

RPMI/FCS	10% FCS in RPMI
RPMI/FCS/SC	10% FCS, 10%SC in RPMI
Sammelpuffer	1,3 ml Acrylamid, 2,5 ml Sammelpuffer, 6 ml H ₂ O, 150 µl APS 10%, 20 µl TEMED
Sammelpuffer	0,5 M Tris , pH 6,8; 0,4% SDS
Trenngel	5 ml Acrylamid, 3,75 ml Trennpuffer, 6,25 ml H ₂ O, 150 µl APS 10%, 25 µl TEMED
Trennpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8; 0,4% SDS
Tris 1 M	Trizma® Base, Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	0,04% in PBS/Azid
1X HAT Medium	46,5 ml RPMI 1640, 2,5 ml SC und 2,5 ml FCS, supplementiert mit 5 µl Maus IL-6 und 1 ml 50X HAT
50X HAT Stock Lösung	1 Röhrchen gefriergetrocknetes HAT Pulver ad 10 ml sterilem RPMI

2.1.6 Standards und Kits

Biorad™-Proteinassay	Biorad, München
Isotype (mouse monoclonal isotyping) test	AbD Serotec, Düsseldorf
Ficoll® Lösung	AppliChem, Darmstadt
Lynx Rapid HRP Antibody Conjugation Kit®	AbD Serotec, Düsseldorf
Marker	PageRuler™, Prestained Protein Ladder, Fermentas, St.Leon-Rot
Mouse IgG ₁ Fab and F(ab') ₂ Preparation Kit	Thermo Fisher Scientific®, Schwerte

2.1.7 Großgeräte und Gebrauchsmaterialien

Durchflußzytometer FACScan® Becton Dickinson, Heidelberg

CellQuestPro® Software BD, Heidelberg

FLOWJO Software Ashland, USA

Bei allen anderen nicht aufgelisteten Geräten und Materialien handelte es sich um Standardgeräte und handelsübliche Gebrauchsmaterialien.

2.2 Versuchstiere

Inzuchtstämme der folgenden Quellen wurden verwendet:

BALB/c Institut für Virologie und Immunbiologie der
Universität Würzburg (Hauszucht) und Charles
River, Sulzfeld

C57BL/6 Hauszucht

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkultivierung

Jurkat Zellen und AgX-Myelomzellen

Die Jurkat Zellen und AgX-Myelomzellen wurden in RPMI⁺ Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 94% Luftfeuchtigkeit in sterilen Plastikkulturflaschen kultiviert. Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurden Aliquots aus Gewebekulturflaschen entnommen und mit Trypanblau verdünnt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus. Die lebenden Zellen konnten so in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt werden.

Wurden Zellen in neue Kulturgefäße überführt, so wurden sie mit einer Pipette zunächst sanft suspendiert. Erhaltungskulturen wurden in vier Verdünnungsstufen in 24-well-

Platten ausgesät und wöchentlich umgesetzt. Die Zellen wurden zur langfristigen Aufbewahrung in einem Gefrierschrank bei -80°C verwahrt. Zum Einfrieren wurden je 2 bis 5×10^6 Zellen in Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und eingefroren. Eingefrorene Zellen wurden in 37°C Wasserbad aufgetaut, in ein Falconröhrchen überführt und mit RPMI^+ resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert und zur weiteren Kultivierung in RPMI^+ aufgenommen.

PBMCs

(Peripheral Blood Mononuclear Cells: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)

Menschliche PBMCs gesunder Spender als ein Nebenprodukt der Plättchenkonzentrate in Blutbanken, die mit sogenannten Leucodestruction System Chambers erhalten werden, wurden mit VerseneTM, einem Chelator zur Bindung von eventuell vorhandenen Metallionen, versetzt und anschließend per Dichtegradientenzentrifugation in AB Medium aufgetrennt. Danach wurden sie mit eiskaltem BSS/0,1% BSA gewaschen. Die PBMCs wurden in AB Medium bei 37°C , 5% CO_2 und 94% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen teilten sich daraufhin zwei Tage lang. Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen, zum Einfrieren und Auftauen wurden die gleichen Verfahren wie auch für die Jurkat Zellen angewandt.

Hybridomzellen

Zunächst wurden die Hybridome, eine Fusion aus BALB/c Milzzellen und AgX Myelomzellen, in Selektionssnährmedium HAT, danach in HT Medium und anschließend in mit murinem IL-6 angereichertem RPMI^+ bei 37°C , 5% CO_2 und 94% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Konzentration an IL-6 betrug 100 U/ml RPMI^+ .

2.3.2 Herstellung der BSA-*Gliotoxin* und BSA-Thyreoglobulin Konjugate

Es wurde entweder ein BSA oder Thyreoglobulin Molekül an *Gliotoxin* gekoppelt. Die Verknüpfung der Moleküle wurde mittels SATA (S-Acetylthioglycolazid N-Hydroxysuccinimid) durchgeführt, das Sulfhydrylgruppen an Amingruppen eines Moleküls anheftet und es damit eine potentiell reaktive Gruppe an einem Teil des Moleküls schafft, um es bei Bedarf mit einem anderen zu koppeln (Duncan et al. 1983). *Gliotoxin*

wurde mit N-P-Maleimidophenyl Isocyanat (PMPI) aktiviert. Dabei ist zu erwähnen, dass Thyreoglobulin potentiell an mehr *Glilotoxin* gekoppelt werden kann, da es über mehr Aminogruppen verfügt (Fox et al. 2004). Die Kopplung wurde freundlicherweise von Stefan Saremba (Institut für Botanik I, Universität Würzburg) durchgeführt.

2.3.3 Zellfusion

Theorie

Die erste Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurde 1975 von Georges Köhler und Cesar Milstein entwickelt (Kohler and Milstein 1975). Sie basiert auf der Tatsache, dass B-Lymphozyten Antikörper mit einer bestimmten Spezifität produzieren. B-Lymphozyten sind normalerweise jedoch nicht besonders langlebig. Deshalb werden B-Zellen mit Myelomzellen fusioniert. Diese fusionierten Zellen, die sogenannten Hybridome, werden anschließend in Selektionsnährmedium kultiviert. Das HAT Medium enthält Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin. Aminopterin hemmt das Enzym Dihydrofolatreduktase, das essentiell für die DNA *de novo* Synthese ist. Hypoxanthin und Thymidin stellen Substrate des Salvage Pathways der DNA Synthese dar. So können Zellen, die die Enzyme Thymidinkinase (TK) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) besitzen, DNA aus Hypoxanthin und Thymidin synthetisieren, wohingegen Zellen, die diese Enzyme nicht besitzen, dazu nicht mehr in der Lage sind, wenn Aminopterin gleichzeitig ihre DNA *de novo* Synthese hemmt. AgX Zellen besitzen weder TK noch HGPRT, da die entsprechenden Gene bei ihnen durch Mutagenese deletiert wurden. Unfusionierte AgX Zellen sind aufgrund dessen nicht mehr zur DNA Synthese befähigt, was letztendlich zum programmierten Zelltod führt. Unfusionierte Milzzellen sterben wegen ihrer kurzen Lebensdauer, die etwa ein bis zwei Wochen beträgt. Die Hybridome besitzen die beiden Enzyme des Salvage Pathways, die sie aus den Milzzellen erhalten, haben dazu eine unkontrollierte Wachstumspotenz und werden somit als einzige Zellen selektioniert (Kohler and Milstein 1975).

Immunisierung

Um die monoklonalen Antikörper herzustellen, wurden Mäuse mit einem BSA-*Gliotoxin* Konjugat, ein BSA gekoppeltes *Gliotoxin* Molekül, immunisiert. *Gliotoxin* ist ein Hapten, das heisst alleine ist es nicht immunogen. Es führt aufgrund seiner geringen Grösse zu keiner spezifischen Immunantwort durch den Organismus. Es wurde bereits gezeigt, dass solche Konjugatmoleküle immunogen sind und die Produktion von spezifischen Antikörpern hervorrufen. Dazu wurden Kaninchen immunisiert und per ELISA die Spezifität der Antiseren für das Konjugat beurteilt. Seren stellen ein polyklonales Antikörpergemisch dar. Auch bei hoher Verdünnung konnte ein positives Signal erhalten werden. Gleichzeitig konnte die Bindung der Antiseren an das Konjugat durch Zugabe von freiem Toxin inhibiert werden (Fox, Gray et al. 2004). In diesen Experimenten wurden direkt monoklonale Antikörper gegen *Gliotoxin* anstatt Antiseren verwendet.

Die BALB/c Mäuse wurden insgesamt jeweils dreimal mit dem BSA-*Gliotoxin* Konjugat, einem an BSA gekoppelten *Gliotoxin* Molekül immunisiert. Zunächst erfolgte dies mit 40 µg des Konjugats und TiterMax®, einem Adjuvans, das zur Verstärkung der Immunantwort führt, subkutan, dann nach vier Wochen mit 10 µg in PBS intraperitoneal und zum Abschluss wurde ein Boost von 2 µg Konjugat in PBS intravenös gegeben. Drei Tage danach wurde die Zellfusion durchgeführt.

Isolation der Milzzellen

Um antikörperproduzierende B-Zellen zu isolieren, wurde die Milz entnommen und kurzzeitig in BSS auf Eis gelegt. Die Fettummantelung wurde entfernt und die Milz durch ein Nylonsieb mit der Porengröße 70 µm in ein Falconröhrchen gedrückt. Dieses wurde mit 50 ml BSS aufgefüllt und insgesamt dreimal bei 1600 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert und zweimal mit 50 ml RPMI gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 10 ml RPMI resuspendiert und gezählt.

Myelomzellen

Die AgX Myelomzellen wurden zehn Tage vor der Fusion aufgetaut und in RMPI/FCS/SC Medium im Verhältnis 1×10^5 bis 1×10^6 pro ml kultiviert. Ein Tag vor

der Fusion wurden diese Zellen nochmals mit frischem RPMI/FCS/SC Medium (Verhältnis 1×10^5 bis 1×10^6 pro ml) versetzt. Die Zellen wurden am Tag der Fusion dreimal mit RPMI γ gewaschen. Dazwischen wurde bei 1600 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Resuspendiert wurden die Zellen in 10 ml RPMI γ und anschließend gezählt.

Fusion

Für die erfolgreiche Zellfusion von Milzzellen und Myelomzellen wurden diese im Verhältnis 5:1 gemischt und mit RPMI γ auf 50 ml in einem Falconröhrchen aufgefüllt. Nach dem fünfminütigen Zentrifugieren bei 1600 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt und die letzten Tropfen RPMI γ mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Das Röhrchen mit den Zellen wurde dann im Wasserbad bei 37°C unter die sterile Werkbank gegeben. Alle nachfolgenden Schritte wurden ebenfalls unter der sterilen Werkbank durchgeführt. Mit einer Plastikpipette wurde 1 ml vorgewärmtes Polyethylenglykol (PEG) pro 1×10^8 Milzzellen tröpfchenweise über eine Minute hinzugefügt und gleichzeitig gerührt. Polyethylenglykol führt durch Membranveränderung zur Zellfusion der Myelomzellen mit den B Lymphozyten. Dann wurden 5 ml vorgewärmtes RPMI γ über fünf Minuten unter kontinuierlichem Rühren zu den Zellen gegeben. Das Gleiche wurde nochmals mit 10 ml vorgewärmtem RPMI γ wiederholt. Am Ende wurden nochmals 30 ml RPMI γ dazugegeben. Die Zellsuspension wurde nachfolgend für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO $_2$ inkubiert. Danach wurden die Zellen nochmals bei 1600 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Sie wurden anschließend vorsichtig in vorgewärmtem Bulk Fusion Medium resuspendiert. Das Verhältnis betrug dabei $2,5 \times 10^6$ Zellen pro ml. Diese Zellen wurden über Nacht in Gewebekulturflaschen im Brutschrank inkubiert. Am Tag nach der Zellfusion wurden die Zellen in 50 ml Falconröhrchen gegeben und bei 1600 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Resuspendiert wurde mit warmen HAT Medium. Das Verhältnis betrug 1×10^8 Milzzellen auf 130 ml Medium. Diese Suspension wurde dann auf 96-well Suspensionsplatten aufgeteilt. Dazu wurden jeweils 2 Tropfen der Zellsuspension aus einer 10 ml Glaspipette in ein Nöpfchen gegeben. Am dritten Tag nach der Zellfusion wurde je ein Tropfen vorgewärmtes HAT Medium pro Nöpfchen auf die Platten gegeben. Die Hybridome wurden dann vier Wochen lang im Inkubator weitergezüchtet. Sie wurden täglich kontrolliert und jeden zweiten Tag wurde das Medium bis zur Hälfte abgesaugt und je ein Tropfen frisches, warmes HAT Medi-

um pro Nöpfchen auf die Platten gegeben. Dies ist nötig, um einerseits die toxischen Stoffwechselprodukte zu entfernen, andererseits aber auch, um funktionstüchtiges HAT dazuzugeben, da das HAT Medium bei 37°C instabil ist. Die Zellen sind nach drei bis vier Wochen soweit gewachsen, dass sie am Boden der Platte konfluieren. Bevor sie allerdings gescreent werden können, werden gut wachsende Klone aus den 96-well Platten entfernt und in 48-well Platten gegeben; die Nöpfchen werden dann mit 500 µl warmem HT Medium aufgefüllt. Die Blockade durch Aminopterin ist hier nicht mehr nötig, da ohnehin nur noch „echte“ Hybridome vital sind. Hypoxanthin und Thymidin sind weiter als Substrate des Salvage Pathways vorhanden. In diesem Stadium können die Hybridome das erste Mal gescreent werden. Dazu werden die im Überstand enthaltenen Antikörper im *Gliotoxin*-ELISA auf ihre Substratbindungseigenschaften hin untersucht.

2.3.4 *Gliotoxin*-ELISA (Enzyme-linked Immunosorption Assay)

Die ELISA Platten wurden zunächst mit 50 µl Beschichtungspuffer, der 100 µg/ml Thyreoglobulin-*Gliotoxin* Konjugat enthielt und zur Kontrolle mit BSA oder BSA-*Gliotoxin* Konjugat gleicher Konzentration beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dieser Inhalt entfernt, die Platten dreimal mit PBS/Tween gewaschen und mit 170 µl Blockierungspuffer für zwei Stunden bei 37°C geblockt. Danach wurde dreimal mit PBS/Tween gewaschen und jeweils 50 µl Überstand aus den verschiedenen Nöpfchen auf die Platten gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die im Überstand vorhandenen Antikörper sollten dann an das am Boden der Platten fixierte *Gliotoxin*, welches an BSA oder Thyreoglobulin gekoppelt ist, binden. Am dritten Tag wurden die Platten fünfmal mit PBS/Tween gewaschen. Danach wurden sie mit einem biotinylierten anti-Maus IgG Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper konnte an die an *Gliotoxin* gebundenen Mausantikörper binden. Dazu wurde eine Konzentration von 1 µl biotinyliertem Antikörper pro 1 ml Probeverdünnungspuffer verwendet. Es waren immer 50 µl pro Napf. Danach wurde wieder fünfmal gewaschen und die Platten als Nächstes mit 1 µl pro 1 ml Probeverdünnungspuffer Avidin-Merrettichperoxidase für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei Avidin an Biotin bindet. Anschließend wurden die Platten achtmal gewaschen und 50 µl A:B Lösung pro Nöpfchen hinzugegeben und für fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur im

Dunkeln inkubiert. Die A Lösung enthält Wasserstoffperoxid, die B Lösung Tetramethylbenzidin. Werden diese Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt, reagieren sie mit Peroxidase-gekoppelten Proteinen und es tritt eine Blaufärbung ein. Die A:B Lösung muss dafür frisch zubereitet werden. Zum Schluss wurde 25 µl 1 M H₃PO₄ Lösung zu jedem Nöpfchen hinzugegeben um die Reaktion zu stoppen. Die Extinktion wurde anschließend im ELISA Reader bei 450 nm gemessen.

2.3.5 Subklonierung der Hybridome

Wenn der Überstand eines Nöpfchens im *Gliotoxin* ELISA positiv war, enthielt er demnach *Gliotoxin*-spezifische Antikörper. Die entsprechenden Zellen produzieren allerdings Antikörper unterschiedlicher Spezifität. Das Ziel war es jedoch, einzelne spezifische monoklonale Antikörper zu gewinnen. Um dies zu erreichen, wurde eine limitierende Verdünnung durchgeführt. Die Zellen wurden dabei so weit in Medium verdünnt, dass sich nur noch eine Zelle in jedem dritten Nöpfchen einer 96-well Platte befand. Zur Durchführung der limitierenden Verdünnung wurden $2,4 \times 10^3$ Zellen in 30 ml frisches Medium gegeben. Aus dieser Lösung wurden 10 ml entnommen und in ein neues Röhrchen mit 20 ml Medium gegeben. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Am Ende erhält man vier verschiedene Verdünnungen. Diese entsprechen bei Ausplattierung der endgültigen Konzentration von 10 Zellen/Napf, 3,3 Zellen/Napf, 1 Zelle/Napf und 0,33 Zelle/Napf. In einen Napf wurden 0,125 ml gegeben. Zur Ausplattierung wurden nur die Zellsuspensionen mit einer Konzentration von 1 Zelle/Napf und 0,33 Zelle/Napf verwendet. Die Platten wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis sie gut gewachsen sind. Es erfolgte eine tägliche Kontrolle der Platten mit regelmäßiger Zugabe frischen Mediums. Danach wurden die einzelnen Klone auf ihre *Gliotoxin*-Spezifität getestet.

2.3.6 Isotypen-Test

Um die Isotypen der monoklonalen Antikörper zu bestimmen, wurden 5 bis 10 µl Überstand aus der jeweiligen Zellkultur entnommen und diese mit je 900 µl PBS und 100 µl 10% BSA in PBS aufgefüllt. Aus dieser Mischung wurden 150 µl auf den Teststreifen gegeben und für 5 bis 10 Minuten inkubiert. Der Teststreifen enthält anti-κ und anti-λ Antikörper, die an einen Farbstoff gekoppelt sind. Weiterhin sind im Streifen Antikör-

per gegen die unterschiedlichen Antikörperisotypen immobilisiert. Gibt man nun den zu untersuchenden Antikörper auf den Anfang des Teststreifens bindet dieser an den Farbstoffgekoppelten Antikörper und dieser Komplex wandert bis zum entsprechenden Antikörper gegen den Subtyp. Die entstehende Bande auf dem Teststreifen konnte dann einem entsprechenden Antikörpersubtyp zugeordnet werden.

2.3.7 Ficoll Trennung der PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation

Durch Zentrifugation mittels eines Ficoll® Dichtegradienten können die mononukleären Zellen von den übrigen Zellen abgetrennt werden. Dazu wird antikoaguliertes Blut direkt aus dem Blutentnahmeröhrchen vorsichtig in ein Leucosep® Röhrchen gegeben und zehn Minuten bei 1000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Daraufhin sind von oben nach unten der Reihe nach folgende Schichten zu erkennen: Plasma, Lymphozyten und PBMCs, Separationsmedium, Trennscheibe, Separationsmedium, Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten. Die Plasmafraktion wird abgesaugt und verworfen. Die Lymphozyten und PBMCs werden mithilfe einer Pasteurpipette aus dem Röhrchen abgenommen, mit 10 ml PBS gewaschen und 10 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird zweimal wiederholt und das Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert. Die Zellen werden anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.3.8 Immunfluoreszenzfärbungen und Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Apoptoserate von Jurkatzellen und PBMCs wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Phosphatidylserin (PS), ein Phospholipid; findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose wird PS auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin V, ein zelluläres Protein, das physiologischerweise negativ geladene Phospholipide bindet, ist mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat), einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und bindet an PS an der Außenseite apoptotischer Zellen. Durch Markierung von Zellen mit an FITC gekoppelten Annexin V kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen. Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, kann FITC-Annexin V aber auch in die Zellen eindringen und sich an die Innenseite der Membran binden. Daher können bei alleiniger Färbung von Zellen mit FITC-Annexin V apoptotische nicht von nekrotischen Zellen unterschieden werden. Man kombiniert daher die

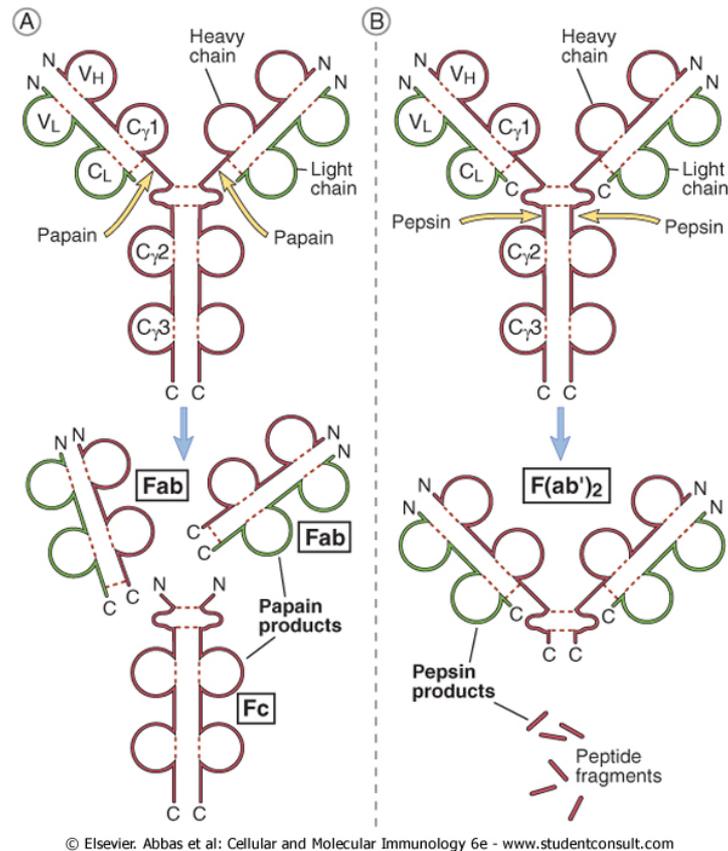
FITC-Annexin V Markierung mit einer 7AAD Färbung. Das 7AAD (7-Amino-Actinomycin-D) dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische Zellen ein. Lebende Zellen sind daher Annexin-negativ und 7AAD-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und 7AAD-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin-positiv und 7AAD-positiv.

Routinemäßig wurden 2×10^5 Zellen in 50 μl PBS/BSA/Azid mit je 0,5 μl FITC-Annexin V und 0,5 μl 7AAD für fünfzehn Minuten bei 4°C inkubiert und dann einmal mit PBS/BSA/Azid gewaschen. Anschließend wurden 350 μl PBS/BSA/Azid hinzugegeben und innerhalb von 60 Minuten im FACSTM Gerät gemessen. Die Analyse der Färbungen erfolgte unter Verwendung der CellQuestPro[®] Software. Es wurden in der Regel 5000-15000 Zellen pro Färbung analysiert, wobei zuvor bei der Darstellung der Zellgröße (FSC-Profil) und der Granularität (SSC-Profil) ein Fenster (Gate) so gewählt wurde, dass alle Zellen erfasst werden. Die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten erfolgt logarithmisch (\log_{10}); die relative Zellgröße ist auf einer linearen Skala dargestellt. Die Auswertung der Färbungen erfolgte mittels des Programms FLOWJO. Für die Messung der Apoptose wurden die Zellen mit verschiedenen *Glilotoxin* Konzentrationen versetzt und so der *Glilotoxin*-sensitive Bereich bestimmt. Dieser stellt die Konzentration an Toxin dar, bei der die Zellen zum Großteil gerade noch vital sind. Mit der betreffenden Konzentration wurden die Versuche fortgesetzt, da so die Einflüsse des *Glilotoxins* und der zugegebenen Antikörper am besten untersucht werden konnten.

Für die Darstellung der einzelnen Subpopulationen der PBMCs wurden diese mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Dazu wurden Annexin V-APC, CD14-PE, CD4-FITC, CD8-PE und CD19-FITC verwendet. Da gleichzeitig die Expression von vier verschiedenen Oberflächenantigenen gemessen werden kann, wurden zwei verschiedene Färbungen durchgeführt, wobei Annexin V-APC und 7AAD immer Bestandteil waren. Es wurden 0,5 μl 7AAD, 4 μl Annexin V-APC und je 115 μl der anderen Fluoreszenzfarbstoffe pro 2×10^5 Zellen verwendet. Zunächst wurde mit PE und FITC gefärbt, zweimal mit PBS/BSA/Azid gewaschen und dann die 7AAD und Annexin V Färbung durchgeführt.

2.3.9 Herstellung von Fab-Fragmenten

Bei den Versuchsansätzen wurden monoklonale Antikörper gegen *Glilotoxin* und auch daraus gewonnene *Glilotoxin*-spezifische Fab-Fragmente eingesetzt. Fab-Fragmente können biochemisch mithilfe proteolytischer Enzyme hergestellt werden und sind weiterhin in der Lage, die entsprechenden Antigene zu binden (Abb.2). Fab steht für Antigen bindendes Fragment. Die Fab-Fragmente besitzen im Gegensatz zu vollständigen Antikörpern keinen Fc Teil und haben im Vergleich zu intakten Antikörpern und Fab'2-Fragmenten auch nur eine Antigenbindungsstelle. Das Fc Stück besteht aus Teilen der konstanten Region. Mehrere Fc Teile können sich miteinander verbinden und auskristallisieren. Fc steht also für kristallisierbares Fragment (engl. crystallizable) (Abdul Abbas 2007).



© Elsevier, Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology 6e - www.studentconsult.com

Abbildung 2: Fragmente eines IgG Moleküls. IgG Moleküle können an den durch die Pfeile markierten Stellen durch Enzyme gespalten werden. Der Papain Verdau (A) führt zur Bildung zweier Fab-Fragmente (antigenbindende Regionen) und eines Fc Teils, der Pepsin Verdau (B) führt zur Bildung eines F(ab')₂-Fragments (Abdul Abbas 2007).

Die in der Durchflusszytometrie verwendeten Fab-Fragmente der monoklonalen Antikörper wurden mithilfe des Mouse IgG₁ Fab and F(ab')₂ Preparation Kit (Thermo Fisher Scientific®) nach Anleitung hergestellt. Die erfolgreiche Generierung wurde mittels Polyacrylamidgelelektrophorese bestätigt.

2.3.10 Einsatz des Fc-Blocks in verschiedenen Zellfärbungen

Zur Blockade der auf der Zelloberfläche aus C57BL/6 Mäusen generierten Thymozyten vorhandenen Fc-Rezeptoren, wurden die Zellen nach Entnahme zunächst zehn Minuten mit einem Fc-Blockadereagenz behandelt (Purified Rat-Anti-Mouse CD16/CD3 BD Fc-Block™, BDPharmingen™, Heidelberg). Dies ist ein Antikörper, der an Fc-Rezeptoren bindet und deren Signalkaskade dadurch inhibiert, beziehungsweise die Bindung von

Immunglobulinen an Fc-Rezeptoren verhindert. Dazu wurden die Zellen auf Eis gegeben und je 1 µl des Blockadereagens pro 2×10^5 Zellen verwendet. Zur Blockade der auf den PBMCs vorhandenen Fc-Rezeptoren wurde humanes Fc-Blockadereagen verwendet. Dazu wurden die PBMCs nach Dichtegradientenzentrifugation für zwanzig Minuten mit je 20 µl humanem Fc-Block pro 2×10^5 Zellen inkubiert (Human Fc Receptor Binding Inhibitor Functional Grade® Purified, eBioscience®, Frankfurt). Dieser war spezifisch für humane Fc-Rezeptoren. Um eine mögliche Toxizität der Fc-Block-Reagenzien auszuschließen, wurden jeweils drei Proben nur mit diesen versetzt und dann die Prozentzahl Annexin V positiver apoptotischer Zellen bestimmt.

2.3.11 Gliotoxin Preparation

Das in fester Pulverform vorliegende *Gliotoxin* wurde in 80% Ethanol gelöst. Aus diesem Grund wurden in den Zellfärbungen immer entsprechende Mengen Ethanol als Negativkontrolle eingesetzt, um eine eventuelle Steigerung der Apoptose, die ausschließlich durch Ethanol hervorgerufen sein könnte, auszuschließen. Es konnte generell keine Steigerung der Apoptoserate durch Ethanol beobachtet werden.

2.3.12 Antikörperaufreinigung mittels Protein G Sepharose

Um hochkonzentrierte und reine Antikörperlösungen zu erhalten, wurden große Mengen niedrigkonzentrierter Antikörper mittels der Protein G Sepharose Antikörperaufreinigung zu kleinen Mengen höher konzentrierter Antikörper verarbeitet. Die Zellkultivierung der ausgewählten Klone erfolgte in einem finalen Gesamtvolumen von 1,5 l. Dieses wurde abschließend in Zentrifugenröhrchen überführt und 30 Minuten bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde gesammelt. Die Zellen fanden sich im Sediment wieder und konnten verworfen werden. Als nächstes wurde Ammoniumsulfat als gesättigte Lösung [761 g/L in a. dest.] langsam unter ständigem Rühren hinzugegeben. Wenn die Löslichkeitsgrenze überschritten wurde, was durch eine plötzlich eintretende Trübung der Lösung markiert wurde, wurde diese über Nacht bei 4°C unter ständigem Rühren verwahrt. Nach erneuter Zentrifugation wurde dann das Sediment, in dem sich die Antikörper befanden, in PBS²⁻ resuspendiert. Dazu wurden etwa 30 ml PBS²⁻ pro 1,5 l Lösung benötigt. Diese Suspension wurde anschließend über 48 Stunden mittels Dialyseschläuchen in PBS²⁻ entsalzt, wobei die Dialyseflüssigkeit alle

12 Stunden ausgewechselt wurde. Danach wurde das Dialysat erneut zentrifugiert (20 Minuten bei 12000 rpm und 4°C), der Überstand gesammelt und zusammen mit 3 ml Protein G Sepharose pro 50 ml Dialysat über Nacht in einem 50 ml Falcon-Röhrchen bei niedriger Umdrehung bei 4°C rotiert.

Protein G kommt natürlicherweise in der Zellwand von Bakterien vor und bindet an den Fc Teil von IgG Molekülen. Eine Auftrennungssäule (Chromatographiesäule, Carl Roth®, Karlsruhe) wurde mit PBS²⁻ gewaschen. Das Dialysat, dessen Inhalt dann an Protein G Sepharose bindet, wurde auf die Säule gegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen. Anschließend wurde die Säule so lange mit PBS²⁻ gewaschen, bis der Durchfluss keine Proteine mehr enthielt. Dies konnte durch Entnahme von 10 µl Durchfluss und Testung mittels Bradford-Reagenz, das bei Proteinzugabe von einer Braunfärbung in eine Blaufärbung übergeht, überprüft werden. Alle Antikörper, die an Protein G Sepharose gebunden haben, befanden sich anschließend auf der Säule, da die gebundenen IgG-Moleküle nicht durch den Filter passten. Die Antikörper wurden dann durch pH Senkung mit 0,1 M Glycinlösung (pH=3,0) von den Protein G Molekülen getrennt. Sie wurden in Aliquots aufgefangen. Um sie vor dem niedrigen pH Wert zu schützen waren in den Eppendorf Röhrchen bereits 100 µl 1M Trispuffer (pH=8,0) vorgelegt. Die Säule wurde nach Gebrauch je zweimal mit der Glycinlösung und PBS²⁻ gespült. Die Protein G Sepharose wurde nach Gebrauch in PBS/Azid bei 4°C aufbewahrt und konnte später für denselben Antikörperklon wiederverwendet werden.

2.3.13 Proteinbestimmung mittels BioradTM-Proteinassay

Nachdem die Antikörper-Aliquots mittels einem Filtersystem (Vivaspin® 6, sartorius, Göttingen) konzentriert und auf PBS umgepuffert wurden, wurde die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt. Dazu wurden unterschiedliche Probenmengen mit je 1 ml BioradTM Reagenz nach Anleitung vermengt und nach fünf Minuten Reaktionszeit bei einer Extinktion von $\lambda=595\text{nm}$ im Photometer gemessen. Mit Hilfe von Kalibrierungslösungen, die mit BioradTM Reagenz und BSA selbst hergestellt wurden, konnten die jeweiligen Proteinkonzentrationen der Antikörper durch Vergleich der Extinktionen bestimmt werden.

2.3.14 Reinheitskontrolle der aufgereinigten Antikörper mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Um die Antikörper auf ihre Reinheit zu überprüfen, wurden diese mittels eines 12,5%igen Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde 20 Minuten bei 80 V und eine Stunde bei 120 V durchgeführt. Das Gel bestand aus zwei Teilen; dem Trenngel und dem Sammelgel. Die Proben wurden mit Probepuffer (4% SDS, 20% Glycerol, 10% Mercaptoethanol, 0,004% Bromphenolblau, 0,125 M Tris) im Verhältnis 3:1 vermengt. Für jeden Antikörper wurden je 3 verschiedene Konzentrationen verwendet. Die Proben wurden jeweils in eine Geltasche pipettiert. Als Kontrolle wurde alleinig Probepuffer verwendet. Zur Größenbestimmung wurde in eine Geltasche ein Marker mit Proteinen unterschiedlicher Molekülgröße gegeben. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel über Nacht mit Comassie Lösung gefärbt. Am nächsten Tag wurde es über zwei Stunden in einer Entfärbelösung (30% Methanol, 10% Essigsäure) entfärbt. Das Gel wurde anschließend fotografiert und auf einem Vakuumtrockner zwei Stunden lang bei 90°C getrocknet.

2.3.15 Biotinylierung monoklonaler Antikörper

Zur Biotinylierung wurden die Antikörper mit 100 µg Sulfo-NHS-Biotin (Sulfo-N-Hydroxysuccinimid-Biotin) pro mg Antikörper gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend auf mit PBS äquilibrierte PD-10 Säulen (PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare, München) aufgetragen und mit 8 ml PBS nach und nach durchgespült. Die konjugierten Antikörper wurden auf mehrere Fraktionen aufgeteilt, um Aliquots mit sehr hohen Antikörperkonzentrationen erhalten zu können. Nicht gebundenes Biotin verblieb an der Säule. Danach wurde die Antikörperkonzentration mittels BioradTM bestimmt. Biotinylierte Antikörper wurden mit 0,1% NaN₃ versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

2.3.16 Sandwich-ELISA

Die ELISA Platten wurden zunächst mit 50 µl Beschichtungspuffer pro Nöpfchen und darin enthaltenen 100 µg/ml eines *Gliotoxin*-spezifischen Antikörpers beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dieser Inhalt entfernt, dreimal mit PBS/Tween gewaschen und die Platten mit 170 µl Blockierungspuffer zwei Stunden lang bei 37°C geblockt. Danach wurde dreimal mit PBS/Tween gewaschen und jeweils 50 µl in Verdünnungspuffer gelöstes *Gliotoxin* unterschiedlicher Konzentration auf die Platten gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am dritten Tag wurden die Platten fünfmal mit PBS/Tween gewaschen und mit unterschiedlichen Mengen an biotinyliertem monoklonalem Antikörper inkubiert. Das Volumen betrug dabei immer 50 µl pro Nöpfchen. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde fünfmal mit PBS/Tween gewaschen und die Platten als Nächstes mit 50 µl Avidin-Meerrettichperoxidase [1 µg/ml] Probediluent 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde achtmal mit PBS/Tween gewaschen und 50 µl A:B Lösung im Verhältnis 1:1 pro Nöpfchen hinzugegeben und fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss wurden 25 µl 1 M H₃PO₄ Lösung zu jedem Nöpfchen hinzugegeben ohne vorher die A:B Lösung abzukippen. Danach wurde im ELISA Reader die Extinktion bei 450 nm gemessen. Als Kontrollen wurde die Beschichtung mit BSA-*Gliotoxin* (Positivkontrolle) und BSA (Negativkontrolle) durchgeführt. Zur Negativkontrolle wurde entweder die Beschichtung, das *Gliotoxin* oder der biotinylierte Antikörper weggelassen.

2.3.17 Herstellung Merrettichperoxidase-konjugierter Antikörper

Die an Merrettichperoxidase (HRP = horseradish peroxidase) gekoppelten Antikörper wurden mithilfe eines Lynx Rapid HRP Antibody Conjugation Kit® (AbD Serotec, Düsseldorf) nach Anleitung hergestellt. Dies war notwendig, um sicherzugehen, dass *Gliotoxin* und Biotin im ELISA nicht beide mit dem Reagenz Streptavidin reagieren und dadurch ein eventuell falsch positives Ergebnis zustande kommen konnte. Der an Biotin gekoppelte Detektionsantikörper hätte so mit dem eigentlich *Gliotoxin*-spezifischen Antikörper, der am Boden der Platten fixiert wurde, kreuzreagieren können; Biotin hätte statt *Gliotoxin* an den auf der Platte fixierten Antikörper binden können. Wenn man nun

direkt HRP gekoppelte *Gliotoxin*-spezifische Antikörper verwendete, konnte man den Schritt der Avidin-Biotin-Reaktion umgehen; der HRP Antikörper konnte direkt an *Gliotoxin* binden. Damit wurde eine mögliche Kreuzreaktivität ausgeschlossen.

3 Ergebnisse

3.1 Zellfusionen

Insgesamt wurden vier Zellfusionen erfolgreich durchgeführt. Dazu wurden BALB/c Mäuse mit dem BSA-*Gliotoxin* Konjugat immunisiert und die Milzzellen dieser Mäuse mit AgX Myelomzellen fusioniert. Die Hybridome wurden in HAT und HT Medium kultiviert und anschließend wurde die *Gliotoxin*-Spezifität der produzierten Antikörper bestimmt. Nach den vier Fusionen konnten fünf positive Klone isoliert werden. Dies waren die Klone #241, #294, #430 aus der ersten Zellfusion sowie Klon #1 und #407 aus der vierten Fusion.

3.2 Screening

Als Erstes wurden die Zellüberstände, die die Antikörper enthielten, auf ihre Spezifität für *Gliotoxin* getestet. Hierfür wurden sie auf mit Thyreoglobulin-*Gliotoxin* Konjugat- bzw. BSA-beschichtete ELISA Platten gegeben. Das Serum von mit BSA-*Gliotoxin* immunisierten Mäusen fungierte als Positivkontrolle. Dieses enthielt Antikörper, die im ELISA an das auf den Platten fixierte BSA-*Gliotoxin* Molekül banden. Als Negativkontrolle wurde Mausserum von nicht immunisierten Mäusen verwendet. Dazu wurde je 1 μl des jeweiligen Serums in 50 μl des Probeverdünnungspuffers verwendet. Die Antikörper der jeweiligen Zellüberstände wurden sowohl auf BSA- als auch auf Thyreoglobulin-*Gliotoxin* beschichtete Platten gegeben. Um die Spezifität für *Gliotoxin* nachzuweisen, wurden die Extinktionswerte mit denen der Positivkontrolle verglichen. Die Extinktion musste bei den BSA-beschichteten Platten im Bereich der Negativkontrolle liegen. Die Werte betragen für die Positivkontrolle 0,725 und für die Negativkontrolle 0,107. Für #241 betrug die Extinktion 1,265, für #294 1,534 und für #430 2,118 (Abb. 3).

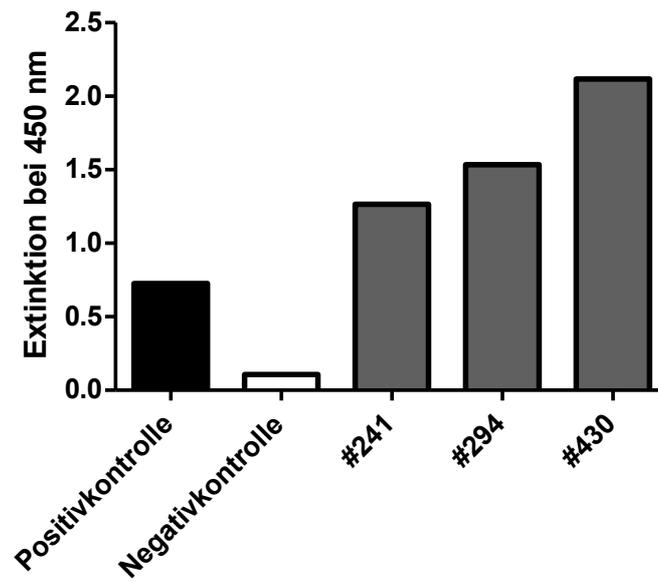


Abbildung 3: Nachweis der Bindung der monoklonalen Antikörperklone #241, #294, #430 im ELISA. Beschichtet wurde die Platte mit BSA-*Gliotoxin*. Als Positivkontrolle wurde Serum von mit BSA-*Gliotoxin* immunisierten Mäusen verwendet, als Negativkontrolle naives Mausserum.

Bei der vierten Zellfusion konnten ebenfalls zwei positive Klone identifiziert werden. Dies waren die Klone #1 und #407 (Abb. 4). Als Positivkontrolle wurde wieder das Serum immunisierter Mäuse verwendet, als Negativkontrolle das Serum nicht immunisierter Mäuse.

Die Werte für die Positiv- und Negativkontrollen unterscheiden sich bei den beiden aufgeführten Versuchsansätzen erheblich. Dies könnte u.a. daran liegen, dass bei den Messungen Seren unterschiedlicher, mit BSA-*Gliotoxin* immunisierter und naiver BALB/c Mäuse verwendet wurden. Die Positiv- und Negativkontrollen dienen hierbei als qualitativer Nachweis, um sicherzustellen, dass der ELISA funktioniert hat. Eine Quantifizierung der Antikörperbindung ist in diesem Screeningstadium nicht beabsichtigt.

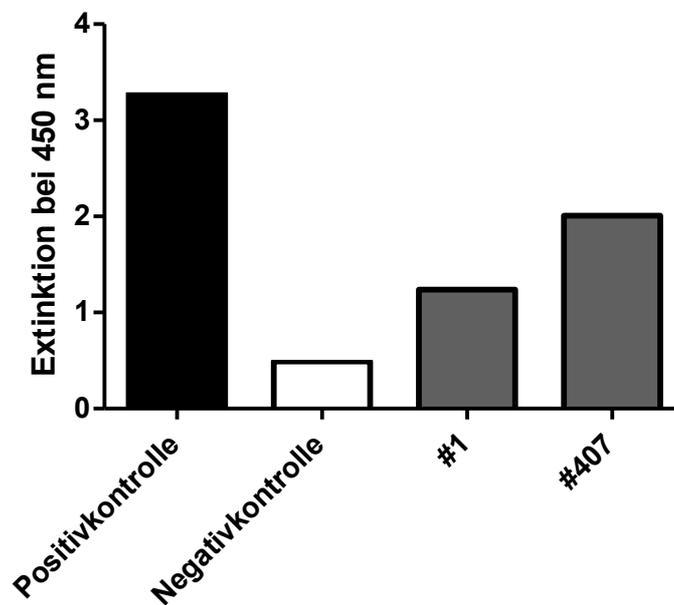


Abbildung 4: Nachweis der Bindung der monoklonalen Antikörperklone #1 und #407 im ELISA. Beschichtet wurde die Platte mit BSA-*Gliotoxin*. Als Positivkontrolle wurde Serum von mit BSA-*Gliotoxin* immunisierten Mäusen verwendet, als Negativkontrolle natives Mausserum.

3.3 Subklonierung

Diese positiven Klone wurden anschließend nach bereits beschriebenem Schema subkloniert und diejenigen unter ihnen, die die höchsten Extinktionswerte im ELISA aufwiesen, weiter gezüchtet. Dies waren die Subklone Nr. 27 von #241, f von #294 und Nr. 16 von #430 (Abb. 5). Aus Fusion IV waren es Nr. 31 von #1 und Nr. 11 von #407

(Abb. 6). Ausgewählt wurden aufgrund erhaltener Extinktion bei hoher Verdünnung Nr. 27 von #241, f von #294, Nr. 16 von #430, Nr. 31 von #1 und Nr. 11 von #407. Die Verdünnung betrug 1 Teil Zellüberstand zu 128 Teilen Probeverdünnungspuffer. Bei #1 und #407 betrug die Verdünnung 1 Teil Zellüberstand zu 8 Teilen Probeverdünnungspuffer, da die Kulturen, aus denen die Überstände gewonnen wurden, weniger dicht gewachsen waren.

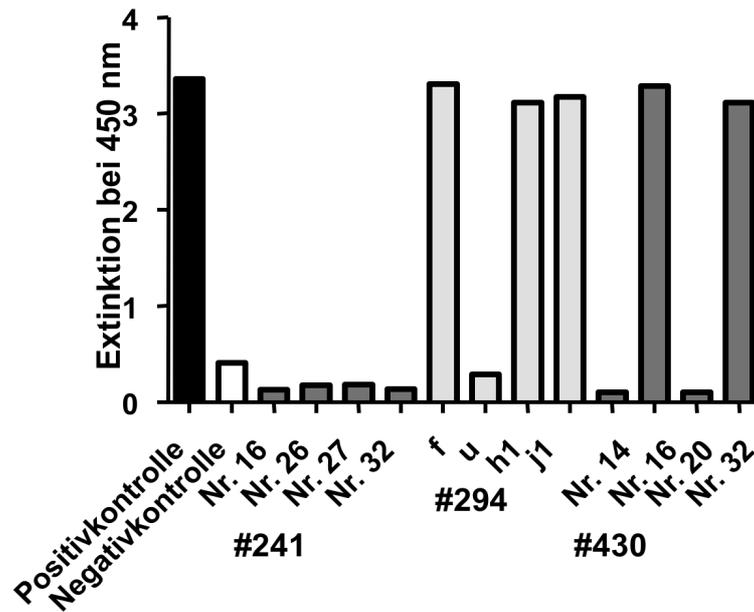


Abbildung 5: Vergleich der Bindung der monoklonalen Antikörpersubklone von #241, #294 und #430 im ELISA. Beschichtet wurde die Platte mit BSA-Gliotoxin. Als Positivkontrolle wurde Serum von mit BSA-Gliotoxin immunisierten Mäusen verwendet, als Negativkontrolle naives Mausserum.

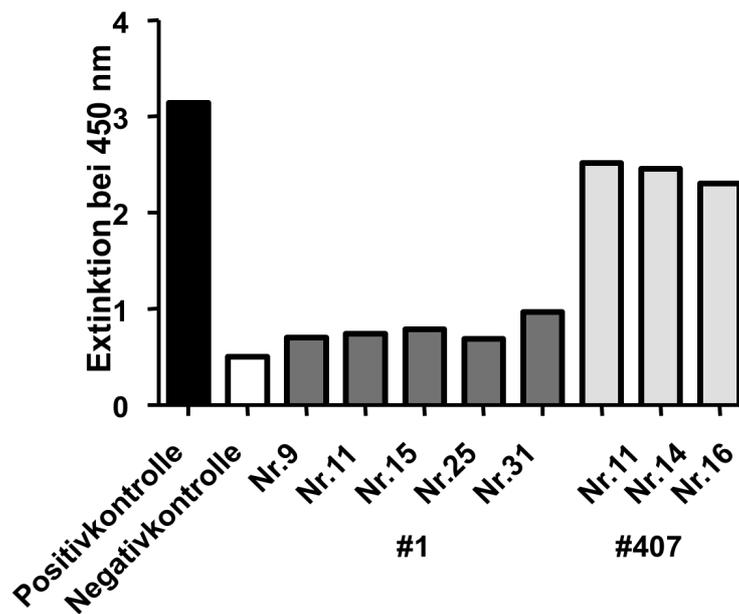


Abbildung 6: Vergleich der Bindung der monoklonalen Antikörpersubklone von #1 und #407 im ELISA. Beschichtet wurde die Platte mit BSA-*Gliotoxin*. Als Positivkontrolle wurde Serum von mit BSA-*Gliotoxin* immunisierten Mäusen verwendet, als Negativkontrolle naives Mausserum.

3.4 Kontrolle der *Gliotoxin*-Spezifität der subklonierten Hybridome

Um zu überprüfen, ob die von den verschiedenen Subklonen produzierten Antikörper spezifisch an *Gliotoxin* binden und nicht ausschließlich an das BSA-*Gliotoxin* Konjugatmolekül oder an ungekoppeltes BSA, wurden die entsprechenden Zellüberstände auch auf nur mit BSA, Thyreoglobulin-*Gliotoxin* und BSA-*Gliotoxin* beschichtete Platten gegeben.

Wie schon im Rahmen des Screeningprozesses für die Ausgangszelllinien 294, 430, 1 und 407 gefunden wurde, waren auch die Subklone in der Lage, an beide Konjugatmoleküle zu binden, jedoch nicht an ungekoppeltes BSA (Abb. 7). Dies spricht für die *Gliotoxin*-Spezifität der Antikörper.

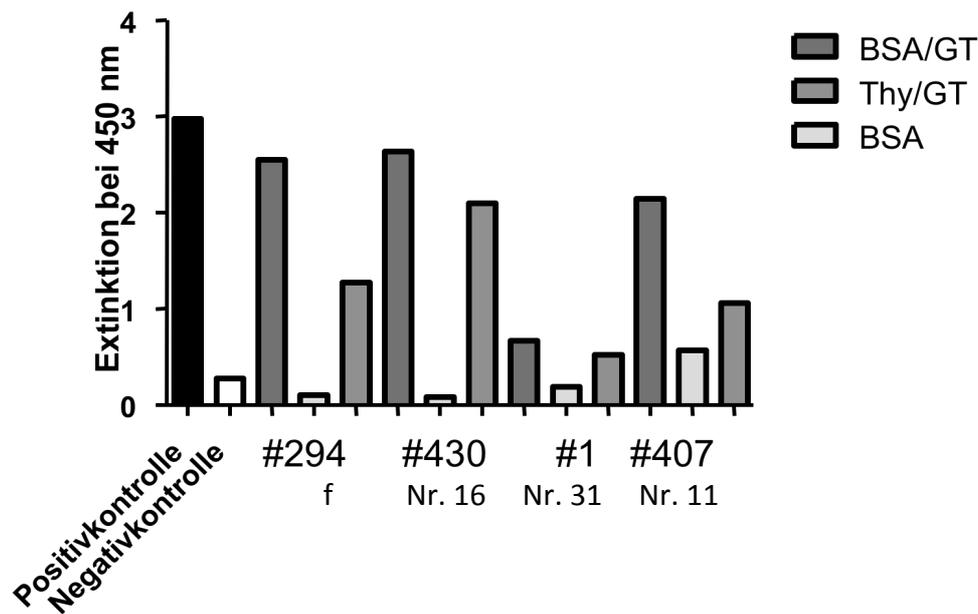


Abbildung 7: Nachweis der Bindung der verschiedenen Subklonantikörper aus Zellüberstand im ELISA an die Konjugate, nicht aber an BSA. Beschichtet wurde sowohl mit 0,1 mg/ml BSA-*Gliotoxin* Konjugat als auch mit BSA und Thyreoglobulin-*Gliotoxin* Konjugat der gleichen Konzentration. Als Positivkontrolle fungierte Mausserum von mit BSA-*Gliotoxin* immunisierten Mäusen, als negative Kontrolle naives Mausserum.

3.5 Antikörperaufreinigung mittels Protein G Affinitätschromatographie

Mittels Protein G Sepharose Affinitätschromatographie wurden die Antikörper aus den Zellüberständen der einzelnen Klone extrahiert. Zur Bestätigung, dass das isolierte Produkt durch die typischen schweren und leichten Ketten der Antikörper gekennzeichnet ist, wurde der aufgereinigte Antikörper mit Probenpuffer reduziert, auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 8).

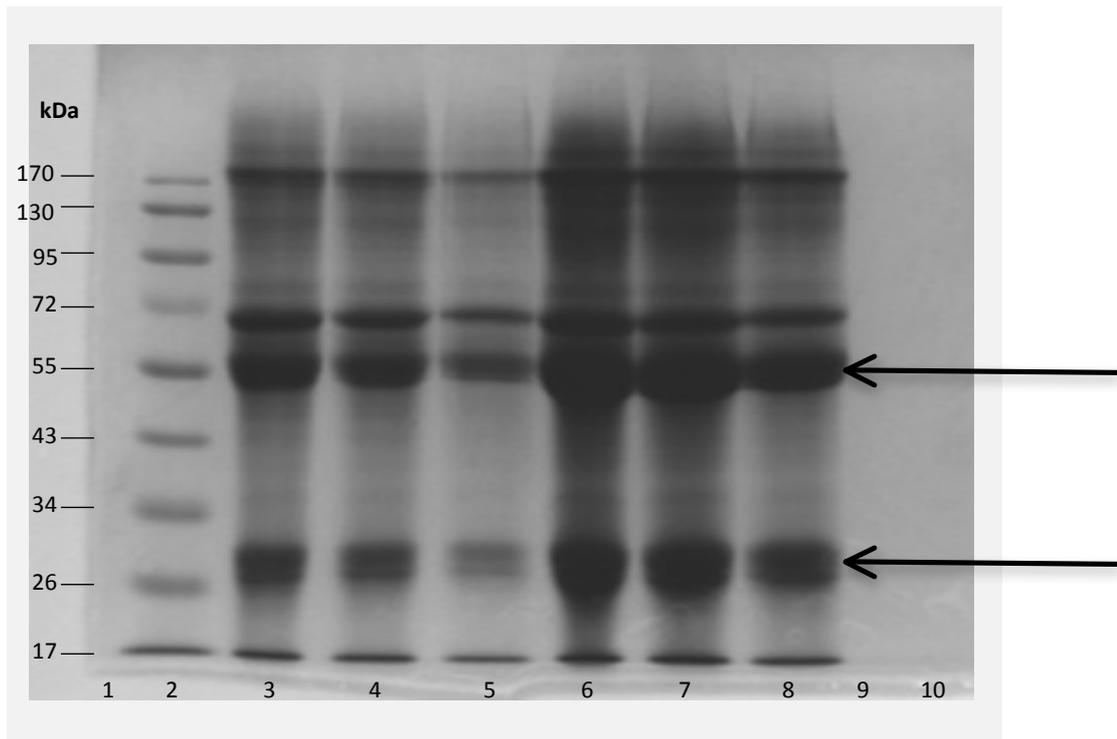


Abbildung 8: Polyacrylamidgelelektrophorese (12,5%iges reduziertes Gel) der aufgereinigten Antikörper des Klons #294 und #430, welche in absteigenden Konzentrationen aufgetragen wurden. Das Gel wurde anschließend mit Comassie gefärbt. Reihenfolge der Auftragung: 1) Probenpuffer, 2) Marker, 3) Klon #430 (0,114 mg), 4) #430 (0,057 mg), 5) #430 (0,019 mg), 6) Klon #294 (0,102 mg), 7) #294 (0,051 mg), 8) #294 (0,017 mg), 9) Probenpuffer, 10) Probenpuffer. Proteinbanden: 26 kDa) Leichtketten, 55 kDa) Schwereketten, 72 kDa) Albumin, 170 kDa) intakte Antikörper. Die beiden Pfeile markieren bei 26 kDa die Leichtketten und bei 55 kDa die schweren Ketten der Antikörper.

Die 26 kDa Bande entspricht den Leichtketten, die 55 kDa Bande den schweren Ketten. Das Albumin, welches der 72 kDa Bande entspricht, stammt dem RPMI 1640 Medium, das mit FCS versetzt wurde. Weiterhin lassen sich intakte Antikörper nachweisen (170 kDa Bande), die vor dem Auftragen auf das Gel nicht vollständig durch den Probenpuffer reduziert wurden.

3.6 Isotypen Bestimmung

Die Isotypen der Antikörper wurden mithilfe des „mouse monoclonal isotyping test kits (AbD Serotec, Düsseldorf) bestimmt. Klon #241 gehört der IgM Klasse an, Klon #294 der IgG₁- und IgG_{2b}-, Klon #430 der IgG₁-, #1 der IgG₃- und #407 der IgG_{2a} Antikörper-

klasse (Abb. 9). Aus welchem Grund Klon #294 Banden bei IgG₁ und IgG_{2b} aufweist, obwohl #294 eigentlich von einem einzigen Ausgangsklon generiert wurde und damit monoklonal sein müsste, ist unklar. Es könnte möglich sein, dass der Klon eventuell doch nicht monoklonal war, wobei dies relativ unwahrscheinlich ist, da der Klon ein zweites Mal subkloniert wurde. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass der Klon während der Kultivierung einen sogenannten Isotypenswitch durchlaufen hat. Dieser tritt bei der Reifung von B-Zellen auf (Xu et al. 2012). Die Leichtketten waren in allen Fällen kappa Leichtketten.

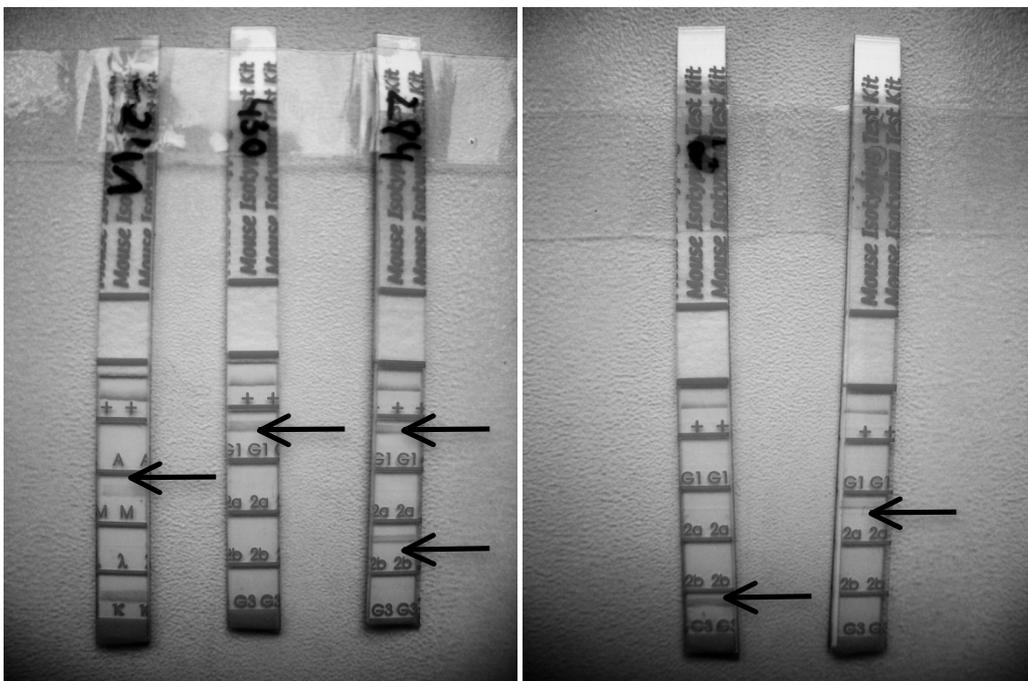


Abbildung 9: Isotypenbestimmung der Antikörper. Von links nach rechts: Klone: #241, #430, #294, #1, #407. Klon #241 ist ein IgM Antikörper, Klon #294 ein IgG₁ und IgG_{2b}, Klon #430 ein IgG₁, #1 ein IgG₃ und Klon #407 ein IgG_{2a} Antikörper. Die Pfeile markieren die entsprechenden Banden für die gefundenen Antikörperklassen der Klone.

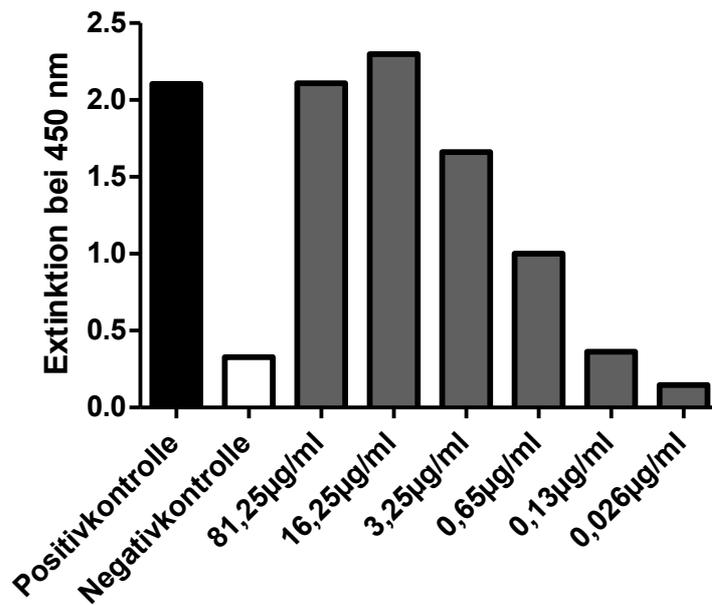
Klon #241 wurde nicht weiter untersucht, da er zur IgM Antikörperklasse gehört und die Extinktion im ELISA ohnehin sehr niedrig war (Abb. 5). Die höchst effektiven neutralisierenden Antikörper sind diejenigen mit hohen Affinitäten für ihre Antigene. Da die hohen Affinitäten durch die Affinitätsreifung durch somatische Mutation der Ig Gene gewährleistet wird und da bei IgG Antikörpern mehr Mutationen stattfinden als bei IgM

Antikörpern, haben IgG Antikörper insgesamt höhere Affinitäten und waren für diese Arbeit somit interessanter (Kracker and Durandy 2011).

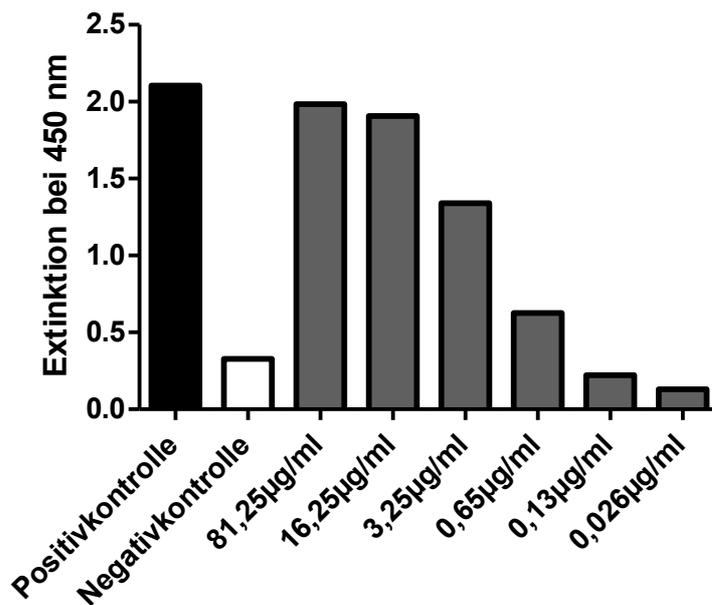
3.7 *Gliotoxin*-ELISA

3.7.1 Sensitivitätsbereich der Antikörper und Inhibitions-ELISA

Um die Konzentration an monoklonalem Antikörper zu bestimmen, bei der die Bindung an das BSA-*Gliotoxin* Konjugat gerade noch zu einem positiven Ergebnis im ELISA führt, wurde eine Verdünnungsreihe der Antikörper erstellt und auf die mit dem Konjugat beschichteten ELISA Platten gegeben (Abb. 10 a + b).



a) #294



b) #430

Abbildung 10: Bestimmung des Sensitivitätsbereiches der Antikörper der Klone #294 (a) und #430 (b). Eine Konzentration von 0,65 µg/ml erwies sich als gerade noch ausreichend, um das Signal als positiv zu werten. Beschichtet wurde mit BSA-Gliotoxin Konjugat. Als Positivkontrolle wurde das Serum BSA-Gliotoxin immunisierter Mäuse, als Negativkontrolle das Serum naiver Mäuse verwendet.

Bei dieser Versuchsreihe konnte man bis zu einer Antikörperkonzentration von 0,65 µg/ml noch ein positives Signal im ELISA beobachten. Diese Konzentration wurde für das folgende Experiment als sensitive Konzentration für die Etablierung eines kompetitiven ELISA festgelegt. Bei einer solchen Konzentration bindet der Antikörper gerade noch nachweisbar an das BSA-*Gliotoxin*-Molekül. Diese Bindung würde sich durch Zugabe freien *Gliotoxins* leichter verhindern lassen, als bei höheren Antikörperkonzentrationen.

Als nächstes wurde die Bindung der Antikörper an das mit den Platten beschichtete BSA-*Gliotoxin* inhibiert, indem freies *Gliotoxin* zum Versuchsansatz hinzugegeben wurde. Dazu wurde die oben bestimmte, suboptimale Konzentration [0,65 µg/ml] der beiden Antikörper verwendet. *Gliotoxin* war in der Lage, bei hohen Konzentrationen [1 mM] die Bindung von Antikörper #294 an das auf den Platten gebundene Konjugat zu reduzieren (Abb. 11). Dies geschieht dadurch, dass der Antikörper im Überschuss vorhandenes freies *Gliotoxin* eher als das fixierte Konjugat bindet.

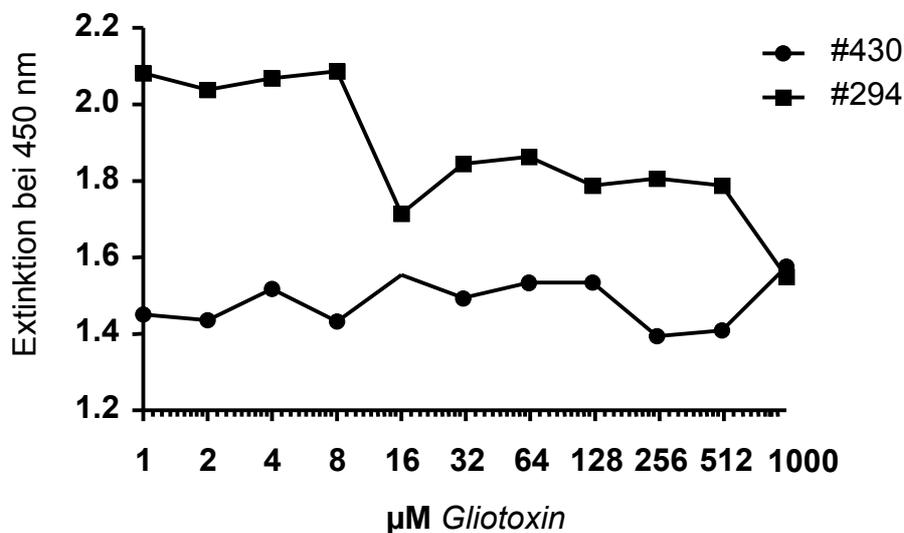


Abbildung 11: Bestimmung der Inhibierbarkeit der Konjugatbindung der Antikörper durch freies *Gliotoxin*. Mit sehr hohen Konzentration an *Gliotoxin* ließ sich die Bindung des Antikörpers #294 an das Konjugat verringern. Die Extinktion betrug ohne *Gliotoxin* Zugabe 2,096. Bei einer Konzentration von 1000 µM *Gliotoxin* betrug sie nur noch 1,55. Es wurde mit BSA-*Gliotoxin* beschichtet.

Die Differenz der Extinktion zwischen der Zugabe von 1000 µM *Gliotoxin* und der Negativkontrolle [= 0 µM *Gliotoxin*] betrug 0,519. Die Bindung des Antikörpers #430 ließ sich durch freies *Gliotoxin* nicht inhibieren.

3.7.2 Etablierung eines Sandwich-ELISA

Da in der klinischen Praxis nur die aufwendige und kostenintensive HPLC Methode zur Detektion von *Gliotoxin* produzierenden Stämmen von *Aspergillus fumigatus* zur Verfügung steht, bestand die Überlegung, einen sogenannten „Sandwich“-ELISA zur Detektion von *Gliotoxin* zu etablieren. Bei einem Sandwich-ELISA wird ein Antikörper auf dem Boden der Platten fixiert, woraufhin das Antigen hinzugegeben wird und an den Antikörper bindet. Anschließend wird ein zweiter antigenspezifischer Antikörper hinzugegeben, der selbst direkt an ein Substrat gebunden ist, das bei entsprechender Enzymzugabe zu einem Farbumschlag führt. Zu diesem Zweck wurden Antikörper von

Klon #294 an Biotin gekoppelt und zur Überprüfung der erfolgreichen Konjugation wurde ein ELISA durchgeführt. Biotin wird bei Zugabe von Merrettichperoxidase-Avidin von Avidin gebunden. Bei Zugabe der A:B Lösung führt dies zum Farbumschlag. Dazu wurde die Platte mit dem BSA-*Gliotoxin* Konjugat [0,1 mg/ml] beschichtet und absteigende Konzentrationen an biotinyliertem Antikörper vom Klon #294 hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurde die Platte lediglich mit BSA beschichtet.

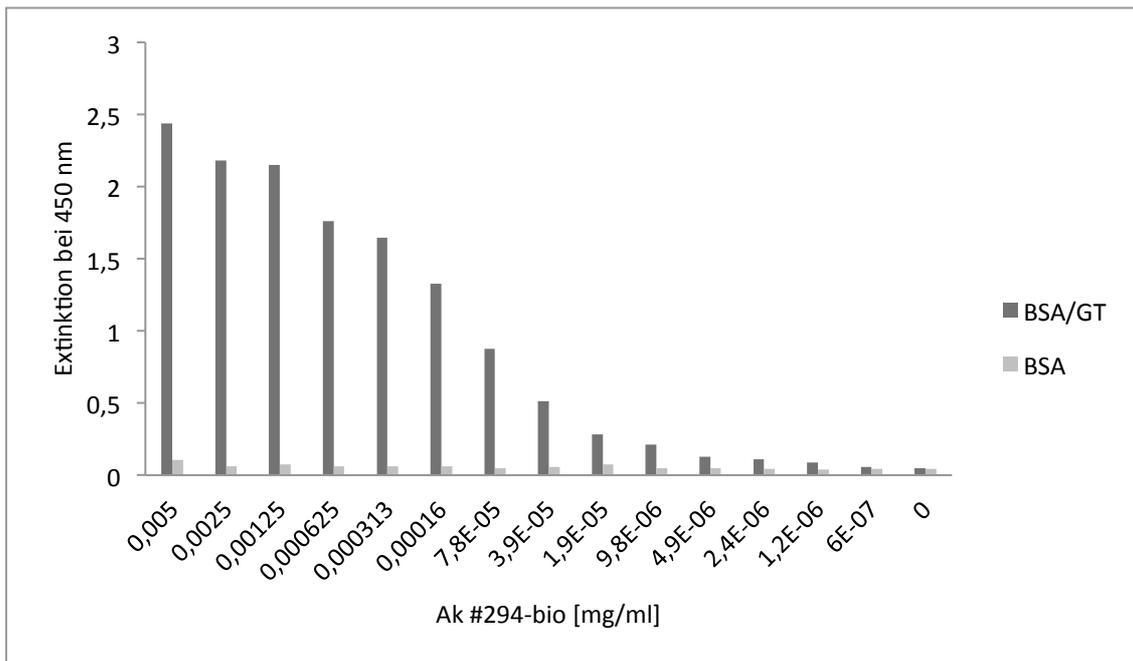


Abbildung 12: Titration des biotinylierten Antikörpers #294 im ELISA. Die Platten wurden mit BSA-*Gliotoxin* Konjugat oder BSA beschichtet und unterschiedliche Konzentrationen an biotinyliertem Antikörper hinzugegeben.

Wie in Abb. 12 gezeigt, bindet der biotinylierte Antikörper zwar an das BSA-*Gliotoxin* Konjugat, nicht aber an unkonjugierte BSA-Moleküle. Darüber hinaus wird das Signal bei sinkender Antikörperkonzentration schwächer. Bei Gabe von 0,005 mg/ml #294-bio auf BSA/GT konnte man eine Extinktion von 2,44 erhalten, wohingegen man bei der Gabe der gleichen Menge an biotinyliertem Antikörper auf BSA nur eine Extinktion von 0,106 erhielt. Bei Gabe von einer sehr geringen Konzentration von 0,000039 mg/ml biotinyliertem Antikörper auf BSA/GT erhielt man immer noch ein positives Ergebnis, das 0,513 betrug. Gab man dieselbe Menge auf BSA konnte eine Extinktion von 0,057 gemessen werden.

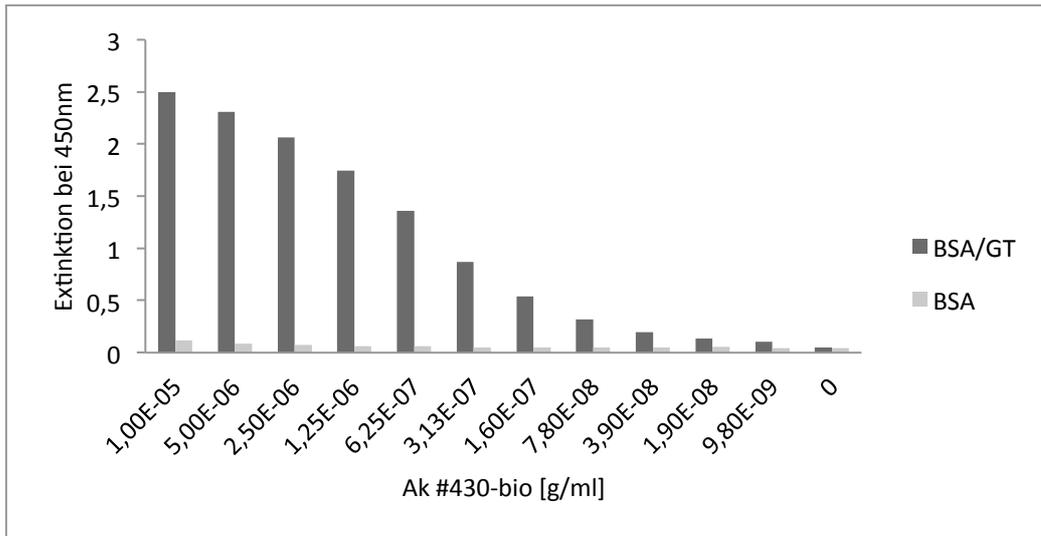


Abbildung 13: Titration des biotinylierten Antikörpers #430. Die Platten wurden mit BSA-*Gliotoxin* Konjugat oder BSA beschichtet und unterschiedliche Konzentrationen an biotinyliertem Antikörper hinzugegeben.

Derselbe Versuch wurde mit dem biotinyliertem Antikörper aus Klon #430 durchgeführt. Es wurde ein ähnliches Ergebnis erhalten (Abb. 13).

Für die folgenden Versuche wurde eine Konzentration von 0,01 mg/ml Antikörper #294-bio verwendet. Bei dieser Konzentration sollte eine mögliche Konkurrenz der Bindung durch lösliches *Gliotoxin* sichtbar werden. Um zu sehen, ob die Bindung des biotinylierten Antikörpers an den auf den Platten fixierten Antikörper mit gebundenem *Gliotoxin* nachgewiesen werden kann, wurde eine Platte mit dem Antikörper vom Klon #430 beschichtet. Dazu wurde eine Konzentration von 0,1 mg/ml des Antikörpers gewählt. Anschließend wurden absteigende *Gliotoxin*-Konzentrationen hinzugegeben. Diese reichten von 50 µg/ml (0,153 µM) bis 0,034 µg/ml ($1,04 \times 10^{-19}$ µM). Dabei wurde beobachtet, dass es unabhängig von der *Gliotoxin* Konzentration ein positives Signal gleicher Stärke gab (Abb. 14).

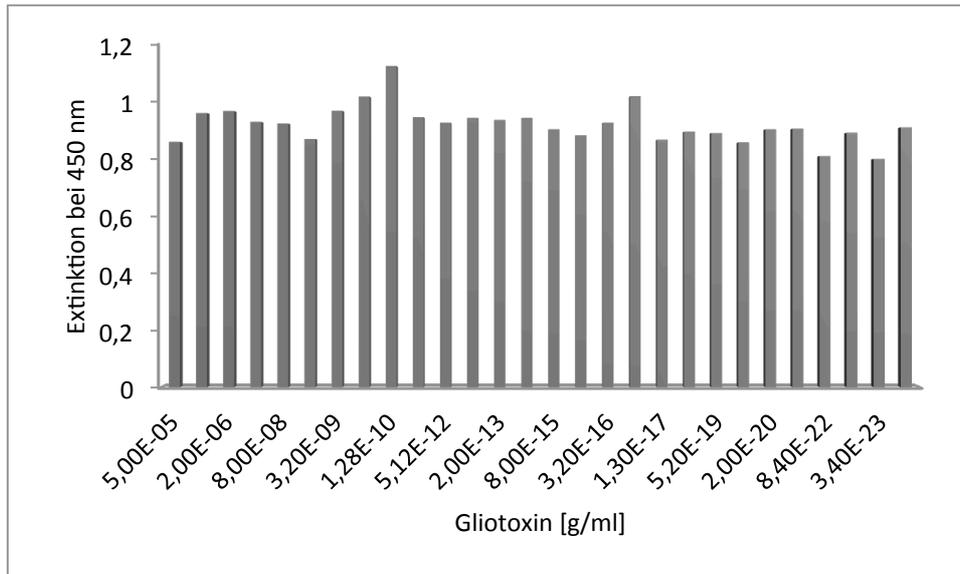


Abbildung 14: Versuch, *Gliotoxin* mithilfe eines Sandwich ELISAs nachzuweisen. Die Platten wurden mit Antikörpern des Klons #430 [0,1 mg/ml] beschichtet. Danach wurden absteigende Konzentrationen an *Gliotoxin* hinzugegeben und anschließend der Detektionsantikörper des Klons #294-bio [0,01 mg/ml] hinzugegeben.

Wenn man von diesem Ergebnis ausgeht, müsste Antikörper #294-bio sogar geringste Konzentrationen an *Gliotoxin* detektieren. Dies erscheint anhand der verwendeten Mengen jedoch mehr als fragwürdig und wurde daraufhin nochmals überprüft. Als Negativkontrollen wurde dabei einerseits kein *Gliotoxin* verwendet, andererseits aber auch der biotinylierte Antikörper oder der Beschichtungsantikörper weggelassen. Dabei stellte sich heraus, dass man auch bei Fehlen von *Gliotoxin* stets ein Signal erhielt. Dies änderte sich auch nicht, wenn man anstatt freiem *Gliotoxin* das BSA-*Gliotoxin* Konjugat oder nur BSA hinzugab. Ließ man dagegen den Beschichtungsantikörper oder den biotinylierten Antikörper weg, erhielt man kein Signal. Daher musste der auf den Platten gebundene Antikörper auch ohne Hinzufügen von *Gliotoxin* den biotinylierten Antikörper binden und damit zu einem positiven Signal führen. Dies könnte an gemeinsamen strukturellen Elementen von Biotin und *Gliotoxin* liegen (Abb. 15). In diesem Fall würde der Antikörper #430 unspezifisch an Biotin statt an *Gliotoxin* binden. Dadurch würde der biotinylierte Antikörper stets binden und so ein positives Signal aussenden können.

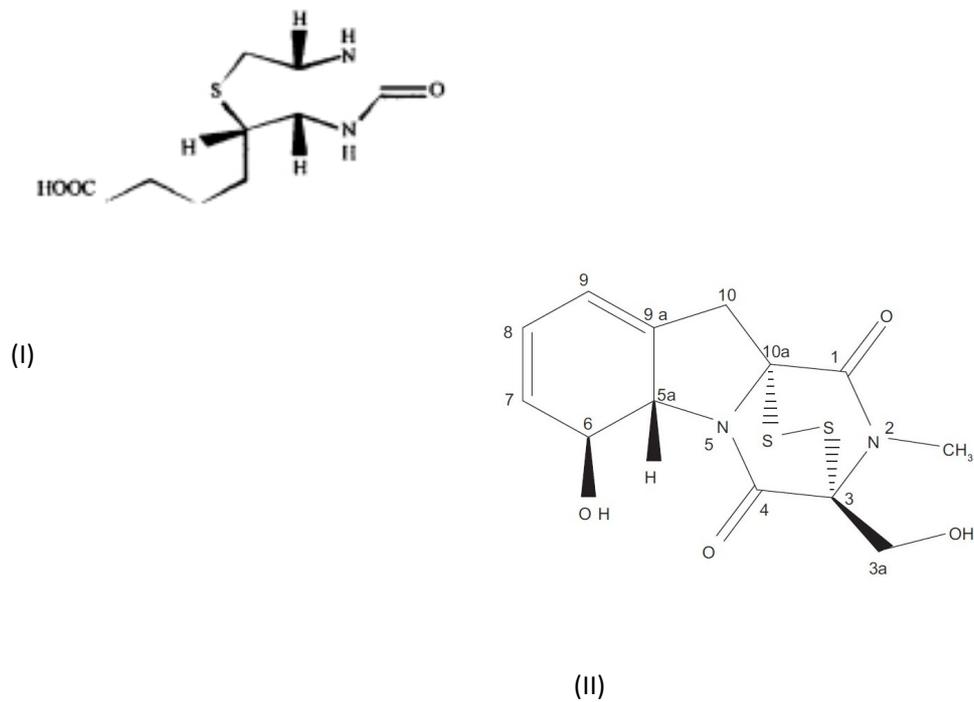


Abbildung 15: (I) Biotin (Said 2009), (II) Gliotoxin (Guo, Chen et al. 2011)

Um diesen Effekt auszuschließen, wurde infolgedessen der Antikörper des Klons #294 direkt an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, um die vermeintlich unspezifische Bindung des Biotins, das an den Detektionsantikörper gekoppelt ist, an den auf der Platte fixierten Antikörper zu umgehen. Für diesen an Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper wurde wiederum gezeigt, dass er spezifisch für das BSA-*Gliotoxin* Konjugat und nicht für BSA ist (Abb. 16). Antikörper #430 (Abb. 17) wurde ebenfalls an HRP gekoppelt und war genauso wie #294 ausschließlich spezifisch für das Konjugat. Bei Zugabe von 0,01 mg/ml #294-HRP bei BSA/GT Beschichtung konnte eine Extinktion von 1,284 gemessen werden. Bei Anwendung der gleichen Menge desselben Antikörpers auf BSA wurde ein Wert von 0,066 erhalten. Bei Verwendung einer geringen Antikörperkonzentration von 0,00125 mg/ml #294-HRP auf BSA/GT betrug die Extinktion 0,306, bei Anwendung auf BSA betrug sie 0,079.

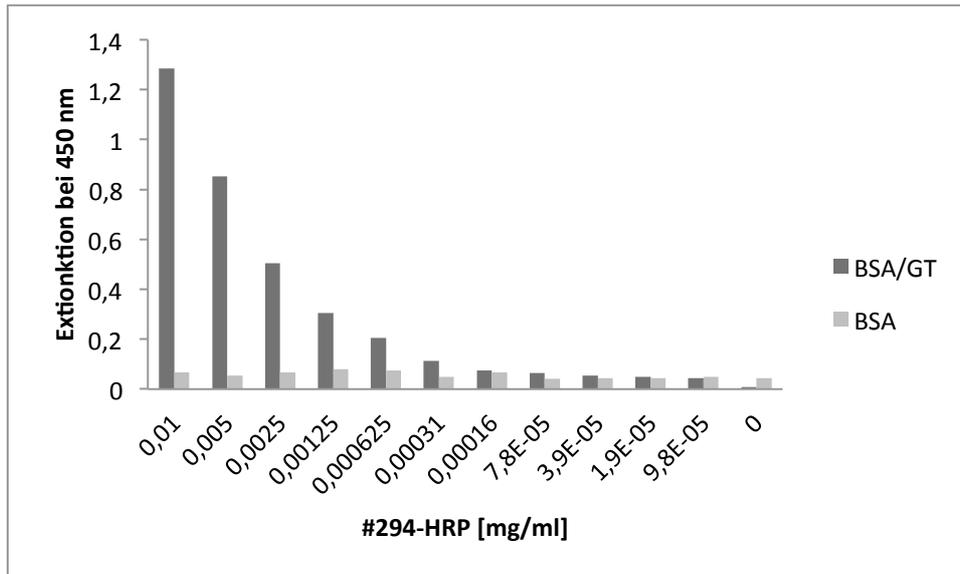


Abbildung 16: Titration des Antikörpers #294-HRP. Die Platten wurden mit BSA-Gliotoxin Konjugat oder BSA beschichtet und der Antikörper #294-HRP in absteigenden Konzentrationen hinzugegeben. Man erhielt ausschließlich ein positives Signal, wenn mit BSA/GT beschichtet wurde und falls der Antikörper in höheren Konzentrationen verwendet wurde.

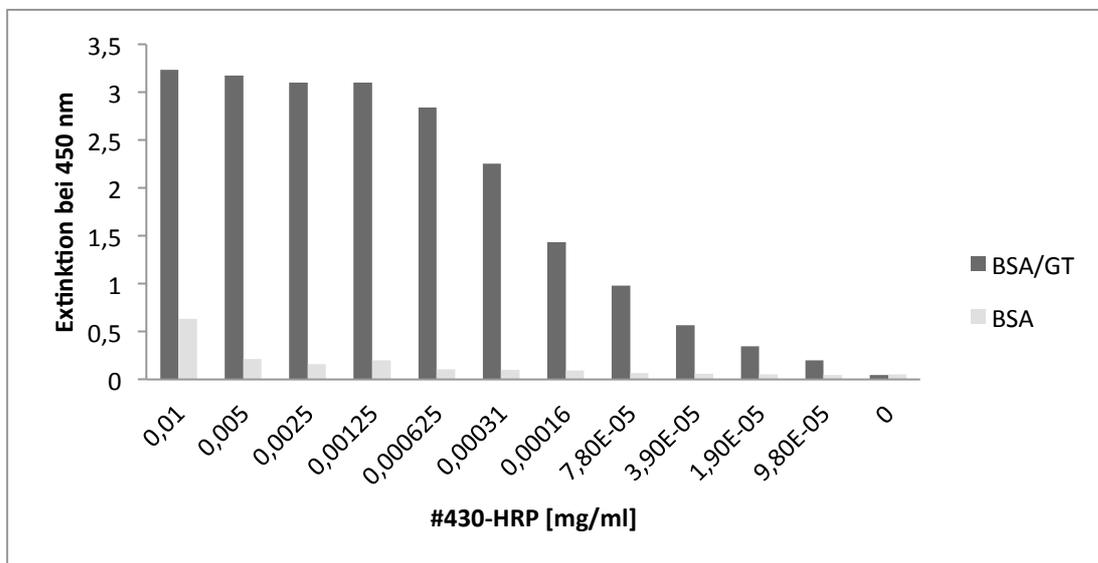


Abbildung 17: Titration des Antikörpers #430-HRP. Die Platten wurden mit BSA-Gliotoxin Konjugat oder BSA beschichtet und der Antikörper #430-HRP in absteigenden Konzentrationen hinzugegeben. Man erhielt ausschließlich ein positives Signal, wenn mit BSA/GT beschichtet wurde und falls der Antikörper in höheren Konzentrationen verwendet wurde.

Wie in Abb. 18 gezeigt, konnte die Bindung der an HRP gekoppelten Antikörper an BSA-*Gliotoxin* Konjugat nicht durch freies *Gliotoxin* inhibiert werden. Freies *Gliotoxin* wurde in unterschiedlichen Konzentrationen auf die mit BSA/GT oder BSA beschichteten Platten gegeben. Daraufhin wurde der Antikörper #430-HRP mit einer Konzentration von $7,8 \times 10^{-8}$ g/ml hinzugegeben. Die Bindung an das Konjugat ließ sich dadurch nicht inhibieren. Bei Zugabe von 1000 μ M *Gliotoxin* und BSA/GT Beschichtung betrug die Extinktion 1,006, bei BSA Beschichtung 0,0555. Ohne *Gliotoxin* betrug sie bei BSA/GT Beschichtung 0,915 und bei BSA Beschichtung 0,0485. Es machte folglich keinen Unterschied ob freies *Gliotoxin* hinzugegeben wurde oder nicht. Allerdings kommt hier auch der Aviditätseffekt zum Tragen. Dieser besagt, dass die Bindung an fixiertes Konjugat durch divalente IgG Antikörper stärker ist, als die monovalente Bindung des Antikörpers an freies *Gliotoxin*. Die Antikörper sind folglich nicht ausreichend affin, um die Bindung an das fixierte Konjugat durch freies *Gliotoxin* zu verhindern. Dies wurde in späteren Messungen auch bestätigt.

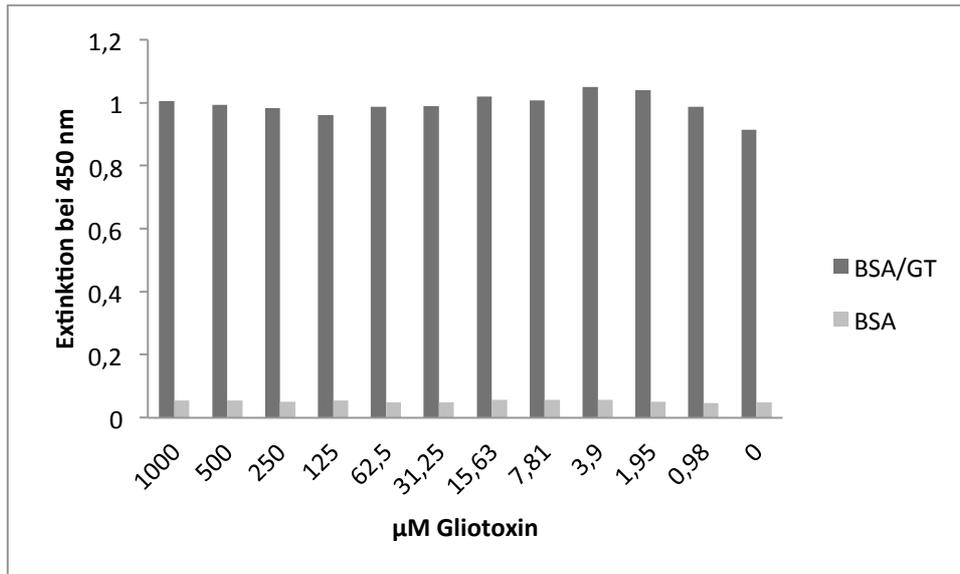


Abbildung 18: Versuch, *Gliotoxin* mithilfe eines Sandwich ELISAs nachzuweisen. Antikörper #430-HRP wurde mit einer Konzentration von $7,8 \times 10^{-8}$ g/ml auf die mit BSA/GT oder BSA beschichteten Platten gegeben. Zusätzlich wurde freies *Gliotoxin* (unterschiedliche Konzentrationen) hinzugegeben. Die Bindung an das Konjugat ließ sich dadurch nicht inhibieren.

3.7.3 Generierung von Fab-Fragmenten

Um den Aviditätseffekt zu umgehen, wurden in nachfolgenden Experimenten Fab-Fragmente eingesetzt. Dazu wurden diese aus den monoklonalen Antikörpern der Klone #294 und #430 hergestellt. Die Antikörper wurden zunächst aufkonzentriert und anschließend mit Ficin (Thermo Fisher Scientific®, Schwerte) inkubiert, einem Enzym, das die intakten Antikörper an der Gelenkregion spaltet (Mariani, Camagna et al. 1991). Dann wurde dieses Gemisch auf eine Protein A-Säule gegeben. Protein A bindet an Fc-Fragmente und unverdaute IgG Antikörper. Der Durchlauf enthielt die gewünschten Fab-Fragmente. Anschließend wurden Fc-Fragmente und intakte IgG Antikörper in drei Waschrufen entfernt und die Antikörper mittels PAGE analysiert (Abb. 19: 1) Antikörper, 2) Konzentrierter Antikörper, 3) Antikörper vor der Protein-A-Aufreinigung, 4) Fab-Fragment des Antikörpers, 5),6),7) Waschrufen mit Fc-Fragmenten und intakten Antikörpern).

Es wurden Aliquots zu je insgesamt 1,5 mg (#430 Fab, #294 Fab) erhalten. Die Messung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels Biorad™ Protein Assay.

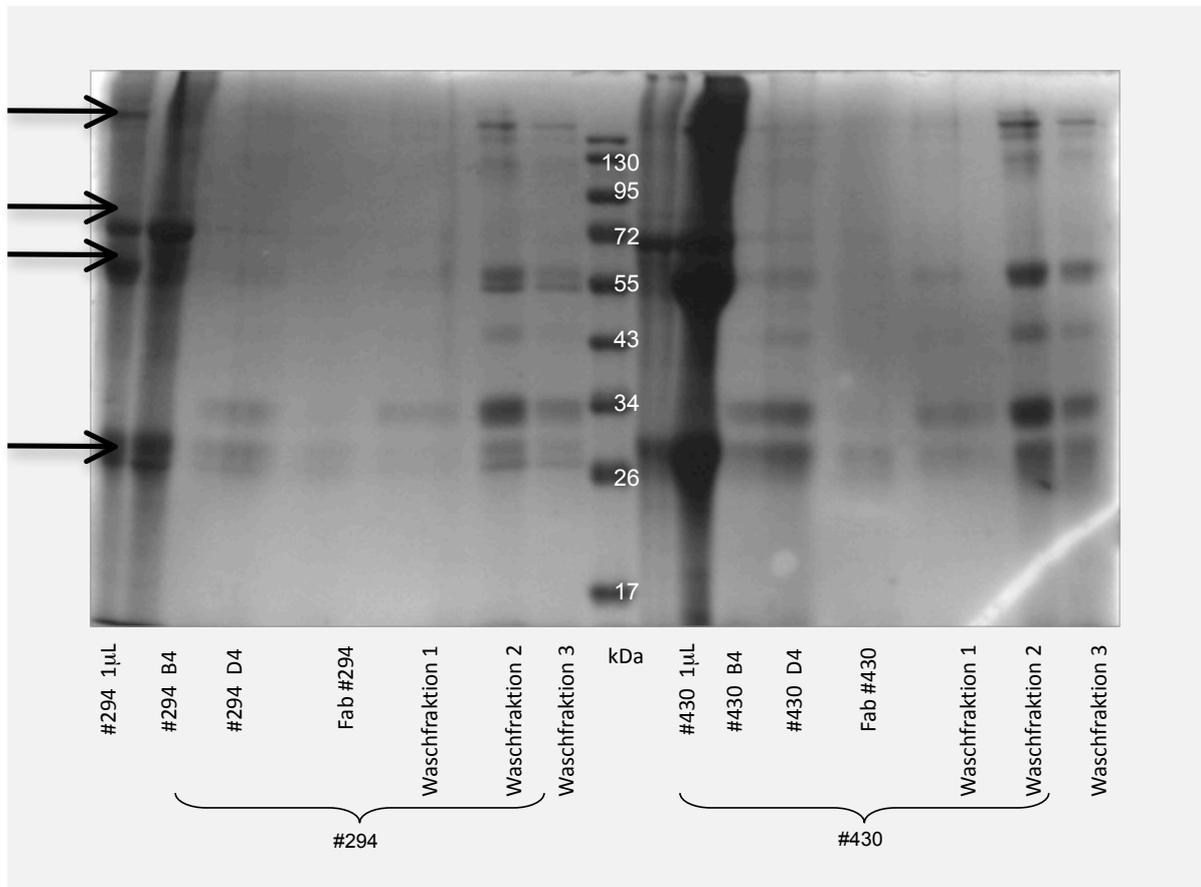


Abbildung 19: PAGE (15% reduziertes Gel) der Fab-Fragmente der Klone #294 und #430. Das Gel wurde mit Comassie gefärbt. Der Reihe nach von links nach rechts wurden folgende Proben aufgetragen: Antikörper #294, #294 nach Konzentrierung, #294 vor Protein-A-Aufreinigung, Fab #294, Waschfraktion 1,2,3; Antikörper #430, #430 nach Konzentrierung, #430 vor Protein-A-Aufreinigung, Fab #430, Waschfraktion 1,2,3. Das Molekulargewicht 26 kDa entspricht den Leichtketten und Fab, 55 kDa den schweren Ketten, 72 kDa Albumin, 170 kDa dem intaktem Antikörper (durch Pfeile markiert).

3.7.4 Fab-ELISA

Der ELISA wurde nun nicht wie bislang mit vollständigen Antikörpern durchgeführt, sondern mit deren Fab-Fragmenten, um so den Aviditätseffekt zu umgehen. Die Platten wurden dazu mit 50 µl BSA oder BSA-*Glilotoxin* Konjugat [0,1 mg/ml] beschichtet und das Fab-Fragment Fab #294 hinzugegeben. Als Detektionsantikörper wurden gegen

Fabs gerichtete, an Biotin gekoppelte polyklonale Antikörper verwendet (Goat Anti-Mouse IgG (Fab specific)–Biotin antibody, Sigma, Deisenhofen). Ein positives Signal konnte nur erhalten werden, wenn mit dem BSA-*Gliotoxin*-Konjugat beschichtet wurde. Die Fabs waren also auch spezifisch für das Konjugat und nicht für das BSA Molekül alleine. Der Wert der Positivkontrolle betrug bei Anwendung von BSA/GT 2,025, von BSA 1,006. Die Negativkontrolle erreichte eine Extinktion von 0,331, wenn sie auf BSA/GT gegeben wurde und einen Wert von 0,115 bei BSA. Bei Verwendung von 10 mg/ml des Fab-Fragments Fab #294 bei BSA/GT erhielt man einen Wert von 2,41; die gleiche Menge bei BSA ergab eine Extinktion von 0,047. Die Anwendung von 0,4 mg/ml des Fab-Fragments Fab #294 bei BSA/GT ergab eine Extinktion von 0,663, bei Anwendung bei BSA wurde ein Wert von 0,041 erreicht.

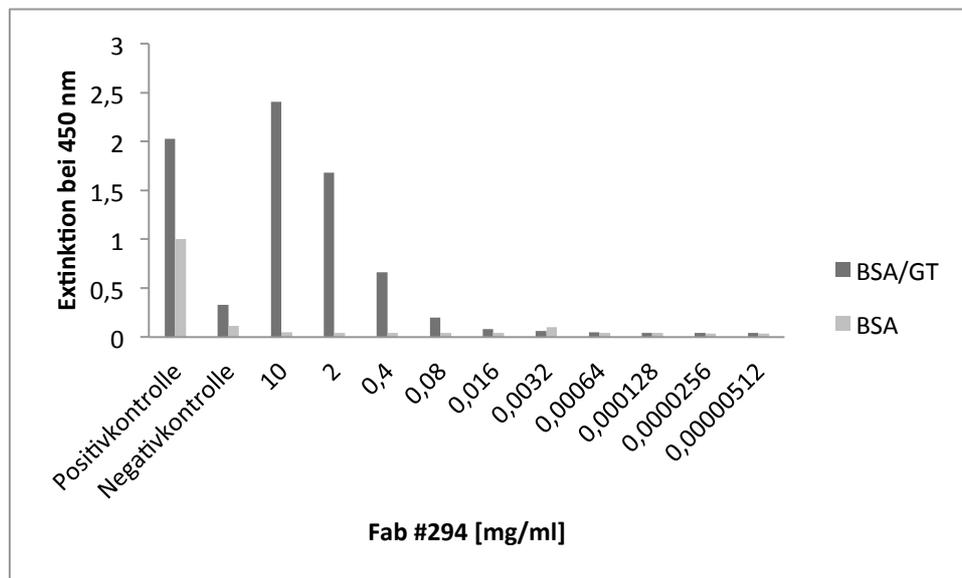


Abbildung 20: Nachweis der Spezifität des Fab-Fragments Fab #294 für *Gliotoxin*. Die Platten wurden mit BSA oder BSA-*Gliotoxin* Konjugat beschichtet und das Fab-Fragment Fab #294 hinzugegeben. Als Detektionsantikörper wurden gegen Fab gerichtete, an Biotin gekoppelte polyklonale Antikörper verwendet. Ein positives Signal erhielt man nur, wenn mit BSA/GT beschichtet wurde. Als Negativkontrolle wurde naives Mausserum, als Positivkontrolle wurden Seren von mit BSA-*Gliotoxin* immunisierten Mäusen verwendet.

Das gleiche Experiment wurde mit dem Fab-Fragment Fab #430 durchgeführt und es wurde ein ähnliches Ergebnis erhalten. Anschließend wurde versucht, die Bindung an

das Konjugat durch Zugabe von freiem *Gliotoxin* zu inhibieren. Dies konnte bei sehr hohen *Gliotoxin* Konzentrationen erreicht werden (Abb. 21).

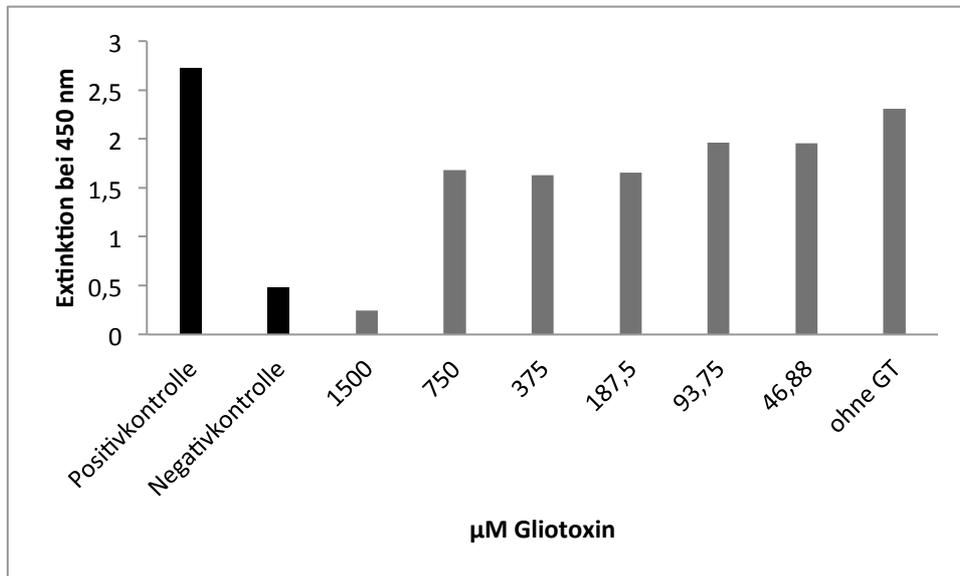


Abbildung 21: Bestimmung der Inhibierbarkeit der Konjugatbindung der Fab-Fragmente des monoklonalen Antikörpers #294 durch freies *Gliotoxin*. Beschichtet wurde mit BSA-*Gliotoxin* Konjugat, anschließend wurden unterschiedliche Konzentrationen an *Gliotoxin* und Fab-Fragment des Antikörpers Fab #294 [0,001mg/ml] hinzugegeben. Die Bindung an das Konjugat ließ sich bei einer Konzentration an freiem *Gliotoxin* von 1500 µM inhibieren.

Dabei betrug der Wert der Positivkontrolle 2,723, der der Negativkontrolle 0,48. Bei Anwendung von 1500 µM *Gliotoxin* betrug der Extinktionswert 0,245. Wurde kein Toxin verwendet lag er bei 2,308. Die Bindung an das Konjugat ließ sich folglich durch die Anwendung von sehr hohen Toxinkonzentrationen inhibieren.

3.8 Affinitätsmessung der Antikörper

Die Affinitätsmessungen wurden freundlicherweise von Stefan Sarembo aus dem Institut für Botanik I der Universität Würzburg mittels Biacore™ durchgeführt. Die Antikörper erkennen *Gliotoxin* zwar, die gemessenen Affinitäten liegen jedoch in einem Bereich zwischen 5 und 10 µM. Herkömmliche Antikörperaffinitäten liegen zwischen 10^{-1} und 10^{-5} µM (Abdul Abbas 2007). Es gibt zwei Möglichkeiten, die relativ schwachen Affinitäten zu erklären. Die erste Erklärung ist, dass die Anwesenheit von

DMSO, die in den Messreihen [Biacore™] 10% betrug, die Affinität der Antikörper verändern könnte. Der zweite Erklärungsversuch ist, dass durch die Kopplungsreaktion an das BSA das *Gliotoxin* derart verändert worden sein könnte, dass es dem nativen *Gliotoxin* nur noch bedingt gleicht.

Um den ersten Punkt auszuschließen, wurde ein ELISA angesetzt, zu dem zusätzlich 10% DMSO hinzugegeben wurde (Abb. 22). Dabei konnte gezeigt werden, dass das DMSO keinen Einfluss auf die Bindungsstärke hatte. Die Antikörper konnten das fixierte BSA/*Gliotoxin*-Konjugat genauso gut detektieren, wie ohne DMSO-Zugabe.

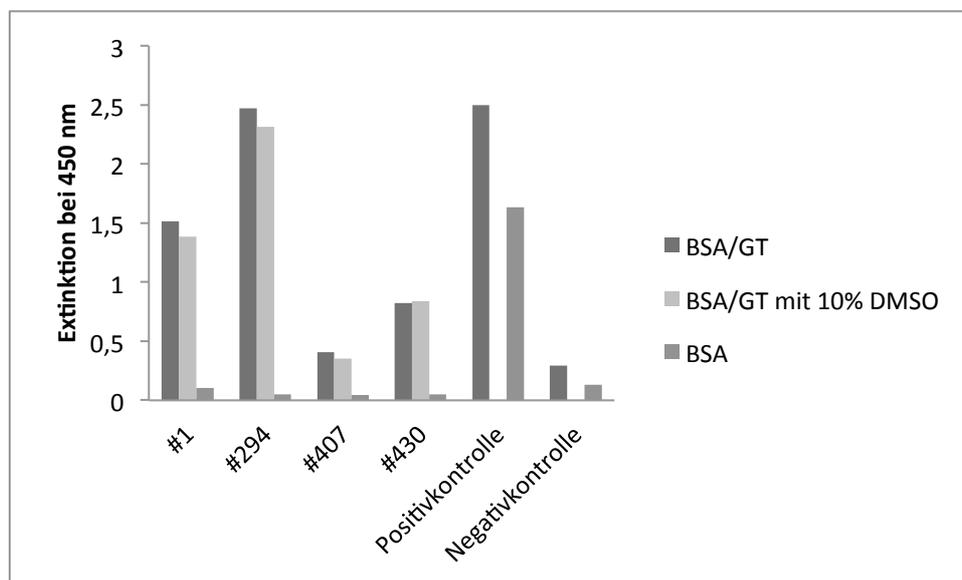


Abbildung 22: Untersuchung des Einflusses von DMSO auf die Konjugatbindung im ELISA. Es wurde mit BSA-*Gliotoxin* und BSA beschichtet, die Antikörper wurden in einer Konzentration von 0,1 mg/ml hinzugegeben. Zu den Ansätzen wurde zusätzlich 10% DMSO gegeben; eine Inhibition der Bindung konnte nicht festgestellt werden. Als Negativkontrolle diente natives Mausserum, als Positivkontrolle das Serum von mit BSA-*Gliotoxin* immunisierten Mäusen.

Der Grund für die niedrige Affinität der Antikörper könnte daher die Kopplung an das BSA-Molekül und die damit einhergehende Veränderung des *Gliotoxins* sein, sodass der Antikörper freies *Gliotoxin* nicht so gut erkennt wie das gekoppelte *Gliotoxin*. Diese Kopplungsreaktionen können die Antigenität aufgrund der Art der Präsentation als auch der Konfiguration des Moleküls verändern (Van Regenmortel, 1988). Erwähnenswert ist hierbei auch die Tatsache, dass *Gliotoxin* für die Kopplung vorher reduziert wurde.

3.9 Charakterisierung der Eigenschaften der monoklonalen Antikörper in Zellkultur

3.9.1 Erhöhte Apoptoseraten bei gleichzeitiger Anwendung von *Gliotoxin* und monoklonalen Antikörpern bei PBMCs

Als nächstes wurden die PBMCs für 16 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ mit einer Konzentration von 0,05 µM *Gliotoxin*, die dem Sensitivitätsbereich der PBMCs für *Gliotoxin* entspricht, inkubiert. Interessanterweise beobachteten wir bei humanen PBMCs eine erhöhte Apoptoserate bei Anwendung von *Gliotoxin* in Kombination mit monoklonalen Antikörpern. Es wurde ersichtlich, dass die Apoptoserate der Zellen, die mit 0,05 µM *Gliotoxin* behandelt wurden (Abb. 23 B), im Vergleich zu mit nur Ethanol behandelten Zellen von 9,21% auf 13% stieg (Abb. 23 A). Gab man weiterhin monoklonalen Antikörper des Klons #294 im zehnfachen Überschuss hinzu (0,5 µM), stieg die Rate apoptotischer Zellen weiter auf 19,3% (Abb. 23 C). Die Apoptoserate blieb bei Inkubation mit ausschließlich Antikörper #294 mit 8,71% weitgehend im Bereich der Ethanolkontrolle (Abb. 23 D). Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die Antikörper an sich keinen toxischen Effekt auf die Zellen ausüben.

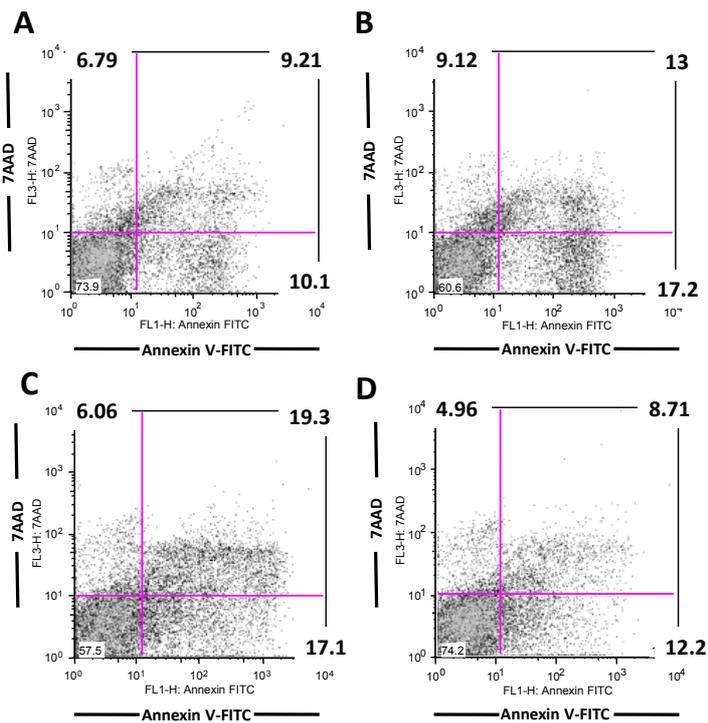


Abbildung 23: Messung des Apoptoseraten bei Zugabe von *Glilotoxin* und *Glilotoxin* in Kombination mit monoklonalem Antikörper. A. PBMCs wurden für 16 h bei 37°C, 5% CO₂ und Ethanol (Kontrolle) inkubiert. B. Die Zellen wurden mit 0,05 µM *Glilotoxin* inkubiert. C. PBMCs wurden zusammen mit 0,05 µM *Glilotoxin* und 0,5 µM Antikörper #294 inkubiert. D. Es wurde nur Antikörper zugegeben. Die Apoptoserate steigt, wenn man gleichzeitig monoklonale Antikörper, die spezifisch für *Glilotoxin* sind und *Glilotoxin* selbst anwendet. Die Anzahl Annexin V FITC⁺/7AAD⁺ Zellen steigt dabei von 13% auf 19,3%. Ein ähnliches Ergebnis ließ sich auch mit #430 erzielen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im nächsten Experiment unterschiedliche Antikörperkonzentrationen von 1,1 µM bis 0,002 µM zusammen mit 0,05 µM *Glilotoxin* eingesetzt. Es sollte untersucht werden, ob die Apoptoserate proportional zur angewendeten Antikörpermenge ansteigt. Dabei stellte sich heraus, dass mit steigender Antikörperkonzentration, bei gleichbleibender *Glilotoxin*konzentration, auch die Apoptoserate stieg (Abb. 24).

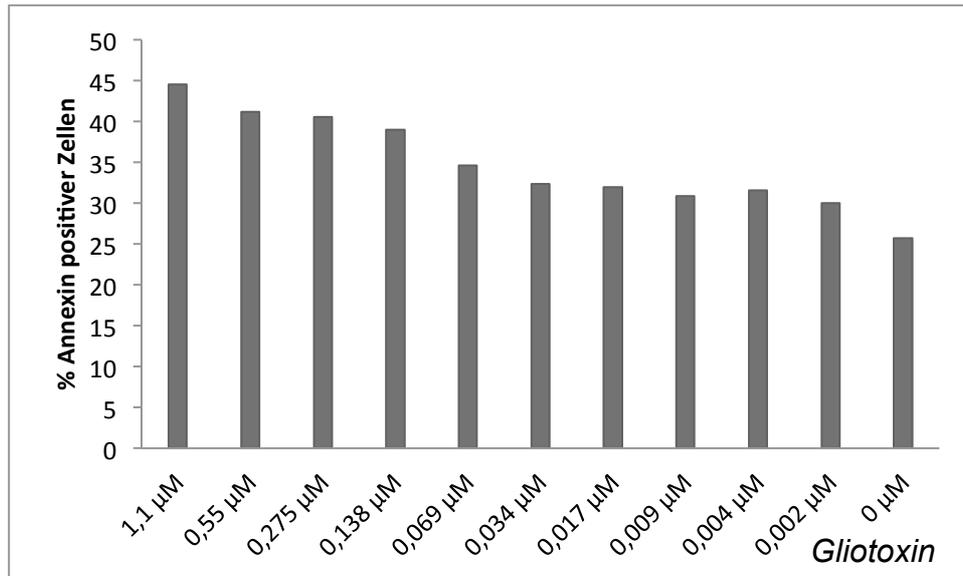


Abbildung 24: Messung der Korrelation von Antikörpermenge in Kombination mit *Gliotoxin* und Apoptoseraten. PBMCs wurden für 16 h bei 37°C, 5% CO₂ mit 0,05 µM *Gliotoxin* inkubiert. Es wurde mit unterschiedlichen Mengen der Antikörpers des Klons #294 inkubiert. Die Apoptoserate steigt, je mehr monoklonale Antikörper bei gleichbleibender *Gliotoxin*konzentration zugegeben wurde.

Dabei betrug die Apoptoserate für nur mit *Gliotoxin* behandelte Zellen 25,7%. Bei Zugabe von 1,1 µM Antikörper #294 zum Reaktionsansatz betrug sie 44,57%. Bei 0,55 µM betrug sie 41,22%. Bei geringen Konzentrationen wie 0,004 µM betrug die Prozentzahl apoptotischer Zellen 31,55%, bei 0,002 µM 29,98%. Um das Ergebnis zu bestätigen, wurden diese Versuche mehrmals wiederholt. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl apoptotischer Zellen entsprechend der vorherigen Beobachtungen bei gleichzeitiger Anwesenheit von 0,05 µM *Gliotoxin* und 0,5 µM Antikörper der Klone #294 oder #430 höher war als bei alleiniger Anwendung von 0,05 µM *Gliotoxin*. Während die Prozentzahl apoptotischer Zellen mit *Gliotoxin* alleine bei durchschnittlich 25% lag, stieg die Prozentzahl dieser Zellen auf 32-36%, wenn zusätzlich noch einen *Gliotoxin*-spezifische monoklonale Antikörper hinzugegeben wurden (Abb. 25).

Der Apoptoseversuch mit den PBMCs wurde mehrmals wiederholt, um die Ergebnisse zu reproduzieren. Dabei wurde ersichtlich, dass die Apoptoserate bei allen Versuchsansätzen bei gleichzeitiger Verwendung von 0,05 µM *Gliotoxin* und 0,5 µM Antikörper im Vergleich zur alleinigen Anwendung von 0,05 µM *Gliotoxin* um etwa zehn Prozent-

punkte anstieg. Für die Versuche wurden jeweils Triplikate der Proben verwendet und aus ihnen ein durchschnittlicher Apoptosewert errechnet. Der Antikörper alleine war nicht toxisch. Die Kontrolle bestand aus mit Ethanol versetzten Zellen. Dabei war die Ethanolkonzentration gleich der Konzentration des Ethanols bei mit *Gliotoxin* versetzten Zellen (0,623 g/L).

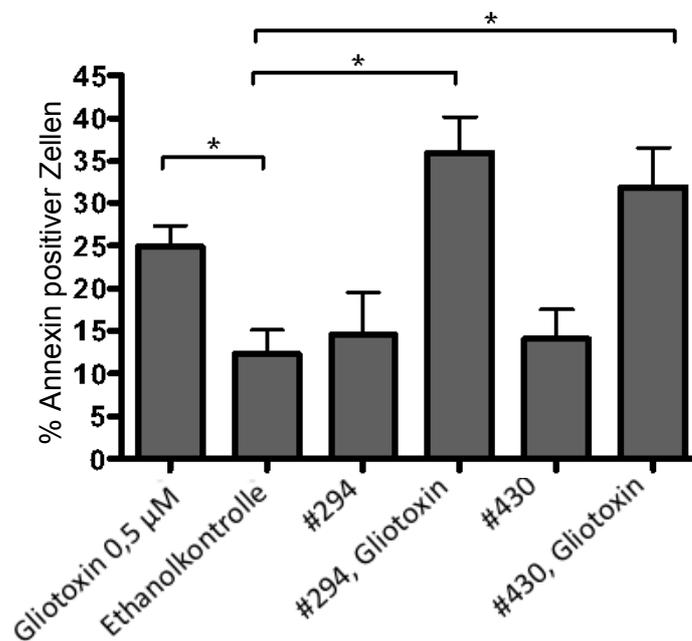


Abbildung 25: Bestätigung der höheren Zelltoxizität bei Inkubation der PBMCs mit *Gliotoxin* und monoklonalen Antikörpern. In mehreren Färbungen humaner PBMCs unterschiedlicher Spender konnte gezeigt werden, dass die Prozentzahl Annexin V positiver Zellen um ca. zehn Prozent stieg, wenn sie zusätzlich zu 0,05 µM *Gliotoxin* mit 0,5 µM Antikörper (#294 oder #430) inkubiert wurden. Die Messungen wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt. In dieser Abbildung werden die Durchschnittswerte der Triplikate gezeigt. Die Ethanolkonzentration bei der Negativkontrolle entsprach der eingesetzten Menge an Ethanol bei den mit *Gliotoxin* versetzten Zellen (0,623 g/L).

Der Grund für die relativ unterschiedlichen Apoptoseraten, welche bei den verschiedenen Messreihen beobachtet wurden, könnten sich dadurch ergeben, dass für die einzelnen Experimente PBMCs verschiedener Spender verwendet wurden. Diese könnten sich sowohl in ihrer Sensitivität auf *Gliotoxin* als auch im Gehalt an Monozyten

unterscheiden, die die Hauptzielpopulation darstellen (s.u.). Weiterhin muss auch der eventuelle toxische Einfluss des Ethanols in allen Proben miteinbezogen werden.

3.9.2 Apoptoseraten der unterschiedlichen Subpopulationen der PBMCs

Als Nächstes wurde untersucht, welche Subpopulationen der PBMCs bei gleichzeitiger Behandlung mit *Gliotoxin* und monoklonalem Antikörper vorwiegend apoptotisch wurden.

Die einzelnen Subpopulationen der PBMCs wurden mit spezifischen Antikörpern, welche an Farbstoffen gekoppelt waren, markiert. Dazu wurden folgende Antikörper verwendet: Annexin V-APC und 7AAD als Apoptosemarker, CD14-PE für Makrophagen und Monozyten, CD4-FITC für Helfer-T-Zellen, CD8-PE für zytotoxische T-Zellen und CD19-FITC für B-Lymphozyten. Gemessen wurde die Apoptoserate der unterschiedlichen Zellpopulationen. Als Maß dafür wurde die Prozentanzahl der Annexin V⁺ Zellen verwendet (Abb. 26). Insgesamt wurde ersichtlich, dass vor allem die CD14⁺ Monozyten bei gleichzeitiger Anwendung von *Gliotoxin* (0,5 µM) und Antikörpern einer erhöhten Apoptose unterlagen. Sie betrug bei Antikörpern des Klons #1 in Kombination mit *Gliotoxin* 36,3%, wohingegen sie bei alleinigem Einsatz des Toxins nur bei 16,72% lag. Erwähnenswert ist hierbei die Tatsache, dass die Apoptoserate vor allem in Anwesenheit des IgG₃ Antikörpers erhöht ist. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass IgG₃ Antikörper besser an FcγRI binden, die vor allem auf Monozyten exprimiert werden (Rozsnyay et al. 1989). Weiterhin konnte eine publizierte Studie von Goh et al. 2011 zeigen, dass *Salmonella enterica* serovar Typhimurium besser über den Komplex mit IgG₃ und FcγRI als über IgG₁ internalisiert werden konnten. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Antikörper in unserem Versuchsansatz an das freie *Gliotoxin* und gleichzeitig auch an Fc-γ Rezeptoren der verwendeten Zellen binden. Dadurch könnte die Aufnahme des *Gliotoxins* in die Zellen erleichtert und damit die apoptotische Wirkung verstärkt werden. Dies würde allerdings bedeuten, dass eine Impfung gegen *Gliotoxin* nicht sinnvoll wäre, da sie die Antikörperproduktion zwar anregt, aber einen gegenteiligen Effekt als den Gewünschten auslösen würde. Anstatt einer Neutralisierung des Toxins durch spezifische Antikörper würde die Aufnahme des *Gliotoxins* in die Zellen und damit auch dessen toxische Wirkung gesteigert werden.

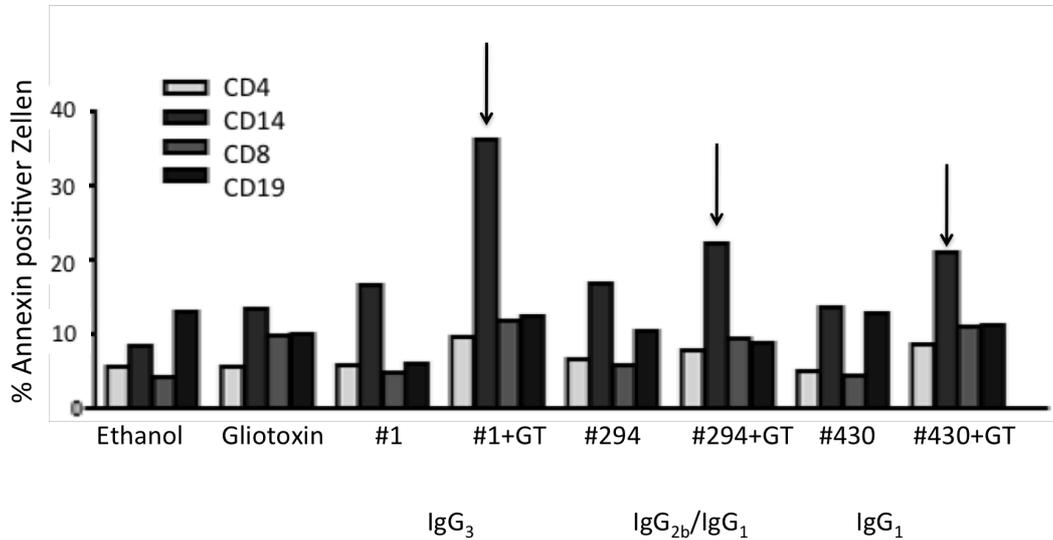


Abbildung 26: Messung der Apoptoseraten der einzelnen Subpopulation der PBMCs. Inkubation über 16 h, bei 37°C und 5% CO₂. Die Zahl der apoptotischen Monozyten (CD14⁺) steigt, wenn gleichzeitig monoklonaler Antikörper (Klone #1, #294, #430) und *Gliotoxin* verwendet wird. Die Apoptoserate ist vor allem bei Anwendung des IgG₃ Antikörpers erhöht.

3.9.3 Apoptoseraten bei gleichzeitiger Anwendung von *Gliotoxin*, monoklonalen Antikörpern und Fc-Block bei C57BL/6 Thymozyten

Bei C57BL/6 Thymozyten wurde gleichzeitig zu *Gliotoxin* und den monoklonalen Antikörpern auch Fc-Block eingesetzt, ein Antikörper, der an FcγIII und FcγII Rezeptoren bindet. Dadurch sollte die unspezifische Bindung des *Gliotoxin* Antikörpers an die Fc-Rezeptoren der Zellen verhindert werden. Dabei wurde ersichtlich, dass diejenigen Zellen die zusätzlich zu *Gliotoxin* und zu den monoklonalen Antikörpern mit Fc Block behandelt wurden, eine erniedrigte Apoptoserate aufwiesen, als diejenigen die nur mit *Gliotoxin* und Antikörpern versetzt wurden (Abb. 27).

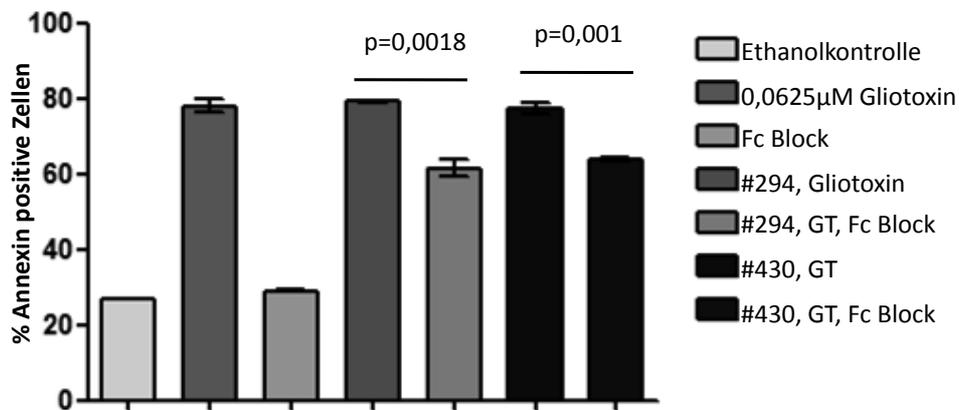


Abbildung 27: Messung des Einflusses von Fc-Block auf die Apoptose von C57BL/6 Thymozyten. Sie wurden über Nacht bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Im Vergleich mit Gliotoxin und Antikörper versetzten Thymozyten wiesen diejenigen, die zusätzlich noch mit Fc-Block behandelt wurden, eine erniedrigte Apoptoserate auf.

Bei Wiederholung des Versuchs zeigten sich sehr unterschiedliche Ergebnisse. Mehrere Färbungen frischer C57BL/6 Thymozyten zeigten, dass die Prozentzahl Annexin V positiver Zellen um durchschnittlich etwa 7 Prozent sank, wenn sie mit *Gliotoxin*, Antikörpern und Fc Block behandelt wurden, statt nur mit *Gliotoxin* und Antikörpern. Es ist zunächst keine Steigerung der GT-induzierten Apoptose durch die monoklonalen Antikörper zu sehen, allerdings ist die Apoptoserate bei durchschnittlich 80% Annexin positiven Zellen durch die Antikörper wahrscheinlich nicht mehr steigerungsfähig. Allerdings kann die Apoptoserate durch die Zugabe des Fc-Blocks wieder gesenkt werden.

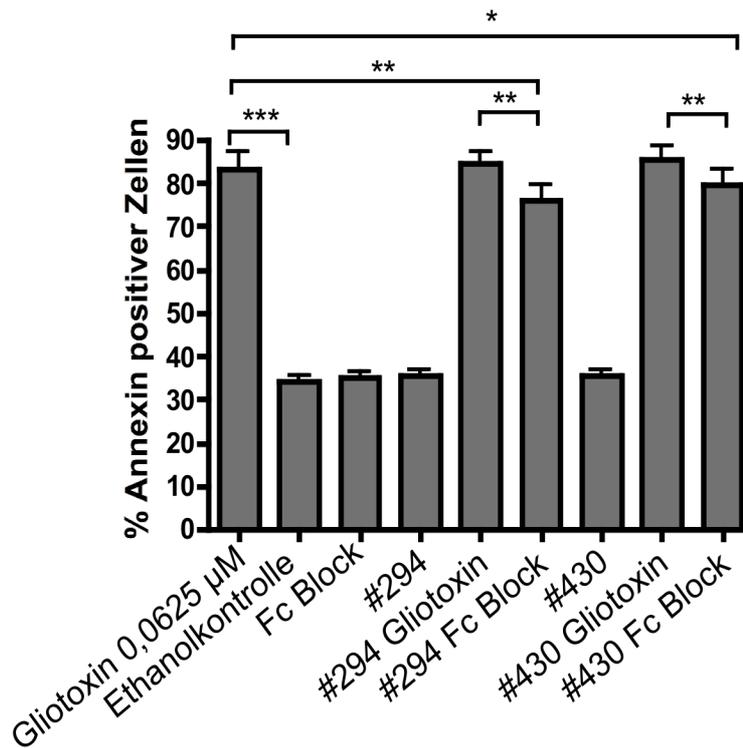


Abbildung 28: Einfluss des Fc-Blocks auf die Apoptoseraten auf C57BL/6 Thymozyten. In sechs Färbungen frischer C57BL/6 Thymozyten sank die Prozentzahl Annexin V positiver Zellen um ca. 7 Prozent, wenn die Zellen zusätzlich zu Gliotoxin [0,0625 µM] und Antikörper [0,625 µM] zuvor mit Fc Block behandelt wurden.

Gemittelt liegt die Apoptoserate bei alleiniger Anwendung von *Gliotoxin* bei 79,5% (Annexin V positive Zellen); bei Anwendung gleicher Mengen Ethanol als Negativkontrolle nur bei 34,4%. Bei alleiniger Anwendung des Fc-Blocks zur Kontrolle seiner Toxizität für die Zellen, beträgt die Apoptoserate 36%. Fc-Block in alleiniger Anwendung führt also nicht zu einer vermehrten Apoptose. Liegt die Antikörperkonzentration des Klons #294 oder #430 bei 0,625 µM, so liegt die Prozentzahl Annexin positiver Zellen bei 31%, während sie bei einer Anwendung mit *Gliotoxin* zusammen bei 81% liegt. Wird zusätzlich Fc-Block zu den Zellen gegeben, so sinkt die Apoptoserate auf 74-77%.

Grundsätzlich könnte bei diesen Ergebnissen davon ausgegangen werden, dass bei Verhinderung der Antikörper-*Gliotoxin*-Komplex – Aufnahme in die Zellen durch den Fc-Block der neutralisierende Effekt der Antikörper auf *Gliotoxin* dann zum Tragen kommt.

3.9.4 Effekt von Fab-Fragmenten auf die *Gliotoxin*-induzierte Apoptose von C57BL/6 Thymozyten

Um zu untersuchen, ob die Anzahl apoptotischer Thymozyten bei *Gliotoxin*-Behandlung sowohl durch Fc-Block und herkömmlichem Antikörper als auch durch die Anwendung von Fab-Fragmenten gesenkt werden kann, wurden diese bei den Zellfärbungen in zehnfachem Überschuss im Vergleich zum Anteil an *Gliotoxin* eingesetzt (Abb. 29). Fab-Fragmente besitzen keinen Fc-Teil und können somit nicht an Fc-Rezeptoren binden. Mit *Gliotoxin* (0,0625 μM) behandelte Zellen waren zu 50% apoptotisch. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen der Ethanolkontrolle lag bei 40%. Die Apoptoserate von mit 0,625 μM Fab-Fragmenten versetzten Zellen betrug 35%. Im Vergleich zu nur mit *Gliotoxin* behandelten Zellen, waren diejenigen, die zusätzlich mit Fab-Fragmenten versetzt wurden, weniger apoptotisch, die Prozentzahl betrug 46%.

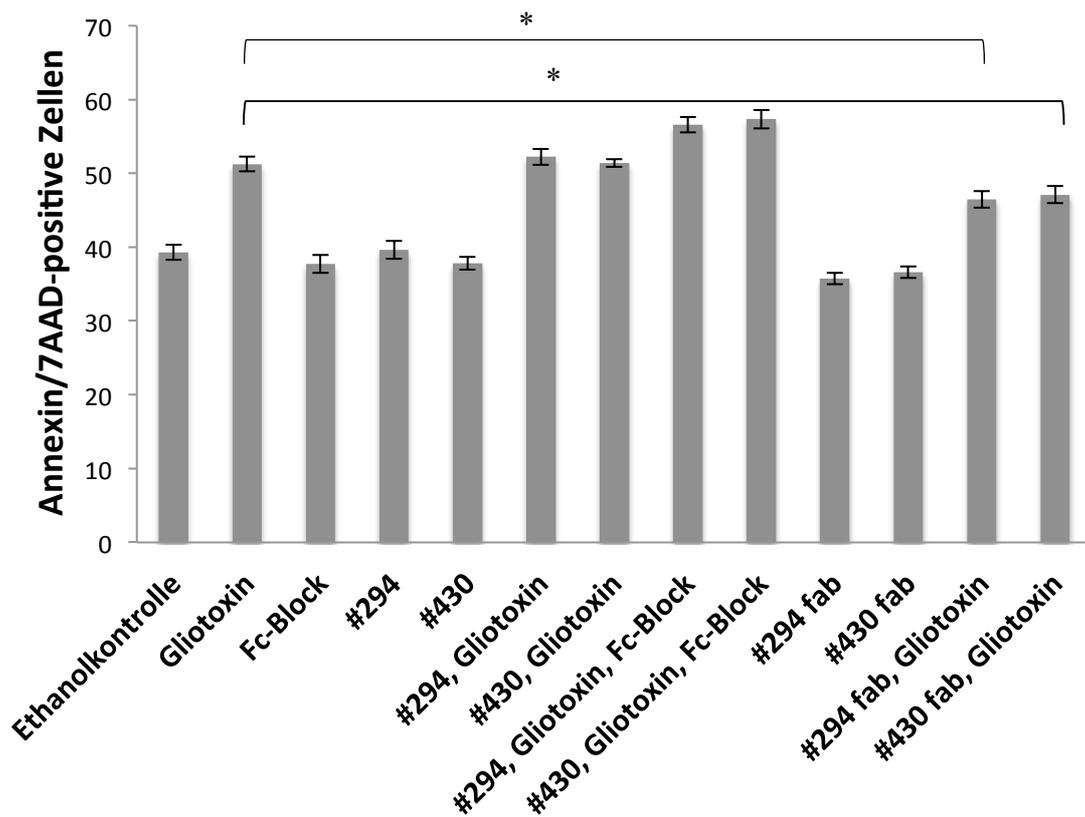


Abbildung 29: Messung der Apoptose von C57BL/6 Thymozyten. 2×10^5 Zellen pro 50 μ l Ansatz wurden mit 7AAD und Annexin V-FITC gefärbt. Die Prozentzahl Annexin V⁺ Zellen spiegelt die Anzahl apoptotischer Zellen wieder. Konzentration an Ethanol in den Proben: 2,04 g/L.

Insgesamt zeigten sich auch bei den verschiedenen Apoptosemessungen, die mit Thymozyten durchgeführt wurden, relativ große Unterschiede. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Messungen mit jeweils neu isolierten Zellen aus verschiedenen C57/BL6 Mäusen durchgeführt wurden. Thymozyten sind sehr fragile Zellen, insbesondere die unreifen Thymozytenpopulationen, die bei jungen Mäusen circa 85% der Thymozyten, bei älteren jedoch deutlich weniger ausmachen. Ein weiterer Faktor ist, ob die Mäuse vor der Entnahme erheblichem Stress ausgesetzt waren oder nicht.

4 Diskussion

Nach erfolgreichen Zellfusionen wurden insgesamt vier IgG Antikörper und ein IgM Antikörper charakterisiert, die im ELISA mit dem BSA-Gliotoxin Konjugat, aber nicht mit BSA reagierten. Der IgM Antikörper wurde nicht weiter untersucht, da IgM Antikörper im Allgemeinen schwer zu handhaben und aufwendiger aufzureinigen sind. Außerdem ist ihre Affinität für das Substrat niedriger und die *in vivo* Applikation schwierig.

Der Grund für den gleichzeitigen Nachweis zweier unterschiedlicher Isotypen der Antikörper des Klons #294 (IgG₁ und IgG_{2b}) kann zum einen daran liegen, dass die Subklonierung unzureichend war; dass zwei Klone, die sich in einem Napf befanden, zwei unterschiedliche Antikörper-Isotypen produzierten. Dies ist relativ unwahrscheinlich, da der Klon insgesamt zwei Mal subkloniert wurde. Zum Anderen könnte es sein, dass der Antikörper einem Isotypenswitch unterlegen ist. Wiederum ist dies aber relativ unwahrscheinlich, da dann nur noch ausschließlich der zweite Antikörper hätte produziert werden müssen. Eine letzte Möglichkeit bestünde darin, dass zwei B-Lymphozyten mit einer AgX-Myelomzelle fusioniert sind und dass dieses Hybridom daraufhin zwei verschiedene H-Ketten produzierte, die unterschiedlichen Isotyps waren.

Die gewählte Strategie der Immunisierung von Mäusen mit einem *Gliotoxin*-BSA Konjugat brachte eine Reihe von *Gliotoxin* spezifischen Antikörpern hervor, die im ELISA sehr gut an das Konjugat, ein *Gliotoxin*-Thyreoglobulin Konjugat, nicht aber an BSA alleine banden. Jedoch konnte in den Zellkultur-Versuchen mit humanen oder murinen Zellen und Antikörpern zusammen mit *Gliotoxin* kein einheitliches Verhalten dieser Antikörper gezeigt werden. Überraschenderweise zeigte sich eine erhöhte Apoptoserate bei gleichzeitiger Anwendung von monoklonalen Antikörpern und *Gliotoxin*. Die experimentelle Überprüfung der daraufhin formulierten Hypothese der Aufnahme des Toxins via Fc-Rezeptoren führte zu uneinheitlichen Ergebnissen. Teils ließ sich die Apoptoserate durch Fc-Blockade-Reagenzien bzw. Anwendung von Fab-Fragmenten, die nicht an Fc-Rezeptoren binden, vermindern. Teilweise konnten diese Ergebnisse aber nicht reproduziert werden. Dies könnte daran liegen, dass die nachgewiesene Affinität der Antikörper von 5 bis 10 μM relativ niedrig ist. Normale Antikörperaffinitäten liegen in einem Bereich von 10^{-1} bis 10^{-5} μM . Diese Zahl entspricht der Dissoziations-

konstanten K_d , die in der Einheit Mol angegeben wird und für die „Leichtigkeit“ steht, mit der eine vorhandene Antigen-Antikörper Bindung wieder zerfällt. Je niedriger die Dissoziationskonstante, desto stärker und affiner ist die Bindung eines Epitops des Antigens an einen Fab-Teil eines Antikörpers. Eine kleinere Konzentration sowohl an Antikörper als auch an *Gliotoxin* ist nötig, um eine stabile Antigen-Antikörper Bindung zu erhalten. Man spricht von einer monovalenten Bindung, da es nur um die Bindung eines Epitops an den Fab-Teil geht (Harris et al. 1999).

In unseren Experimenten würde dies bedeuten, dass die Bindung eines Fab-Teils im Zellkultur-Versuch an ein Epitop des freien *Gliotoxins* wegen der niedrigen Affinität der Antikörper ineffizient ist. Die gute Funktion der Antikörper im ELISA könnte hingegen dafür sprechen, dass ein hoher Aviditätseffekt besteht. Die Avidität eines Antikörpers ergibt sich aus der Anzahl der Bindungen, die die Fab-Fragmente eines Antikörpers mit verschiedenen Epitopen eingehen können und deren zugehörigen Affinitäten (Abdul Abbas 2007). Avidität steht also vereinfacht für die Gesamtstärke einer Antigen-Antikörper Bindung. Eine polyvalente Bindung eines IgM Antikörpers an insgesamt zehn Epitope eines multivalenten Antigens, deren Bindung jeweils nur schwach affin ist, kann so zu einer hohen Gesamtavidität führen. Diese kann sogar höher sein als die Avidität eines höher affinen IgG Antikörpers für das gleiche Antigen (Abdul Abbas 2007). In den ELISA Experimenten kommt der Aviditätseffekt zum Tragen. Das *Gliotoxin*-Konjugat ist auf dem Boden der Platten fixiert, so dass ein Antikörper gleichzeitig zwei *Gliotoxin* Moleküle binden kann. Damit ist die Bindung stärker als beispielsweise in einem Versuch mit freiem *Gliotoxin*. Bei der primären Auswahl der potentesten Antikörper bestimmte dieser Aviditätseffekt schon das Ergebnis, da die Antikörper nur anhand ihrer Avidität im ELISA ausgewählt wurden. Diese Tatsache legt nahe, dass die Antikörper für eine Anwendung mit freiem *Gliotoxin* eine zu niedrige Affinität besitzen.

Allerdings zeigte sich in den ELISA Experimenten auch, dass sich die Bindung der monoklonalen Antikörper an die auf den Platten fixierten Konjugate durch sehr hohe *Gliotoxin*-Konzentrationen inhibieren ließ (vgl. Abbildung 11). Die Wiederholung dieses Versuchs zeigte auch eine Inhibierbarkeit bei der Verwendung von Fab-Fragmenten (vgl. Abbildung 21). Dies zeigt, dass es prinzipiell möglich ist, einen kompetitiven

ELISA aufzubauen. Um diesen zu optimieren, bräuchte es Antikörper mit erhöhten Affinitäten für das Toxin, um in einen nützlichen Messbereich zu gelangen. Dieser Versuch würde den Grundstein für eine Behandlung mit neutralisierenden GT-Antikörpern *in vivo* legen. Weiterhin würden für das Toxin hoch affine Antikörper besser für die Anwendung im Sandwich-ELISA zur *Gliotoxin*-Detektion geeignet sein.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Daten der Zellkultur-Versuche mit PBMCs oder Thymuszellen könnte die Herstellung und Auswahl der Konjugate betreffen. Es wurde dabei entweder ein BSA oder Thyreoglobulin Molekül an *Gliotoxin* gekoppelt. Die Verknüpfung der Moleküle wurde mittels SATA (S-Acetylthioglycolazid N-Hydroxysuccinimid) durchgeführt, das Sulfhydrylgruppen an Amingruppen eines Moleküls anheftet und es damit eine potentiell reaktive Gruppe an einem Teil des Moleküls schafft, um es bei Bedarf mit einem anderen zu koppeln (Duncan et al. 1983). *Gliotoxin* wurde mit N-P-Maleimidophenyl Isocyanat (PMPI) aktiviert. Dabei ist zu erwähnen, dass Thyreoglobulin an mehrere *Gliotoxin*-Moleküle gekoppelt werden kann, da es über mehrere Aminogruppen verfügt (Fox et al. 2004). Da beide Konjugate mit der gleichen Methode an das Toxin gekoppelt wurden, besitzen sie ein identisches Verbindungsstück, eine sogenannte Spacer-Sequenz. In diesem Fall wäre dies ein Lysin-SATA, ein relativ großes Molekül. Wären die Antikörper auch spezifisch für diesen Spacer, würde dies auch die gute Bindung an die Konjugate im ELISA und gleichzeitig die schwache Bindung an freies *Gliotoxin* im Apoptoseversuch mit PBMCs erklären. Dies würde bedeuten, dass man eine Möglichkeit finden müsste, das Toxin mit einer anderen Methode an ein Trägermolekül zu koppeln, damit die Spacer-Sequenzen so unterschiedlich wie möglich sind, um ein solches Ergebnis auszuschließen. Man könnte auch das Molekül selbst auf Platten fixieren. Durch radio-derivatisiertes Polystyren können kleine Moleküle sowie Peptide direkt an die Platten polymerisiert werden (Varga and Fritsch 1990). Weiterhin könnte ein anderes Kopplungsreagenz als SATA verwendet werden, zum Beispiel Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimid (Darwish et al. 2012).

In einigen Versuchen zeigte sich eine vermehrte Apoptose bei gleichzeitiger Anwendung von *Gliotoxin* und monoklonalen Antikörpern, die spezifisch für dieses Toxin sind. Ein Erklärungsansatz hierfür war die Aufnahme des *Gliotoxins* über zelluläre Fc-Rezeptoren. Dieser Mechanismus würde einen weiteren Weg darstellen, *Gliotoxin* in die

Zelle aufzunehmen. Da das Toxin ein hydrophiles Molekül mit mehreren polaren Gruppen ist (Eichner and Mullbacher 1984), kann es nicht einfach über die Zellmembran in die Zelle diffundieren. Folglich muss es mit membranständigen Rezeptoren, Transporten oder Kanälen interagieren, um in das Zellinnere zu gelangen und dort seine Wirkung zu entfalten. Es wurde gezeigt, dass *Gliotoxin* mit organischen Anionen- und Kationentransportern interferiert. Es inhibiert die Aufnahme der Ionen in Leber, Nieren und andere Organe (Tachampa et al. 2008). Dies legt nahe, dass das Toxin ein potentielles Transportsubstrat der humanen organischen Anionen- bzw. Kationentransporter (hOAT und hOCT) ist (Tachampa et al. 2008), also im Sinne eines kompetitiven Agonisten agiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *Gliotoxin* über einen aktiven Glutathion-abhängigen, reversiblen Transportmechanismus als oxidierte Form in den Zellen konzentriert wird (Bernardo et al. 2003). Dabei ist es wichtig, dass das Toxin aufgrund seiner internen Disulfidbrücke sowohl als reduzierte Thiolform, als auch als oxidierte Sulfidform vorliegen kann. Nur die oxidierte Form gelangt über die Zellmembran, während das Toxin im Zellinneren reduziert vorliegt (Bernardo et al. 2003). Allerdings ist nur die oxidierte Form reaktiv und kann über die Disulfidbrücke an Proteine binden und dann seine toxische Wirkung entfalten. In der Zelle herrscht dabei ein Fließgleichgewicht, das nur wenig oxidierte Form des Toxins verfügbar macht (Bernardo et al. 2003). Da das *Gliotoxin*-Molekül in unseren Versuchen für die Kopplungsreaktion reduziert wurde, käme es auch in Betracht, dass die dagegen gebildeten monoklonalen Antikörper in den nachfolgenden Versuchen nicht mehr in der Lage waren, das oxidierte *Gliotoxin* mit hoher Affinität zu binden, welches der aktiven Form des Toxins entspricht. Allerdings spricht die toxizitätssteigernde Wirkung der Antikörper in *Gliotoxin*-behandelten Kulturen dafür, dass die Bindung ausreichend ist, um einen Antikörper-vermittelten Transport in die Zelle zu ermöglichen. Dies wäre trotz der relativ schlechten Affinität der Antikörper-*Gliotoxin* Bindung denkbar, da im Gegensatz zu den Bindungsstudien im ELISA kein Waschschriff erfolgt, der die beiden Partner wieder trennt, sondern diese kontinuierlich gemeinsam in den Kulturen vorhanden sind.

Zusammenfassend dienen die oben beschriebenen Experimente zur qualitativen Untersuchung der toxischen Einflüsse von *Gliotoxin* sowie deren Modulation durch Antikörper und ihrer Derivate auf PBMCs und Thymozyten. Eine quantitative Beschreibung der Phänomene konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr vorgenommen werden.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen *Gliotoxin* und eine Charakterisierung der Eigenschaften dieser Antikörper sowie ihrer Fab-Fragmente im ELISA sowie in *Gliotoxin*-behandelten Kulturen lymphoider Zellen des Menschen und der Maus. Insgesamt konnten fünf monoklonale Antikörper generiert werden, die spezifisch für das Mykotoxin *Gliotoxin* waren. Dies ließ sich durch Untersuchung im ELISA bestätigen. Dabei konnten die Antikörper sowohl an BSA/*Gliotoxin* als auch an Thyreoglobulin/*Gliotoxin* binden, nicht aber an BSA. Die Bindung ließ sich teilweise durch freies *Gliotoxin* inhibieren. Mit sehr hohen Konzentrationen an *Gliotoxin* ließ sich die Bindung des Antikörpers oder seines Fab-Fragments an das Konjugat verringern. Niedrige Affinitäten der Antikörper (5 - 10 μM) und der überwiegende Aviditätseffekt (bei intaktem Antikörper) im ELISA könnten ein Grund für die niedrige Inhibierbarkeit durch freies *Gliotoxin* sein.

Bei menschlichen PBMCs rief die gleichzeitige Anwendung des Giftes und der Antikörper eine erhöhte Apoptoserate vor allem der Monozyten hervor, was auf eine mögliche Bindung der Antikörper an zelluläre Fc-Rezeptoren zurückzuführen war. Gab man zusätzlich ein Fc-Rezeptor blockierendes Reagenz hinzu, konnte die Apoptoserate bei Maus-Thymozyten dadurch gesenkt werden. Bei der Anwendung von Fab-Fragmenten erhielt ich unterschiedliche Ergebnisse. Thymozyten wiesen eine geringere Apoptoserate auf, während sich bei PBMCs die Apoptoserate nicht verringern ließ.

Diese Ergebnisse sind nun Voraussetzung für weitere Studien. Das Ziel ist, einige neue Antikörper herzustellen, die eine höhere Affinität für *Gliotoxin* aufweisen. Weiterhin wäre es von Bedeutung, die Immunisierung mit einem Konjugat durchzuführen, das durch eine differente Kopplungsreaktion gewonnen wurde, als das Testkonjugat. Mithilfe solcher spezifischerer Antikörper würden die Zellkultur-Versuche eventuell eindeutiger Ergebnisse liefern und ein kompetitiver ELISA von höherer Sensitivität könnte aufgebaut werden.

Es besteht ein wachsender Bedarf für alternative Behandlungsmethoden für *Aspergillus fumigatus* Infektionen, da die bisherigen Therapieregimen keine ausreichenden Erfolge

aufweisen. Eine Neutralisation des Toxins in Form einer monoklonalen Antikörpertherapie gegen *Gliotoxin* würde solch eine Alternative darstellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen allerdings dafür, dass wegen der beobachteten Verstärkung der *Gliotoxintoxizität* durch intakte monoklonale Antikörper weder eine Impfung noch eine Behandlung mit intakten, Fc-Rezeptor-bindenden Antikörpern aussichtsreich erscheint.

6 Literaturverzeichnis

- Abad, A., J. V. Fernandez-Molina, J. Bikandi, A. Ramirez, J. Margareto, J. Sendino, F. L. Hernando, J. Ponton, J. Garaizar and A. Rementeria (2010). "What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis." Rev Iberoam Micol 27(4): 155-182.
- Abdul K. Abbas, A. H. L., Shiv Pillai (2007). Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, PA 19103-2899, Saunders Elsevier.
- Balloy, V. and M. Chignard (2009). "The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*." Microbes Infect 11(12): 919-927.
- Bernardo, P. H., N. Brasch, C. L. Chai and P. Waring (2003). "A novel redox mechanism for the glutathione-dependent reversible uptake of a fungal toxin in cells." The Journal of biological chemistry 278(47): 46549-46555.
- Bouillet, P., O'Reilly L.A. (2009). "CD95, BIM and T Cell homeostasis." Nat Rev Immunol 9(7): 514-9.
- Choi, H. S., J. S. Shim, J.-A. Kim, S. W. Kang and H. J. Kwon (2007). "Discovery of gliotoxin as a new small molecule targeting thioredoxin redox system." Biochemical and biophysical research communications 359(3): 523-528.
- Chu, H. Y., R. Jain, H. Xie, P. Pottinger and D. N. Fredricks (2013). "Voriconazole therapeutic drug monitoring: retrospective cohort study of the relationship to clinical outcomes and adverse events." BMC Infect Dis 13(1): 105.
- Dagenais, T. R. and N. P. Keller (2009). "Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis." Clin Microbiol Rev 22(3): 447-465.
- Darwish, I. A., N. Z. Alzoman, R. M. Abuhejail and T. E. El-Samani (2012). "Synthesis of hapten and preparation of specific polyclonal antibody with high affinity for lenalidomide, the potent drug for treatment of multiple myeloma." Chem Cent J 6(1): 125.
- Duncan, R. J., P. D. Weston and R. Wigglesworth (1983). "A new reagent which may be used to introduce sulfhydryl groups into proteins, and its use in the preparation of conjugates for immunoassay." Anal Biochem 132(1): 68-73.
- Eichner, R. D. and A. Mullbacher (1984). "Hypothesis: Fungal toxins are involved in aspergillosis and AIDS." Aust J Exp Biol Med Sci 62 (Pt 4): 479-484.
- Eshwika, A., J. Kelly, J. P. Fallon and K. Kavanagh (2013). "Exposure of *Aspergillus fumigatus* to caspofungin results in the release, and de novo biosynthesis, of gliotoxin." Med Mycol 51(2): 121-127.
- Fitzpatrick, L. R., J. Wang and T. Le (2000). "In vitro and in vivo effects of gliotoxin, a fungal metabolite: efficacy against dextran sodium sulfate-induced colitis in rats." Dig Dis Sci 45(12): 2327-2336.

Fox, M., G. Gray, K. Kavanagh, C. Lewis and S. Doyle (2004). "Detection of *Aspergillus fumigatus* mycotoxins: immunogen synthesis and immunoassay development." J Microbiol Methods 56(2): 221-230.

Futosi, K., S. Fodor and A. Mócsai (2013). "Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways." Int Immunopharmacol 17(3): 638-650.

Guo, D., J. Chen, Y. Liu, H. Yao, F. A. Han and J. Pan (2011). "A high-performance molluscicidal ingredient against *Oncomelania hupensis* produced by a rhizospheric strain from *Phytolacca acinosa* Roxb." Pharmacogn Mag 7(28): 277-283.

Harris, L. J., S. B. Larson and A. McPherson (1999). "Comparison of intact antibody structures and the implications for effector function." Adv Immunol 72: 191-208.

Imose, M., M. Nagaki, K. Kimura, S. Takai, M. Imao, T. Naiki, Y. Osawa, T. Asano, H. Hayashi and H. Moriwaki (2004). "Leflunomide protects from T-cell mediated liver injury in mice through inhibition of nuclear factor kappaB." Hepatology 40(5): 1160-9.

Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature 256(5517): 495-497.

Kracker, S. and A. Durandy (2011). "Insights into the B Cell specific process of immunoglobulin class switch recombination." Immunol Lett 138(2): 97-103.

Kupfahl, C., T. Heinekamp, G. Geginat, T. Ruppert, A. Hartl, H. Hof and A. A. Brakhage (2006). "Deletion of the gliP gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model." Mol Microbiol 62(1): 292-302.

Kupfahl, C., A. Michalka, C. Lass-Flörl, G. Fischer, G. Haase, T. Ruppert, G. Geginat and H. Hof (2008). "Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains." Int J Med Microbiol 298(3-4): 319-327.

Kwon-Chung, K. J. and J. A. Sugui (2009). "What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*?" Med Mycol 47 Suppl 1: S97-103.

Latge, J. P. (2001). "The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*." Trends Microbiol 9(8): 382-389.

Larsen, BD, Megeney LA (2010). "Parole terms for a killer: directing caspase3/CAD induced DNA strand breaks to coordinate changes in gene expression." Cell Cycle 9(15): 2940-5.

Lewis, R. E., N. P. Wiederhold, J. Chi, X. Y. Han, K. V. Komanduri, D. P. Kontoyiannis and R. A. Prince (2005). "Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis." Infect Immun 73(1): 635-637.

Maertens, J., I. Raad, G. Petrikos, M. Boogaerts, D. Selleslag, F. B. Petersen, C. A. Sable, N. A. Kartsonis, A. Ngai, A. Taylor, T. F. Patterson, D. W. Denning and T. J. Walsh (2004). "Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in

patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy." Clin Infect Dis 39(11): 1563-1571.

Mariani, M., M. Camagna, L. Tarditi and E. Seccamani (1991). "A new enzymatic method to obtain high-yield F(ab)₂ suitable for clinical use from mouse IgG1." Mol Immunol 28(1-2): 69-77.

Pahl, H. L., B. Krauss, K. Schulze-Osthoff, T. Decker, E. B. Traenckner, M. Vogt, C. Myers, T. Parks, P. Warring, A. Muhlbacher, A. P. Czernilofsky and P. A. Baeuerle (1996). "The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB." J Exp Med 183(4): 1829-1840.

Pardo, J., C. Urban, E. M. Galvez, P. G. Ekert, U. Muller, J. Kwon-Chung, M. Lobigs, A. Mullbacher, R. Wallich, C. Borner and M. M. Simon (2006). "The mitochondrial protein Bak is pivotal for gliotoxin-induced apoptosis and a critical host factor of *Aspergillus fumigatus* virulence in mice." J Cell Biol 174(4): 509-519.

Perkins, ND. (2012). "The diverse and complex roles of NF-κB subunits in cancer." Nat Rev Cancer 12(2): 121-132.

Rozsnyay, Z., G. Sarmay, M. Walker, K. Maslanka, Z. Valasek, R. Jefferis and J. Gergely (1989). "Distinctive role of IgG1 and IgG3 isotypes in Fc gamma R-mediated functions." Immunology 66(4): 491-498.

Said, H. M. (2009). "Cell and molecular aspects of human intestinal biotin absorption." J Nutr 139(1): 158-162.

Spikes, S., R. Xu, C. K. Nguyen, G. Chamilos, D. P. Kontoyiannis, R. H. Jacobson, D. E. Ejzykowicz, L. Y. Chiang, S. G. Filler and G. S. May (2008). "Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence." J Infect Dis 197(3): 479-486.

Stanzani, M., E. Orciuolo, R. Lewis, D. P. Kontoyiannis, S. L. Martins, L. S. St John and K. V. Komanduri (2005). "*Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes." Blood 105(6): 2258-2265.

Sutton, P., A. Moreland, I. V. Hutchinson and A. Mullbacher (1995). "Investigation of the potential use of immunosuppressive agent gliotoxin in organ transplantation." Transplantation 60(9): 900-902.

Tachampa, K., M. Takeda, S. Khamdang, R. Noshiro-Kofuji, M. Tsuda, S. Jariyawat, T. Fukutomi, S. Sophasan, N. Anzai and H. Endou (2008). "Interactions of organic anion transporters and organic cation transporters with mycotoxins." J Pharmacol Sci 106(3): 435-443.

Tait, SW, Green DR (2010). "Mitochondria and Cell Death: outer membrane permeabilization and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol 11(9): 621-32.

Tochigi, N., Y. Okubo, M. Wakayama, H. Shinozaki, K. Gocho, Y. Hata, T. Ishiwatari, T. Nemoto and K. Shibuya (2013). "Histopathological Implications of *Aspergillus* Infection in Lung." Mediators Inflamm, ID 809798: 9 pages.

Tsunawaki, S., L. S. Yoshida, S. Nishida, T. Kobayashi and T. Shimoyama (2004). "Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase." Infect Immun 72(6): 3373-3382.

Varga, J. M. and P. Fritsch (1990). "Immobilization of small molecules and proteins by radio-derivatized polystyrene." FASEB J 4(9): 2671-2677.

Walsh, T. J., E. J. Anaissie, D. W. Denning, R. Herbrecht, D. P. Kontoyiannis, K. A. Marr, V. A. Morrison, B. H. Segal, W. J. Steinbach, D. A. Stevens, J. A. van Burik, J. R. Wingard, T. F. Patterson and A. Infectious Diseases Society of (2008). "Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America." Clin Infect Dis 46(3): 327-360.

Walsh, T. J., J. W. Hiemenz, N. L. Seibel, J. R. Perfect, G. Horwith, L. Lee, J. L. Silber, M. J. DiNubile, A. Reboli, E. Bow, J. Lister and E. J. Anaissie (1998). "Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases." Clin Infect Dis 26(6): 1383-1396.

Waring, P., A. Sjaarda and Q. H. Lin (1995). "Gliotoxin inactivates alcohol dehydrogenase by either covalent modification or free radical damage mediated by redox cycling." Biochemical pharmacology 49(9): 1195-1201.

Wichmann, G., O. Herbarth and I. Lehmann (2002). "The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells." Environmental toxicology 17(3): 211-218.

Woo, P. C., C. M. Chan, A. S. Leung, S. K. Lau, X. Y. Che, S. S. Wong, L. Cao and K. Y. Yuen (2002). "Detection of cell wall galactomannoprotein Afmp1p in culture supernatants of *Aspergillus fumigatus* and in sera of aspergillosis patients." J Clin Microbiol 40(11): 4382-4387.

Xu, Z., H. Zan, E.J. Phone, T. Mai and P. Casali (2012). "Immunoglobulin class-switch DNA recombination: Induction, targeting and beyond." Nat Rev Immunol 12(7) 517-31.

Yamada, A., T. Kataoka and K. Nagai (2000). "The fungal metabolite gliotoxin: immunosuppressive activity on CTL-mediated cytotoxicity." Immunol Lett 71(1): 27-32.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: (I) Oxidierte Disulfidform <i>Gliotoxins</i> , (II) Reduzierte Dithiolform <i>Gliotoxins</i>	4
Abbildung 2: Fragmente eines IgG Moleküls. IgG Moleküle können an den durch die Pfeile markierten Stellen durch Enzyme gespalten werden. Der Papain Verdau (A) führt zur Bildung zweier Fab Fragmente (antigenbindende Regionen) und eines Fc Teils (Abdul K. Abbas 2007).	23
Abbildung 3: Nachweis der Bindung der monoklonalen Antikörperklone #241, #294, #430 im ELISA. Beschichtet wurde die Platte mit BSA-Gliotoxin. Als Positivkontrolle wurde Serum von mit BSA- <i>Gliotoxin</i> immunisierten Mäusen verwendet, als Negativkontrolle naives Mausserum.	30
Abbildung 4: Nachweis der Bindung der monoklonalen Antikörperklone #1 und #407 im ELISA. Beschichtet wurde die Platte mit BSA-Gliotoxin. Als Positivkontrolle wurde Serum von mit BSA- <i>Gliotoxin</i> immunisierten Mäusen verwendet, als Negativkontrolle naives Mausserum	31
Abbildung 5: Vergleich der Bindung der monoklonalen Antikörpersubklone von #241, #294 und #430 im ELISA. Beschichtet wurde die Platte mit BSA-Gliotoxin. Als Positivkontrolle wurde Serum von mit BSA- <i>Gliotoxin</i> immunisierten Mäusen verwendet, als Negativkontrolle naives Mausserum	32
Abbildung 6: Vergleich der Bindung der monoklonalen Antikörpersubklone von #1 und #407 im ELISA. Beschichtet wurde die Platte mit BSA-Gliotoxin. Als Positivkontrolle wurde Serum von mit BSA- <i>Gliotoxin</i> immunisierten Mäusen verwendet, als Negativkontrolle naives Mausserum.....	33
Abbildung 7: Nachweis der Bindung der verschiedenen Subklonantikörper aus Zellüberstand im ELISA an die Konjugate, nicht aber an BSA. Beschichtet wurde sowohl mit 0,1 mg/ml BSA- <i>Gliotoxin</i> Konjugat als auch mit BSA und Thyreoglobulin- <i>Gliotoxin</i> Konjugat der gleichen Konzentration. Als Positivkontrolle fungierte Mausserum von mit BSA- <i>Gliotoxin</i> immunisierten Mäusen, als negative Kontrolle naives Mausserum.....	34
Abbildung 8: Polyacrylamidgelelektrophorese (12,5%iges reduziertes Gel) der aufgereinigten Antikörper des Klons #294 und #430, welche in absteigenden Konzentrationen aufgetragen wurden. Das Gel wurde anschließend mit Comassie gefärbt. Reihenfolge der Auftragung: 1) Probenpuffer, 2) Marker, 3) Klon #430 (0,114 mg), 4) #430 (0,057 mg), 5) #430 (0,019 mg), 6) Klon #294 (0,102 mg), 7) #294 (0,051 mg), 8) #294 (0,017 mg), 9) Probenpuffer, 10) Probenpuffer. Proteinbanden: 26 kDa) Leichtketten, 55 kDa) Schwereketten, 72 kDa) Albumin, 170 kDa) intakte Antikörper.....	35

Abbildung 9: Isotypenbestimmung der Antikörper. Von links nach rechts: Klone: #241, #430, #294, #1, #407. Klon #241 ist ein IgM Antikörper, Klon #294 ein IgG ₁ und IgG _{2b} , Klon #430 ein IgG ₁ , #1 ein IgG ₃ und Klon #407 ein IgG _{2a} Antikörper.....	36
Abbildung 10: Bestimmung des Sensitivitätsbereiches der Antikörper der Klone #294 (a) und #430 (b). Eine Konzentration von 0,65 µg/ml erwies sich als gerade noch ausreichend, um das Signal als positiv zu werten. Beschichtet wurde mit BSA- <i>Gliotoxin</i> Konjugat. Als Positivkontrolle wurde das Serum BSA- <i>Gliotoxin</i> immunisierter Mäuse, als Negativkontrolle das Serum naiver Mäuse verwendet.....	38
Abbildung 11: Bestimmung der Inhibierbarkeit der Konjugatbindung der Antikörper durch freies <i>Gliotoxin</i> . Mit sehr hohen Konzentration an <i>Gliotoxin</i> ließ sich die Bindung des Antikörpers #294 an das Konjugat verringern. Die Extinktion betrug ohne <i>Gliotoxin</i> Zugabe 2,096. Bei einer Konzentration von 1000 µM <i>Gliotoxin</i> betrug sie nur noch 1,55. Es wurde mit BSA- <i>Gliotoxin</i> beschichtet.....	40
Abbildung 12: Titration des biotinylierten Antikörpers #294 im ELISA. Die Platten wurden mit BSA- <i>Gliotoxin</i> Konjugat oder BSA beschichtet und unterschiedliche Konzentrationen an biotinyliertem Antikörper hinzugegeben.....	41
Abbildung 13: Titration des biotinylierten Antikörpers #430. Die Platten wurden mit BSA- <i>Gliotoxin</i> Konjugat oder BSA beschichtet und unterschiedliche Konzentrationen an biotinyliertem Antikörper hinzugegeben.....	42
Abbildung 14: Versuch, <i>Gliotoxin</i> mithilfe eines Sandwich ELISAs nachzuweisen. Die Platten wurden mit Antikörpern des Klons #430 [0,1 mg/ml] beschichtet. Danach wurden absteigende Konzentrationen an <i>Gliotoxin</i> hinzugegeben und anschließend der Detektionsantikörper des Klons #294-bio [0,01 mg/ml] hinzugegeben.	43
Abbildung 15:(I) Biotin (Said 2009), (II) <i>Gliotoxin</i> (Guo, Chen et al. 2011).....	44
Abbildung 16: Titration des Antikörpers #294-HRP. Die Platten wurden mit BSA- <i>Gliotoxin</i> Konjugat oder BSA beschichtet und der Antikörper #294-HRP in absteigenden Konzentrationen hinzugegeben. Man erhielt ausschließlich ein positives Signal, wenn mit BSA/GT beschichtet wurde und falls der Antikörper in höheren Konzentrationen verwendet wurde.....	45
Abbildung 17: Titration des Antikörpers #430-HRP. Die Platten wurden mit BSA- <i>Gliotoxin</i> Konjugat oder BSA beschichtet und der Antikörper #430-HRP in absteigenden Konzentrationen hinzugegeben. Man erhielt ausschließlich ein positives Signal, wenn mit BSA/GT beschichtet wurde und falls der Antikörper in höheren Konzentrationen verwendet wurde.....	45
Abbildung 18: Versuch, <i>Gliotoxin</i> mithilfe eines Sandwich ELISAs nachzuweisen. Antikörper #430-HRP wurde mit einer Konzentration von $7,8 \times 10^{-8}$ g/ml auf die mit BSA/GT oder BSA beschichteten Platten gegeben. Zusätzlich wurde freies <i>Gliotoxin</i> (unterschiedliche Konzentrationen) hinzugegeben. Die Bindung an das Konjugat ließ sich dadurch nicht inhibieren.....	47

Abbildung 19: PAGE (15% reduziertes Gel) der Fab-Fragmente der Klone #294 und #430. Das Gel wurde mit Comassie gefärbt. Der Reihe nach von links nach rechts wurden folgende Proben aufgetragen: Antikörper #294, #294 nach Konzentrierung, #294 vor Protein-A-Aufreinigung, Fab #294, Waschfraktion 1,2,3; Antikörper #430, #430 nach Konzentrierung, #430 vor Protein-A-Aufreinigung, Fab #430, Waschfraktion 1,2,3. Das Molekulargewicht 26 kDa entspricht den Leichtketten und Fab, 55 kDa den schweren Ketten, 72 kDa Albumin, 170 kDa dem intaktem Antikörper.....48

Abbildung 20: Nachweis der Spezifität des Fab-Fragments Fab #294 für *Gliotoxin*. Die Platten wurden mit BSA oder BSA-*Gliotoxin* Konjugat beschichtet und das Fab-Fragment Fab #294 hinzugegeben. Als Detektionsantikörper wurden gegen Fab gerichtete, an Biotin gekoppelte polyklonale Antikörper verwendet. Ein positives Signal erhielt man nur, wenn mit BSA/GT beschichtet wurde. Als Negativkontrolle wurde natives Mausserum, als Positivkontrolle wurden Seren von mit BSA-*Gliotoxin* immunisierten Mäusen verwendet..... 49

Abbildung 21: Bestimmung der Inhibierbarkeit der Konjugatbindung der Fab-Fragmente des monoklonalen Antikörpers #294 durch freies *Gliotoxin*. Beschichtet wurde mit BSA-*Gliotoxin* Konjugat, anschließend wurden unterschiedliche Konzentrationen an *Gliotoxin* und Fab-Fragment des Antikörpers Fab #294 [0,001mg/ml] hinzugegeben. Die Bindung an das Konjugat ließ sich bei einer Konzentration an freiem *Gliotoxin* von 1500 µM inhibieren. 50

Abbildung 22: Untersuchung des Einflusses von DMSO auf die Konjugatbindung im ELISA. Es wurde mit BSA-*Gliotoxin* und BSA beschichtet, die Antikörper wurden in einer Konzentration von 0,1 mg/ml hinzugegeben. Zu den Ansätzen wurde zusätzlich 10% DMSO gegeben; eine Inhibition der Bindung konnte nicht festgestellt werden. Als Negativkontrolle diente natives Mausserum, als Positivkontrolle das Serum von mit BSA-*Gliotoxin* immunisierten Mäusen 51

Abbildung 23: Messung des Apoptoseraten bei Zugabe von *Gliotoxin* und *Gliotoxin* in Kombination mit monoklonalem Antikörper. A. PBMCs wurden für 16 h bei 37°C, 5% CO₂ und Ethanol (Kontrolle) inkubiert. B. Die Zellen wurden mit 0,05 µM *Gliotoxin* inkubiert. C. PBMCs wurden zusammen mit 0,05 µM *Gliotoxin* und 0,5 µM Antikörper #294 inkubiert. D. Es wurde nur Antikörper zugegeben. Die Apoptoserate steigt, wenn man gleichzeitig monoklonale Antikörper, die spezifisch für *Gliotoxin* sind und *Gliotoxin* selbst anwendet. Die Anzahl Annexin V FITC⁺/7AAD⁺ Zellen steigt dabei von 13% auf 19,3%. Ein ähnliches Ergebnis ließ sich auch mit #430 erzielen..... 53

Abbildung 24: Messung der Korrelation von Antikörpermenge in Kombination mit *Gliotoxin* und Apoptoseraten. PBMCs wurden für 16 h bei 37°C, 5% CO₂ mit 0,05 µM *Gliotoxin* inkubiert. Es wurde mit unterschiedlichen Mengen der Antikörpers des Klons #294 inkubiert. Die Apoptoserate steigt, je mehr monoklonale Antikörper bei gleichbleibender *Gliotoxin*konzentration zugegeben wurde..... 54

Abbildung 25: Bestätigung der höheren Zelltoxizität bei Inkubation der PBMCs mit *Gliotoxin* und monoklonalen Antikörpern. In mehreren Färbungen humaner PBMCs unterschiedlicher Spender wurde ersichtlich, dass die Prozentzahl Annexin V positiver

Zellen um ca. zehn Prozent stieg, wenn man sie statt nur mit 0,05 μM Gliotoxin zusätzlich auch mit 0,5 μM Antikörper (#294 oder #430) versetzte. Die Messungen wurden jeweils mit Triplikaten durchgeführt. Hier werden die Durchschnittswerte dieser Triplikate angezeigt.....55

Abbildung 26: Messung der Apoptoseraten der einzelnen Subpopulation der PBMCs. Inkubation über 16 h, bei 37°C und 5% CO₂. Die Zahl der apoptotischen Monozyten (CD14⁺) steigt, wenn gleichzeitig monoklonaler Antikörper (Klone #1, #294, #430) und *Gliotoxin* verwendet wird. Die Apoptoserate ist vor allem bei Anwendung des IgG₃ Antikörpers erhöht..... 57

Abbildung 27: Messung des Einflusses von Fc-Block auf die Apoptose von C57BL/6 Thymozyten. Sie wurden über Nacht bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Im Vergleich mit Gliotoxin und Antikörper versetzten Thymozyten wiesen diejenigen, die zusätzlich noch mit Fc-Block behandelt wurden, eine erniedrigte Apoptoserate auf.....58

Abbildung 28: Einfluss des Fc-Blocks auf die Apoptoseraten auf C57BL/6 Thymozyten. In sechs Färbungen frischer C57BL/6 Thymozyten sank die Prozentzahl Annexin V positiver Zellen um ca. 7 Prozent, wenn die Zellen zusätzlich zu Gliotoxin [0,0625 μM] und Antikörper [0,625 μM] zuvor mit Fc Block behandelt wurden..... 59

Abbildung 29: Messung der Apoptose von C57BL/6 Thymozyten. 2×10^5 Zellen pro 50 μl Ansatz wurden mit 7AAD und Annexin V-FITC gefärbt. Die Prozentzahl Annexin V⁺ Zellen spiegelt die Anzahl apoptotischer Zellen wieder. 61

Abkürzungsverzeichnis

AgX	Myelomzelllinie AgX-63
AV-HRP	Avidin-Horseradishperoxidase (Merrettichperoxidase)
Bio	Biotin
BL6	Black 6
BSA	Bovine Serum Albumine
BSA/GT	BSA/Gliotoxin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme linked immunosorption assay
Fab	Fragment antigen binding
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	Fragment crystallizable
FcR	Fc Rezeptor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FCS	Fetal calf serum
GT	Gliotoxin
HAT	Hypoxanthin-aminopterin-thymidin Medium
hOAT	Humaner organischer Anionentransporter
hOCT	Humaner organischer Kationentransporter
HT	Hypoxanthin -thymidin Medium
HPGRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate Buffered Saline

PEG	Polyethylenglykol
PS	Phosphatidylserin
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institut
SATA	S-Acetylthioglycolazid N-Hydroxysuccinimid
SC	Synthetic complete medium
Sulfo NHS	N-hydroxysulfosuxinimid
TK	Thyrosinkinase
V-APC	V-Allophycocyanin
7AAD	7-Amino-Actinomycin D

Lebenslauf

Madeleine Elisabeth Zinser

SCHULBILDUNG und SPRACHKENNTNISSE

03/1993-02/1998	Privatschule der Deutschen Botschaft, Ankara
02/1998-06/2006	Emil-von-Behring-Gymnasium, Spardorf - Erlangen (Abitur: 1,3)

Deutsch: Muttersprache

Englisch: 7 Schuljahre; Englisch-Leistungskurs mit sehr guten Kenntnissen

Französisch: 3 Schuljahre, Gute Kenntnisse

Türkisch: Grundschulkenntnisse

STUDIUM

04/2006-06/2013	Studium der Humanmedizin, an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08/2008	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)
06/2013	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: 1,66)

PRAKTISCHES JAHR

02/2012-06/2012	Innere Medizin; Gastroenterologie und Kardiologie im Leopoldina Krankenhaus, Schweinfurt
06/2012-10/2012	Anästhesiologie: Universitätsklinikum Würzburg
10/2012-01/2013	Chirurgie: Stadtspital Triemli, Zürich

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Hünig für die Themenwahl, seine große Unterstützung und die Möglichkeit der Teilnahme am Graduiertenprogramm bedanken. Mein großer Dank gilt auch Susanne Berr, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Weiterhin danke ich Paula Römer Roche für ihre guten Tipps, Monika Fröhlich für eine gute Zeit im Labor, Josip Zovko und Lisa Starick für ihre Unterstützung und Stefan Saremba für die Zusammenarbeit. Auch danken möchte ich meiner Familie, allen voran meinen Eltern, die mir während der Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen.