Aus dem Institut für Immunologie
Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Charakterisierung immuninhibitorischer Eigenschaften von SIGIRR und die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes SIGIRR

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von

Jasmin Ute Kumler
aus Speyer

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 05.10.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Herr Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Her Prof. Dr. S. Bauer
1. Korreferent:	Herr Prof. Dr. M. Lohoff

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis **iv**

Abbildungsverzeichnis **v**

Abkürzungsverzeichnis **vii**

1. Einleitung **1**
1.1. Ein kurzer Einstieg in die Immunologie 1
1.1.1. Kommunikation im Immunsystem - Die Zytokine 2
1.1.2. Antigen präsentierende Zellen 4
1.1.3. Mustererkennung: Toll-like Rezeptoren . 13
1.2. Hypothese und Zielsetzung 21

2. Material und Methoden **23**
2.1. Material 23
2.2. Methoden Teil 1: Stimulationsexperimente . . . 40
2.2.1. Der Mausstamm TIR27BC 40
2.2.2. Mäuse-Präparation 40
2.2.3. Auswahl und Gegenüberstellung der Versuchstiere 43
2.2.4. Differenzierung myeloider dendritischer Zellen 43
2.2.5. MACS 44

2.2.6. Stimulation (primärer) Mauszellen . . . 47
2.2.7. ELISA 50
2.2.8. FACS 54
2.3. Methoden Teil 2: Hybridomazellen und die Herstellung von α-h-SIGIRR Antikörpern 56
2.3.1. Proteinaufreinigung mit FPLC 56
2.3.2. Bestimmung von Proteinkonzentrationen im NanoDrop 59
2.3.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen im BCA-Test 60
2.3.4. Thrombinverdau 60
2.3.5. Immunisierung von SIGIRR-ko Mäusen 61
2.3.6. Generierung von Hybridoma-Zellen . . . 63
2.3.7. Zellkultur und Subklonierung 65
2.3.8. Einfrieren und Auftauen von Zellklonen 66
2.3.9. HEK-Zellen 66
2.3.10. SDS-PAGE 67
2.3.11. Western Blot 69

3. Ex-vivo Stimulation von Milzzellen, B-Zellen und mDCs 72
3.1. Ergebnisse 72
3.1.1. Stimulation muriner Milzzellen 72
3.1.2. Stimulation muriner B-Zellen aus der Milz 81
3.1.3. Stimulation muriner myeloider dendritischer Zellen 92
3.2. Diskussion 101
3.2.1. Diskussion zum Aufbau der Experimente 101
3.2.2. Diskussion der Milzzellstimulation . . . 103
3.2.3. Diskussion der B-Zell Stimulation 106
3.2.4. Diskussion der mDC Stimulation 112

4. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen humanes SIGIRR 134
4.1. Ergebnisse 134
4.1.1. Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes SIGIRR 134
4.1.2. Antikörper im ELISA: Antikörperauswahl, Antikörperklassen und Kreuzreaktivität 135
4.1.3. Antikörper im Western Blot 138
4.1.4. Antikörper im FACS 143
4.1.5. Endstand der Antikörperherstellung . . 145
4.2. Diskussion 146
4.2.1. Problematiken bei der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes SIGIRR 146
4.2.2. Diskussion zur Charakterisierung von Antikörpern gegen humanes SIGIRR . . . 152
4.2.3. Diskussion zum Endstand der Antikörperherstellung 161

5. Zusammenfassung / Abstract 163

Literatur 167

A. Anhang
A.1. Verzeichnis der akademischen Lehrer . . . . . .
A.2. Danksagung . . . . . .

Tabellenverzeichnis

1.1. Dendritische Zellen im Vergleich. 8
1.2. TLRs in B-Zellen 10
1.3. Toll-like Rezeptoren und Liganden. 16
1.4. humanes SIGIRR versus murines SIGIRR . . . 20

2.4. Stimulationen mit Vorinkubation 50
2.5. pH-Werte für Antikörperbindung 58
2.6. SDS-Gel 69

4.1. Antikörperklassen 137
4.2. Kryokonservierte Hybridoma-Zellklone 147
4.3. Eigenschaften ausgewählter α-hSIGIRR-AK . . 148

Abbildungsverzeichnis

1.1. Struktur eines IgG Antikörpers. 11
1.2. TLR4-IL1R Signalweg. 14
1.3. SIGIRR 18

2.1. Prinzip der Genotypisierung mit PCR 41
2.2. Stimulation muriner Milzzellen. 47
2.3. IL-6 ELISA 52
2.4. Fc-ELISA 53
2.5. SIGIRR-Fc im SDS-Gel mit Coomassie-Färbung 62

3.1. Milzzellen im FACS. 73
3.2. Stimulation nicht selektionierter Milzzellen (1) 75
3.3. Stimulation nicht selektionierter Milzzellen (2) 77
3.4. Stimulation nicht selektionierter Milzzellen (3) 78
3.5. Stimulation nicht selektionierter Milzzellen (4) 80
3.6. B-Zellen nach MACS-Separation. 82
3.7. Stimulation muriner B-Zellen (1) 83
3.8. Stimulation muriner B-Zellen (2) 84
3.9. Stimulation muriner B-Zellen (3) 85
3.10. Stimulation muriner B-Zellen (4) 89
3.11. Stimulation muriner B-Zellen (5) 91
3.12. SIGIRR Wildtyp und Knockoutzellen nach Differenzierung mit GM-CSF. 94

3.13. Stimulation muriner myeloider dendritischer Zellen (1) 95
3.14. Stimulation muriner myeloider dendritischer Zellen (2) 96
3.15. Stimulation MACS-separierter CD11c$^+$ mDCs . 99

4.1. Bindung ausgewählter α-hSIGIRR Antikörper an SIGIRR und an Kontrollprotein zu verschiedenen Messzeitpunkten. 136
4.2. Test auf Kreuzreaktivität gegenüber murinem SIGIRR am Beispiel von 4-A10 139
4.3. Test von α-hSIGIRR Antikörpern im Western Blot (1). 141
4.4. Test von α-hSIGIRR Antikörpern im Western Blot (2). 142
4.5. Oberflächenfärbung für FACS 144

Abkürzungsverzeichnis

1668PTO	Synthetisches Oligonukleotid mit Phosphothioat Rückrat, 1668 Sequenz (Typ B (20 mer)(5'-tccatgacgttcctgatgct-3'))
aa	Aminosäuren (amino acids)
α-h-SIGIRR ...	Antikörper gegen humanes SIGIRR
Abb.....	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	activator protein 1
APC.....	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPR	ATP-Rezeptor
BCA.....	Bicinchoninsäure
BCR.....	B-Zell Rezeptor (B cell receptor)
bp	Basenpaare (base pairs)
bzw.....	beziehungsweise
ca.....	circa
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CpG-DNA	DNA mit CpG-Sequenzmotiv („C“= Cytosin, „p“ = Phosphat, „G“= Guanin)
Cys.....	Cystein

DC	dendritische Zelle (dendritic cell)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyriblonucleic acid)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere (et alii(ae,a))
etc.	und so weiter (et cetera)
evtl.	eventuell
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetales Kalbsserum (foetal calf serum)
ff	fortfolgend
Flt3	Fms-like tyrosine kinase receptor-3
FITC	fluorescein isothiocyanat
FPLC	fast protein liquid chromatography
g	Erdbeschleunigung ($\approx 9,81\ m/s^2$)
G-Protein	GTP bindendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
Glu	Glutamin
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
hSIGIRR	humanes SIGIRR
hSIGIRR-Fc	humanes SIGIRR mit Fc-Markierung
hSIGIRR-HA	humanes SIGIRR mit HA-Markierung
hSpSIGIRR-HA	humanes SIGIRR mit Signalpeptid und HA-Markierung
HA	human influenza hemagglutinin
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
i.A.	im Allgemeinen

IFNγ	Interferon-γ
IFNGR	Interferon-γ-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IκB	inhibitor of kappa B
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin-1
IL-1β	Interleukin-1β
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-18R	Interleukin-18-Rezeptor
IL-6	Interleukin-6
inkl.	inklusive
IRAK	IL-1 receptor associated kinase
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
kD	Kilo Dalton ($1\,D = 1\,u = 1,660538921(73) * 10^{-27}\,\mathrm{kg}$)
ko	Knockout
Leu	Leucin
LPS	Lipopolysaccarid
LRR	Leucin-Rich Repeat
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (macrophage colony-stimulating factor)
mSIGIRR	murines SIGIRR
MAC3	macrophage differentiation antigen 3
MACS	Immunomagnetische Separation (magnetic activated cell sorting)
MAP	mitogen activated protein
max.	maximal
mDC	myeloide dendritische Zelle (myeloid dendritic cell)
MEM	Minimalmedium (minimal essential

	medium)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min.	mindestens
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier (mammalian Target of Rapamycin)
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88(s): Splicevariante von MyD88)
nd	nicht detektierbar (not detectable)
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natürliche Killerzelle
ODN	Oligodesoxynukleotid
OPD	O-Phenylenediamin Dihydrochlorid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektophorese
PAMP	pathogen associated molecular pattern
Pam3Cys	synthetisches Lipopeptid (S)-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser(S)-Lys4-OH, Trihydrochlorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pDC	plasmozytoide dendritische Zelle (plasmocytoic dendritic cell)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PP	Probenpuffer
P/S	Penicillin/Streptomycin
RNA	Ribunukeinsäure (riboneucleic acid)

PRR	pathogen recognition receptor
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
$RPMI^{comp}$	RPMI inkl. aller Zellkulturzusätze (RPMI completed)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
s.a.	siehe auch
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
Ser	Serin
SG	Sammelgel
SIGIRR	single-immunglobulin IL-1R related molecule
SOCS	suppressor of cytokine signaling
sog.	so genannten
Sp	Signalpeptid
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl-ethylendiamin
TG	Trenngel
T_H	T-Helferzelle
TIR	Toll/IL-1R
TLR	Toll-Like Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
tollip	toll interacting protein
TRAF	TNF receptor associated factor

TRIF	TIR domain–containing adaptor-inducing IFN-ß
TTP	Thymidintriphosphat
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
ÜS	Überstand
usw.	und so weiter
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1. Ein kurzer Einstieg in die Immunologie

Das Immunsystem wird funktionell in zwei Teile geteilt. Auf der einen Seite das angeborene Immunsystem, welches eine sofortige Immunreaktion auf eine Vielzahl pathogentypischer Merkmale vermittelt. Auf der anderen Seite das adaptive Immunsystem, welches zeitverzögert reagiert, dafür aber eine sehr spezifische Immunantwort auslöst und über die Bildung von Gedächtniszellen einen immunologischen Lernprozess ermöglicht.

Beide Teilsysteme kann man zusätzlich in eine humorale und eine zelluläre Abwehr einteilen. Beispiele für humorale Abwehr - also eine Abwehr durch lösliche Stoffe - sind das Komplementsystem (als Teil des angeborenen Immunsystems) und Antikörper (als Teil des adaptiven Immunsystems). Eine zelluläre Abwehr wird z.B. durch Makrophagen (angeborenes Immunsystem) oder durch $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (adaptives Immunsystem) vermittelt. Dabei richtet sich die humorale Abwehr vor allem gegen extrazelluläre Pathogene und Toxine, während die zelluläre Abwehr gegen intrazellulär residierende Pathogene gerichtet ist [64].

Zum angeborenen Immunsystem gehören demnach unter anderem Makrophagen, dendritische Zellen und das Komplementsystem. Zum adaptiven Immunsystem gehören beispielsweise

T-Zellen, B-Zellen und Antikörper.

Diese Einteilung ist aber künstlicher Natur und so gibt es viele Schnittstellen zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem. Das Immunsystem in seiner ganzen Komplexität muss somit als Einheit verstanden werden.

1.1.1. Kommunikation im Immunsystem - Die Zytokine

Im Immunsystem sind es bestimmte Botenstoffe, die Zytokine, die eine Kommunikation von Zellen untereinander ermöglichen.

Zytokine sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 25 Kilo Dalton (kD). So können Zytokine, u.a. von Zellen des Immunsystems, als Antwort auf einen Stimulus wie Pathogene oder zellschädigende Substanzen sezerniert werden. Sie bewirken eine unmittelbare Zellantwort über spezifische Rezeptoren. Über die dadurch induzierte Signalkaskade und die damit verbundene Änderung in der Genexpression beeinflussen sie so das Zellverhalten und führen beispielsweise zu Wachstum, funktioneller Differenzierung und der Aktivierung von Lymphozyten. Zytokine können auf die sezernierende Zelle selbst (autokrin), benachbarte Zellen (parakrin) oder über Ausschüttung in die Blutbahn auch auf entfernte Zellen (endokrin) wirken. Dabei sind die Wirkungen pleiotrop, d.h. ein Zytokin kann diverse biologische Effekte haben oder auch redundant, unterschiedliche Zytokine können also in ähnlicher Weise wirken (z.B. Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor-α (TNFα)).

Zu den Zytokinen gehören u.a. die Interleukine. Dieser Name wurde geprägt, da viele Zytokine auf Leukozyten wirken und

von ihnen sezerniert werden. Sie sind eine heterogene Klasse mit unterschiedlichen Strukturen und Wirkungen. Ein Beispiel für ein bedeutsames Interleukin ist Interleukin-6 (IL-6).

Auch die Klasse der Interferone gehört zu den Zytokinen. Stoffe dieser Klasse zeichnen sich durch eine antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Funktion aus. Interferone gliedern sich in Interferone vom Typ I und Typ II. Ein Beispiel für Interferone ist Interferon-γ (IFNγ), das Typ II Interferon. [64, 1, 76]

Interleukin-6

Interleukin-6 ist ein vielseitiges Zytokin, dass im Körper unterschiedliche biologische Funktionen hat. Zu diesen gehört unter anderem die Förderung der Immunantwort. So bewirkt IL-6 beispielsweise, zusammen mit anderen Faktoren (Interleukin-1β (IL-1β), TNFα), die Produktion akuter Phase Proteine in der Leber, fördert die Ausschüttung von Neutrophilen aus dem Knochenmark, wirkt als endogenes Pyrogen zur Erhöhung der Körpertemperatur und führt zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. In der adaptiven Immunantwort fördert IL-6 das Wachstum antigenproduzierender B-Zellen und hemmt die Generierung und Aktivität regulatorischer T-Zellen. Produziert wird IL-6 vor allem durch mononukleäre Phagozyten (z.B. Makrophagen), Endothelzellen, Fibroblasten und T-Zellen. Jedoch sind auch andere Zellen in der Lage IL-6, wenn auch in geringeren Mengen, auszuschütten (z.B. B-Zellen). [64, 1, 84, 45]

Interferon-γ

Interferon-γ wird von Natürlichen Killerzellen, $CD4^+T_H1$-Zellen und $CD8^+$T-Zellen gebildet und fördert die Ausbildung einer makrophagenreichen entzündlichen Reaktion, die besonders gegen intrazelluläre Mikroben wirksam ist. Diese Reaktion wird durch gehemmte Differenzierung von T_H2-Zellen, einer verbesserten Expression von MHCI und II auf Zielzellen und die Förderung in der Produktion von bestimmten Antikörperunterklassen (z.B. Immunglobulin (Ig)G2a in Mäusen) unterstützt [1]. IFNγ spielt auch eine Rolle im sog. „Priming“ des Toll-Like Rezeptor (TLR) Signalweges. Durch unterschiedliche Mechanismen ist es so in der Lage, die TLR-vermittelte Immunantwort zu verstärken [35].

1.1.2. Antigen präsentierende Zellen

Zu den Antigen präsentierenden Zellen (APCs) gehören die Zellarten Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen und Endothelzellen. Alle diese Zellen sind befähigt, Antigene in Form von Mikroorganismen (wie zum Beispiel (z.B.) Bakterien) oder andere Stoffe aus der Umgebung aufzunehmen und zu verstoffwechseln. Dies geschieht über die Bindung an Phagozytoserezeptoren wie Dectin1, Mannoserezeptor (MR), Komplementrezeptoren, Scavenger Rezeptoren und Lipidrezeptor, gefolgt von Aufnahme in Phagosomen und gezieltem Abbau in so genannten (sog.) Phagolysosmen [63, S.78]. Bruchstücke dieser Antigene werden dann auf dem Major Histocompatibility Complex II (MHCII) Molekül präsentiert. Zusammen mit kostimulatorischen Signalen dient die Antigenpräsentation so der eigenen Aktivierung (s. Abschnitt „Makrophagen“) oder der anderer

Zellen (s. Abschnitt „Dendritische Zellen“).

Makrophagen, dendritsche Zellen und B-Zellen unterscheiden sich in ihren Aufgabenfeldern: Wie im Folgenden eingehender dargestellt, bilden Makrophagen durch Phagozytose von Pathogenen die erste Linie der Verteidigung und schaffen so ein inflammatorisches Umfeld. Dendritsche Zellen stellen das Bindeglied zum angeborenen Immunsystem dar und sind entscheidend bei der Aktivierung naiver T-Lymphozyten. B-Zellen können, unter Beihilfe von T-Helferzellen einen Ig-Klassenwechsel vornehmen und zu Plasmazellen differenzieren [64].

Makrophagen

Den ersten Kontakt zu Pathogenen haben zumeist gewebsständige Makrophagen. Makrophagen finden sich in besonders großer Zahl an Stellen mit häufigem Kontakt zu Pathogenen: Im Bindegewebe, in der Submukosa des Gastrointestinaltraktes, in Alveolen und Interstitium der Lunge, in Leber und Milz. Hier besteht ihre Aufgabe darin, Pathogene und apoptotische Zellen aufzunehmen und zu zerlegen, durch die Ausschüttung von Zytokinen und anderen aktiven Substanzen (z.B. NO oder H_2O_2) ein inflammatorisches Milieu zu schaffen und weitere Immunzellen anzulocken (z.B. Neutrophile Granulozyten). T_H1 Zellen unterstützen die Aktivierung ruhender Makrophagen über IFNγ in Kombination mit weiteren Signalen (z.B. CD40-Ligand). Auch durch andere Stoffe, z.B. LPS oder membranassoziiertes TNFα kann dieses zweite notwendige Signal geliefert werden. Aktivierte Makrophagen exprimieren vermehrt CD40, TNF-Rezeptoren, B7 und Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)II und fördern dadurch wiederum ihre eigene Aktivierung. Sie sind damit besser in der Lage,

aufgenommene Mikroorganismen abzutöten, z.B. durch eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. [64, S.48-48,339-340,368-372].

Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind das entscheidende Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Im peripheren Blut kommen myeloid dendritische Zellen (mDCs) und plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) vor[1]. Sie exprimieren unterschiedliche Chemokinrezeptoren und TLRs und unterscheiden sich damit auch in ihrer Funktion.

pDCs beteiligen sich weniger an der Antigenpräsentation, als dass sie die Immunantwort gegen Viren über die Ausschüttung großer Mengen an Typ I Interferonen anführen und dirigieren. Daneben können sie mDCs in der Antigenpräsentation unterstützen.

Myeloide dendritische Zellen sind „professionelle“ Antigen präsentierende Zellen (APCs). Ihre Aufgabe besteht in der Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation. Als unreife Zellen in peripheren Geweben nehmen sie Antigene von Pilzen, Bakterien, Viren und Parasiten ebenso wie Umweltantigene und Alloantigene (nach Transplantationen) auf. Sie binden diese auf MHC-Molekülen, um sie in Lymphknoten oder anderen lymphatischen Organen naiven T-Zellen zu präsentieren und diese zu aktivieren. Auf dem Weg aus dem Gewebe zu den Lymphknoten reifen mDCs und exprimieren größere Level

[1] Neben pDCs und mDCs werden weitere Arten von dendritischen Zellen unterschieden. Dazu gehört beispielsweise die Einteilung myeloider dendritischer Zellen in Zellen vom Langerhanstyp und und unreife interstitielle bzw. reife interdigitierende dendritische Zellen.

MHCI und II sowie kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86, DC-SIGN, usw.) [2, S.115].

Einzelne Zellpopulationen dendritischer Zellen werden über unterschiedliche Oberflächenstrukturen definiert.
Eine klare Einteilung ist jedoch schwierig, da je nach Differenzierungsgrad unterschiedliche Rezeptoren exprimiert werden [1, 39]. Tabelle 1.1 zeigt einen Überblick über Oberflächenmarker und Toll-like Rezeptoren von myeloiden und plasmazytoiden dendritischen Zellen.

Da dendritische Zellen eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene präsentieren können, darunter auch Selbstantigene und harmlose Umweltantigene, gibt es Kontrollmechanismen, die eine Immunreaktion auf solche Antigene verhindern sollen: Autoreaktive T-Zellen werden in der Regel bereits im Thymus deplettiert, womit nur eine geringe Gefahr besteht, dass Präsentation von Selbstantigen zur Entstehung autoreaktiver T-Effektorzellen führt. Ein anderer Schutz besteht im Fehlen kostimulatorischer Signale, wie sie z.B. durch pathogen spezifische Muster (z.B.: Lipopolysaccarid (LPS), CpG-DNA) über TLRs ausgelöst werden. Beim Fehlen solcher Signale werden dendritische Zellen nicht aktiv, sondern verbleiben in einem anergen Zustand, die T-Zellantwort wird unterdrückt.

Um überschießende Reaktionen, bzw. Reaktion auf harmlose Umweltantigene einzuschränken, ist auch eine Kontrolle kostimulatorischer Signale essentiell, also beispielsweise die Kontrolle der über Toll-like Rezeptor 9 vermittelten Signalkaskade [64, 41]. Diese Kontrollmechanismen sind im Abschnitt „Regulation der Toll-like Rezeptoren“ (unter 1.1.3) erläutert.

	$CD8^-$ mDCs	**pDCs**	**$CD8^+$ mDCs**
Oberflächenmarker	$CD11c^{high}$	$CD11c^{low}$	$CD8\alpha^+$
	$CD11b^{high}$	$CD11b^-$ $B220^{high}$	$CD11c^{low/high}$ $CD11b^-$
Wachstumsfaktor	GM-CSF,Flt3-Ligand	Flt3-Ligand	Flt3-Ligand?
Toll-like Rezeptoren	TLR-1,2,4,5,6,8,(9*)	TLR-7,9	TLR-3
Zytokinprodukte	TNF, IL-6	Typ I Interferone	IL-12
Hauptfunktion	Induktion der T-Zellantwort	angeborene Immunität, antivirale T-Zellantwort	Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen („cross-priming“)

Tab. 1.1.: **Dendritische Zellen im Vergleich.** *=murine mDCs auch TLR-9 [97]. Tabelle modifiziert nach Abbas *Cellular and Molekular Immunity* 2007 [1, S. 119].

B-Lymphozyten

B-Lymphozyten, im Folgenden auch als B-Zellen bezeichnet, werden dem adaptiven Immunsystem zugerechnet.

Dabei unterscheidet man unterschiedliche Arten von B-Zellen: B1-Zellen entstehen früh aus Stammzellen der fetalen Leber. B2-Zellen entstehen aus Stammzellen des Knochenmarks. Sie gliedern sich in follikuläre und Marginalzonen B-Zellen.

Follikuläre B2-Zellen sind B-Zellen im „klassischen“ Sinne. Sie sind IgD, IgM und CD23 positiv und rezirkulieren zwischen Blut und B-Zellregionen der Lymphknoten. In ihrer Funktion als Antigen präsentierende Zellen (APCs) können B-Zellen lösliche Antigene aufnehmen, prozessieren und für $CD4^+$ T-Helferzellen (T_H) auf MHCII präsentieren. Dabei wird jenes Antigen aufgenommen und präsentiert für welches der B-Zellrezeptor spezifisch ist, d.h. für welches diese Zelle spezifische Antikörper produzieren kann. Eine Bindung eines Proteinantigens an den B-Zell Rezeptor (BCR) allein ist im Allgemeinen nicht ausreichend, um einen Ig-Switch zur Plasmazelle zu verursachen. Erst das Erkennen von Antigen auf MHCII durch $CD4^+$ T-Helferzellen (T_H) in Zusammenhang mit kostimulatorischen Signalen (z.B. durch Assoziation von CD40 mit CD40Ligand, durch Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR-4,-5,-9), bzw. CD86, CD80) liefert die notwendigen Signale, um eine klonale Expansion und Reifung zur Plasmazelle zu bewirken. Primär werden dabei vor allem weniger spezifische IgM Antikörper produziert, aber durch eine Vielzahl von Reifungsprozessen und Klassenwechsel entstehen hochspezifische Antikörper für (theoretisch) jedes denkbare Antigen (s.a. Abschnitt „Antikörper“).

humane naive B-Zelle	**humane B-Gedächtniszelle**	**murine B-Zellen**
keine signifikante TLR-Expression	TLR-2, 6, 7, 9, 10	TLR-2, 3, 4, 7, 9 (konstitutiv)

Tab. 1.2.: **Toll-like Rezeptoren in B-Zellen.** TLR Expression humaner und muriner B-Zellarten im Vergleich. Humane B-Zellen exprimieren TLRs nach Aktivierung des B-Zellrezeptors. Murine B-Zellen exprimieren prinzipiell TLRs auch ohne vorherige Stimulation (konstitutiv), selbiges gilt für humane B-Gedächtniszellen. [60]

Antikörper

Antikörper (AK) sind Produkte von Plasmazellen (vergleiche (vgl.) Abschnitt „B-Lymphozyten“). Antikörper haben in der Immunreaktion an vielen Stelle eine große Bedeutung. Sie können durch Bindung an Gefahrenstoffe, wie Toxinen, deren Wirkung neutralisieren (= Neutralisation). Sie markieren Pathogene und ermöglichen oder verstärken so die Phagozytoserate (= Opsonierung) und können eine Aktivierung des Komplementsystems einleiten (= Komplementaktivierung) [64].

Jeder Antikörper besteht aus vier Ketten, zwei jeweils identischen schweren (H) und leichten Ketten (L), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Kette wiederum besteht aus einem variablen (V) und einem konstanten Teil (C) (vgl. Abbildung (Abb.) 1.1)

Der konstante Teil (der schweren Ketten) determiniert die Klasse des Antikörpers. Die Antikörperklassen sind IgM, IgD, IgG, IgA und IgE, die in weitere Subklassen unterteilt wer-

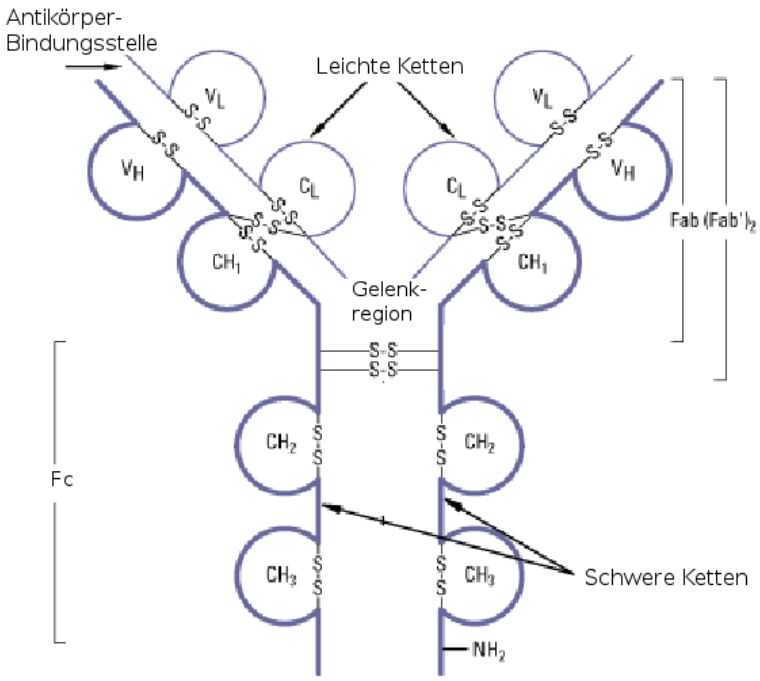

Abb. 1.1.: **Struktur eines IgG-Antikörpers.** CH_{1-3}= Konstante Regionen der schweren Ketten; C_L= Konstante Region der leichten Ketten; V_H= Variable Region der schweren Ketten; V_L= Variable Region der leichten Ketten. Abbildung adaptiert von ThermoScientific: Protein Methods Library-„Antibody Fragmentation“ [33].

den können. Die variablen Teile je einer leichten und einer schweren Kette bilden miteinander die Antigenbindungsstelle, sodass jeder Antikörper zwei Antigenbindungsstellen mit identischer Konfiguration besitzt.

Die Antikörpervielfalt gründet sich auf Mechanismen der genetischen Rekombination während der Entwicklung zu naiven B-Zellen im Knochenmark: Die variable Region der leichten Kette wird aus der Kombination von 2 Gensegmenten (V, J), die der schweren Kette aus 3 Gensegmenten (V, D, J) kodiert. Jedes dieser Gensegment liegt dabei in multiplen Kopien im Genom vor. Der Zufall entscheidet, welche der multiplen (und leicht unterschiedlichen) Kopien miteinander in der Keimbahn rearrangiert werden (= Somatische Rekombination). Dieser Prozess ist nicht absolut punktgenau und angrenzende DNA-Sequenzen können mit in den Prozess eingebunden werden (= Junktionale Diversität).

Desweiteren liegen unterschiedliche Sequenzen für leichte (κ, λ) und schwere Ketten ($\mu, \delta, \gamma, \alpha, \epsilon$) im Genom vor. Während unterschiedliche schwere Ketten die Antikörperklasse determinieren (s.o.), trägt die Verwendung unterschiedlicher leichter Ketten zur Antikörpervielfalt bei.

Aus den genannten Möglichkeiten ergibt sich ein geschätztes (BCR- bzw. Antikörper-) Repertoire für naive B-Zellen von ca. 10^{11}.

B-Zellen, welche sich in dieser Entwicklung als nicht funktionell herausstellen, oder aber im Gegenteil Eigenantigene erkennen, werden eliminiert. Andere verlassen als naive B-Zellen das Knochenmark, besiedeln die B-Zellregionen der Lymphknoten und lymphoider Organe und rezirkulieren im Blut, um schließlich aktiviert zu werden. Aktivierte B-Zellen (in ihrer

Differenzierung zu Plasmazellen) können in der Affinitätsreifung eine weitere Diversifikation ihrer Antikörper erreichen. Dies geschieht durch Somatische Hypermutation (Induktion von Mutation in den variablen Regionen) Genkonversion und Klassenwechsel (zu IgG, IgE, etc.).

In der klonalen Expansion und Differenzierung entstehen neben Plasmazellen auch Gedächtniszellen. Gedächtniszellen können schneller aktiviert werden und sind der Grund, weshalb eine zweite Immunreaktion auf ein Antigen schneller und heftiger verläuft (Boosterung) [2]. Kostimulatorische Signale sind ein wichtiger Mechanismus, um eine unkontrollierte Immunreaktion zu vermeiden („fremd aber nicht gefährlich“ vs. „fremd und gefährlich“). In einer Impfung (bzw. Immunisierung, vgl. auch 2.3.5) kann diese Kostimulation durch die Zugabe von Adjuvanzien (als „Gefahrenzeichen“ für das Immunsystem), oft handelt es sich hierbei um TLR-Liganden, angestoßen werden.

1.1.3. Mustererkennung: Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Mustererkennung ist eine wichtige Fähigkeit des angeborenen Immunsystems: Bestimmte Rezeptoren, sogenannte pathogen recognition receptors (PRRs) ermöglichen es dem Organismus gezielt und differenziert auf diese zu reagieren, indem bestimmte Muster, sog. pathogen associated molecular patterns (PAMPs), erkannt werden.

Dies leitet Signalkaskaden ein, die zu einer Antwort des Organismus führen. PRRs kommen membrangebunden (z.B. TLRs, C-Typ Lektine), intrazellulär (z.B. NLR-Familie, CARD-

[2] Diesen Vorgang macht man sich auch bei der Immunisierung zunutze.

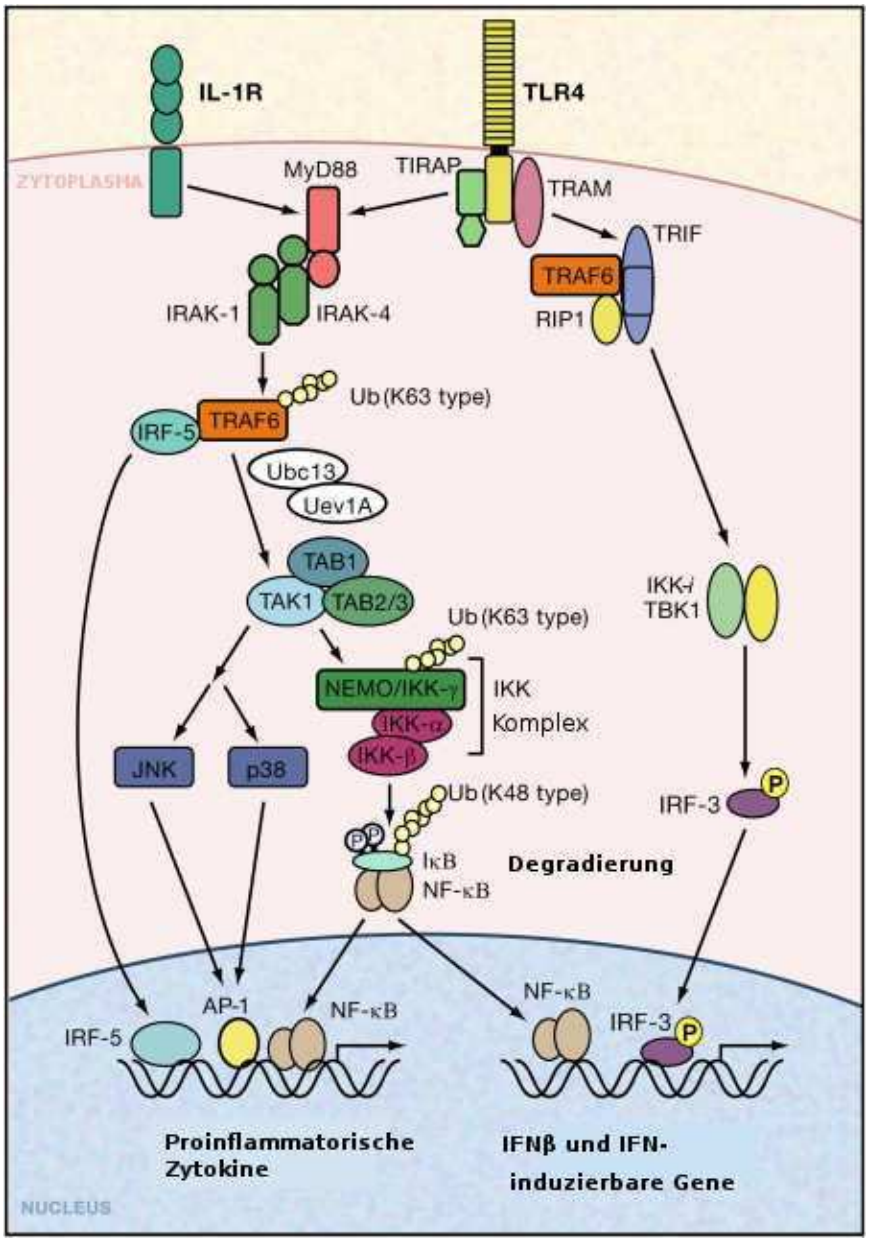

Abb. 1.2.: **Gemeinsamkeiten zwischen TLR4 und IL1R Signalweg.** Abbildung adaptiert von Akira *et al.* 2006 [3].

Familie) und auch in löslicher Form (z.B. Pentraxine) vor. Die Konformation dieser Rezeptoren ist in der Keimbahn festgelegt. Sie wird nicht, wie im adaptiven Immunsystem (vgl. 1.1.2 „Antikörper“), verändert und führt auch nicht zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses.

Wichtige PRRs sind die Toll-Like Rezeptoren (TLRs). TLRs sind Typ I Membranglykoproteine und bestehen aus einer extrazellulären Leuzin-reichen (Leucin-Rich Repeat (LRR)) Domäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Toll/IL-1R (TIR) Domäne [48]. Besonders werden sie von APCs exprimiert. TLRs sind in Wirbeltieren hoch konserviert und erkennen ein breites Spektrum mikrobieller Liganden. Die Assoziation von TLR mit Liganden löst, oft über Bildung von TLR Hetero-oder Homodimeren (vgl. Tab. 1.3 und Abb. 1.2) und die Bindung von Adapterproteinen (wie z.B. MyD88 [3]) eine Signalkaskade aus, die unter anderem über NFκB zur Expression proinflammatorischer Zytokine führt [5]. Im adaptiven Immunsystem spielen TLRs eine Rolle in der Kostimulation und fördern im Allgemeinen eine T_H1 gerichtete Immunantwort [87]. Zehn Mitglieder der TLR Familie sind im Menschen, elf in der Maus beschrieben [59]. Sie werden dementsprechend als TLR-1 bis -13 bezeichnet. Menschen exprimieren TLR-1 bis -10, Mäuse exprimieren nicht TLR-10 und TLR-8, dafür aber TLR-11, -12 und -13 [17]. TLR-1, -2, -4, -5, -6 werden an der Zelloberfläche exprimiert, TLR-3, -7, -8, -9 finden sich in intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen, bzw. Lysosomen. Abbildung 1.2 zeigt exemplarisch

[3] Alle TLRs rekrutieren MyD88 als Adapterprotein, ausgenommen TLR-3 welcher TRIF als Adapterprotein nutzt. TLR-4 kann sowohl MyD88 als auch TRIF rekrutieren.

Toll-like Rezeptor	**Ligand**
TLR-1:TLR-2 Heterodimer TLR-1:TLR-6 Heterodimer	Peptidoglykan, Lipoproteine, Lipoarabinomannan
TLR-3	dsRNA
TLR-4 Dimer (mit MD-2, CD14)	LPS, Lipoteichonsäuren
TLR-5	Flagellin
TLR-7	ssRNA
TLR-8	G-reiche Oligonukleotide
TLR-9	Unmethylierte CpG DNA
TLR-10	?
TLR-11	Profilin
TLR-12	?
TLR-13	Bakterielle 23S rRNA [71]

Tab. 1.3.: **Toll-like Rezeptoren und Liganden**. Abbildung modifiziert nach *Janeway's immunobiology* 2008 [64] und *Immunology- Understanding the Immune System* 2009 [17]. *dsDNA*= doppelsträngige DNA, *ssRNA*= einsträngige RNA, *rRNA*= ribosomale RNA *?*= unbekannt.

die Signalkaskade für TLR-4 und Gemeinsamkeiten mit dem Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) Signalweg.

Regulation der Toll-like Rezeptoren

Toll-Like Rezeptoren (TLRs) spielen eine entscheidende Rolle in der Induktion einer Immunantwort im angeborenen wie im adaptiven Immunsystem. Eine Regulation der TLR-vermittelten Signalkaskade ist daher entscheidend, um eine unkontrollierte Aktivierung dieses Systems zu verhindern. Regulation findet dabei durch unterschiedlichste Mechanismen und auf diversen Ebenen statt:

Durch den Aufbau der Zelle mit ihrer Unterteilung in verschiedene Kompartimente können die entsprechenden TLRs nur an bestimmten Orten Kontakt mit ihrem Liganden herstellen (z.B. an der Zelloberfläche oder in Lysosomen) [5], unterschiedliche Zellarten exprimieren jeweils andere TLRs und die Expression kann herabreguliert werden.

Auf molekularer Ebene findet eine intensive Kommunikation zwischen pro- und antiinflammatorischen Signalwegen statt, die gezielt zur Inaktivierung einzelner für die Signalkaskade wichtiger Elemente führen kann, beispielsweise durch Inhibition von Phosphorylierung oder Ubiquitinierung [73]. Auch können wichtige Adapterproteine durch andere Proteine ohne Effektorfunktion blockiert werden. Ein Beispiel ist MyD88s, ein verkürztes MyD88 Molekül, welches MyD88 blockiert (und damit alle TLR vermittelten Signalwege mit Ausnahme von TLR-3 und TLR-4) [40]. Ein ähnlicher Mechanismus wird auch für single-immunglobulin IL-1R related molecule (SIGIRR) vermutet. Weitere endogene Inhibitoren sind unter anderem (u.a.) IRAK-M [46], IRAK-2 [29], SOCS-1 [44] und SOCS-3

[72, 78].

SIGIRR (IL-1R8, TIR8)

Zum ersten Mal beschrieben wurde single-immunglobulin IL-1R related molecule (SIGIRR) 1999 von Thomassen *et al.* [95]. Andere Namen für SIGIRR sind IL-1R8 oder TIR8 [69].

SIGIRR gehört zur TLR/IL-1R Superfamilie. Es besteht aus einer extrazellulären einfachen Ig ähnlichen Domäne, einer Transmembrandomäne, sowie einer intrazellulären TIR-Domäne an die sich ein spezifischer, 95 Aminosäuren langer Rest anschließt [77]. Unterschiede zu anderen Mitgliedern der IL-1R Familie besteht v.a. in der einfachen (statt dreifachen) Ig-Domäne und einem Austausch von zwei Aminosäuren in der ansonsten hochkonservierten TIR Domäne [81], wobei in humanem SIGIRR Cystein (Cys)222 ein Serin (Ser) und Leucin (Leu)305 ein Tyrosin (Tyr) in der korrespondierenden Region des humanen IL-1R1 ersetzt (vgl. Abb. 1.3) [95, 98], wobei dieses Serin und Tyrosin als entscheidend für die Signalgebung über IL-1R1 beschrieben wurden [55].

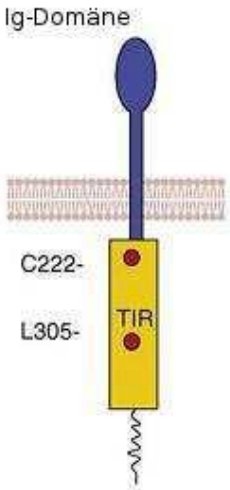

Abb. 1.3.: **SIGIRR.** Abbildung adaptiert aus Garlanda *et al.* 2009 [19].

Für humanes SIGIRR existieren vier mögliche N-Glykosylierungsstellen, für murines SIGIRR sind es fünf [95], wobei auch O-Glykosylierungen möglich sind. Stärke und Art der

Glykosylierung sind vom Zelltyp abhängig [49].

Im menschlichen Genom liegt SIGIRR auf Chromosom 11, bei der Maus auf Chromosom 7 [19]. Weitere Details zu Aufbau und Unterschieden zwischen humanem SIGIRR (hSIGIRR) und murinem SIGIRR (mSIGIRR) sind Tabelle 1.4 zu entnehmen.

Während die meisten Rezeptoren der TLR/IL-1R Familie proinflammatorisch wirken, wird für SIGIRR eine regulatorische Funktion im Immunsystem postuliert: Einflüsse von SIGIRR sind auf die Signalwege über IL-1RI, IL18R, TLR1/2, TLR3, TLR-4, TLR-7 und TLR-9 beschrieben [49, 21, 98, 78, 52, 15, 23, 50, 7]. Ein Eingreifen von SIGIRR in weitere Signalwege wird diskutiert. Keinen Einfluss besitzt SIGIRR auf die TNFα vermittelte NFκB Aktivierung [98]. Funktionell wird dies u.a. über eine Bindung SIGIRRs an MyD88, einem wichtigen Adaptorprotein in der IL1R/TLR-Signalkaskade, vermittelt (veränderte Konformation der MyD88-Bindungsstelle, Verhinderung der MyD-88 Dimerisierung durch Bindung der Monomere) [14, 23]. In T_H17-Zellen moduliert SIGIRR die IL-1 induzierte Phosphorylierung von JNK und mTOR-Kinase [26, 82]. Weiter bindet SIGIRR vermutlich als membranständiger Rezeptor Moleküle wie IRAK-1 oder TRAF-6 und verhindert damit deren Verwendung in Signalwegen, die zur Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NFκB führen [98].

Die diskutierte immunmodulatorische Funktion von SIGIRR macht es zu einem interessanten Ansatzpunkt bei der Suche nach Ursachen von Autoimmunerkrankungen, wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa), Rheuma und Lupus erythematodes [52], oder Überemp-

hSIGIRR	**mSIGIRR**
Chromosom 11 (11.p15.5)	Chromosom 7 (7.F4)
10 Exons	9 Exons
cDNA: 1695 bp	cDNA: 1540 bp
Protein: 410 aa	Protein: 409 aa

Tab. 1.4.: **humanes SIGIRR versus murines SIGIRR.** Tabelle modifiziert nach Garlanda *et al.* 2009 [19].
Nach Riva *et al.* 2009: hSIGIRR *8* Exons, mSIGIRR auf Chromosom 7.F*5* [81].
aa= Aminosäuren, *bp*= Basenpaare, *cDNA*= komplementäre DNS.

findlichkeitsreaktionen wie dem allergischen Asthma [65] (s.a. [21, 99, 11, 15, 50]). Die Assoziation von SIGIRR mit PRRs deutet darauf hin, dass SIGIRR gerade bei der Toleranz gegenüber Kommensalen, beispielsweise in der Darmflora, eine besondere Bedeutung besitzt [99]. SIGIRR ist besonders hoch in Geweben exprimiert, die häufig Kontakt zu körperfremden Stoffen haben, wie beispielsweise in der Milz („Blutmonitoring“), Lunge und Darm. Neben Epithelzellen unterschiedlicher Gewebe exprimieren auch aus dem Knochenmark stammende dendritische Zellen (DCs) [21] in größerem Maße SIGIRR. Im Vergleich exprimieren B-Zellen geringere Mengen SIGIRR mRNA [77]. Sehr wenig SIGIRR exprimieren Gewebe wie Muskel oder Gehirn und Zellarten wie Makrophagen und Fibroblasten [98, 21].

SIGIRR Knockout-Mäuse zeigen gegenüber Wildtypmäusen nur wenig Einschränkungen. Beschrieben werden jedoch ei-

ne höhere Empfindlichkeit auf Endotoxine (Endotoxinschock) und eine vermehrte Anfälligkeit gegenüber chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [98, 11].

SIGIRR gehörte lange zu den Rezeptoren, für die keine Ligand bekannt ist (Orphan-Rezeptor) [82]. In 2015 beschrieben Nold-Petry *et al.* SIGIRR als Co-Rezeptor von IL-18Rα (Alpha Kette des IL18-Rezeptors): Zusammen binden sie IL-37 und sind damit Teil der durch dieses Interleukin vermittelten immunsuppressiven Signalkaskade [69]. Zu den intrazellulären Signalwegen SIGIRRs ist zum jetzigen Zeitpunkt wenig bekannt, jedoch scheint SIGIRR als „Decoy"-Rezeptor zu funktionieren, also kompetitiv Signale proinflammatorischer Signalwege innerhalb der Zelle abzufangen [78]. Wenig Daten existieren auch dazu, wie sich Glykosylierungen auf die Funktion von SIGIRR auswirken (vgl. auch [95, 49]).

1.2. Hypothese und Zielsetzung

Für SIGIRR wird ein inhibitorischen Effekt auf pro-inflammatorische TLR vermittelte Signale postuliert (vgl. Einleitung 1.1.3). Als Surrogatparameter für die Funktion SIGIRRs wurde in vielen Studien die Expression von SIGIRR RNA oder nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) gemessen [98, 78, 14]. Weniger Daten existieren hingegen zur Zytokinantwort einzelner Zellarten, wie beispielsweise bei Garlanda *et al.* 2004 [21] oder Lech *et al.* 2009 für CD11b$^+$ APCs [51]. Daten der Diplomarbeit von H. Schreiner [88] von 2008 zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine vermehrte IL-6 Antwort SIGIRR defizienter B-Zellen auf Stimulation nach Vorinkubation mit Bakterien. Ziel dieser Arbeit soll

es daher sein, aufbauend auf den Ergebnissen von H. Schreiner, diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen. Dazu sollen in der ex-vivo Stimulation Zellen SIGIRR defizienter Mäuse ($SIGIRR^{-/-}$) im Vergleich zu Zellen aus Wildtypmäusen ($SIGIRR^{+/+}$) untersucht werden. Es ist zu erwarten, dass die Ausschüttung des Zytokin Interleukin (IL)-6 in SIGIRR defizienten Mäusen, als Reaktion auf einen TLR-Liganden (z.B. 1668PTO), gegenüber Wildtyp-Zellen erhöht ist, da die Negativregulation des TLR Signalweges durch SIGIRR ausfällt. In den Stimulationsexperimenten sollen Milzzellen untersucht werden. Da neben B-Zellen in der Milz auch T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen vorkommen [17, S.53][1], ist die Untersuchung gemischter Milzzellen näher am in-vivo Zustand, die Aussagekraft zu einzelnen Populationen nimmt aber ab. Daher sollen desweiteren murine B-Zellen und mDCs in Stimulationsexperimenten untersucht werden, um mehr über die Bedeutung von SIGIRR in diesen Zellartarten herausfinden. Zusammenfassend sollen die Stimulationsexperimente den Einfluss SIGIRRs auf die inflammatorische Erregbarkeit der verschiedenen Zellpopulationen klären. Unterschiedliche Stimuli sollen im Vergleich zu Kontrollen zeigen, welche der Toll-like-Rezeptoren durch SIGIRR inhibiert werden.

Zusätzlich sollen im zweiten Teil dieser Arbeit monoklonale Antikörper gegen humanes SIGIRR hergestellt und in Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (s. 2.2.7), Western Blot und fluorescence-activated cell sorting (FACS) (s. 2.2.8) nach ihren Eigenschaften charakterisiert werden (α-h-SIGIRR Antikörper).

2. Material und Methoden

2.1. Material

Geräte	**Modell**	**Firma, Firmensitz**
Agarosegelkammer		OWL, Weilheim
Analysenwaage	R160P-D1	Sartorius GmbH, Göttingen
Blot Modul	Xcell II mini Cell(EI9001)	Novex, San Diego, USA
Durchflusszytometer	Calibur	BD, Basel, Schweiz
Entwicklermaschine	Optimax 2010	PROTEC, Oberstenfeld
FPLC	FPLC System	Pharmacia LKB
Gel Imaging System		Fröbel Labor Technik, Lindau
Inkubator-Schüttler	TS-100 Thermoshaker	Peqlab, Erlangen

Inkubator	HERA cell 240	Heraeus, Hanau
MACS-Ständer	MidiMACS Separator	MiltenyBiotec, Gladbach
	QuadroMACS Separator	MiltenyBiotec, Gladbach
Mikroplatten Waschgerät	Skan Washer 400	Molecular Devices, Ismaning
Mikroskop	Wilovert	Will, Wetzlar
Neubauer Zählkammer		W.Schreck, Hofheim
pH-Meter	pH523	WTW, Weilheim
Plattenphotometer	Emax	Molecular Devices, Ismaning
Präzisionswaage	P100	Mettler Toledo, Gießen
Schwenkplatte	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
SDS Gelelektrophoresekammer	Standard Power-Pack P25	Peqlab, Erlangen
Spannungsquelle	Power Ease 500	Novex, San Diego, USA
	Power Pac 300	BioRad, Hercules, USA

Spektrophotometer	NanoDrop-1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Western Blot semidry	TE70X Semy-dry Blotter	Hoefer, San Franzisko, USA
Sterilbank	LaminAir HB 2448	Heraeus, Hanau
	Master cycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Elite	Helena, Sunderland, UK
	iCycler Thermocycler	Biorad, Hercules, USA
Thermo-Schüttler	TS-100	Peqlab, Erlangen
Tischzentrifuge	Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Vortexer	Mikro 200R	Peqlab, Erlangen
Wasserbad	LAUDA M20	LAUDA, Lauda-Königshofen
Zell-Counter	Casy- 1TT	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge	BIOHIT	Heraeus, Hanau
	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau

Multifuge 1 L-R	Heraeus, Hanau
Rotanta RP	Hettich, Tuttlingen

Reagenzien	**Firma, Firmensitz**
ECL-Reagenz	Merck Millipore, Billerica(MA), USA
EDTA	Roth, Karlsruhe
Glycin 75,67 g/mol	Roth, Karlsruhe
Murines IL-6 (Standard)	R+D, Minneapolis, USA
OPD (o-Phenylendiamindihydrochlorid) (ELISA)	SigmaAldrich, St.Louis, USA
Protein A Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden
Stopplösung (2 M H_2SO_4) (ELISA)	
Streptavidin-POD Konjugat	Roche, Basel, Schweiz

N,N,N,N-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	
Thrombin [1 U/µl]	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Tris-OH (Tris-Base) 121,14 g/mol	Roth, Karlsruhe

Zellkulturmedien	**Firma, Firmensitz**
2-Mercaptoethanol 50 mM [1000x]	Life Technologies, Carlsbad(CA), USA
Dulbecco's PBS^{def} (1x)	PAA, Cölbe
Dulbecco's PBS^{++}(1x)	PAA, Cölbe
DMEM (high glucose 4,5 g/l) without L-Glu	PAA, Cölbe
FCS	Merck Millipore, Billerica(MA), USA
L-Glutamine 200 mM (100x)	PAA, Cölbe

Opti-MEM® (Gibco®)	Life Technologies, Carlsbad(CA), USA
Penicillin/ Streptomycin (P/S) (100x)	PAA, Cölbe
RPMI1640	PAA, Cölbe

Medium	**Zusammensetzung**
DMEM^{comp}	DMEM (high glucose 4,5 g/l)+ 1 % L-Glu, 1 % P/S, 0,1 % β-ME
Einfriermedium	90 % FCS, 10 % DMSO
Opti-MEM®-HAT	Opti-MEM® + 10 % FCS, 0,1 % β-ME, 1 % P/S
Opti-MEM®^{comp}	Opti-MEM® + 5 % FCS, 1 % P/S, 0,1 % β-ME
RPMI^{comp}	RPMI + 10 % FCS, 1 % L-Glu, 0,1 % β-ME, 1 % P/S
RPMI/GM-CSF	RPMI^{comp} + 15 % GM-CSF enthaltender Zellkulturüberstand

Zelllinien	**Eigenschaften, Ursprung**
Ag8P3X	Tumorzellinie zur Hybridiserung mit B-Plasmazellen

HEK293	human embryonale Nierenzellen, TU München (Prof. Dr. Bauer)

Sonstiges	**Zusammensetzung**
1x Trypsin	aus 10x Trypsin EDTA in PBS^{def}

Puffer (Western Blot)	**Pufferkapazität/ Zusammensetzung**
Blockpuffer	5 % Milchpulver in Waschpuffer (vor Gebrauch 1 h bei Raumtemperatur quellen lassen)
Blotting Puffer	6 g Tris, 28,67 g Glycine ad 1600 ml ddH_2O, vor Gebrauch 20 % Methanol zugeben
Waschpuffer	1x PBS, 0,1 % Tween20, pH 7,2-7,6

Puffer (SDS-Gel)	**Pufferkapazität/ Zusammensetzung**
Laufpuffer	3,04 g TRIS-OH; 14,42 g Glycin; 10 ml 10 -%iges SDS ad 1 l ddH_2O

2x Probenpuffer	1,25 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 2 ml Glycerol, 4,6 ml 10 %-iges SDS; 500 µl gesättigte wässrige Bromphenolblaulösung ad 10 ml ddH_2O; vor Gebrauch auf 10 ml 2x PP 1 Tbl. Proteinaseinhibitor und 800 µl β-Mercaptoethanol
Sammelgel-Puffer	8,06 g Tris-HCl pH 6,8; 4 ml 10 -%iges SDS ad 100 mL ddH2O
Trenngel-Puffer	18,16 g Tris-HCl pH 8,8; 4 ml 10 -%iges SDS ad 100 mL ddH2O

Puffer (Sonstige)	**Pufferkapazität/ Zusammensetzung**
Blockpuffer (ELISA)	1xPBS, 0,1 % Tween20, 1 % BSA
FACS Puffer	PBS^{def}; 2 % FCS; 0,01 % Na-Azid
Glycinlösung (FPLC)	100 mM Glycin; auf pH 3 eingestellt; sterilfiltriert
Lysepuffer (Zellen)	50 mM Tris (pH 7,8), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40; 1 Tbl. Proteinaseinhibitor auf 10 ml
MACS Puffer	PBS^{def}, 0,5 % FCS, 2 mM EDTA
PBS^{def} ?	8,00 g NaCl, 0,20 g KCl, 2,85 g Na_2HPO_4x6HO, KH_2PO_4 ad 5 l ddH_2O

Saponin- Puffer	PBS^{def}, 0,5 % BSA; 0,5 % Saponin; 0,01 % Na-Azid
Substratpuffer (ELISA)	7,3 g $C_6H_8O_7$ x H_2O, 11,87 g Na_2HPO_2 x 2 H_2O ad 1 l ddH_2O
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	pH 7,2 - 9,0
Trislösung (FPLC)	50 mM Tris-OH, 150 mM NaCl; eingestellt auf pH 8,5; sterilfiltsriert
Waschpuffer (ELISA)	500 ml 10xPBS, 2,5 mL Tween20 ad 5 l ddH_2O

Kits	**Firma, Firmensitz**
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA

Mausstämme	**Quelle, Referenz**
TIR27BC, C57Bl/6j Hintergrund („SIGIRR-Knockoutmäuse“)	Garlanda *et al.* 2004 [21]
C57Bl/6	Animal Facility BMFZ Marburg

Verbrauchs-materialien	**Firma, Firmensitz**
Reagiergefäße (0,5 ml/ 1,5 ml/ 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
ELISA-Platten Nunc, Maxisorp	ThermoFisherScientific, Waltham(MA), USA
FACS-Röhrchen groß	BD, Heidelberg
FACS-Röhrchen klein	Greiner bio-one, Frickenhausen
Falcon-Röhrchen(15 ml/ 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
FILCON syringe fitting 30 µm	Keul, Steinfurt
Immobilon-P Transfer Membran (PVDF Membran)	Millipore, Billerica(MA), USA
Kryoröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
MACS LS Column	Milteny Biotech, Gladenbach

Mikrotiterplatte, steril (96-Well, Flachboden)	
Mikrotiterplatte, steril (96-Well, Rundboden)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikrotiterplatte Mikrolon, unsteril (96-Well, Rundboden)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Nylon-Sieb (70 µm) Cell Strainer	BD, Heidelberg
Petrischale mit Nunclon Oberfläche; 12,5 ml	ThermoFisherScientific, Waltham(MA), USA
Plastikpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (gelb, blau)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Protein-A Säule 1ml	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB

Slide-A-Lyzer mini Dialysis Devices 2K MWCO; 10-100 µl	Pierce, Rockford, USA
Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes 2 K MWCO; 3 ml	Pierce, Rockford, USA
Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes 3,5 K MWCO; 3 ml	Pierce, Rockford, USA
Tube-Streifen (weiß 0,2 ml)+ Deckel (transparent) für Real-time PCR	Biorad, Herkules, USA
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschale (6 cm, 10 cm)	BD, Heidelberg

Software, Version	**Firma, Firmensitz**
CellQuestPro	BD, Heidelberg
SigmaPlot	Systat Software GmbH, Erkrath
SoftMaxPro v5	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
FlowJo 8.10	Tree Star Inc, Ashland, USA
Flowing Software 2.5.1	Turku Center for Biotechnology, Finnland

Stimuli	**Rezeptor**	**Firma, Firmensitz**
LPS (Lipopolysaccharid)[1 mg/ml]	TLR-4	InvivoGen, San-Diego(CA), USA
Pam3Cys (synthetisches Lipopeptid)[1 mg/ml]	TLR-2	InvivoGen, San-Diego(CA), USA
1668PTO (20mer) [500 µM]	TLR-9	TIB Molbiol, Berlin

TNFα [10 µg/ml]	TNFR
IFNγ [100 µg/ml]	IFNGR
ATP [507,18 g/mol]	ATPR

Antikörper (FACS)	**Markierung; Ursprung**	**Firma, Firmensitz**
α-CD11c	PE; Hamster, IgG_1	BD, Heidelberg
α-CD11c	FITC; Hamster, IgG_1	BD, Heidelberg
α-CD43	PE; Ratte, IgG_{2a}	BD, Heidelberg
α-CD45R/B220	FITC; Ratte, IgG_{2b}	BD, Heidelberg
α-CD45R/B220	PE; Ratte, IgG_{2b}	BD, Heidelberg
α-CD45R/B220	APC; Ratte, IgG_{2a}	BD, Heidelberg
Fc-Block	–; Maus IgG	BD, Heidelberg
α-MHCII	FITC; Ratte, IgG	BD, Heidelberg

TO-PRO®-3 (Totfarbstoff)	–	Life Technologies, Carlsbad(CA), USA
α-mouse-IgG (Fc-Fragment spezifisch)	ALEXA; Ratte, IgG_1	BD Heidelberg

Antikörper (MACS)	**Markierung; Ursprung**	**Firma, Firmensitz**
α- FITC MicroBeads	magnetisch; Maus, IgG_1	Milteny Biotec, Gladbach
αCD43(Ly-48)-MicroBeads	magnetisch; Ratte, IgG_{2a}	Milteny Biotec, Gladbach

Antikörper (ELISA)	**Markierung; Ursprung**	**Firma, Firmensitz**
α-mouse IL-6 (capture-antibody)	–;	R+D, Minneapolis, USA
Biotin α-mouse IL-6 (detection-antibody)	Biotin; Ratte	R+D, Minneapolis, USA

Antikörper (Western Blot)	**Markierung; Ursprung**	**Firma, Firmensitz**
α-mouse-POX (Detektion)	POX; Ziege	Jackson-ImmunoResearch, WestGrove(PA), USA
α-goat-POX (Detektion)	POX; Rind	Jackson-ImmunoResearch, WestGrove(PA), USA
α-HA-POX (Detektion)	POX; Ratte	Roche, Basel, CH

Antikörper (Sonstige)	**Markierung; Ursprung**	**Firma, Firmensitz**
α-goat-IgG	FITC; Esel	ThermoFisherScientific, Waltham(MA), USA
α-mouse-IgM	– ; Ziege; humane IgG, whole molecule	Jackson-ImmunoResearch, WestGrove(PA), USA

α-mouse-IgG	– ; Ziege	Jackson-ImmunoResearch, WestGrove(PA), USA
α-humane-IgG	– ; Ziege	Jackson-ImmunoResearch, WestGrove(PA), USA
Biotin SP-conjugated α-humane IgGFc	Biotin; Ziege	Jackson-ImmunoResearch, WestGrove(PA), USA

2.2. Methoden Teil 1: Stimulationsexperimente

Bei den Stimulationsexperimenten wurden murine Zellen aus Milz (Milzzellen, aufgereinigte B-Zellen) und Knochenmark (differenzierte mDCs) stimuliert und deren IL-6 Antwort im ELISA gemessen.

2.2.1. Der Mausstamm TIR27BC

TIR7BC Mäuse sind SIGIRR-Knockoutmäuse mit Black6 (C57 BL/6j) Hintergrund. Der Knockout wurde über eine Insertion in Exon 2 generiert (DNA Fragment (8,3 kb) + IRES-lacZ Kassette + PGK-Neomycin Resistenzgen) (vgl. auch [21]).

Die Typisierung der Mäuse erfolgte mittels PCR. Das PCR-Produkt für Wildtyp (WT) ($SIGIRR^{+/+}$) lag dabei bei 146 Basenpaare (bp), das PCR-Produkt für Knockout (ko) ($SIGIRR^{-/-}$) bei 400-500 bp im Agarosegel (vgl. auch Abb.2.1).

2.2.2. Mäuse-Präparation

Wildtyp, bzw. SIGIRR-Knockout Mäuse wurden im Rahmen der Stimulationsexperimente zur Gewinnung von Milzzellen und B-Zellen (aus der Milz) und mDCs (aus dem Knochenmark), sowie zur Generierung von Hybridomazellen (B-Zellen aus Milz und Lymphknoten) für die Herstellung von Antikörpern gegen humanes SIGIRR (α-h-SIGIRR), verwendet.

Nach zervikaler Dislokation wurden die Mäuse auf einem Präparationsbrett fixiert und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Das Präparierbesteck wurde in 70 % Ethanol bereitgestellt. Alle Medien und Proben wurden auf Eis aufbewahrt und steril

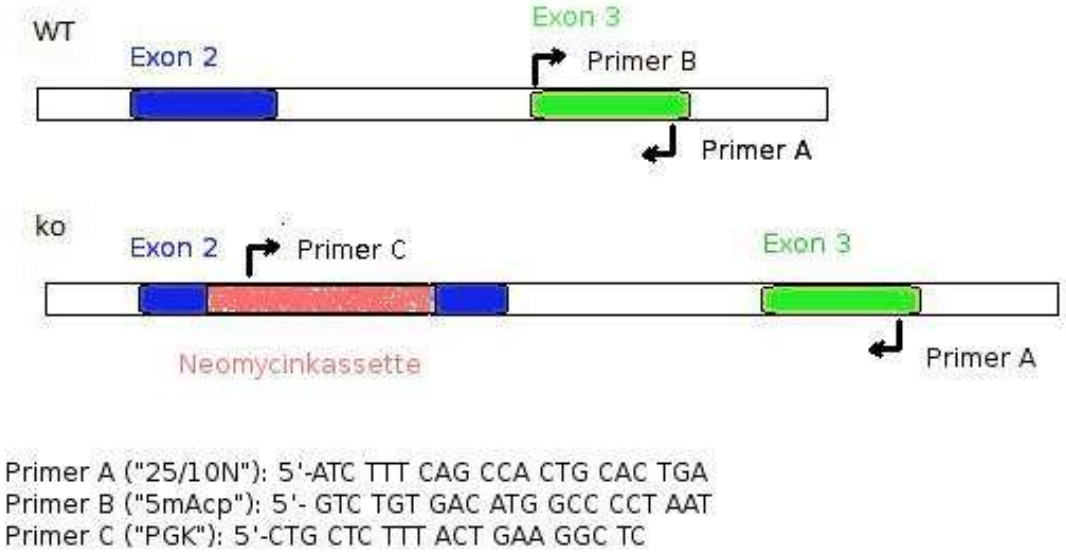

Abb. 2.1.: **Prinzip der Genotypisierung mit PCR und Lage der Primer.** Abbildung adaptiert von H. Schreiner [88]

behandelt. Gewebeproben der Ohren wurden bei -20 °C für eine Kontrolltypisierung aufbewahrt.

Präparation der Milz

Die Bauchdecke wurde eröffnet, die Milz entnommen, das anhängende Pankreasgewebe entfernt und diese in ein vorbereitetes 50 ml Bluecap mit 10 ml RPMI inkl. aller Zellkulturzusätze ($RPMI^{comp}$) überführt. Das Milzgewebe wurde mit dem Stößel einer 1 ml Spritze durch ein Metallsieb in einer Petrischale homogenisiert und die Einzelzellsuspension in ein 50 ml Bluecaps gegeben. Die Zentrifugation erfolgte bei 1300 rpm (350 g), 7 min und 4 °C. Anschließend wurde das Zellpellet zur Erythrozytenlyse in 5 ml RBL-Puffer resuspendiert und für 10 min

bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zum Abstoppen der Lyse wurden 5 ml RPMI^{comp} zugefügt und erneut bei 1300 rpm, 7 min, 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml RPMI^{comp} resuspendiert und die Zellzahl mit einem Zell-Counter (Casy-1TT, Schärfe System, Reutlingen) bestimmt.

Präparation der Lymphknoten

Zur Präparation der Lymphknoten wurden Haut und Fell der fixierten Mäuse y-förmig eröffnet. Im Unterhautfettgewebe konnten nun die inguinalen Lymphknoten beidseits dargestellt und freipräpariert werden. Anschließend wurden die inguinalen Lymphknoten je einer Maus in 50 ml Bluecaps mit 10 ml RPMI^{comp} überführt und bis zur Weiterverwendung auf Eis gestellt. Die Lymphknoten wurden wie bei den Milzzellen (s.o.) beschrieben homogenisiert. Eine Erythrozytenlyse war nicht notwendig. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Zell-Counter wurden die Zellen wie im Abschnitt „Generierung von Hybridoma-Zellen“ beschrieben verwendet.

Präparation des Knochenmarks

Femur und Tibia wurden freipräpariert und in eine Petrischale überführt. Anschließend wurde der Knochenschaft unter der Sterilbank eröffnet und das Knochenmark mit 10 ml RPMI^{comp} herausgespült (10 ml Spritze, 24 G Kanüle).

Die Einzelzellsuspension wurde mit einer 10 ml Pipette und Pipettierhilfe hergestellt und in ein 50 ml Bluecap überführt. Die Zentrifugation erfolgte bei 1300 rpm (350 g), 7 min bei 4 °C. Das erhaltene Zellpellet wurde in 5 ml RPMI^{comp} Medium resuspendiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem unter „Prä-

paration der Milz“ beschriebenen. Die Knochenmarkszellen wurden mit Casy-Counter oder Neubauer-Zählkammer gezählt. Sie wurden zur mDC Differenzierung (s. Abschnitt 2.2.4) weiterverwendet. Eine Analyse der Zellen erfolgte im FACS (s. 2.2.8) .

2.2.3. Auswahl und Gegenüberstellung der Versuchstiere

In den Stimulationsexperimenten wurden Tiere der Mauslinie TIR27BC verwendet (vgl. auch 2.2.1). Alle Tiere dieses Mausstammes wurden nach Wildtyp ($SIGIRR^{+/+}$) und Knockout ($SIGIRR^{-/-}$) differenziert. Um eine gute Vergleichbarkeit herzustellen wurden nach Möglichkeit Tiere des gleichen Wurfes und gleichgeschlechtliche Tiere miteinander verglichen. Die Tiere waren durchschnittlich 12 Wochen alt, das älteste war 22 Wochen, das jüngste 7 Wochen alt [1].

2.2.4. Differenzierung myeloider dendritischer Zellen

Myeloide dendritische Zellen, im Weiteren als mDCs bezeichnet, wurden aus Knochenmarkszellen mit Hilfe von granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) differenziert.

Zur Differenzierung der Knochenmarkszellen wurden beschichtete Petrischalen (NUNC) mit einem Durchmesser von 10 cm verwendet. Für RPMI/GM-CSF wurde $RPMI^{comp}$ mit 15 % eines konditionierten GM-CSF-haltigen Zellkulturüberstandes versetzt (z.B. 425 ml $RPMI^{comp}$ + 75 ml GM-CSF Zell-

[1] In einem Fall wurde ein Tier mit 82 Wochen verwendet, im Durchschnitt nicht berücksichtigt.

kulturüberstand, Vorrat). Diese Zellkulturüberstände entstammten der Zelllinie X6310, die rekombinantes GM-CSF konstitutiv exprimiert. GM-CSF-haltige Zellkulturüberstände dieser Linie waren sterilfiltriert bei 4 °C im Labor verfügbar.

In jeder Schale wurden für die mDC Differenzierung $6*10^6$ Knochenmarkszellen in 10 ml RPMI/GM-CSF vorgelegt. Die Petrischalen wurden nach dem Aussäen für 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. An Tag drei und sechs wurden den Zellkulturen noch einmal je 10 ml des hergestellten RPMI/GM-CSF zugegeben und ihr Wachstum im Mikroskop beurteilt. Allgemein musste auf eine möglichst erschütterungsfreie Behandlung der Zellen geachtet werden, da mechanische Beanspruchung der Zellen zu ihrer Aktivierung und damit zu einer Entwicklung zu Makrophagen führt. Differenzierte mDCs ordneten sich im Überstand zu schwimmenden Zellhaufen an. So konnten die mDCs durch vorsichtiges Abnehmen des Überstandes geernet werden. Makrophagen setzten sich am Plattenboden fest [37] und wurden verworfen. Die Überstände wurden zentrifugiert (300 ∗ g, 7 min, 4 °C) und in 5 ml $RPMI^{comp}$ resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Casy-Counter oder Neubauer Zählkammer bestimmt. Proben für FACS-Analysen wurden entnommen und die Zellen anschließend auf Eis zur Stimulation bereitgestellt.

2.2.5. Immunomagnetische Separation/ Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

Die Immunomagnetische Separation (MACS) ist eine Methode zur Aufreinigung von Zellen bei der Oberflächenstrukturen

mit Magnetbeads [2] markiert und durch Anlage eines Magnetfeldes von unmarkierten Zellen separiert werden können. Die Zellen werden dabei nach Inkubation mit den entsprechenden Magnetbeads über eine sogenannte ferromagnetische Matrix, eine mit Eisenkügelchen oder Eisenwolle gefüllte Säule, geleitet, die in einem starken Magnetfeld eingespannt ist. Die Separation kann prinzipiell als Positiv- oder Negativselektion und mit direkter oder indirekter Markierung erfolgen. Reinheit und Ausbeute in der immunmagnetischen Separation sind abhängig von der Größe der Zellpopulation und dem Expressionsgrad des Antigens. [56, S.73ff]

Gewinnung muriner B-Zellen im MACS

Primäre B-Zellen wurden aus der Milz von Mäusen isoliert. Dazu wurden die Mäuse wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben präpariert und die Milzzellen entsprechend gewonnen. Diese Zellen konnten nun einer Aufreinigung mit MACS unterzogen werden.

Dabei wurden CD43 positive Zellen mit CD43(Ly48)Microbeads (Milteny Biotec) magnetisch markiert, um dann beim Durchlaufen der Säule (LD-Säule, Milteny Biotec) im magnetischen Feld zurückgehalten zu werden. CD43 wird auf beinahe allen Lymphozyten mit Ausnahme ruhender, naiver B2-Zellen exprimiert. Das angewendete Verfahren entsprach also einer Negativselektion, bei der sich im Durchlauf die nicht markierten ruhenden, naiven B-Zellen fanden. Zur Qualitätssicherung wurden je 10^5 Zellen des Durchlaufs und der in der Säule zurückgehaltenen Zellen auf B220, CD43 und TOPRO gefärbt

[2] kolloidal suspendierte, von einer Polystyrol-, Polysaccharid- oder Silanhülle umhüllte, superparamagnetische Partikel

und der FACS-Analyse zugeführt (s. 2.2.8). Die zurückgehaltenen Zellen wurden schließlich verworfen und die gewonnen B-Zellen wurden bis zur Stimulation auf Eis aufbewahrt. Microbeads und Säule wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Gewinnung von CD11c$^+$ Zellen im MACS

Zur Gewinnung reiner CD11c positiver (CD11c$^+$) mDCs wurde ein Teil der in der Differenzierung gewonnenen Zellen einer Positivselektion mit MACS unterzogen. Da die Zellen nach der Separation auch im FACS auf ihre CD11c Expression beurteilt werden sollten, wurden die Zellen indirekt magnetisch markiert und durch Positivselektion separiert: In einem ersten Schritt wurden die Zellen mit α-CD11cFITC (markerspezifischer, fluorochromgelabelter Primärantikörper, Verdünnung 1:100 in MACS-Puffer) mit 100 µl pro Ansatz für 15 min bei 4-8 °C gefärbt und anschließend durch Zugabe von 2 ml MACS-Puffer und Zentrifugation bei $350 * g$) für 7 min bei 4 °C gewaschen. Als Zweiter Schritt erfolgte die Markierung mit α-FITC-Microbeads (meagnetbeadgekoppelter Sekundärantikörper gegen das verwendete Fluorochrom) entsprechend den Herstellerangaben. Die Trennung der Zellen erfolgte im Magnetfeld bei Durchlaufen der mit MACS-Puffer equilibrierten LS-Säule. Nach Auftragen der Zellen wurde die Säulen noch drei mal mit 3 ml MACS-Puffer nachgespült und der Durchlauf mit der CD11c$^-$ Population gesammelt. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld wurde diese abschließend mit 5 ml MACS-Puffer gewaschen, um die CD11c$^+$ Population zu gewinnen. Alle Zellen wurden zentrifugiert und in je 1 ml RPMI^{comp} resuspendiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen,

wie unter 2.2.6 beschrieben.

2.2.6. Stimulation (primärer) Mauszellen

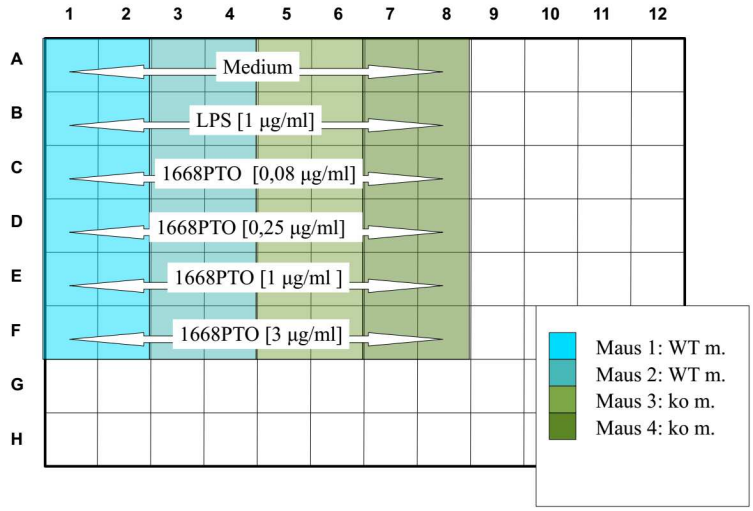

Abb. 2.2.: **Stimulation muriner Milzzellen.** Beispiel für die Anordnung der Proben bei Stimulation. Angegebene Konzentration der Stimuli als Endkonzentration im Well. Je $0,25 * 10^6$ Zellen pro Well.

Mit der Stimulation von Mauszellen sollte die Reaktion dieser Zellen auf unterschiedliche TLR-Liganden gezeigt werden. Die Zellantwort wurde als IL-6 Antwort, die in den Zellkulturüberständen mit ELISA-Technik gemessen wurde, bestimmt. Alle Arbeiten mit Zellen/Zellkulturen wurden unter der Sterilbank ausgeführt. Die Zellen wurden entsprechend der gewünschten Zellzahl pro Well eingestellt und mit 100 µl in sterilen 96-Well Rundbodenplatten ausplattiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit je 100 µl der auf das Doppelte der Endkonzentration eingestellten Stimuli (vgl. Abb. 2.2). Eine

Auflistung der verwendeten Stimuli und Ausgangskonzentrationen findet sich im Materialteil (S. 36). Nach Zugabe der Stimuli wurden die Platten für 17 h bei 37 °Cund 5 % CO_2 inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Zur Beurteilung der Stimulation wurden die Überstände im Interleukin-6 ELISA, wie im Abschnitt 2.2.7 beschrieben, getestet.

Stimulationen mit Vorinkubation

In einigen Versuchen wurden Vorinkubationen verwendet. Eine Übersicht über die Stimuli bei Vorinkubation und ihre Verwendung im Versuch gibt Tabelle 2.4.

Stimuli	**Vorgehensweise**
IFNγ [100 µg/ml]	- Ausplattieren der Zellsuspensionen auf 96-Well Platte - Zugabe von IFNγ entsprechend einer Endkonzentration von 20 ng/ml im Well - Inkubation für 3 h bei 37 °C, 5 % CO_2 - Stimulation
LPS [1 mg/ml] + ATP [1 M]	- Zugabe von 1 µg/ml LPS (Endkonzentration) zur Zellsuspension - Ausplattieren auf 6-well Platte, Inkubation 4 h bei 7 °C, 5 % CO_2

	- Zellen ernten, zentrifugieren, Überstand (ÜS) verwerfen, Zellpellet resuspendieren in RPMI^{comp} - Zugabe von 1 mM ATP (Endkonzentration), Inkubation 10 min bei RT - zentrifugieren, ÜS verwerfen, Zellpellet resuspendieren in RPMI^{comp} - Ausplattieren auf 96-Well Platte, Stimulation
IFNγ + ATP	- Zugabe von 20 ng/ml IFNγ (Endkonzentration) zur Zellsuspension - Inkubation 3 h bei 37 °C (Wasserbad) - zentrifugieren, ÜS verwerfen, Zellpellet resuspendieren in Opti-MEM®^{comp} - Zugabe von 5 µM ATP (Endkonzentration), Inkubation 30 min bei 37 °C (Wasserbad) - zentrifugieren, ÜS verwerfen, Zellpellet resuspendieren in RPMI^{comp} - Ausplattieren auf 96-Well Platte, Stimulation

ATP	- Zellsuspension zentrifugieren, ÜS verwerfen, Zellpellet resuspendieren in Opti-MEM®comp - Zugabe von 5 µM ATP (Endkonzentration), Inkubation 30 min bei 37 °C (Wasserbad) - zentrifugieren, ÜS verwerfen, Zellpellet resuspendieren in RPMI^{comp} - Ausplattieren auf 96-Well Platte, Stimulation

Tab. 2.4.: **Vorgehensweise bei Stimulationen mit Vorinkubation.**

2.2.7. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit Hilfe der ELISA-Technik kann ein Antigen (z.B. ein Zytokin wie IL-6) über eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung mit anschließender enzymatischer Farbreaktion nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden. Bei dem hier verwendeten Sandwich-ELISA wurde ein Antigen spezifischer Antikörper (Coating-AK) in einer 96-Well Flachbodenplatte (Maxisorp) immobilisiert (Coating) und mit Proben des zu bestimmenden Stoffes inkubiert. Durch eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen konnte eine Kalibrationskurve zur späteren Quantifizierung des Stoffes erstellt werden.

Die gebundenen Antigene wurden über einen weiteren AK (Detektions-AK) erfasst, welcher spezifisch an ein anderes Epitop des Stoffes band. Dieser Detektionsantikörper war, in der

Regel, biotinmarkiert. Sichtbar gemacht wurde diese Bindung über den Umsatz eines Substrats durch das Enzym Peroxidase (Meerrettichperoxidase (HRP)), welche an Streptavidin gebunden vorlag und an den biotinmarkierten Detektionsantikörper band. Der POD-abhängige Substratumsatz von einem löslichen farblosen Chromogen zu einem löslichen Farbstoff war proportional zur Menge des gebundenen Antigens und konnte aufgrund dieser Farbentwicklung photometrisch erfasst und quantifiziert werden. Zwischen allen Schritten mussten Waschschritte vorgenommen werden, um überschüssiges Material zu entfernen. ELISA-Platten wurden im Plattenphotometer (Emax, Moleculare Devices) bei λ= 490 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm) ausgelesen und mit SoftMaxPro ausgewertet. Die Standardkurve galt als auswertbar bei sigmoidalem Verlauf, wobei der annähernd linear verlaufende Teil zwei Logstufen betragen sollte. Grafiken wurden mit dem Programm SigmaPlot erstellt.

Muriner Il-6 ELISA

Muriner IL6-capture-AK (Stocklösung: 0,5 mg/ml) wurde in PBS^{def} 1:500 verdünnt. Anschließend wurden 96-Well Platten mit 50 µl pro Vertiefung über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die ausgeschlagenen Platten mit 250 µl Blockpuffer für eine Stunde geblockt. Die Platten wurden hier, wie nach jeder weiteren Inkubation, mit Mikroplattenwaschgerät (Skan Washer 400) gewaschen und vor dem jeweils nächsten Schritt ausgeschlagen.

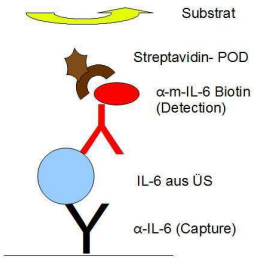

Abb. 2.3.: **IL-6 ELISA (Sandwich-ELISA).**

Die Platten wurden nun mit 50 µl IL-6 haltigen Überständen aus der Stimulation bedeckt und eine dazu passende Standardreihe mit murinem IL-6 Standard in 1:2 Verdünnung pipettiert. Der erste Standard wurde hierbei auf eine Konzentration von 10 ng/ml eingestellt (Stocklösung: 10 µg/ml). Die Platten wurden 1,5 Stunden inkubiert. Im Weiteren wurde je Vertiefung 50 µl Biotin- gekoppelter Detektionsantikörper (Biotin α-mouse IL-6, Stocklösung: 50 µg/ml) in 1:500 Verdünnung und nach 1,5 h Inkubationszeit je 50 µl Enzymkonjugat (Streptavidin-POD Konjugat; Stocklösung: 500 U/ml) in 1:5000 Verdünnung 0,5 Stunden hinzugegeben. Der ELISA wurde abschließend noch einmal gewaschen und mit O-Phenylenediamin Dihydrochlorid (OPD) (20 mg Tablette in 20 ml Substratpuffer mit 20 µl 30 %-igem H_2O_2) entwickelt. Das Abstoppen der Farbreaktion erfolgte mit 2-molarer H_2SO_4 Lösung.

Fc-ELISA zur Antikörper Austestung (96-Well-Platte)

Mit dieser abgewandelten Form eines Fc-ELISA konnten die in den Zellkulturüberständen der Hybridomazellen befindlichen Antikörper (s. 2.3.6) auf ihre Bindungsfähigkeit von hSIGIRR und mSIGIRR (Kreuzreaktivität) getestet werden. Das Beschichten der Platten („Coating“) erfolgte mit α-IgG1-Fc in PBS^{def} 1:1300 Verdünnung (z.B. 4 µl AK auf 5200 µl PBS^{def}) mit 50 µl pro Well. Inkubiert wurde über Nacht bei 4 °C. Die Lösung wurde ausgeschlagen. Für den Block wurde anschlie-

ßend je Vertiefung 250 µl Blockpuffer für 1 h bei RT zugegeben. Die Platten wurden mit dem Mikroplattenwaschgerät gewaschen. Nun konnten Zellkulturüberstände mit m-TLR9-Fc (diese Wells sollten bei spezifisch gegen SIGIRR gerichteten Antikörpern negativ bleiben) bzw. h-SIGIRR-Fc (diese Wells sollten bei spezifisch gegen humanen SIGIRR gerichteten Antikörpern aus Hybridoma Überständen positiv werden) pipettiert werden.

Um die Antikörper auf Kreuzreaktivität zu testen, wurde zusätzlich m-SIGIRR-Fc, ebenfalls aus Zellkulturüberständen, eingesetzt. Alle genannten Zellkulturüberstände mit Fc-Proteinen wurden unverdünnt mit 50 µl/Well verwendet. Die Platten wurden für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten gewaschen und die Überstände aus den Hybridoma-Zellkulturen (auszutestende Antikörper) unverdünnt, sowie in den Verdünnungen 1:5 und 1:25, zugegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Auch nach diesem Schritt wurden die Platten gewaschen. Zur Detektion wurde ein Biotin gekoppelter, gegen den Fc-Teil von Maus IgG gerichteter Antikörper (pure goat α-mouse IgG) in 1:10000 Verdünnung zugegeben (Inkubation 1 h bei RT). Die folgenden Schritte entsprachen dem Vorgehen beim IL-6 ELISA (s.o.).

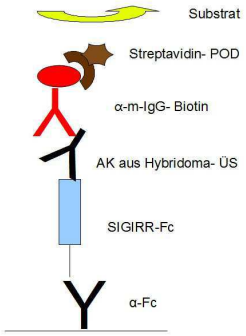

Abb. 2.4.: **Fc-ELISA.**

Bestimmung von Antikörperklassen

SIGIRR-spezifische Antikörper wurden mit einem Subtyp-spezifischen ELISA weiter charakterisiert. Dabei wurde zwischen den AK-Klassen IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 unterschieden.

Der Fc-ELISA wurde wie oben beschrieben durchgeführt, wobei auf m-SIGIRR-Fc und eine Kontrolle mit m-TLR9-Fc verzichtet wurde. Entscheidender Unterschied bestand im Einsatz Subtyp-spezifischen α-mouse-Fc Antikörpern (α-m-IgG1, α-m-IgG2a, α-m-IgG2b, α-m-IgG3). Sie wurden 1:500 verdünnt und mit 50 µl/Well verwendet. Gekoppelt waren diese Detektionsantikörper mit Alkalischer Phosphatase (AP). Desweiteren war hier die Verwendung einer Standardreihe nicht möglich, sondern es erfolgte allein eine qualitative Beurteilung mit der Einteilung in positive Reaktion versus negative Reaktion. Als Substrat diente 4-Nitrophenylphoshat (1 Tablette auf 20 ml Diethanolamin). Die Farbreaktion wurde mit 3-molarer NaOH Lösung abgestoppt.

2.2.8. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Bei der Phänotypisierung im fluorescence-activated cell sorting (FACS) können Zellen mithilfe von Lasern und Photodetektoren auf ihre Größe und Granularität und durch Zuhilfenahme von Fluoreszenzmarkierten Antikörpern auch auf spezielle (Oberflächen-) Merkmale hin untersucht werden.

Alle FACS Färbungen wurden nach laborinternem FACS-Protokoll gehandhabt. Details sind bei den einzelnen Färbungen aufgeführt. Zum Einstellen der Kanäle wurden Einzelfärbungen und ungefärbte Kontrollen mitgeführt. Um den Hintergrund zu detektieren wurde bei Färbung mit Zweitantikörper

dieser auch als Einzelfärbung mitgeführt.

FACS-Oberflächenfärbung

Für die Oberflächenfärbung wurden je $5 * 10^5$ Zellen in FACS-Röhrchen vorgelegt. Im Waschschritt wurde das Volumen mit FACS-Puffer auf 1 ml ergänzt und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Vakuumpumpe abgesaugt (verworfen) und die Zellen mit Fc-Rezeptorblock für 15 min auf Eis inkubiert. Erneut wurde das Volumen auf 1 ml ergänzt, die Röhrchen anschließend zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nun konnte die Färbung durchgeführt werden. Abhängig von der Fragestellung kamen fluoreszenzmarkierte Antikörper für unterschiedliche Oberflächenstrukturen zum Einsatz: Im Mausexperiment wurde die FACS-Analyse verwendet, um eine Übersicht über die Zellpopulation und den Anteil an toten Zellen in der Zellpopulation zu erhalten und auch, um die Reinheit aufgereinigter Zellen zu testen. Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper wurde die FACS-Analyse verwendet, um das Bindungsverhalten der hergestellten Antikörper zu untersuchen. Da diese Antikörper nicht selbst fluoreszierend waren, mussten sie, nach ihrer Bindung an SIGIRR, ihrerseits mit α-mouse-Fc Fluoreszenzantikörpern detektiert werden. Es handelte sich hier also um eine zweistufige Färbung. Ein Fc-Rezeptorblock wurde in diesem Fall nicht verwendet.

Die Messung erfolgte mit dem FACS Calibur Durchflusszytometer unter Verwendung der Software CellQuest (BD). Zur Auswertung der Daten wurde FlowJo 8.11 (Tree Star Inc., Ashland, USA) und Flowing Software 2.5.1 (Turku Center for Biotechnology, Finnland) verwendet.

2.3. Methoden Teil 2: Hybridomazellen und die Herstellung von α-h-SIGIRR Antikörpern

Zur Herstellung von α-h-SIGIRR Antikörpern wurden Mäuse der Mauslinie TIR27BC (s. 2.2.1) mit humanem SIGIRR immunisiert (2.3.5). Das hierfür verwendete humane SIGIRR wurde zuvor aus SIGIRR-Fc durch Abspaltung des Fc Teils im Thrombinverdau (2.3.4) gewonnen. Das Fusionsprotein SIGIRR-Fc wurde aus anderen Arbeiten für diese Arbeit zur Verfügung gestellt, musste aber noch aus Zellkulturüberständen mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography s. 2.3.1) aufgereinigt werden.

Nach der Immunisierung wurden B-Plasmazellen aus homogenisierten Zellsuspensionen von Lymphknoten oder Milz der Mäuse verwendet und mit einer Tumorzelllinie hybridisiert. Die so immortalisierten Zellen produzierten Antikörper wurden auf ihre Spezifität gegenüber SIGIRR getestet (s. Fc-ELISA S. 2.2.7). Zur Aufreinigung der Antikörper aus den Zellkulturüberständen kam erneut die FPLC zum Einsatz.

2.3.1. Proteinaufreinigung mit Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Die fast protein liquid chromatography (FPLC) wurde genutzt um SIGIRR-Fc Fusionsprotein (dieses wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit hergestellt, sondern aus anderen Arbeiten zur Verfügung gestellt) oder Antikörper gegen humanes SIGIRR aus Zellkulturüberständen aufzureinigen.

Die Proteinaufreinigung mit FPLC beruht auf der Bindung

des Fc-Teils von Antikörpern oder des SIGIRR-Fc Fusionsproteins an eine mit Protein A beschichtete Matrix (Protein-A Säule). Die Bindungseigenschaften der Proteine an der Säule werden durch den pH-Wert der Umgebung beeinflusst. So begünstigt ein pH-Wert im physiologischen Bereich die Bindung an Protein A, ein saurer pH-Wert wird zum Lösen von der Matrix genutzt. Bindungs- und Elutions-pH-Werte für verschiedene humane und murine AK-Klassen sind Tabelle 2.5 zu entnehmen.

Bei der FPLC führt eine Pumpe den aufzureinigenden Kulturüberstand über ein Schlauchsystem in fester Geschwindigkeit über die Säule. Über ein an das System angeschlossenes Spektrometer werden Änderungen in der Absorption gemessen. So kann der Proteingehalt des Mediums bestimmt und entsprechende Fraktionen gezielt aufgefangen werden.

Vor Beginn der Aufreinigung wurde das System mit angeschlossener 1 ml Säule mit 10 ml PBS^{def} gespült. Anschließend wurden der Kulturüberstand mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min über die Säule geleitet. Es war darauf zu achten, dass der pH-Wert des Kulturüberstandes im Bereich des Bindungs-pH lag. Es folgte ein Waschschritt mit 15 ml PBS^{def} (für murine Antikörper gegen humanes SIGIRR) oder 10 ml Trislösung (für humanes SIGIRR-Fc Fusionsprotein): Unerwünschtes, nur schwach an der Säule haftendes Material wurde so entfernt.

Im Anschluss wurde die Elution der Proteine (Antikörper oder humanes SIGIRR-Fc Fusionsprotein) von der Säule mit auf den Elutions pH-Wert (vgl. 2.5) eingestellter 100 mM Glycinlösung durchgeführt. Ein Ausschlag des Spektrometers bei

Antikörper	Bindungs-stärke	Bindungs-pH	Elutions pH
Human			
IgG1	sehr hoch	6,0-7,0	3,5-4,5
IgG2	sehr hoch	6,0-7,0	3,5-4,5
IgG3	niedrig-keine	8,0-9,0	3,0-6,0
IgG4	niedrig-hoch	7,0-8,0	3,0-6,0
Maus			
IgG1	niedrig	8,0-9,0	4,5-6,0
IgG2a	mittel	7,0-8,0	3,5-5,5
IgG2b	hoch	ca. 7,0	3,0-4,0
IgG3	niedrig-hoch	ca. 7,0	3,5-5,5

Tab. 2.5.: **pH-Werte für Antikörperbindung an eine Protein A-Säule.** Tabelle adaptiert von: *Instructions 71-7002-00 AP, GE Healthcare* [34].

λ= 280 nm zeigte den Beginn der eluierten Proteinfraktion an. Ab diesem Zeitpunkt wurden je 200 µl pro Eppendorftube aufgefangen und der saure pH-Wert durch in die Eppendorftubes vorgelegtes Tris-OH (1,5 M, pH 8,5) neutralisiert. Die notwendige Verhältnis von Tris-OH (ca. 3 µl) zu Glycinlösung war jeweils vor Beginn der Elution bestimmt worden, um einen neutralen pH-Wert zu gewährleisten.

Abschließend wurde die Säule mit 5 ml Glycinlösung, 5 ml PBS^{def} und 4 ml Ethanol (20 %) gespült und bis zur erneuten Verwendung aufbewahrt.

Danach wurde im Nanodrop die Proteinkonzentration in den einzelnen aufgefangenen Fraktionen (s.o.) gemessen: Proben mit hohen Proteinkonzentrationen wurden vereinigt und gegen 2 l PBS^{def} dialysiert (Dialysekassetten: Slide-A-Lyzer; PIERCE, Rockford, USA [3]). Zur Äquilibrierung wurden die Proben über Nacht (bei 4 °C) in PBS belassen, am Morgen wurde PBS^{def} gewechselt und erneut für 3 h dialysiert. Alle Proben wurden steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

2.3.2. Bestimmung von Proteinkonzentrationen im NanoDrop

Zur schnellen Konzentrationsbestimmung von Antikörpern oder SIGIRR-Fc im Eluat wurde der NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) verwendet. Dieses Gerät nutzt ein photometrisches Messverfahren, dessen Vorteil in dem geringen benötigten Probenvolumen von 0,5 - 2 µl besteht. Die Verwendung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte bei einer Wellen-

[3] Verwendung entsprechend Herstellerangaben

länge von λ= 280 nm.

2.3.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen im BCA-Test

Proteine bilden mit Cu^{2+}-Ionen in alkalischen Lösungen Komplexe. Diese Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, der im BCA- Test zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen genutzt werden kann [80].

Die Testausführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben (BCA Protein Assay Kit; Pierce, Rockford, USA). Die Farbreaktion wurde gegen die Referenzwellenlänge von λ= 490-650 nm im ELISA-Reader ausgelesen und die Konzentration der Probe anhand einer BSA- Standardreihe (erster Standard: 1 mg/ml BSA) bestimmt (Programm: SoftMaxPro).

2.3.4. Thrombinverdau von humanem SIGIRR-Fc

Für die Immunisierung von SIGIRR ko Mäusen wurde humanes SIGIRR aus zuvor aufgereinigtem hSIGIRR-Fc Fusionsprotein verwendet (vgl. 2.3.1). Dieses Fusionsprotein beinhaltet eine klonierte Schnittstelle für den Thrombinverdau und ermöglicht damit eine Trennung von hSIGIRR vom Fc-Teil.

Für den Thrombinverdau wurden 520 µg hSIGIRR-Fc mit 10 µl Thrombin (Konzentration: 1 U/µl) über Nacht (ü.N.) bei RT inkubiert. Die Aufreinigung dieses Gemisches nach dem Verdau erfolgte von Hand über eine Protein A-Säule (GE Healthcare): Alle Proben und Puffer wurden sterilfiltriert. Die Säule wurde mit 5 ml PBS^{def} gespült. Anschließend wurde die Probe (= hSIGIRR mit Fc, nach Verdau) in die senkrecht gehaltene Säule eingespritzt und je drei Tropfen (ca. 100 µl) in

Eppendorftubes aufgefangen (= Durchlauf mit hSGIRR). Die Säule wurde nun mit 2 ml PBS^{def} gespült. Anschließend wurde die Säule mit 3 ml Glycinlösung eluiert und je ca. 200 µl in Eppendorftubes mit vorgelegter Tris-OH (je 3 µl; 1,5 M, pH 8,5) gesammelt (= Eluat mit Fc-Teil). Zum Schluss wurde die Säule nacheinander mit 5 ml Glycinlösung, 4 ml PBS^{def} und 4 ml Ethanol (20 %) gespült.

Proteinkonzentrationen wurden im NanoDrop (2.3.2) gemessen. Proben mit hoher Proteinkonzentration an hSIGIRR wurden vereinigt, dialysiert und bei 4 °C aufbewahrt.

Eine Kontrolle des Verdaus erfolgte im SDS-Gel (s. 2.3.10) mit Coomassie-Färbung (s. Abb. 2.5) und eine Kontrolle der Schnittstelle zusätzlich mit N-terminaler Edman-Sequenzierung (Biochemisches Institut, Justus Liebig Universität Gießen).

2.3.5. Immunisierung von SIGIRR-ko Mäusen

Bei der Immunisierung wird ein dem Organismus fremdes Antigen eingebracht, welches zu einer Immunreaktion des Organismus und zur Produktion von Antikörpern führt.

Die verwendeten Mäuse waren 72 Tage alte $SIGIRR^{-/-}$ Tiere der Linie TIR27BC (vgl. auch Abschnitt 2.2.1). Sie wurden nach zwei Methoden immunisiert: subkutan (foot pad) oder intraperitoneal. Das subkutane Immunisierungsschema sah Injektionen am Tag 0, Tag 4 und Tag 7 vor mit Entnahme der inguinalen Lymphknoten am Tag 8. Nach dem intraperitonealen Immunisierungsschema wurden die Mäuse am Tag 0 und Tag 21 immunisiert, die Entnahme der Milz erfolgte an Tag 24. Für die Immunisierung wurde die vorbereitete Injektionslösung (s.u.) in Pfoten (subkutan) oder Bauchraum (intraperi-

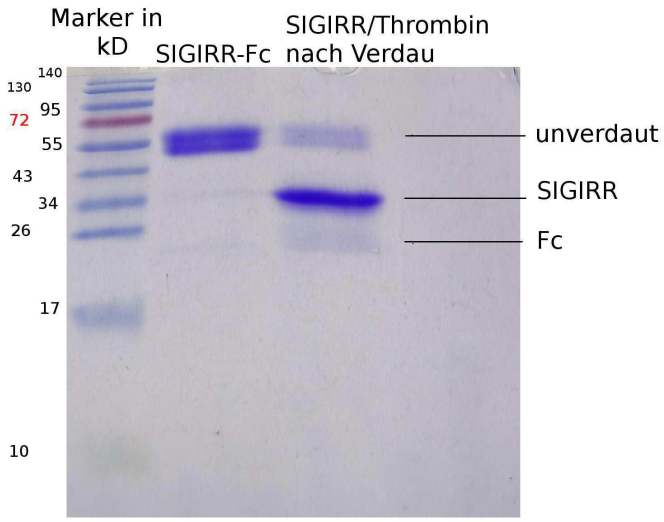

Abb. 2.5.: **Darstellung von SIGIRR-Fc im SDS-Gel mit Coomassie-Färbung.** Test von SIGIRR-Fc nach Aufreinigung und Thrombinverdau zur Abspaltung des Fc-Teils.

toneal) injiziert. Das Antigen war humanes SIGIRR, wie unter 2.3.4 beschrieben. Für das subkutane Immunisierungsschema wurden je 165 µl hSIGIRR mit 20 µl CpG-DNA (1668PTO) als Adjuvanz eingesetzt, für das intraperitoneale Immunisierungsschema je 250 µl hSIGIRR und 20 µl CpG-DNA (1668PTO).

2.3.6. Generierung von Hybridoma-Zellen

Zur Generierung von Hybridoma-Zellen wurden B-Plasmazellen aus homogenisierten Zellsuspensionen von Lymphknoten oder Milz immunisierter Mäuse (s. Abschnitt 2.3.5) mit der Tumorzelllinie Ag8P3X (Myelomazellen) hybridisiert.

Ziel der Hybridiserung war die Immortalisierung der B-Zellen bei erhaltener Antikörperproduktion. Im Hybridisierungsvorgang destabilisiert das Detergenz Polyethylenglycol (PEG) die Zellmembranen der Zellen, was eine Fusion ermöglicht. Durch die langsame erneute Zugabe von Zellkulturmedium wird PEG verdünnt und die Zellmembranen stabilisieren sich wieder. Nicht fusionierte B-Zellen überleben in Kultur nicht. Unfusionierte Zellen der Tumorzelllinie, oder Myeloma-Myeloma-Hybride werden durch die Nutzung eines Selektionsmediums (= H(-ypoxanthin)-A(-minopterin-T(-hymidin)-Medium, hier Opti-MEM®-HAT), aussortiert. Dabei inhibiert Aminopterin die de novo Synthese von Guanosintriphosphat (GTP) und Thymidintriphosphat (TTP). B-Zellen können über einen alternativen Syntheseweg (über das Enzym HGPRT) GTP aus Hypoxanthin synthetisieren. Myelomazellen fehlt durch eine Mutation dieses Enzym, damit können sie das Nukleotid GTP bei Verwendung von HAT-Medium nicht produzieren und gehen zugrunde. Damit alle Zellen auch weiterhin TTP herstellen könnten wird Thymidin dem Medium zugesetzt. [56, 91]

Als Zellkulturmedium wurde hier, wenn nicht anders beschrieben, Opti-MEM® verwendet. Opti-MEM® ist ein modifiziertes Minimalmedium („Eagle's minimal Essential Medium“ (MEM)), das es erlaubt, den Anteil von FCS im Kulturmedium zu reduzieren. Weiterhin wurde der Anteil an $CaCl_2$ im Medium auf 99,9 mg/L reduziert, um die Arbeit mit Hybridomazellen zu vereinfachen [10].
Ag8P3X-Zellen (Myelomazellen) wurden drei mal mit RPMI (ohne Zusätze) gewaschen. Dann wurden Myelomazellen und B-Zellen im Glasröhrchen im Verhältnis 2:1 gemischt. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 1300 rpm (350 g) über fünf Minuten. Anschließend wurde das Medium (RPMI) abgesaugt und die Zellen resuspendiert. Nun konnte 1 ml PEG (37 °C) tropfenweise innerhalb einer Minute zugegeben werden. In diesem und allen folgenden Schritten wurde das Röhrchen vorsichtig gedreht. Nach 60 Sekunden wurde innerhalb der nächsten Minute zunächst 2 ml Opti-MEM®comp (37 °C) zugegeben, danach 4 ml und 8 ml ebenfalls je innerhalb einer Minute. Der Vorgang wurde durch eine Zentrifugation bei 1400 rpm (406 g) über 10 min bei Raumtemperatur beendet. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen in Hybridoma Selektionsmedium (Opti-MEM®-HAT, Zusammensetzung: s. Seite 28) aufgenommen und auf 96-Well Flachbodenplatten mit 200 µl je Vertiefung ausplattiert.

Die Platten wurden regelmäßig makroskopisch und mikroskopisch kontrolliert. Stellten sich Zellkolonien für das bloße Auge sichtbar dar, so wurde eine Probe des Zellkulturüberstandes abgenommen und auf Antikörper gegen humanes SIGIRR (α-h-SIGIRR) getestet (s. 2.2.7). Positiv getestete Zell-

populationen wurden subkloniert und expandiert (siehe unten (s.u.)). Antikörperhaltige Zellkulturüberstände wurden bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.7. Zellkultur und Subklonierung

Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen und entsprechend den Anforderungen der Zelllinien gehandhabt.

Die Subklonierung diente in den Zellkulturen dazu, eine Überwucherung der Hybridoma-Zellkultur mit Klonen, die keine oder nur noch unspezifische Antikörper herstellen, zu verhindern. Weiterhin dienten Subklonierungen auch dazu, Monoklonalität zu erreichen.

Zur Subklonierung wurden zunächst Hybridoma-Zellen aus den angelegten Zellkulturen entnommen, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und die Zellzahl mit Hilfe der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

Die Zellen wurden vereinzelt, so dass sich beim Ausplattieren auf 96-Well Platten eine statistische Verteilung von einer Zelle mit je 200 µl pro Vertiefung ergab. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach etwa zwei Wochen wurden in einzelnen Vertiefungen Zellkolonien sichtbar. Ausgewählte Klone wurden nun erneut auf SIGIRR spezifische Antikörperproduktion getestet. War diese gegeben, wurden die entsprechenden Kolonien expandiert und in regelmäßigen Abständen erneut getestet. Zur Sicherung der Zellklone wurden diese eingefroren (s. 2.3.8).

2.3.8. Einfrieren und Auftauen von Zellklonen

Alle Schritte bis zum Einfrieren der Hybridoma-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt und die Zellen zwischen den Arbeitsschritten auf Eis gelagert. Das Einfriermedium (Zusammensetzung: s. Abschnitt 2.2, S. 28) wurde vorbereitet und die Zellen 7 min bei 1300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Kulturmedium der Zellen wurde abgenommen und bei 4 °C zur Austestung der darin enthaltener Antikörper aufbewahrt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium suspendiert und möglichst rasch 0,8 ml davon in die auf Eis vorgekühlten Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden nun in einen bei 4 °C vorgekühlten Isopropanolständer gestellt. Für das Herunterkühlen der Proben wurde der Behälter über Nacht im -80 °C Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben trockeneisgekühlt transportiert und zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurde Zellkulturmedium in 50 ml Bluecaps vorgelegt und auf Eis bereitgestellt. Die eingefrorenen Zellen wurden nun vorsichtig im Wasserbad bei 37 °C unter leichtem Schütteln aufgetaut. Unter der Sterilbank wurden die Zellen schließlich in das vorgelegte Medium überführt. Nach Zentrifugation (1300 rpm, 350 g, 7 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, die Zellen resuspendiert, nach einer Wiederholung dieses Vorgangs in eine Kulturflasche gegeben und den Anforderungen der Zellen entsprechend inkubiert.

2.3.9. HEK-Zellen- Humane embryonale Nierenzellen

Zellen der Zelllinie HEK293 waren mit Sp-hSIGIRR-HA oder Sp-mSIGIRR-HA (murines oder humanes SIGIRR mit Signal-

peptid und HA-Markierung) transfiziert und wurden zur Austestung der α-hSIGIRR Antikörper in Kultur gehalten.

HEK Zellen wurden mit DMEM^{comp} auf Kulturschalen (Falcon, blau) oder in Kulturflaschen (Greinert) gehalten. Zur Zellernte und zum Umsetzen der Zellen wurde der ÜS abgeschüttet und die Flasche oder Schale vorsichtig mit PBS^{def} ausgeschwenkt. PBS^{def} wurde ebenfalls abgeschüttet und stattdessen ca. 1 ml 1x Trypsin (vgl. Materialteil) auf den in der Schale anhaftenden Zellrasen gegeben. Die aufschwimmenden Zellen wurden durch Beklopfen der Schale gänzlich gelöst. Schließlich wurde, zur Neutralisation des Trypsins, ca. 10 ml DMEM^{comp} zugegeben. Aufschwimmende Zellen und Medium wurden in ein 50 ml Falcon gegeben und bei 1300 rpm (ca. 350 g) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl ermittelt. Die Zellen standen nun zur Verwendung bereit, z.B. wurden Lysate dieser Zellen im Western-Blot und intakte Zellen in FACS-Analysen verwendet.

2.3.10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der Polyacrylamid-Gelelektophorese (PAGE) können Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Diese Technik wurde verwendet, um die Reinheit der Proteinaufreinigungen (h-SIGIRR-Fc und α-h-SIGIRR Antikörper, vgl. 2.3.1) zu überprüfen indem Proteinlösungen aus unterschiedlichen Aufreinigungsschritten aufgetragen wurden. Der SDS-PAGE ist auch der erste Schritt beim Western-Blot, der zur Austestung der Antikörper aus den Immunisierungen verwendet wurde.

Durch die Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS), ei-

nem anionischen Detergens, werden Proteine denaturiert und SDS-Moleküle lagern sich proportional zur Größe des Proteins durch nicht-kovalente Wechselwirkungen an hydrophoben Bereichen von Aminosäuren an. Durch diesen Besatz und die komplette Entfaltung werden Ladungsunterschiede ausgeglichen. Die nun negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode. β-Mercaptoethanol reduziert zusätzlich Disulfidbrücken zu Thiolgruppen und trennt auf diese Weise Proteinuntereinheiten voneinander. Dies unterbindet den Einfluss von Sekundärstrukturen auf die Laufweite. In diesem Fall wurde die diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli angewandt. Dabei wird dem Trenngel (TG) ein sogenanntes Sammelgel (SG) mit weiten Poren vorangestellt, dessen pH-Wert um zwei Einheiten niedriger liegt als der des Trenngels. Die Banden werden so verschärft und sauberer getrennt.

Für die Herstellung zweier Gele wurden die Reagenzien entsprechend laborinternen Vorgaben (vgl. Tab.: 2.6) verwendet. Ammoniumpersulfat und TEMED wurden erst unmittelbar vor dem Gießen zugegeben, da sie die Polymerisation einleiten. Die Glasplatten wurden gründlich mit H_2O und 70 % Ethanol gereinigt und in der Apparatur zusammengebaut. Zunächst wurde das TG bis zur gewünschten Höhe eingegossen und mit H_2O überschichtet, die Polymerisation des TG dauerte ca. 30 Minuten. H_2O wurde abgegossen, das TG mit dem SG überschichtet und der Kamm eingesteckt, das Gel polymerisierte ü.N. bei 4 °C aus. Die Gelkammer wurde mit Laufpuffer befüllt, der Kamm entfernt und die Taschen mit Laufpuffer gespült. 12 - 20 µl der jeweiligen Probe wurden aufgetragen und als Proteingrößenmarker 5 µl des Page Ruler Prestained Protein Ladder verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen

Trenngel (TG)		**Sammelgel (SG)**	
H_2O	3248 µl	H_2O	2700 µl
TG-Puffer	2346 µl	SG-Puffer	1580 µl
Acrylamid	3836 µl	Acrylamid	652 µl
APS (20 %)	16,8 µl	APS (20 %)	11,2 µl
TEMED	6,6 µl	TEMED	4,5 µl

Tab. 2.6.: **SDS-Gel.** Angaben für je 2 Gele (12 -%ig)

mit 2 x Probenpuffer (PP) versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Bis zum Eintritt ins TG wurde an das Gel eine Spannung von 80 V angelegt, für die Auftrennung im TG eine Spannung von 120 V. Die fertigen Gele konnten direkt mit Coomassie gefärbt oder für einen Western Blot verwendet werden.

2.3.11. Western Blot

An die SDS-Gelelektrophorese konnte ein Western Blot angeschlossen werden. Der Western Blot wurde genutzt, um die in der Immunisierung hergestellten Antikörper auf ihr Bindungsverhalten (gegenüber mSIGIRR-Fc, hSIGIRR-Fc, hSIGIRR-HA, hSpSIGIRR-HA) zu testen.

Für den Western Blot wurden die zuvor aufgetrennten Proteinbanden aus dem Gel auf PVDF Membran (Immobilon Transfer Membran; Millipore) übertragen. An die mit Blot-Puffer gefüllte Kammer wurde ein Strom von 25 V für 90 Minuten angelegt. Die Membranen wurden zuvor zur Aktivierung der Proteinbindungsstellen kurz in Methanol gelegt. Nach Abschluss des Verfahrens wurden die Membranen getrocknet. [27, 80]

Western Blot im Semi-Dry Verfahren

Membranen, Schwämme und Gel wurden in Blot-Puffer eingelegt und feucht auf dem Gerät (TE70X Semy-dry Blotter, Hoefer) verwendet. Die notwendige Amperezahl wurde den Herstellerangaben entsprechend nach Membranfläche berechnet mit 0,8 mA pro Quadratzentimeter: Bei einer Fläche von $7{,}3{*}4{,}45\,\mathrm{cm}^2$ ergab dies entsprechend ca. 25 mA. Die benötigte Zeit ist abhängig von der Größe des Proteins, in vorliegendem Fall waren dies 75 min. Das Verfahren besitzt den Vorteil schneller als die feuchte Kammer zu sein und liefert scharfe Banden. Der Nachteil besteht in einer erschwerten Kühlung und damit einer möglicherweise größeren Hitzeentwicklung [31].

Test der Antikörperüberstände im Western Blot

Nach dem Blotten wurden die getrockneten Membranen mit 5 % Trockenmilchpulver in $\mathrm{PBS}^{\mathrm{def}}$ für 1 h geblockt und anschließend $3{*}10$ min mit Western Blot Waschpuffer gewaschen. Das Blocken der Membran dient neben der Reduktion unspezifischer Bindungsstellen auch der Stabilisation der Proteine [56, 32]. Glasplatten wurden sorgfältig mit Ethanol gesäubert und in einer feuchten Kammer ausgelegt. 500 µl der antikörperhaltigen Überstände der Hybridomazellen wurden unverdünnt oder in 1:2 Verdünnung auf die Glasplatten pipettiert. Die Membranen wurden mit der Proteinseite auf diesen Überständen inkubiert. Die Membranen wurden nun unter zweimaligem Wechsel des Waschpuffers gewaschen und in einem zweiten Schritt mit einem Peroxidase gekoppeltem α-mouse IgG Detektionsantikörper (= α-mouse-POX) inkubiert. Es folgte ein

weiterer Waschschritt, wie oben beschrieben, dann wurden die Membranen mit ECL-Reagenz besprüht. ECL zeigt durch die Aktivität der an den Detektionsantikörper gekoppelten HRP eine Lichtreaktion (Chemolumineszenz).

$$2\ H_2O_2 + \text{Luminol} \overset{HRP}{\rightarrow} 3\text{‘-Aminophosphat} + N_2 + \text{Licht}$$

(Ref.: Calbiochem, DataSheet345818, Rev 19.Nov2009 RFH)

Nach fünfminütiger Inkubation konnte die überschüssige Lösung ausgestrichen und die Membranen in einer Kassette in der Dunkelkammer auf lichtempfindlichem Film aufgelegt werden. Anschließend erfolgte die Entwicklung mit der Entwicklermaschine (Optimax2010, PROTEC, Oberstenfeld).

3. Ex-vivo Stimulation von Milzzellen, B-Zellen und mDCs

3.1. Ergebnisse

3.1.1. Stimulation muriner Milzzellen

Stimulationsexperimente mit Milzzellen wurden durchgeführt, um einen Überblick über die Stimulierbarkeit unselektionierter Zellen, ähnlich den Bedingungen in-vivo, zu erhalten. Auch sollte ein Einfluss von Geschlecht und Alter auf das Stimulationsergebnis untersucht werden.

Bei den verwendeten Milzzellen handelte es sich um eine, in Einzelzellsuspension gebrachte, gemischte Zellpopulation. Die Kontrolle der Zellen erfolgte im FACS (vgl. 2.2.8) mit Färbung auf CD43, B220 und TOPRO. Ruhende B-Zellen zeigten sich B220 positiv und CD43 negativ (vgl. Abb. 3.1). Tote Zellen waren positiv für TOPRO („Totfarbstoff“). Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Stimulationen mit $0,25 * 10^6$ Zellen/Well entsprechend dem unter 2.2.6 beschriebenen Stimulationsschema durchgeführt.

Für den gezeigten Stimulationsversuch (s. Abb. 3.2) wurden Milzzellen vier männlicher Mäuse, zwei Wildtyp und zwei

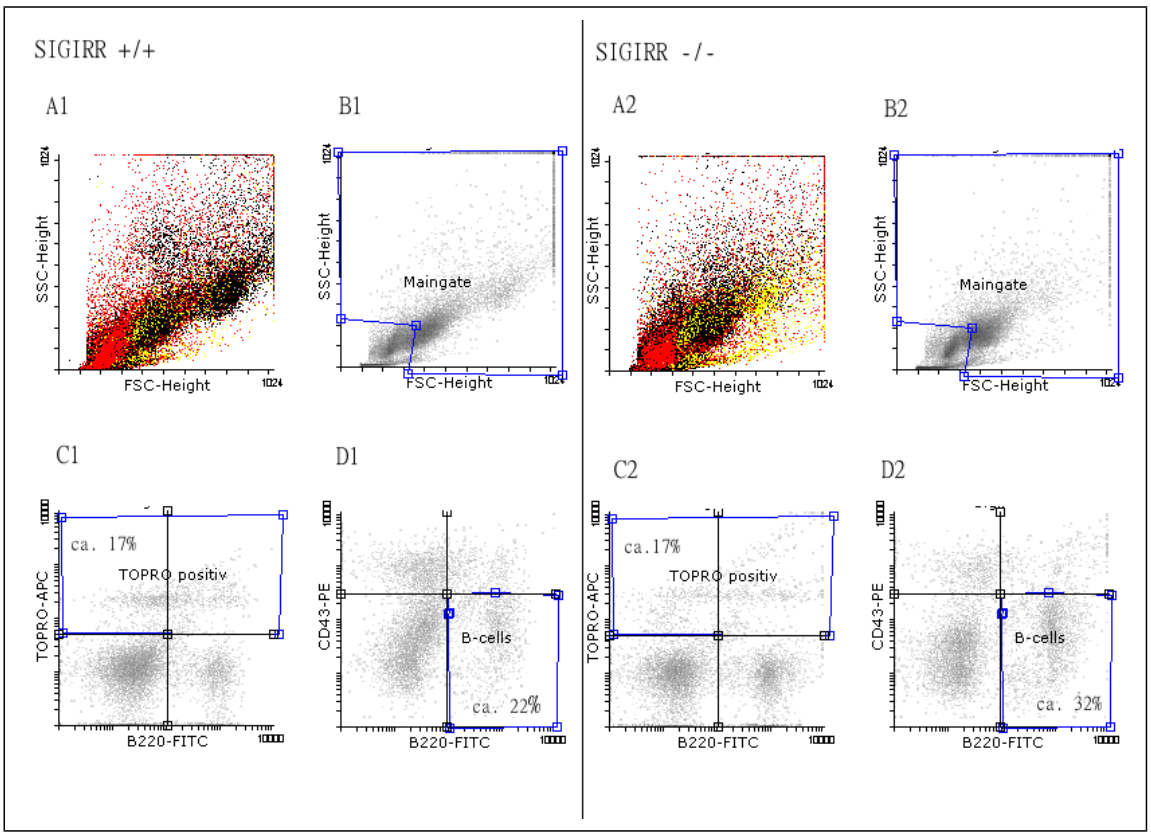

Abb. 3.1.: **Milzzellen im FACS.** Gegenüberstellung von Milzzellen aus Wildtyp- versus Milzzellen aus SIGIRR Knockoutmäusen im FACS. **A** Forward Sideward Scatter aller Zellen; Darstellung der als B-Zellen definierten Zellen ($CD43^{-}B220^{+}$) in gelb, TO-PRO positive Zellen in rot. **B** Definition des Maingates unter Ausschluss des Zelldetritus. **C** TOPRO positive Zellen nach Definition des Maingates. **D** B-Zellen ($CD43^{-}B220^{+}$) gegenüber z.B. T-Zellen, Natürliche Killerzellen, Makrophagen bzw. Monozyten und Granulozyten ($CD43^{+}$).

SIGIRR Knockoutmäuse, im Alter von ca. 19 Wochen, gewonnen und zur Stimulation in sterilen 96-Well Rundbodenplatten ausplattiert. Zur Stimulation wurden die TLR-Liganden 1668PTO (Konzentration im Well: 3 µM, 1 µM, 0,25 µM und 0,08 µM) und LPS (Konzentration im Well: 1 µg/ml) eingesetzt. Medium diente als Negativkontrolle. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 17 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die IL-6 Produktion der Milzzellen wurde im Anschluss im ELISA (vgl. 2.2.7) bestimmt.

In der Auswertung (Abb. 3.2) des IL-6 ELISA fällt auf, dass die Milzzellen einer SIGIRR-Knockoutmaus (grüner Balken) so gut wie keine IL-6 Produktion zeigen. Ebenso keine Reaktion zeigen WT Milzzellen (roter Balken) mit 3 µM 1668PTO. Davon abgesehen zeigt sich für alle anderen Zellen eine schwache Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an 1668PTO (TLR-9 Ligand), wobei die höchste IL-6 Produktion jene Zellen zeigen, die mit 0,25 µM 1668PTO stimuliert wurden. Mehr beziehungsweise (bzw.) weniger 1668PTO führt zu geringerer IL-6 Produktion. Im Vergleich zur Mediumkontrolle und unter Berücksichtigung der Standardabweichung fällt die Reaktion der gemischte Milzzelpopulation auf LPS (TLR-4 Ligand) gering aus. Die insgesamt höchste IL-6 Menge von ca. 2,5 ng/ml zeigen WT Milzzellen (schwarzer Balken) mit 0,25 µM 1668PTO. Auffallend ist vor allem, dass die IL-6 Produktion der Milzzellen einer männlichen Wildtypmaus (schwarzer Balken) im Mittel bis zu ca. 30 % höher ist, als die IL-6 Produktion aus Zellen der anderen beiden Tiere. Die vergleichsweise geringere IL-6 Produktion SIGIRR defizienter Zellen spricht gegen eine Negativregulation der TLR-9 Signalkaskade durch SIGIRR. Die Regulation der TLR-4 Si-

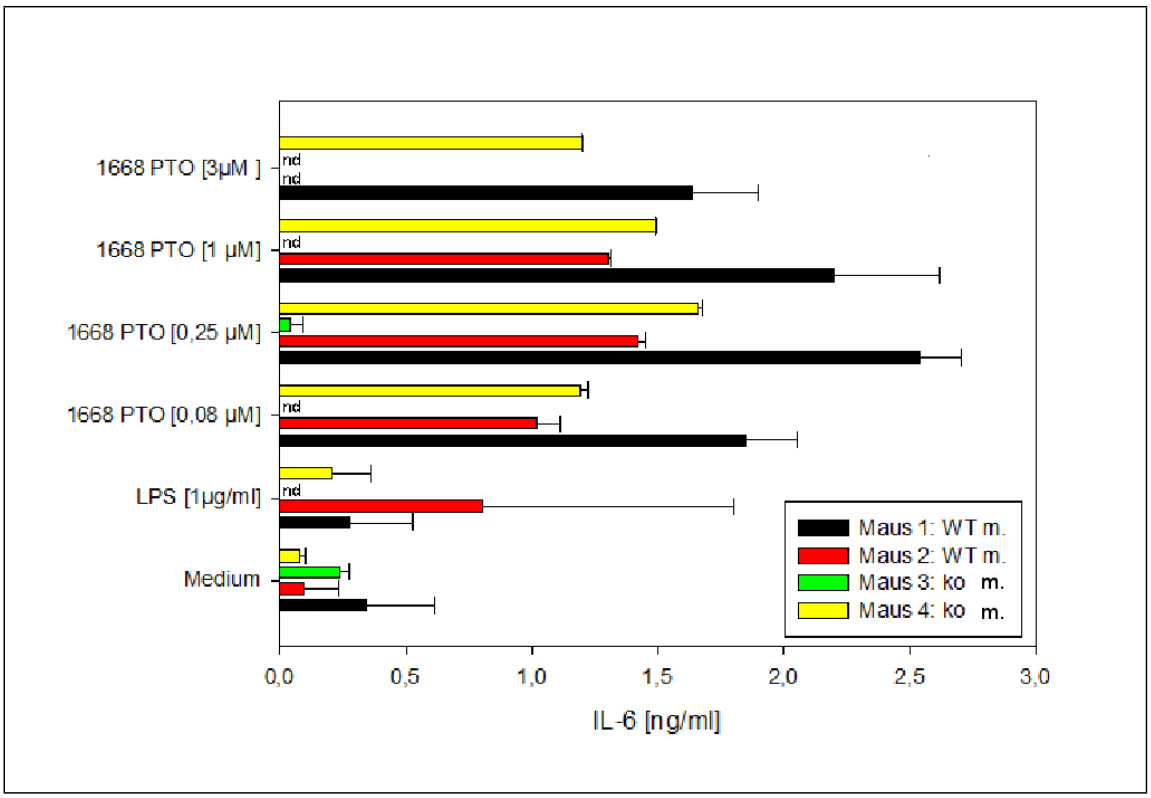

Abb. 3.2.: **Stimulation nicht selektionierter Milzzellen.** IL-6 im ELISA. Doppelbestimmung ± Standardabweichung. Milzzellen (mit $0,25 * 10^6$ Zellen/Well) vier männlicher Mäuse (2 ko: grün, gelb; 2 WT: schwarz, rot) im Alter von 19 Wochen (ko) und 20 Wochen (WT) wurden mit 1668PTO (3 µM, 1 µM, 0,25 µM und 0,08 µM) und LPS (1 µg/l) stimuliert. *nd= nicht detektierbar*

gnalkaskade durch SIGIRR ist, bei nur schwach ausgeprägter IL-6 Antwort, schwer zu beurteilen. Für die Zellen einer Maus war in keinem der Ansätze eine Reaktion nachzuweisen, die stärker gewesen wäre als der Hintergrund des ELISA. Zu vermuten ist daher, dass ein prinzipieller Fehler vorlag, z.B. ein hoher Anteil toter Zellen oder, wahrscheinlicher, ein Fehler beim pipettieren der Zellen in die Vertiefungen der ELISA-Platte. Das Ergebnis dieser Maus ist damit nicht zu werten.

Für alle weiteren Experimente entsprach die Vorgehensweise der oben beschriebenen. Es wurden aber Mäuse unterschiedlichen Alters und/oder Geschlechts verwendet. Abb. 3.3 zeigt das Stimulationsergebnis unselektionierter Milzzellen von Mäusen im Alter von 12 (WT), bzw. 15 Wochen (ko).

Erneut fällt die Reaktion auf LPS schwach aus und die Reaktion auf 1668PTO ist abhängig von der eingesetzten Konzentration. Entgegen den Ergebnissen aus dem vorherig beschriebenem Experiment, findet sich hier jedoch die stärkste IL-6 Antwort auf 1668PTO bei einer eingesetzten Konzentration von 0,08 µM für alle Zellen. Mit ca. 20 ng/ml IL-6 ist auch die maximale Produktion an IL-6 um das fast 10-fache höher. Die Stimulationsergebnisse beider Wildtypmäuse (roter, schwarzer Balken) und der zweiten Knockoutmaus (grüner Balken) fallen vergleichbar stark aus. Dagegen zeigen Milzzellen einer Knockoutmaus (gelber Balken) eine wesentlich stärkere IL-6 Produktion als die der anderen Tiere.

Im in Abb. 3.4 gezeigten Versuch wurden Milzzellen weiblicher Tiere im Alter von 11 Wochen (ko), bzw. 8 Wochen (WT) zur Stimulation verwendet.

In der Auswertung der Stimulation zeigt sich eine minimal höhere IL-6 Produktion SIGIRR defizienter Milzzellen (gelber

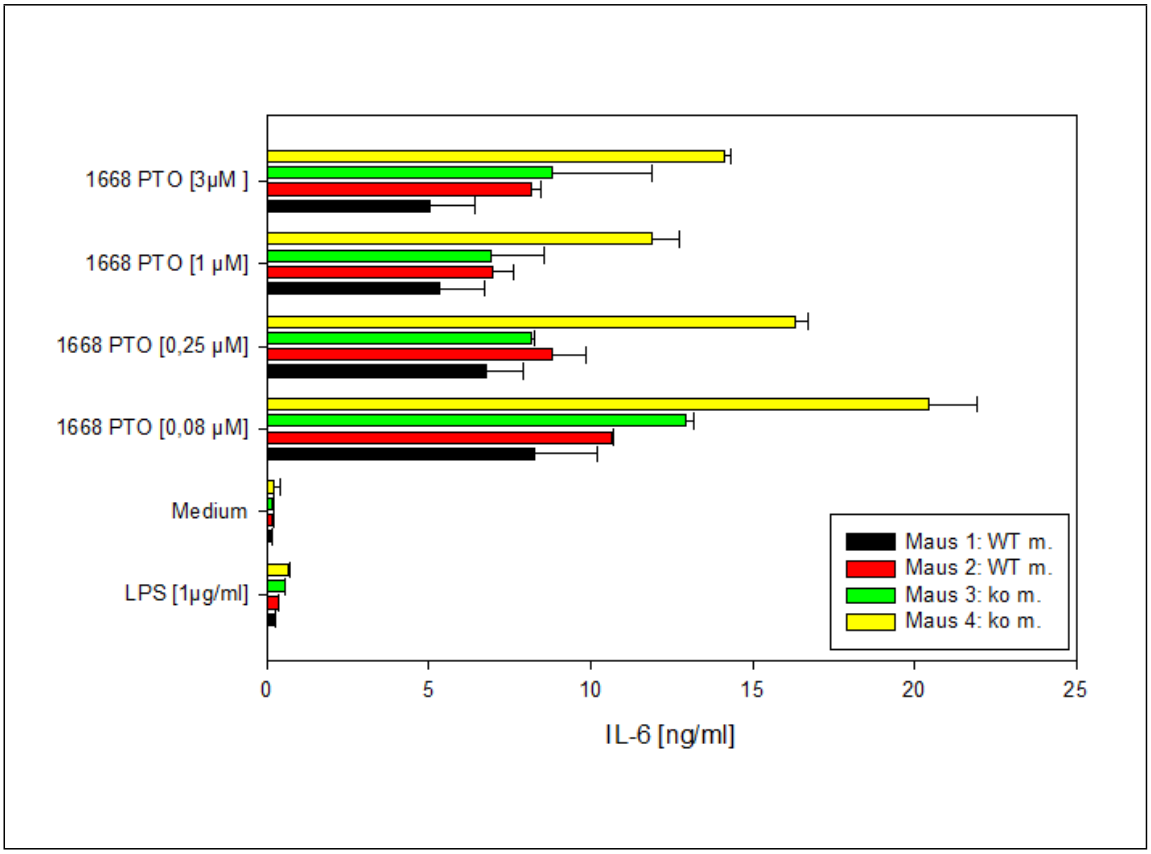

Abb. 3.3.: **Stimulation nicht selektionierter Milzzellen.** IL-6 im ELISA. Doppelbestimmung ± Standardabweichung. Milzzellen (mit $0,25 * 10^6$ Zellen/Well) vier männlicher Mäuse (2 ko: grün, gelb; 2 WT: schwarz, rot) im Alter von 15 Wochen (ko) und 12 Wochen (WT) wurden mit 1668PTO (3 µM, 1 µM, 0,25 µM und 0,08 µM) und LPS(1 µg/l) stimuliert.

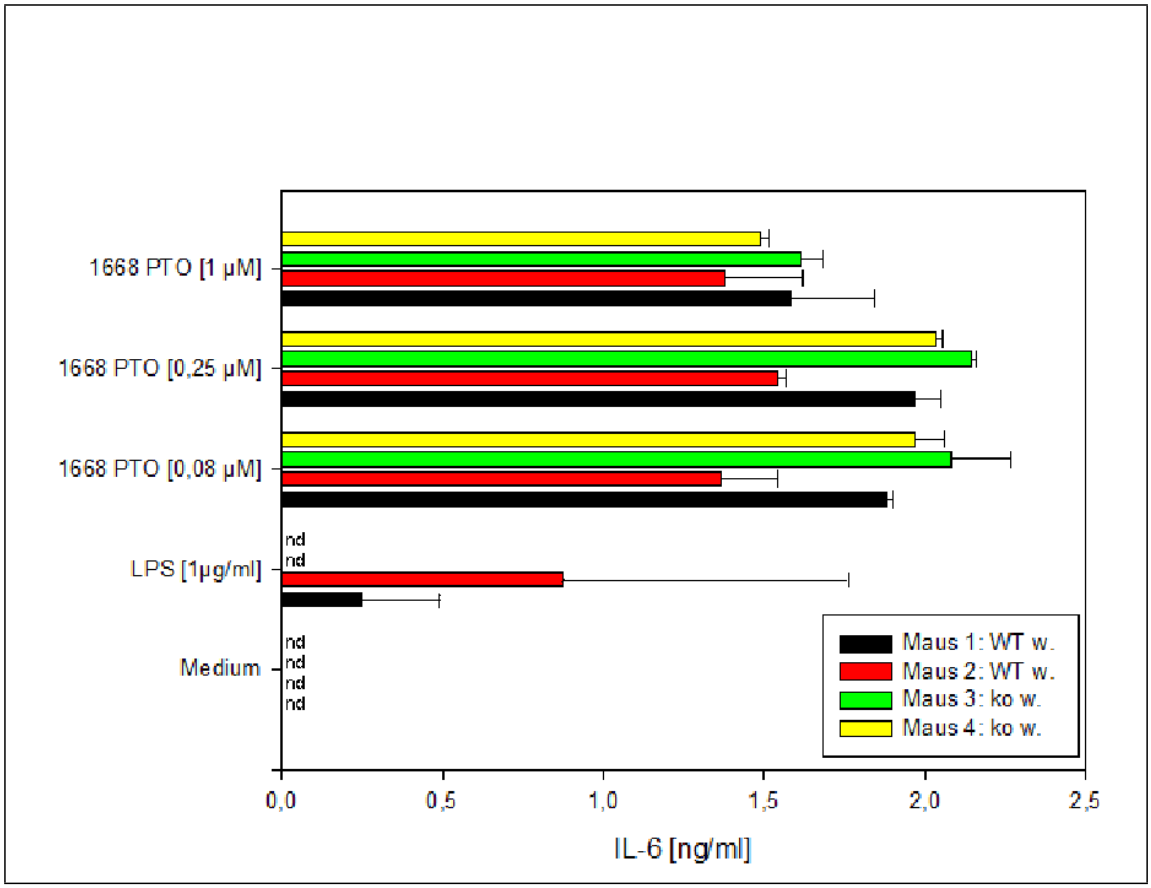

Abb. 3.4.: **Stimulation nicht selektionierter Milzzellen.** IL-6 im ELISA. Doppelbestimmung ± Standardabweichung. Milzzellen (mit $0,25 * 10^6$ Zellen/Well) vier weiblicher Mäuse (2 ko: grün, gelb; 2 WT: schwarz, rot) im Alter von 11 Wochen (ko) und 8 Wochen (WT) wurden mit 1668PTO (3 µM, 1 µM, 0,25 µM und 0,08 µM) und LPS(1 µg/l) stimuliert.
nd= nicht detektierbar.

und grüner Balken) gegenüber Wildtypzellen in allen 1668PTO-Ansätzen. Zu beachten ist dabei, dass der Unterschied zwischen beiden Wildtypmäusen (schwarzer und roter Balken) größer ausfällt, als zwischen ko und WT. In der Auswertung ergaben sich weiterhin sehr hohe Einzelwerte in der LPS Stimulation, hier handelt es sich um, wie der Fehlerbalken zeigt, einzelne Fehlbestimmungen im ELISA. Sie kamen in einer Wiederholung des IL-6 ELISA nicht zur Darstellung, eine Reaktion auf LPS ist daher hier nicht anzunehmen.

Die maximal produzierte IL-6 Menge liegt bei ca. 2,1 ng/ml für SIGIRR$^{-/-}$ Zellen (grüner Balken) bei Stimulation mit 0,25 µM 1668PTO.

Im letzten Experiment (vgl. Abb. 3.5) der Reihe wurden Zellen von zwei männlichen (WT: schwarzer Balken, ko: grüner Balken) mit Zellen von zwei weiblichen Mäusen (WT: roter Balken, ko: gelber Balken) verglichen. Die Tiere waren zu diesem Zeitpunkt ca. 11 Wochen alt. Stimuliert wurden je $0,2{*}10^6$ Zellen/Well. Es zeigt sich eine ähnliche Verteilung bezüglich der Reaktion auf 1668PTO (stärkste Reaktionen bei 0,08 µM bzw. 0,25 µM 1668PTO) wie bisher. Auffällig ist in dieser Stimulation die knapp doppelt so hohe IL-6 Produktion der Milzzellen einer weiblichen Wildtypmaus (roter Balken), die sich damit deutlich von den anderen stimulierten Zellen abhebt.

Es zeigen sich über alle Versuche hinweg, von der Stärke der IL-6 Antwort abgesehen, nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Milzzellansätzen. In der IL-6 Produktion besteht kein reproduzierbarer Unterschied zwischen Knockout und Wildtypmäusen. Selbst wenn Unterschiede zwischen ko und WT zu sehen sind, ist festzustellen, dass die interindividuellen Unterschiede, z.B. zwischen zwei Wildtypmäusen, oft

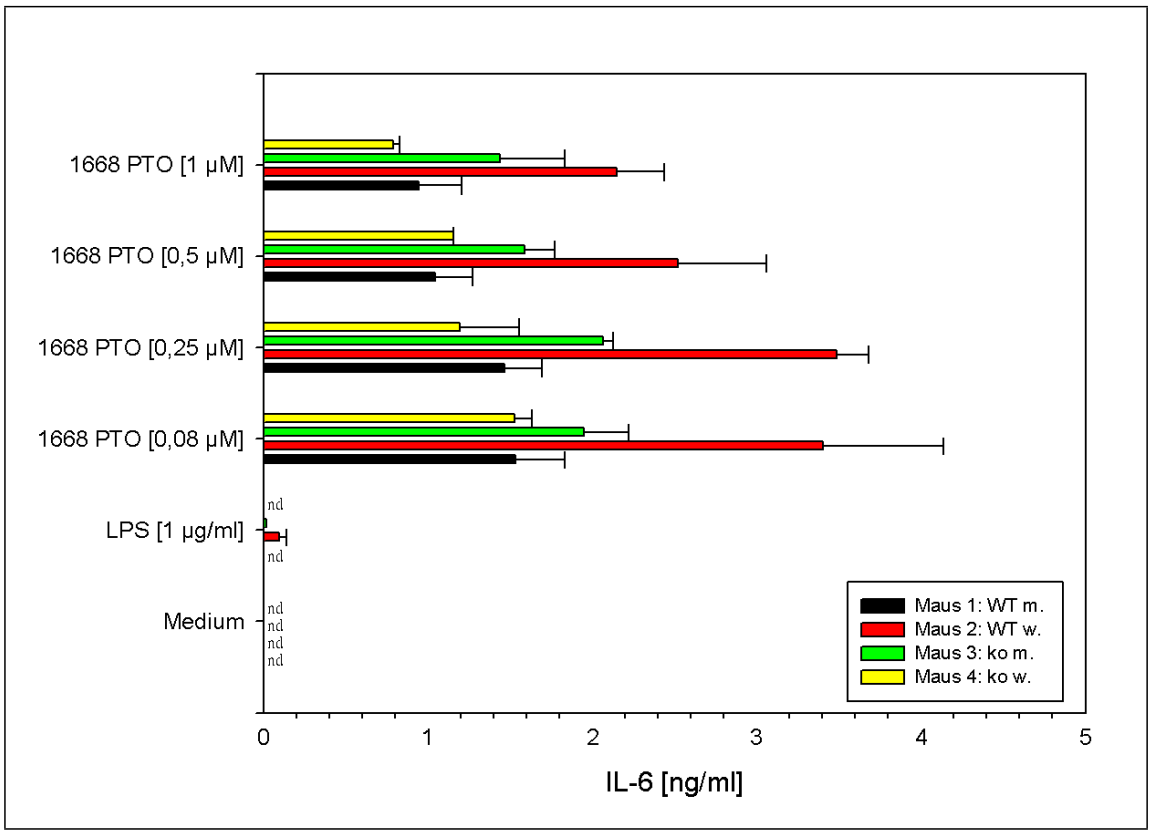

Abb. 3.5.: **Stimulation nicht selektionierter Milzzellen.** Milzzellen (mit $0,2{*}10^6$ Zellen/Well) 2 weiblicher Mäuse und 2 männlicher Mäuse (ko: grün, gelb; WT: schwarz, rot) im Alter von ca. 11 Wochen wurden mit 1668PTO (1 µM, 0,5 µM, 0,25 µM und 0,08 µM) und LPS(1 µg/l) stimuliert.
nd= nicht detektierbar.

größer sind. Diese Beobachtung spricht gegen eine Regulation der TLR-9 vermittelten Signalweg durch SIGIRR. Wie bereits für den ersten hier gezeigten Versuch beschrieben, bleibt die TLR-4 vermittelte Kaskade schwer zu beurteilen.

3.1.2. Stimulation muriner B-Zellen aus der Milz

Zur Untersuchung der Funktion von SIGIRR in B-Zellen wurden murine Zellen aus der Milz, wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben, gewonnen und mit magnetisch aktivierter Zell Separation (vgl. 2.2.5) CD43 negative B-Zellen (naive, rezirkulierende B-Zellen) isoliert. Reinheit und Identität der aufgereinigten B-Zellen wurden im FACS überprüft (vgl. 2.2.8).

In Abb. 3.6 werden Aufreinigungen SIGIRR$^{+/+}$ und SIGIRR$^{-/-}$ B-Zellen gegenübergestellt. Hier wird die gute Reinheit der MACS-aufgereinigten Zellen ersichtlich. Ebenso zeigen sich nur geringe Unterschiede im Anteil toter Zellen an der Gesamtpopulation zwischen Wildtyp und SIGIRR-Knockout. Auffallend sind im gezeigten Ansatz ein sehr hoher Anteil TOPRO-positiver Zellen, in anderen Ansätzen (Ergebnisse nicht gezeigt) war der Prozentsatz toter Zellen zum Teil niedriger, stets aber für SIGIRR$^{+/+}$ und SIGIRR$^{-/-}$ in einem vergleichbaren Rahmen. Auf die Bedeutung der im FACS TOPRO-positiven Zellen soll in der Diskussion näher eingegangen werden.

Die Stimulationen der Zellen erfolgte nach dem oben (2.2.6) beschriebenen Stimulationsschema. Abweichungen davon werden bei den einzelnen Experimenten erläutert.

Im ersten Experiment der Reihe wurden isolierte B-Zellen aus WT- bzw. ko-Mäusen in drei Ansätzen stimuliert und verglichen (s. Abb. 3.7,3.8, 3.9). Im ersten Ansatz (Ansatz 1 „so-

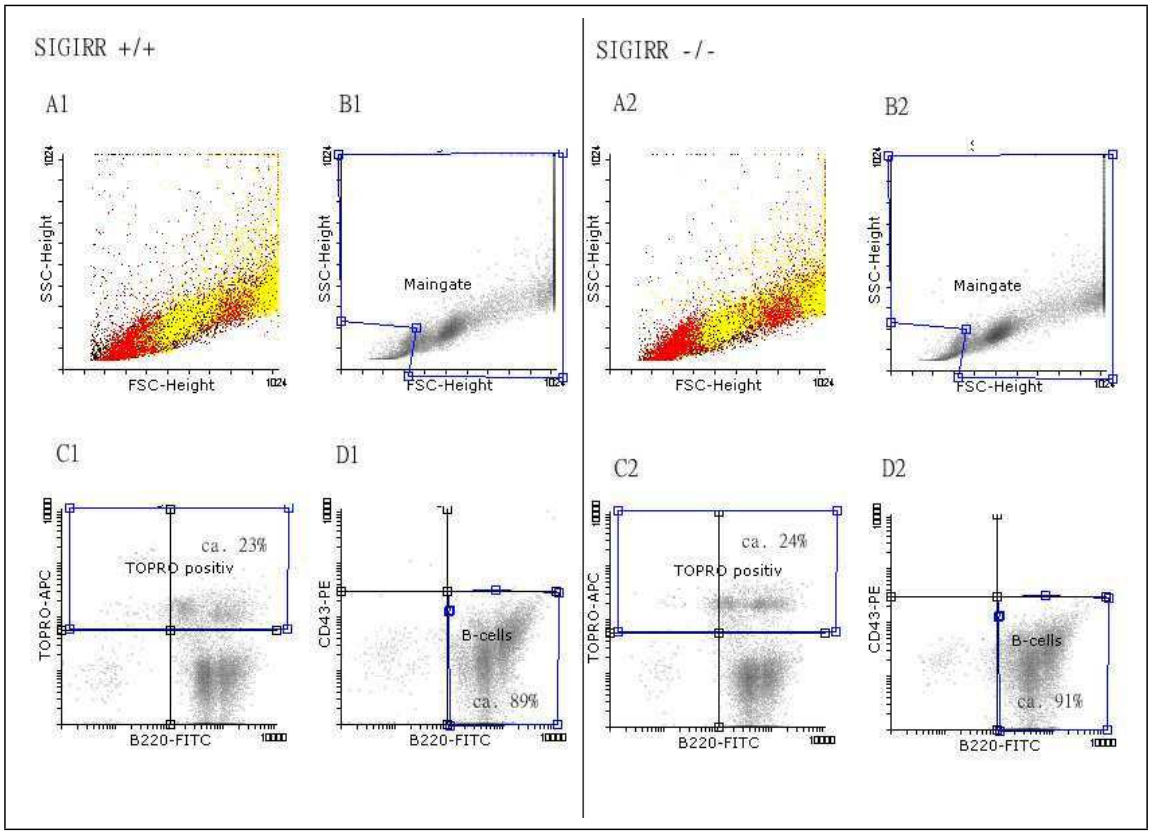

Abb. 3.6.: **B-Zellen nach MACS-Separation.** Darstellung im FACS. **A** Forward Sideward Scatter aller Zellen; Darstellung der als B-Zellen definierten Zellen ($CD43^{+}B220^{+}$) in gelb. **B** Definition des Maingates unter Ausschluss des Zelldetritus. **C** TOPRO positive Zellen nach Definition des Maingates. **D** B-Zellen.

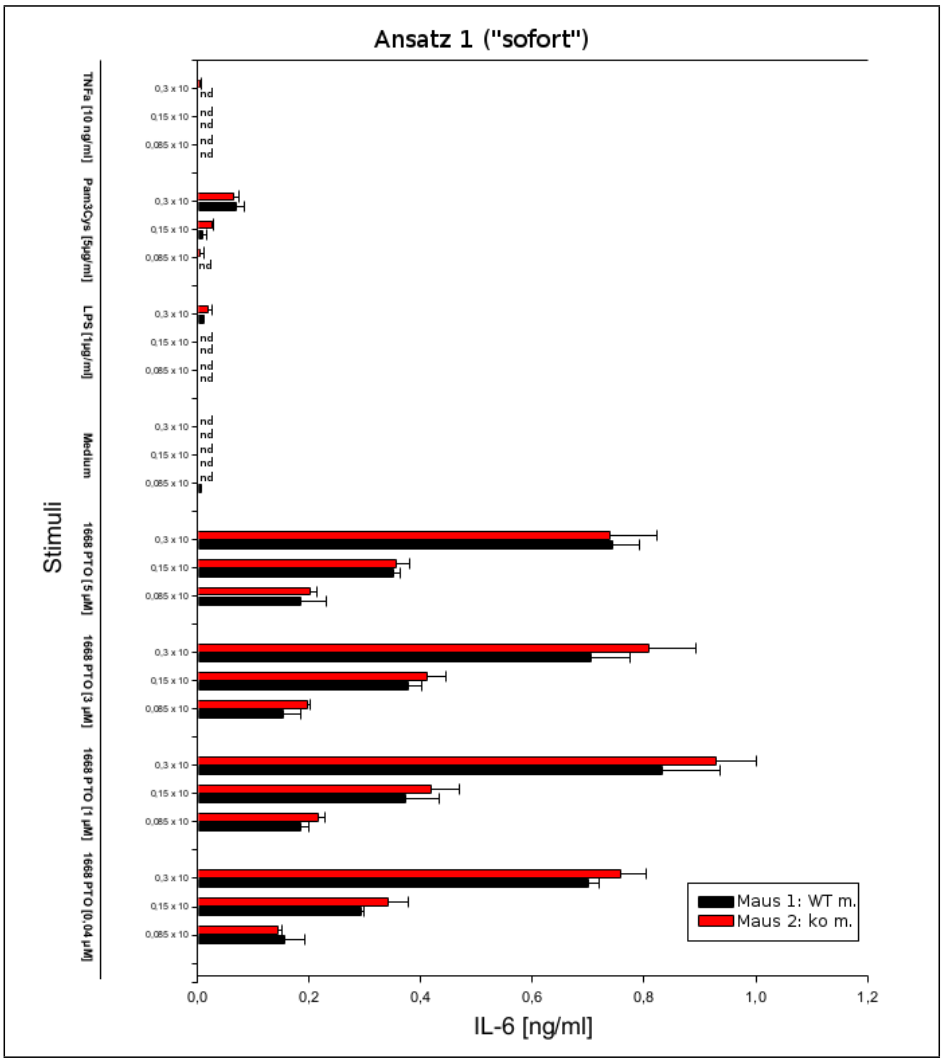

Abb. 3.7.: **Stimulation muriner B-Zellen: Sofortansatz ohne Vorstimulation (= Ansatz 1).** IL-6 ELISA. Doppelbestimmung ± Standardabweichung. $0,3 * 10^6$, $0,15 * 10^6$ oder $0,085 * 10^6$ Zellen mit den Stimuli LPS (1 µg/ml), 1668PTO (5 µM, 3 µM, 1 µM und 0,04 µM) und Pam3Cys (5 µg/ml). Kontrollen mit Medium und TNFα (10 ng/ml). Zellen zwei männlicher Mäuse (WT/ko) im Alter von 8 Wochen.
nd= nicht detektierbar

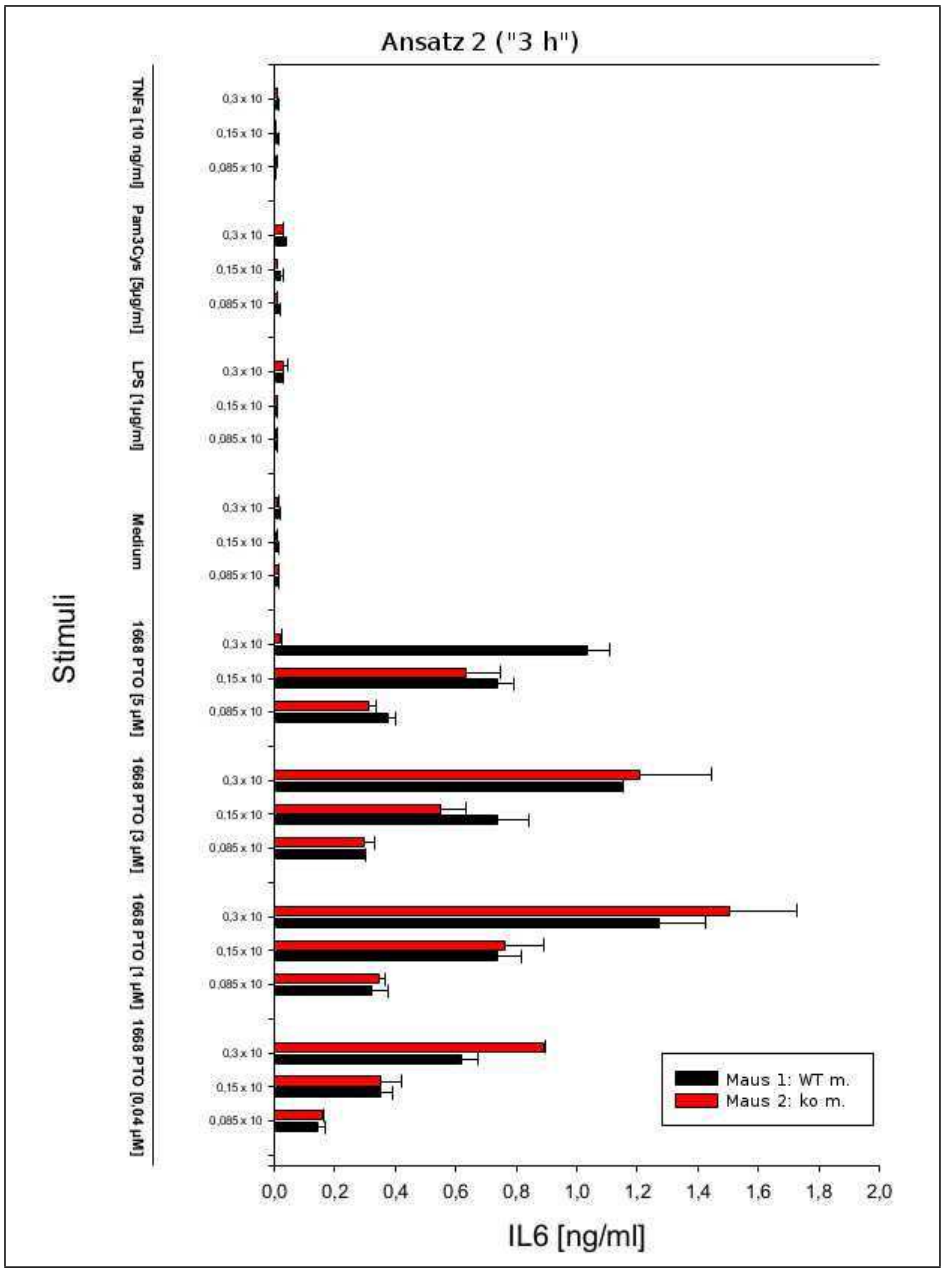

Abb. 3.8.: **Stimulation muriner B-Zellen: Ansatz mit Vorinkubation über 3 Stunden (= Ansatz 2).** IL-6 ELISA. Doppelbestimmung ± Standardabweichung. $0,3 * 10^6$, $0,15 * 10^6$ oder $0,085 * 10^6$ Zellen mit den Stimuli LPS (1 µg/ml), 1668PTO (5 µM, 3 µM, 1 µM und 0,04 µM) und Pam3Cys (5 µg/ml). Kontrollen mit Medium und TNFα (10 ng/ml). Zellen zwei männlicher Mäuse (WT/ko) im Alter von 8 Wochen.
nd= nicht detektierbar

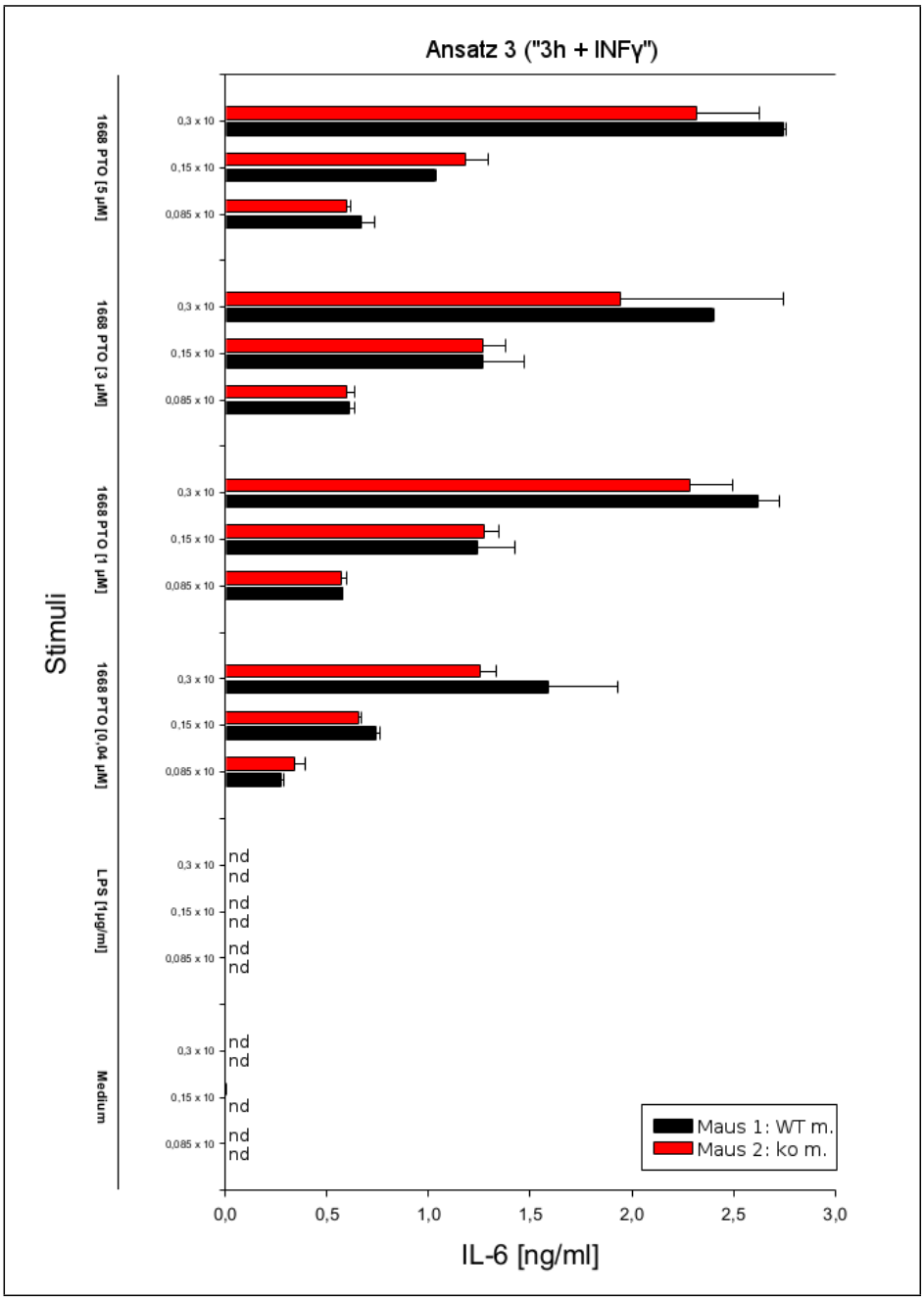

Abb. 3.9.: **Stimulation muriner B-Zellen: Ansatz mit Vorinkubation mit IFNγ (20 ng/ml) über 3 Stunden (= Ansatz 3).** IL-6 ELISA. Doppelbestimmung ± Standardabweichung. $0,3 * 10^6$, $0,15 * 10^6$ oder $0,085 * 10^6$ Zellen mit den Stimuli LPS (1 µg/ml) und 1668PTO (5 µM, 3 µM, 1 µM und 0,04 µM), sowie Kontrolle mit Medium. Zellen zwei männlicher Mäuse (WT/ko) im Alter von 8 Wochen.
nd= nicht detektierbar

fort“) wurden je $0,3 * 10^6$, $0,15 * 10^6$ oder $0,085 * 10^6$ Zellen mit den TLR-Stimuli LPS (TLR-4), 1668PTO (TLR-9) und Pam3Cys (TLR-2) gegen Kontrollen mit Medium und TNFα (als TLR-unabhängigen NFκB Aktivator) stimuliert. Für Ansatz 2 („3h“) wurden die Zellen wie für Ansatz 1 ausplattiert und erst nach einer Ruhephase von 3 Stunden (bei 37 °C, 5 % CO_2) wie Ansatz 1 stimuliert.

Für Ansatz 3 („3h + IFNγ“) wurden die Zellen unter Zugabe von 20 ng/ml IFNγ (vgl. 2.2.6) ausplattiert und nach 3 h (bei 37 °C, 5 % CO_2) mit 1668PTO und LPS gegen eine Mediumkontrolle stimuliert. IFNγ sollte hier die TLR-Antwort verstärken und dadurch Unterschiede zwischen ko und WT deutlicher hervorheben (vgl. „IFNγ“ 1.1.1). Durch einen Vergleich mit den Ergebnissen aus Ansatz 2 kann der Effekt von IFNγ auf diese Stimulation bewertet werden.

Die Menge an produziertem IL-6 zeigt sich in allen Ansätzen abhängig von der eingesetzten Zellzahl. Weiter ist in den Auswertungen (Abb. 3.7, 3.8, 3.9) zu erkennen, dass sowohl SIGIRR defiziente Zellen (ko) , als auch Wildtypzellen (WT) keine nennenswerte IL-6 Antwort auf Medium und TNFα zeigen. Auf Pam3Cys reagieren die Zellen nur schwach in Ansatz 1, nicht in Ansatz 2. Ebenfalls kaum messbar bleibt auch die Antwort auf LPS in allen Ansätzen.

Die Zytokinantwort auf 1668PTO zeigt sich abhängig von der eingesetzten Konzentration (5 µM , 3 µM, 1 µM, 0,04 µM), wobei die stärkste Gesamtreaktion in Ansatz 1 und Ansatz 2 bei 1 µM, in Ansatz 3 bei 5 µM zu sehen ist.

In Ansatz 1 bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinproduktion von Wildtyp und SIGIRR-Knockout: Bei 3 µM und 1 µM 1668PTO zeigen SIGIRR ko Zellen im Mittel

eine leicht höhere IL-6 Produktion, die aber nicht wesentlich höher als die Standardabweichung ausfällt.

Ansatz 2 zeigt, wie Ansatz 1, nur geringe Unterschiede zwischen WT und ko [1]. Für $0,3 * 10^6$ Zellen in den Stimulationen mit 1 µM und 0,4 µM zeigen sich hier die stärksten Unterschiede zwischen ko und WT mit einer vermehrten IL-6 Produktion SIGIRR defizienter Zellen (höher als die Standardabweichung). Bei weniger hoher Zellzahl und höherer Konzentration an 1668PTO (z.B. $0,15 * 10^6$ und $0,085 * 10^6$ mit 5 µM 1668PTO, $0,15 * 10^6$ mit 3 µM 1668PTO) sind keine Unterschiede, z.T. auch eine stärkere Zytokinproduktion der WT-Zellen zu sehen.

Dies wiederholt sich nicht in Ansatz 3. In allen Stimulationen mit $0,3 * 10^6$ Zellen pro Well (mit 5 µM, 1 µM und 0,04 µM 1668PTO) zeigen Wildtyp B-Zellen eine höhere IL-6 Produktion als SIGIRR defiziente B-Zellen. Die Stimulation mit 3 µM 1668PTO ist durch die hohe Standardabweichung schwierig zu beurteilen. In Stimulationen mit geringerer Zellzahl pro Well zeigen sich, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, keine oder nur sehr geringe, also nicht signifikante, Unterschiede zwischen WT und ko.

Zusammenfassend unterscheidet sich die IL-6 Antwort SIGIRR defizienter B-Zellen in diesem Versuch nicht von der Zytokinantwort der Wildtypzellen. Dieses Ergebnis deutet, besonders in Hinsicht auf das Ergebnis aus Ansatz 3, darauf hin, dass SIGIRR auf die Induktion der TLR-9 vermittelten Immunantwort in B-Zellen keinen regulatorischen Einfluss hat.

[1] Mit der Ausnahme der Stimulation von $0,3 * 10^6$ Zellen pro Well mit 5 µM 1668PTO: Hier ist die IL-6 Produktion des SIGRR$^{-/-}$ Ansatzes kaum messbar. Die starke Abweichung ist vereinbar mit einem Fehler in der Versuchsausführung und daher nicht zu beurteilen.

Stimulation muriner B-Zellen mit Vorinkubation

Weitere Versuche sollten dieses Ergebnis mit veränderten Versuchsansätzen überprüfen. Eine Übersicht der hier verwendeten Ansätze gibt auch Tabelle 2.4 des Materialteils.

In diesem Experiment (vgl. Abb. 3.10) wurden B-Zellen in fünf unterschiedlichen Ansätzen stimuliert. Als Stimuli wurden 1668PTO (3 µM und 5 µM), LPS und Pam3Cys verwendet. Als Kontrollen dienten Medium und TNFα. Nicht alle Stimuli oder Kontrollen wurden in allen Ansätzen verwendet (s.u.).

Die Ansätze 1 („sofort“) und 2 („3h IFNγ“) entsprechen den im ersten Experiment beschriebenen Ansatz 1 und Ansatz 3. Im Ansatz 1 wurde die Kontrolle mit TNFα nicht mitgeführt.

Da die Zytokinantwort nach dreistündiger Vorinkubation im letzten Experiment insgesamt höher ausgefallen war, wurden hier zwei Ansätze, ohne und mit IFNγ (Ansatz 3: „üN“ und Ansatz 4: „üN+IFNγ“), nach Übernachtinkubation bei 37 °C durchgeführt. Die Stimulation erfolgte entsprechend am nächsten Morgen, nach weiteren 17 h wurden die Überstände abgenommen und die IL-6 Produktion bestimmt. Der dritte Ansatz wurde nur mit 1668PTO (5 µM) gegen Mediumkontrolle durchgeführt.

Im fünften Ansatz (Ansatz 5: „LPS+ATP“) wurden die Zellen zunächst mit LPS inkubiert. Schließlich wurden die Zellen in neuem Medium resuspendiert und mit ATP bei Raumtemperatur inkubiert. ATP wurde durch erneuten Wechsel des Zellkulturmediums entfernt und die Zellen zur Stimulation in der 96-Well Platte ausplattiert (vgl. auch 2.2.6).

Wie Abb. 3.10 entnommen werden kann, zeigen die Ansätze nach Inkubation über Nacht und anschließender Stimulation (Ansatz 3 und 4) eine geminderte IL-6 Antwort im Vergleich

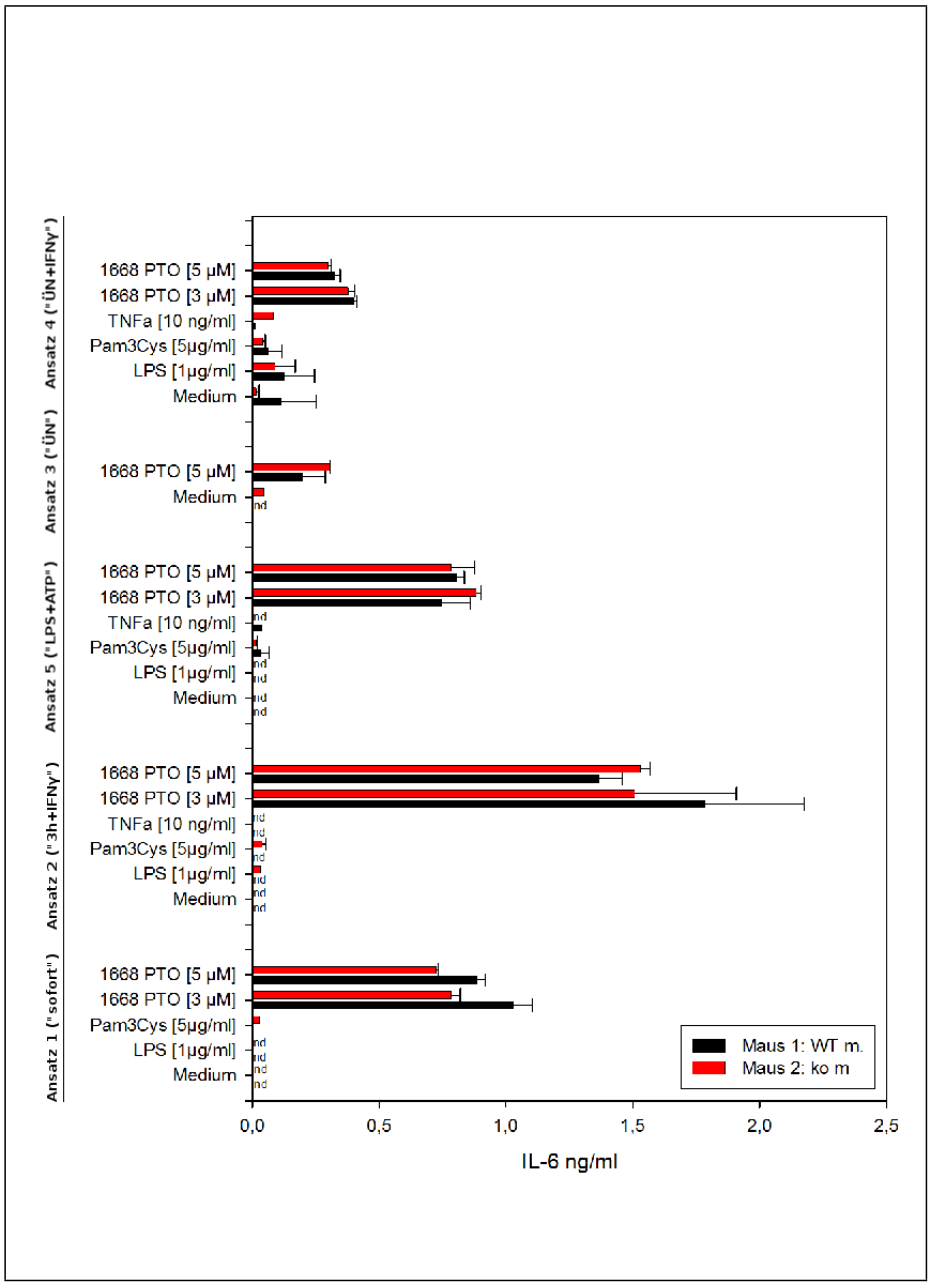

Abb. 3.10.: **Stimulation muriner B-Zellen. Sofortansatz ohne Vorstimulation (Ansatz 1: „sofort“), Vorinkubation mit IFNγ [20 ng/ml] (Ansatz 2: „3 h+IFNγ“) oder LPS [1 µg/ml] und ATP [1 mM] (Ansatz 5: „LPS+ATP“) und Stimulation am nächsten Tag ohne Zusätze (Ansatz 3: „ÜN“) oder mit IFNγ (Ansatz 4: „ÜN+IFNγ“).** IL-6 ELISA. Doppelbestimmung ± Standardabweichung. $0,065 * 10^6$ Zellen pro Well. Zellen zwei männlicher Mäuse (WT/ko) im Alter von 9 Wochen.
nd= nicht detektierbar

zum ersten Ansatz. Die insgesamt stärkste IL-6 Produktion zeigen Zellen des zweiten Ansatzes. Der fünfte Ansatz ähnelt in der Reaktionsstärke dem ersten Ansatz.

Keiner der Reaktionsansätze zeigt einen relevanten Unterschied zwischen B-Zellen mit SIGIRR-Knockout und B-Zellen vom Wildtyp. LPS und Adenosintriphosphat (ATP) zeigen keinen Einfluss auf die Reagibilität der B-Zellen, wie im Vergleich zum ersten Ansatz deutlich wird. Die Zugabe von IFNγ erhöht dagegen, wie auch im ersten Experiment, jeweils die Gesamtreaktion der Zellen. Die Zytokinantwort auf die Stimuli synthetisches Lipopeptid (Pam3Cys), LPS und TNFα ist wie im Vorexperiment gering, bzw. nicht nachweisbar. Eine Ausnahme davon zeigt Ansatz 4: Hier ist die Zytokinantwort auf LPS sowie Pam3Cys, gegenüber der vergleichsweise schwachen Reaktion der Zellen auf 1668PTO, etwas deutlicher.

Das Experiment wurde mit ähnlichen Ansätzen wie bisher wiederholt (s. Abb. 3.11). Zur Stimulation wurde in drei verschiedenen Ansätzen der TLR-9 Stimulus 1668PTO (1 µM, 0,25 µM und 0,08 µM) verwendet. Da die B-Zellen auf LPS und TNFα bisher nur eine schwache Antwort gezeigt hatten, kam hier α-mouse IgM zur Anwendung, ein über die Quervernetzung von B-Zellrezeptoren wirkenden, TLR unabhängigen Aktivator von B-Zellen. In den zwei Ansätzen mit Vorstimulation wurde nur ATP (Ansatz 2: „ATP“) oder IFNγ mit ATP (Ansatz 3: „3 h IFNγ+ATP“) verwendet.

In der Auswertung (vgl. Abb. 3.11) zeigt sich, dass das Antwortsignal auf α-mouse IgM entgegen der erwarteten Reaktion nicht messbar ausfällt.

SIGIRR Wildtyp wie auch SIGIRR defiziente Zellen reagieren in allen drei Ansätzen am stärksten auf 1668PTO bei

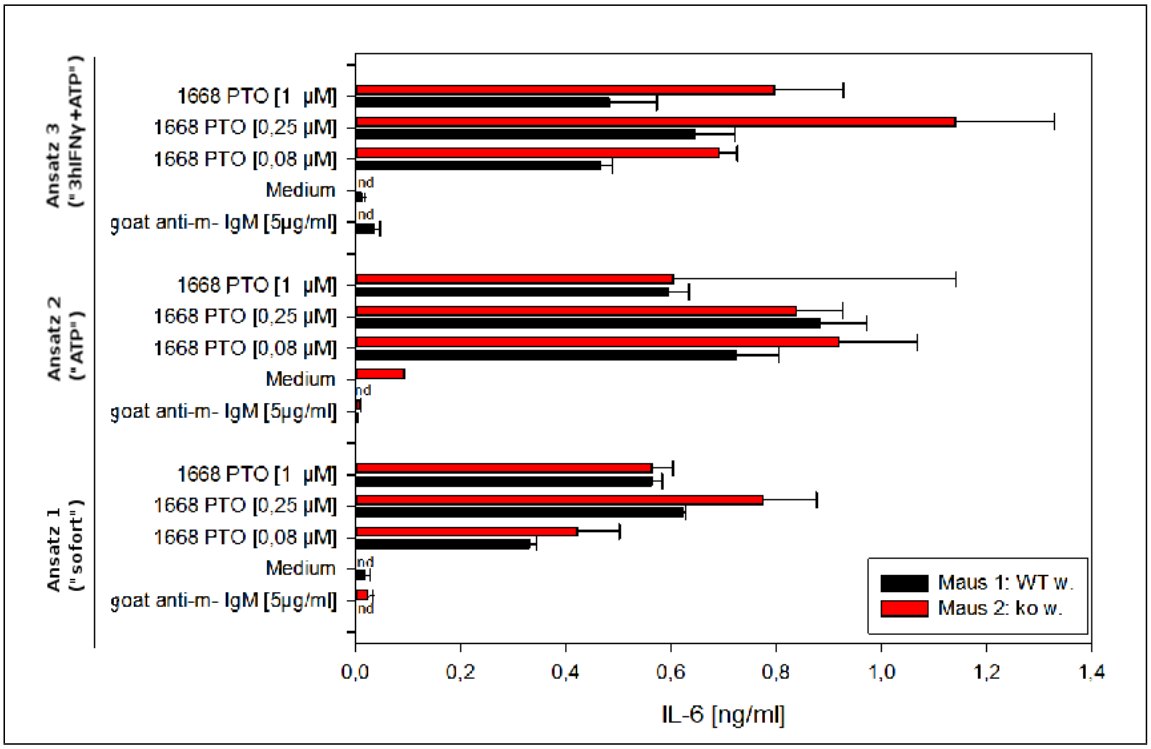

Abb. 3.11.: **Stimulation muriner B-Zellen. Sofortansatz ohne Vorstimulation (Ansatz 1: „sofort“), Vorstimulation mit ATP (5 mM) (Ansatz 2: „ATP“) oder IFNγ (20 ng/ml) und ATP (5 mM) (Ansatz 3: „3h IFNγ+ATP“).** IL-6 ELISA. Doppelbestimmung ± Standardabweichung. $0,13 * 10^6$ Zellen pro Well. Zellen zwei weiblicher Mäuse (WT/ko) im Alter von 7 Wochen.
nd= nicht detektierbar

0,25 µM, die insgesamt höchste IL-6 Produktion zeigt sich für SIGIRR ko Zellen in Ansatz 3 mit 1668PTO (0,25 µM) mit ca. 1,1 ng/ml IL-6.

Auffallend ist Ansatz 3 auch durch eine durchweg erhöhte IL-6 Produktion SIGIRR defizienter B-Zellen unter der Stimulation mit dem TLR-9 Liganden 1668PTO nach Vorinkubation mit IFNγ und ATP. Die IL-6 Produktion SIGIRR defizienter B-Zellen ist dabei unter Berücksichtigung der Standardabweichung um min. 13,8 % höher als die IL-6 Produktion der Wildtypzellen.

Allerdings konnten in zwei weiteren unabhängigen Versuchen mit Vorinkubation dieses Ergebnis nicht bestätigt werden: Der einmalig sichtbare Unterschied in der IL-6 Freisetzung zwischen Wildtyp und Knockout kam nicht mehr zur Darstellung.

In den Versuchen konnten damit insgesamt *keine* signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und SIGIRR-Knockout in der IL-6 Freisetzung aus isolierten ruhenden B-Zellen nach Stimulation mit TLR-Liganden gezeigt werden.

3.1.3. Stimulation muriner myeloider dendritischer Zellen

Myeloide dendritische Zellen (mDCs) spielen eine wichtige Rolle in der Initialisierung und Aufrechterhaltung der adaptiven Immunantwort. Weiterhin ist bekannt, dass sie größere Mengen an SIGIRR mRNA exprimieren [19]. Daher bilden sie ein geeignetes Ziel, die IL-6 Antwort SIGIRR defizienter Zellen zu untersuchen.

Myeloide dendritische Zellen wurden aus dem Knochenmark SIGIRR defizienter und Wildtypmäuse mit dem Wachstums-

faktor GM-CSF (vgl. 2.2.4) differenziert.

Die Differenzierung wurde anhand der MHCII-Expression und dem Marker CD11c in FACS-Analysen überprüft. Der Anteil toter Zellen wurde im FACS mit TOPRO („Totfarbstoff“) bestimmt. Es zeigt sich dabei, soweit durchgeführt, ein Anteil toter Zellen zwischen 7-18 % der Gesamtzellzahl, abhängig von der Versuchsreihe. Innerhalb einer Versuchsreihe fielen diese Differenzen geringer aus, es zeigte sich keine Abhängigkeit von Wildtyp oder Knockout.

In den FACS-Analysen aus murinem Knochenmark gewonnener mDCs zeigten sich keine Unterschiede zwischen SIGIRR Knockout oder Wildtypzellen bezüglich der Expression des Oberflächenmarkers CD11c und MHCII. Der Anteil an $MHCII^{high}$-Population war unterschiedlich in jeder Differenzierung, unterschied sich aber jeweils nicht wesentlich zwischen SIGIRR-Knockoutzellen und Wildtypzellen.

Differenzierte myeloide dendritische Zellen wurden in gleicher Weise wie B- und Milzzellen stimuliert (vgl. 2.2.6) und die IL-6 Antwort dieser Zellen mit ELISA gemessen.

Abb. 3.13 und Abb. 3.14 zeigen exemplarisch zwei von vier unabhängigen Experimenten.

Zu Abb. 3.13: Im Versuch wurden differenzierte mDCs aus dem Knochenmark vier männlicher Mäuse im Alter von 21 Wochen verglichen (WT: schwarzer und roter Balken, ko: gelber und grüner Balken). Im Vergleich zu den Stimulationen unselektionierter Milzzellen und B-Zellen fällt auf, dass die IL-6 Antwort auf den TLR-4 Liganden LPS mit über 100 ng/ml IL-6 (Reichweite des Standards im IL-6 ELISA) deutlich stärker ausfällt. Die Reaktion auf 1668PTO ist ebenfalls höher als bei Milz- und B-Zellen und für alle Ansätze abhängig von der

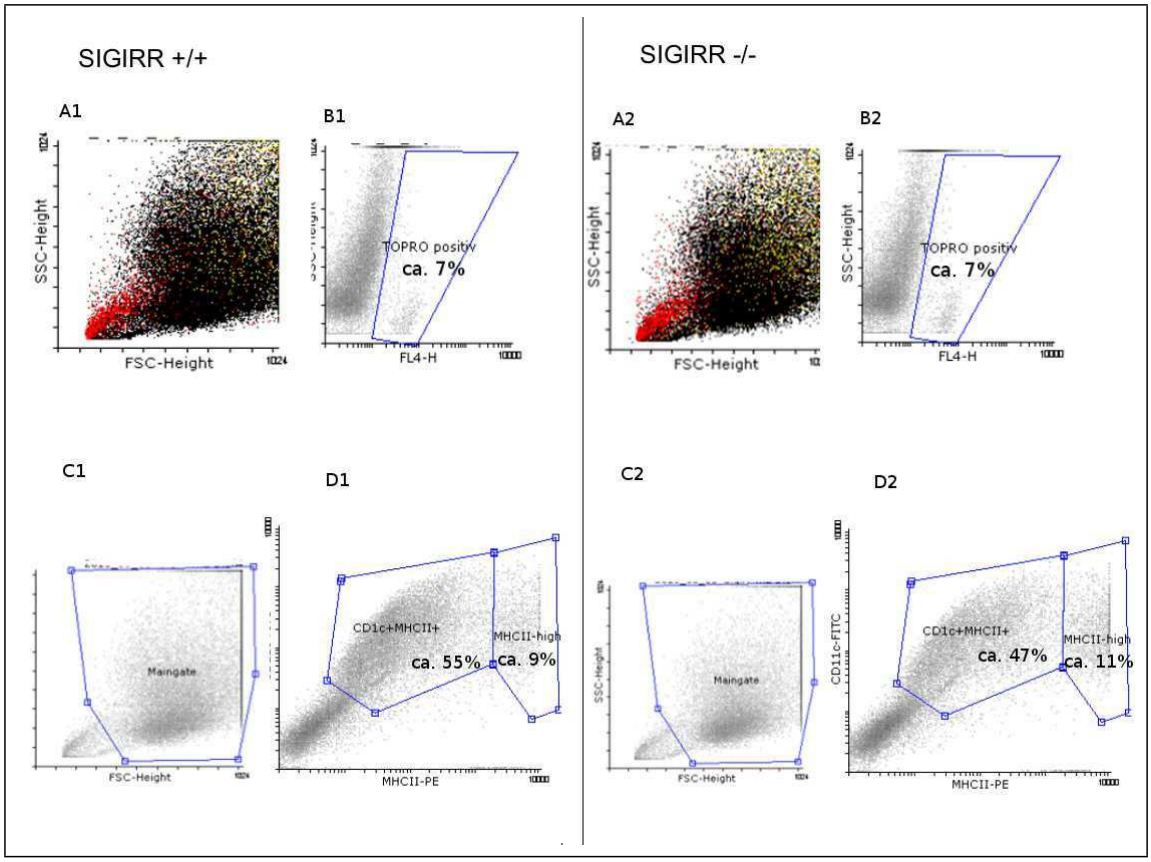

Abb. 3.12.: **SIGIRR Wildtyp und Knockoutzellen nach Differenzierung mit GM-CSF.** FACS-Färbung auf CD11c-FITC, MHCII-PE und TOPRO. **A** Forward Sideward Scatter aller Zellen: Darstellung aller TOPRO positiven Zellen in rot und Darstellung der $MHCII^{high}$-Population in gelb. **B** TOPRO positive Zellen als Anteil an der Gesamtzellzahl. **C** Definition des Maingates. **D** Myeloide dendritische Zellen werden definiert als $CD11c^{+}MHCII^{+}$, wobei die entstehende $MHCII^{high}$-Population so gering wie möglich gehalten wurde.
Wie in der Abbildung deutlich wird zeigten sich im FACS vergleichbare Ergebnisse für $SIGIRR^{+/+}$ und $SIGIRR^{-/-}$.

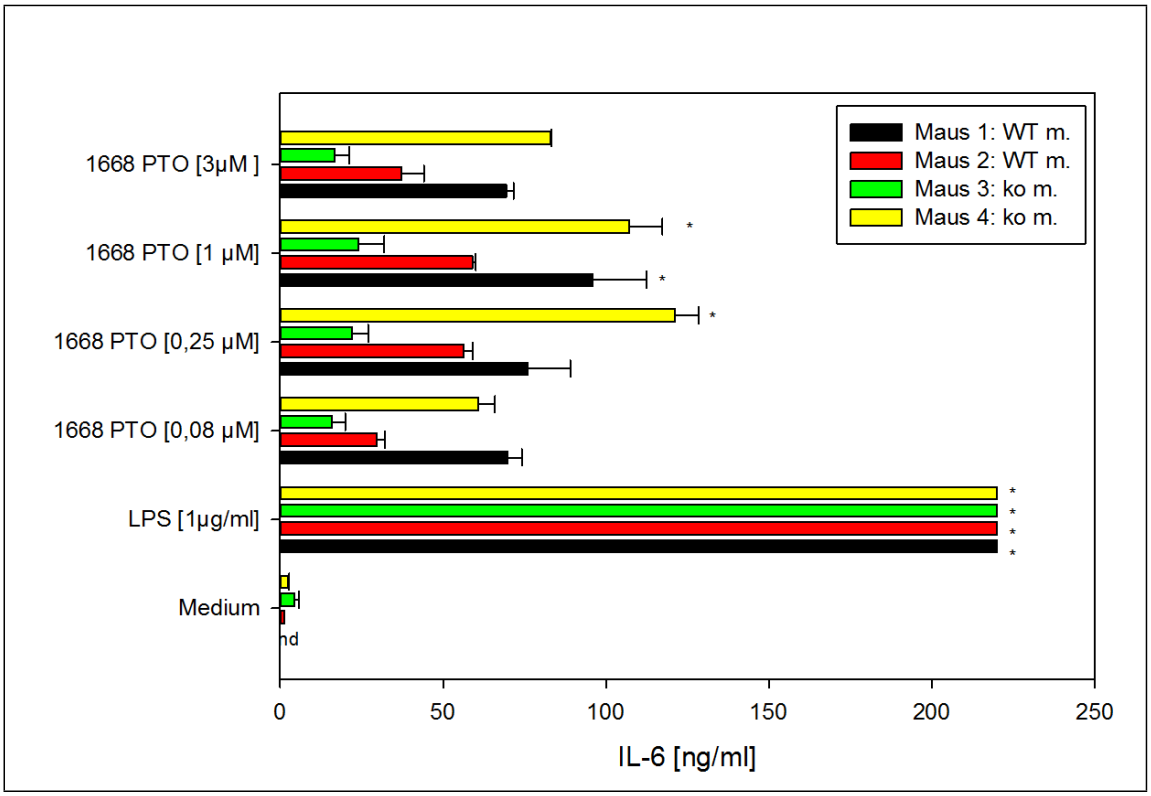

Abb. 3.13.: **Stimulation muriner myeloider dendritischer Zellen vom Wildtyp versus SIGIRR Knockout.** IL-6 Produktion (ng/ml) nach Stimulation muriner myeloider dendritischer Zellen mit 1668PTO (3 µM, 1 µM, 0,25 µM und 0,08 µM) und LPS (1 µg/ml) und einer Kontrolle mit Medium. Zellen vier männlicher Mäuse (2 WT, 2 ko) im Alter von 21 Wochen. $0,2 * 10^6$ Zellen/Well. Daten aus 1:10 Verdünnung. Doppelbestimmung ± Standardabweichung.
**= Außerhalb der Standardreichweite (100 ng/ml), nd= nicht detektierbar.*

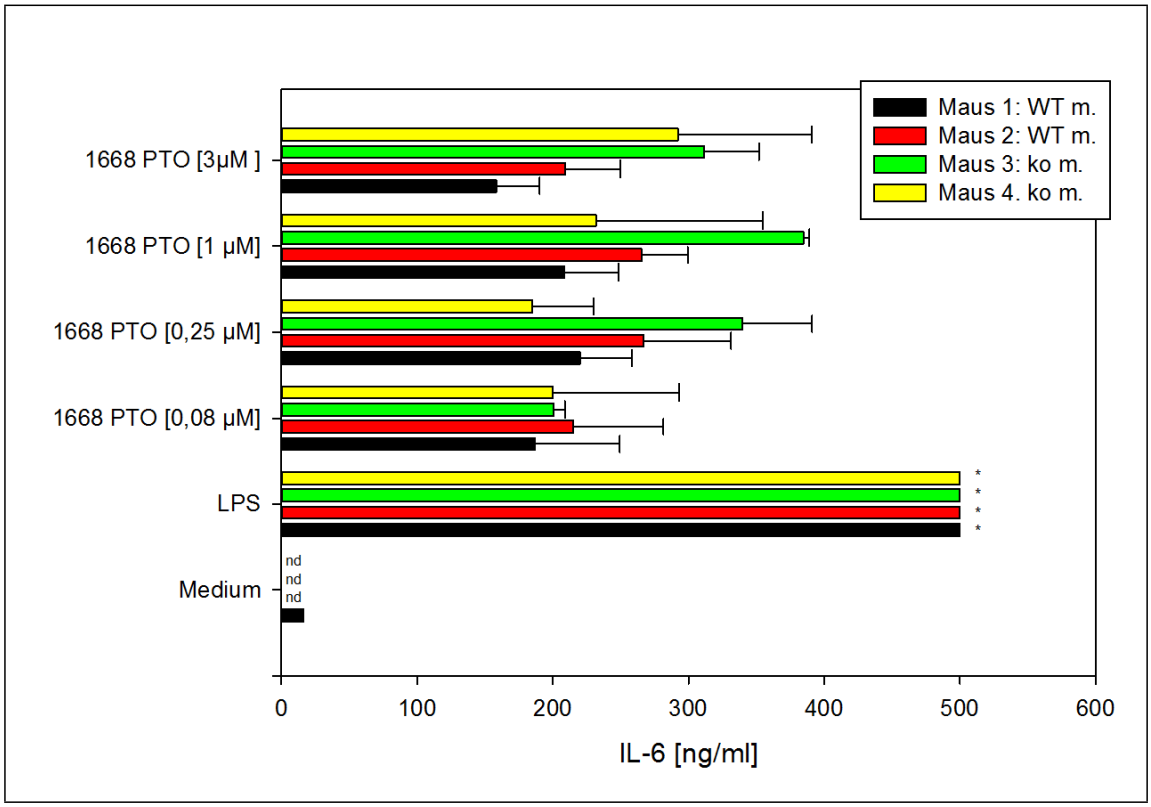

Abb. 3.14.: **Stimulation muriner myeloider dendritischer Zellen vom Wildtyp versus SIGIRR Knockout.** IL-6 Produktion (ng/ml) nach Stimulation muriner myeloider dendritischer Zellen mit 1668PTO (3 µM, 1 µM, 0,25 µM und 0,08 µM) und LPS (1 µg/ml) und einer Kontrolle mit Medium. Zellen zwei männlicher Wildtyp Mäuse (12 und 13 Wochen) und zwei männlicher SIGIRR Knockout Mäuse (15 Wochen). $0,2 * 10^6$ Zellen/Well. Daten aus 1:50 Verdünnung. Doppelbestimmung ± Standardabweichung.
**= Außerhalb der Standardreichweite (500 ng/ml), nd= nicht detektierbar.*

Konzentration des TLR-9 Stimulus, wobei sich die stärksten IL-6 Antworten hier bei 0,25 µM und 1 µM 1668PTO finden. Dabei fallen die Reaktionen für die stimulierten Zellen unterschiedlich aus, jedoch erscheint die Höhe der IL-6 Antwort hier nicht abhängig von einer SIGIRR Defizienz. Für die Ansätze mit LPS sowie teilweise für die Ansätze mit 1 µM 1668 PTO und 0,25 µM und 1668 PTO (gelber und schwarzer Balken) gilt, dass Werte oberhalb der Standardreichweite des ELISA erreicht werden.

Für das in Abbildung 3.14 dargestellte Experiment wurden myeloide dendritische Zellen aus dem Knochenmark jüngerer Tiere im Alter von ca. 14 Wochen gewonnen. Wie in der Grafik erkennbar, ist die Interleukin-6 Antwort für Wildtyp und SIGIRR defiziente Zellen in allen Ansätzen miteinander vergleichbar. Dabei liegt die IL-6 Produktion aller „LPS“-Ansätze über 500 ng/ml und damit über der Reichweite des Standards im IL-6 ELISA, die Reaktion auf 1668PTO bei ca. 200 ng/ml IL-6.

Von allen mDC Versuchen zeigt sich in diesem Versuch, bei gleicher eingesetzter Zellzahl, die stärkste IL-6 Produktion. Dagegen werden in einem weiteren Versuch mit weiblichen Tieren vergleichbaren Alters wesentlich geringere Konzentrationen an IL-6 gemessen. Die Höhe der IL-6 Antwort fällt damit in allen vier Versuchen sehr unterschiedlich aus. Gleichzeitig ist die Reaktion der SIGIRR defizienten und Wildtyp-Zellen auf die unterschiedlichen Stimuli in allen Versuchen vergleichbar.

Die Stimulationsversuche ergaben, entgegen der These, keine deutlichen Unterschiede zwischen Wildtyp und SIGIRR-Knockoutmäusen (vgl. Abb. 3.13 und Abb. 3.14). In keiner

Stimulation zeigt sich eine deutlich erhöhte IL-6 Reaktion SIGIRR defizienter muriner Zellen auf den TLR-9 Liganden 1668PTO und den TLR-4 Liganden LPS. Da die im ELISA ermittelten IL-6 Werte für alle Ansätze mit LPS meist über der Standardreichweite liegen, können mögliche Unterschiede zwischen $SIGIRR^{+/+}$ und $SIGIRR^{-/-}$ Zellen in diesem Fall nicht sicher beurteilt werden.
Dieses Ergebnis steht damit im Kontrast zu der Erwartung an das Experiment, nach der SIGIRR defiziente mDCs nach Stimulation mit TLR-Liganden eine erhöhte Produktion an IL-6 zeigen sollten.

Stimulation MACS-separierter $CD11c^+$ myeloider dendritischer Zellen

Die in den Experimenten mit dendritischen Zellen auftretende Diskrepanz zwischen den Erwartungen an das Experiment und den Ergebnissen, führte zu der Überlegung, mit einem zusätzliche Aufreinigungsschritt die Reinheit der getesteten Zellen zu verbessern.

Daher wurden im Folgenden die durch Differenzierung gewonnenen myeloiden dendritischen Zellen in einem zweiten Schritt mit Hilfe von MACS aufgereinigt (vgl. auch „Gewinnung von $CD11c^+$ Zellen im MACS“ 2.2.5).

In zwei unabhängigen Versuchen wurden aufgereinigte $CD11c^+$ mDCs von SIGIRR defizienten Mäusen mit $CD11c^+$ mDCs von Wildtypmäusen verglichen. Je $0,065 * 10^6$ Zellen/ Well wurden dabei mit 1668PTO (0,25 µM und 0,08 µM) und LPS (1µg/ml) gegenüber einer Kontrolle mit Medium stimuliert. Die Aufreinigung wurde im FACS durch Färbung auf MHCII und CD11c überprüft.

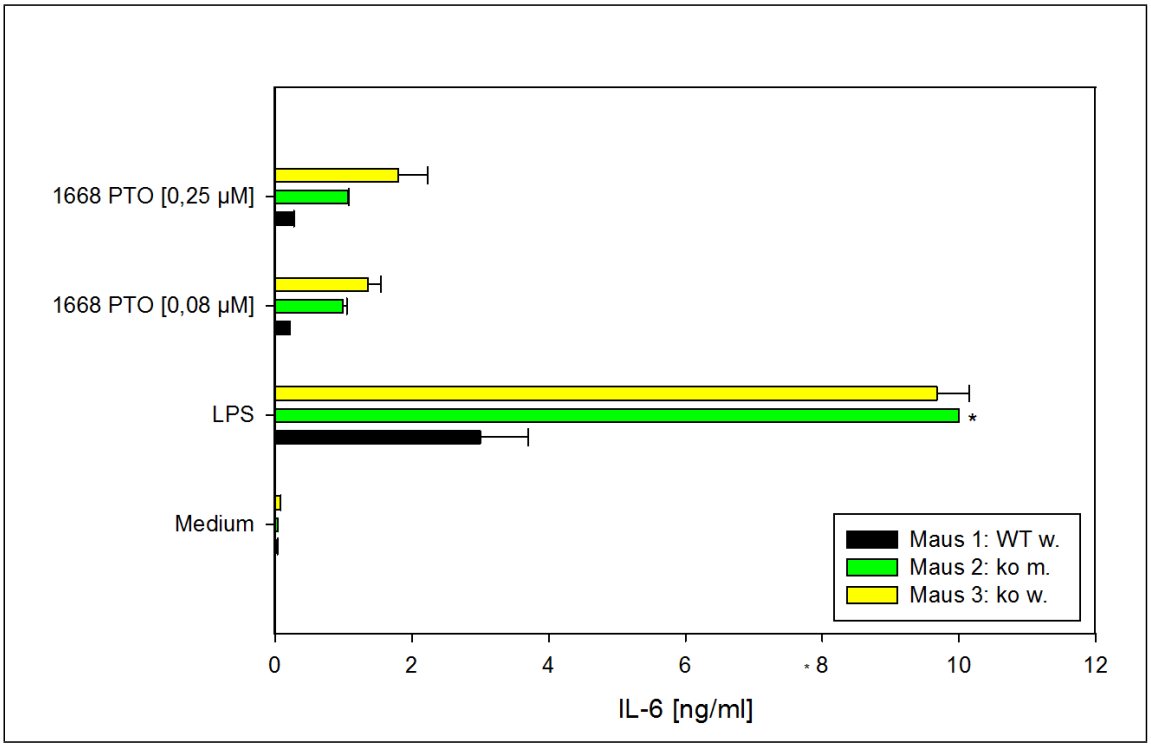

Abb. 3.15.: **Stimulation MACS-separierter CD11c$^+$ mDCs.** IL-6 Produktion (ng/ml) nach Stimulation muriner MACS-separierter CD11c$^+$ mDCs mit 1668PTO (0,08 µM, 0,25 µM), LPS (1 µg/ml) und Mediumkontrolle. Zellen einer weiblichen WT Maus (7 Wochen) und einer weiblichen und männlichen SIGIRR-ko Maus (7 und 8 Wochen). $0,065 * 10^6$ Zellen/Well. Doppelbestimmung ± Standardabweichung.
**= Außerhalb der Standardreichweite (10 ng/ml).*

Im gezeigten Versuch (s. Abb. 3.15) wurde neben der $CD11c^+$ Fraktion auch die $CD11c^-$ Fraktion zum Vergleich stimuliert. Bei der Stimulation CD11c positiver Zellen wurden SIGIRR Knockoutmäuse mit den Zellen nur einer Wildtypmaus (schwarzer Balken) verglichen, da nach Aufreinigung CD11c positiver Zellen aus der mDC-Differenzierung der zweiten Wildtypmaus nicht ausreichend Zellen für eine Stimulation verfügbar waren. Allgemein zeigt sich sowohl in der Stimulation CD11c positiver, wie auch CD11c negativer mDCs eine starke IL-6 Antwort auf LPS. Die Reaktion auf 1668PTO fällt wesentlich schwächer aus, ist aber für die meisten Ansätze von der Kontrolle (Medium) abzugrenzen.

Die $CD11c^-$ Fraktion stellt sich ähnlich wie die unter Abb. 3.13 gezeigte Stimulation unsortierter myeloider dendritischer Zellen dar: Die IL-6 Antwort der Zellen einer männlichen SIGIRR Knockoutmaus liegt in der Stimulation mit 1668PTO etwas höher, während die anderen Zellen vergleichbare IL-6 Mengen zeigen. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ist dieser Unterschied aber weniger stark ausgeprägt. Dies wird besonders deutlich im Vergleich zur $CD11c^+$ Fraktion: Hier ist die IL-6 Antwort auf 1668PTO (mit 0,25 µM und 0,08 µM) für beide Knockoutmäuse etwa gleich stark, während die IL-6 Antwort für den Wildtyp kaum nachzuweisen ist. Besonders deutlich werden die Unterschiede für LPS. Während die IL-6 Antwort auf LPS für beide Knockoutansätze bis ca. 5 ng/ml bzw. über die Reichweite des eingesetzten Standards reicht, liegt die IL-6 Antwort für Wildtypzellen auf LPS bei gerade 0,4 ng/ml.

Dieses Verhältnis zeigt auch ein zweites in dieser Weise durchgeführtes Experiment mit $CD11c^+$ Zellen (2 SIGIRR-WT, 1

SIGIRR-ko, Daten nicht gezeigt)

Im Ganzen wurden 16 Stimulationsexperimente ausgewertet, davon 5 B-Zell Stimulationen, 5 Milzzellstimulationen, 4 mDC-Stimulationen und 2 Stimulationen mit aufgereinigten $CD11c^+$ bzw. $CD11c^-$ mDCs. Da ein Teil der Stimulationen parallel durchgeführt und von den Mäusen sowohl Knochenmark als auch Milz verwendet wurde, beziehen sich diese Stimulationsexperimente auf insgesamt 24 Mäuse: 12 Wildtypmäuse und 12 SIGIRR-Knockoutmäuse, die in Zweier- oder Vierergruppen miteinander verglichen wurden. Es wurden 11 Weibchen und 13 Männchen verwendet.

3.2. Diskussion

3.2.1. Diskussion zum Aufbau der Experimente

IL-6

IL-6 wird von einer Vielzahl von Zellen als Antwort auf eine Stimulation ausgeschüttet und wird im Allgemeinen als ein Immunsystem aktivierendes Zytokin verstanden. IL-6 ist wichtig in der späten Entwicklung von B-Zellen, für B-Zell Proliferation und AK-Sekretion [17]. B-Zellen sezernieren aber auf Stimulation hin geringere Mengen an IL-6, als dies beispielsweise für T-Zellen oder Makrophagen beschrieben ist. In den durchgeführten Experimenten wurde IL-6 als Aktivierungsmarker verwendet, da die Ausschüttung von IL-6, verglichen mit unstimulierten Kontrollen für 1668PTO stets deutlich messbar ist. Im gleichen Sinne gilt dies für heterogene Milzzellenpopulationen.

In vielen Publikationen zu SIGIRR wurde ebenso IL-6 als

Marker der Zellaktivierung verwendet [21, 51]. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von IL-6 ist somit die mögliche Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Arbeiten.

Knockout und Typisierung

In dem Großteil der von mir durchgeführten Experimente zeigten sich keine Unterschiede in der Zytokinantwort zwischen SIGIRR ko und SIGIRR WT nach Stimulation mit TLR-Agonisten. Man kann also erstens überlegen, ob der Knockout vollständig war, und zweitens, ob die Typisierung der Mäuse richtig durchgeführt wurde.

Die Typisierung wurde für jede Maus nach der Geburt standardisiert durchgeführt und erfolgte über einen, durch einen Insert im SIGIRR- Gen entstandenen Längenpolymorphismus, der sich nach PCR im Agarosegel nachweisen ließ (vgl. 2.2.1). Nur eindeutige Typisierungsergebnisse wurden als gültig angesehen und durch stichprobenhafte Kontrolle der Typisierung konnte ein Fehler an dieser Stelle mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die SIGIRR-Knockoutmäuse entstammen dem Mausstamm TIR27BC (mit C57Bl/6j Hintergrund). Ein entsprechendes Brutpaar wurde von der Arbeitsgruppe um C. Garlanda dem Institut für Immunologie Marburg zur Verfügung gestellt. Der Knockout ist in einem Paper der Arbeitsgruppe beschrieben [21].

Der eingefügte Knockout kann anhand der Messung von SIGIRR mRNA mithilfe Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestätigt werden. Dieses Experiment wurde für den Mausstamm TIR27BC von H. Schreiner durchgeführt und in ihrer Arbeit [88] veröffentlicht.

Ob der Knockout damit vollständig ist, lässt sich daraus nicht eruieren. Die veröffentlichten Ergebnisse von Garlanda *et al.* zur Stimulation von SIGIRR defizienten Mäusen geben aber keinen Hinweis darauf, dass ein unvollständiger Knockout vorliegen könnte.

3.2.2. Diskussion der Milzzellstimulation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Verhalten von Milzzellen SIGIRR defizienter Mäuse unter Stimulation mit Milzzellen vom Wildtyp verglichen. Die Versuche zeigen keine Abhängigkeit der IL-6 Antwort von der Expression SIGIRRs in Milzzellen bei Stimulation mit dem TLR-9 Liganden 1668PTO (vgl. 3.1.1).

Dies widerspricht der Arbeitshypothese, nach der mit Wegfall der immun-regulativen Wirkung SIGIRRs eine deutlich stärkere IL-6 Antwort der SIGIRR defizienten Zellen zu erwarten war. Da die Hypothese nicht bestätigt werden kann werden im Folgenden mögliche Ursachen dafür diskutiert.

Bei der Untersuchung einer gemischten Zellpopulation, wie Milzzellen, besteht eine Nähe zur Situation in vivo, bei der unterschiedliche Zellarten in beständiger Kommunikation und Kontakt zueinander stehen und sich dabei gegenseitig beeinflussen. So finden sich in der Literatur Angaben von bis zu 50 % B-Zellen, daneben kommen in relevanter Zahl T-Zellen (30-40 %, 2/3 $CD4^+$, 1/3 $CD8^+$), Antigen präsentierenden Makrophagen und dendritischen Zellen vor [17, S.53][1].

In den durchgeführten Experimenten lassen sich keine SIGIRR-spezifischen Unterschiede nachweisen. Damit stellt sich die Frage, ob das Ergebnis durch eine bestimmte Subpopulati-

on mit von Natur aus geringer SIGIRR Expression beeinflusst ist:

Zu diskutieren ist an dieser Stelle ein Einfluss der Makrophagen auf das Stimulationsergebnis. Denn Makrophagen zeigen keine, oder nur eine sehr geringe SIGIRR Expression [98, 21]. So kann in Stimulationsexperimenten ein SIGIRR-spezifischer Effekt verdeckt werden. Die Sekretion von IL-6 als Reaktion auf eine Stimulation ist darüber hinaus bei Makrophagen wesentlich stärker ausgeprägt als bei B-Zellen. [64, S.83].

In FACS-Analysen zeigten sich in den Experimenten 40 % der Milzzellen B220 positiv (B-Zellen), mit etwa 20 % ruhenden B-Zellen (B220 und CD43 positiv) (vgl. Abbildung 3.1). Diese Zahlen waren für Wildtyp und SIGIRR Knockoutzellen vergleichbar. Der B-Zellanteil ist damit etwas geringer als nach Literaturangaben (s.o.) zu erwarten. Eine Färbung auf Makrophagen erfolgte nicht.

Für dendritische Zellen und T-Zellen ist, wie auch für B-Zellen eine Expression von SIGIRR beschrieben [26]. Damit ist, selbst wenn man einen möglichen Einfluss von Makrophagen auf das Stimulationsergebnis berücksichtigt, das Fehlen eines jeglichen SIGIRR-spezifischen Effektes überraschend.

Wald *et al.* beschrieben 2003 in der ex-vivo Stimulation SIGIRR defizienter Milzzellen eine erhöhte NFκB und JNK Aktivierung bei Stimulation mit LPS und IL-1, nicht dagegen mit TNFα, und zeigten damit die negativ regulative Funktion SIGIRRs für den IL1 und LPS Signalweg. Weiter bestand eine erhöhte Proliferation SIGIRR defizienter Milzzellen bei Stimulation mit CpG-DNA. [98]

Im Vergleich dazu ist in dieser Arbeit ein Einfluss von SIGIRR auf die Aktivierung von TLR-4 durch LPS in den Milz-

zellexperimenten nicht sicher beurteilbar, da die Zellen nur eine schwache IL-6 Antwort auf LPS Stimulation zeigen und intrazelluläre Aktivitätsmarker (wie NFκB) nicht erfasst wurden. Für 1668PTO (CpG-DNA) zeigen sich keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen SIGIRR$^{-/-}$ und SIGIRR$^{+/+}$ Milzzellen bezüglich ihrer IL-6 Produktion.

Eine erhöhte Aktivierung von NFκB bedeutet nicht zwangsläufig eine höhere Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6. So ist eine Regulation der IL-6 Produktion auf anderer Ebene möglich, zum Beispiel bei der mRNA-Stabilität [74], die in den hier gezeigten Ergebnissen den regulatorischen Einfluss SIGIRRs verdecken.

Anders verhält es sich für die von Wald *et al.* beschriebene Proliferation nach TLR-9 Stimulation mit CpG-DNA.

Die Proliferation der Zellen in Kultur wurde in meinen Experimenten nicht untersucht. Jedoch ist zu erwarten, dass mit vermehrter Proliferation SIGIRR defizienter Zellen auch eine erhöhte IL-6 Menge in den Zellkulturüberständen SIGIRR defizienter Zellen nachzuweisen sei. Dies war im Vergleich zum Wildtyp nicht der Fall.

Garlanda *et al.* vergleichen 2004 SIGIRR$^{-/-}$ und SIGIRR$^{+/+}$ Mäuse bezüglich ihrer IL-6 Serumspiegel nach intraperitonealer Injektion von LPS. In diesem Experiment zeigen sich *keine* Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout. Die bestehenden Unterschiede zu den Ergebnissen von Wald *et al.* werden hier durch einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Mäuse erklärt. [21]

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mäuse besitzen den gleichen genetischen Hintergrund, wie die von Garlanda *et al.* verwendeten (s. S. 3.2.1). Ein Einfluss des genetischen

Hintergrundes auf das Stimulationsergebnis bei dem Vergleich zu den Ergebnissen von Wald *et al.* ist also nicht auszuschließen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Stimulation von Milzzellen durch den hohen Anteil an SIGIRR exprimierender Zellen (vor allem B-Zellen) geeignet ist, einen Überblick über einen möglichen immun-regulatorischen Einfluss von SIGIRR in Wildtypzellen gegenüber SIGIRR-defizienter Zellen zu erhalten. Rückschlüsse auf einzelne Zellpopulationen sind dabei aber schwer möglich. In den aufgeführten Experimenten zeigte SIGIRR *keinen* regulatorischen Einfluss auf die Stimulierbarkeit der getesteten Zellen durch den TLR-9 Liganden 1668PTO (CpG-DNA).

Ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und einem Einfluss von SIGIRR auf die Stimulierbarkeit der Zellen stellt sich nicht dar. Auch zeigt sich kein Einfluss des Geschlechts auf das Stimulationsergebnis.

Um Rückschlüsse auf spezifische Zellpopulationen ziehen zu können, wurden aufgereinigte B-Zellen (SIGIRR-WT vs. SIGIRR-ko) sowie aus Knochenmark differenzierte mDCs (SIGIRR-WT vs. SIGIRR-ko) bezüglich ihrer Stimulierbarkeit im ex-vivo Modell untersucht.

3.2.3. Diskussion der B-Zell Stimulation

Bei den von uns aus der Milz, nach Depletion CD43 positiver Zellen, separierten B-Zellen (s. 2.2.5) für die B-Zell Stimulation handelte es sich in der Mehrheit um ruhende, naive $B220^{+}/CD43^{-}$ B-Zellen.

Die Reinheit der aufgereinigten Zellen wurde im FACS über-

prüft (vgl. auch Abbildung 3.1). Durchschnittlich 85 % der Zellen waren $B220^+/CD43^-$. $CD43^+$ Zellen waren nach MACS Aufreinigung im FACS nicht mehr in relevanter Menge nachzuweisen. Das bedeutet insbesondere, dass T-Zellen, Natürliche Killerzellen, Makrophagen bzw. Monozyten und Granulozyten aus der Zellsuspension eliminiert werden konnten [6]. Die verbleibenden 15 % der Zellen zeigten sich CD43 und B220 negativ. Diese Zellen können ungefärbt geblieben sein, wenn nicht ausreichend fluoreszenzmarkierte Antikörper hinzugegeben wurden, oder aber es handelt sich um Zellen die weder B220 noch CD43 exprimieren, wie beispielsweise Epithel- oder Endothelzellen [6].

Neben konventionellen B2-Zellen kommen in der Milz zwei weitere Typen von B-Zellen vor: B1 und Marginalzonen (MZ) B-Zellen. Letztere machen im Vergleich zu B2-Zellen nur einen geringen Anteil von maximal (max.) 10 % der Gesamtpopulation aus. Ihre immunologische Funktion, soweit bekannt, unterscheidet sich von der konventioneller B2-Zellen durch ihre schnelle AK-Produktion bei einem eingeschränkten Repertoire von V Genen [1, S.175].

Bei den im MACS aufgereinigten Zellen sollte es sich für die verwendeten Präparationstechnik, den Herstellerangaben entsprechend, jedoch um reine B2-Zellen handeln [22].

Das bedeutet, dass auch MZ B-Zellen und B1-Zellen in den B-Zellstimulationen nicht miterfasst sind. In den Milzzellstimulationen wiederum sind sie Teil des Zellgemisches, mögliche Auswirkungen dieser kleinen Zellpopulation sind aber eher zu schwach um sichtbar zu werden. Anzumerken ist, dass z.B. MZ B-Zellen beim Erstkontakt mit Antigenen mit schneller Antikörperproduktion in der Milz eine besondere Rolle spielen

[58]. Da sie dem angeborenen Immunsystem damit näher stehen als konventionelle B-Zellen wäre es interessant herauszufinden, welche Bedeutung der immun-modulatorischen Funktion SIGIRRs in diesem Kontext zukommt.

Der Prozentsatz TOPRO-positiver Zellen im FACS vor und nach Aufreinigung liegt zwischen kaum nachweisbar bis zu 30 % der Zellen (vgl. dazu beispielsweise Abb. 3.1 und Abb. 3.6, andere FACS-Analysen wurden durchgeführt, sind aber nicht gezeigt). Jeweils relevante Unterschiede zwischen SIGIRR-ko und Wildtyp kommen nicht zur Darstellung. Diese unterschiedlichen, z.T. sehr hohen Zahlen können der Zeit geschuldet sein, die es brauchte, die Stimulationen anzusetzen und anschließend die beiseite gestellten Proben für die FACS-Färbung vorzubereiten. Für die Stimulation, die direkt im Anschluss an die Isolation angesetzt wurde ist demgegenüber ein geringerer Anteil toter Zellen zu vermuten, beweisen lässt sich dies aufgrund fehlender Daten nicht. Aufgrund dem jeweils gleichen Anteil toter Zellen ist eine Vergleichbarkeit zwischen SIGIRR-ko und Wildtyp gegeben.

Da der Einfluss von Makrophagen auf das Stimulationsergebnis in einer gemischten Milzzellpopulation nicht auszuschließen war, wurden in einem parallelen Ansatz Milzzellen und aus diesen Milzzellen isolierte B-Zellen verglichen. Es zeigt sich, von der bei gleicher Zellzahl stärkeren IL-6 Produktion der Milzzellen abgesehen, in beiden Ansätzen kein Unterschied zwischen SIGIRR-ko und WT.

Weitere Experimente mit im MACS-sortierten B-Zellen, wie im Ergebnisteil beschrieben, validieren das Ergebnis: Die ex-vivo Stimulationen aus der Milz von SIGIRR-WT und SIGIRR-ko gewonnen B-Zellen zeigten keine Unterschiede in der IL-6

Antwort zwischen SIGIRR Wildtyp und Knockout. Dies gilt für die Stimuli 1668PTO in den getesteten Konzentrationen, LPS, TNFα und Pam3Cys.

2008 beschrieben *Lech et al.* bei SIGIRR defizienten $B6^{lpr/lpr}$ Mäusen eine Vermehrung von B-Zellregionen und eine erhöhte Anzahl an B-Zellen im FACS. Bei Stimulation mit LPS und CpG-DNA zeigten diese Zellen im Vergleich mit dem Wildtyp ohne SIGIRR-Defizienz eine vermehrte Proliferation [52].

Die Proliferation der untersuchten Zellen wurde in meinen Experimenten nicht untersucht, jedoch wäre zu erwarten, dass eine vermehrte Proliferation auch zu größeren Mengen produzierten IL-6 führt. Dies war über den Großteil der B-Zellstimulationen für SIGIRR Knockout im Vergleich zum Wildtyp nicht festzustellen. Es ist möglich, dass SIGIRR eben nur im beschriebenen Lupus Hintergrund einen nachweisbaren Effekt auf die B-Zellzahlen nach Stimulation zeigt.

Zwei Jahre später (2010) publizierten Lech *et al.*, außerhalb des Lupusmodells, eine vermehrte Anzahl an Milzzellen in Pristane behandelten $SIGIRR^{-/-}$ Mäusen, die vor allem durch eine Vergrößerung der B220 positiven B-Zellregionen entstand [50]. Dies deutet auf eine Rolle von SIGIRR bei der Expansion von B-Zellen der Milz hin. In Bezug zu meinen Ergebnissen ist festzustellen, dass dieser Einfluss SIGIRRs sich aber auch auf die Regulation bei der Entstehung solcher Lymphfollikel beziehen kann. Ein Einfluss auf die eigentliche Zellfunktion bei Stimulierung, wie hier untersucht, muss deswegen nicht bestehen. Die Experimente sind auch durch den Einsatz von Pristane nur bedingt vergleichbar.

Als mögliche Erklärung für diese Differenz der Ergebnisse kann des weiteren gelten, dass SIGIRR in B-Zellen unter den

meisten Umständen eine eher untergeordnete Rolle in der Regulation von B-Zellen einnimmt.

So konnten Polentarutti *et al.* 2003 nur geringe Mengen sigirr mRNA in humanen wie murinen B-Zellen nachweisen [77].

Neben Toll-like Rezeptoren sind vor allem zwei weitere Signale für die Entwicklung naiver B-Zellen zu Plasmazellen entscheidend: Die Aktivierung des B-Zell Rezeptors (BZR) und die Unterstützung durch T_H-Zellen [18]. Die Verfügbarkeit dieser beiden effektiven Regulationswege lässt die Bedeutung von SIGIRR in den Hintergrund rücken. Möglicherweise ist die Regulation von TLR über SIGIRR in B-Zellen ein redundanter regulatorischer Weg, der nur unter bestimmten experimentellen Bedingungen, etwa bei starker Aktivierung des Immunsystems, wie z.B. im Lupusmodell [52] oder nach Vorinkubation mit Bakterien [88], an Bedeutung gewinnt.

Da es sich bei den ausgetesteten B-Zellen um B2-Zellen handelte (vgl. 3.2.1), bedeutet dies gleichzeitig, dass SIGIRR in den B-Zellspezies der B1 oder MZ B-Zellen, die ein etwas anderes Aktivierungsprofil als herkömmliche B2-Zellen aufweisen, eine größere Bedeutung zukommen kann.

Zuletzt kann SIGIRR auch bei B2-Zellen, aber an anderer Stelle, wie z.B. in der Regulation von B-Vorläuferzellen, eine Rolle spielen. Dies wäre in den in dieser Arbeit durchgeführten Tests nicht erfasst worden, könnte aber in vivo zu veränderten Bedingungen im Immunsystem führen. Da SIGIRR einerseits in die TLR Kaskade eingreift und TLRs auf der anderen Seite an mehreren Stellen der B-Zell Reifung und Aktivierung als drittes Signal eine Rolle spielen [75, 83] ist ein solches Szenario möglich.

B-Zellstimulation mit Vorinkubation

Die Verwendung von Vorinkubationen, insbesondere mit LPS und ATP, sollte einen SIGIRR spezifischer Effekt verstärken. In diesem Zusammenhang bestand die Überlegung, dass SIGIRR, bei Fehlen eines typischen Signalpeptids, wie 1999 von Thomassen *et al.* für IL-1 vorgeschlagen [95], nicht über Golgi-Apparat und Endoplasmatische Retikulum, sondern beispielsweise über Caspase-1 an der Zelloberfläche exprimiert wird (= unkonventionelle Proteinsekretion) [13, 43, 66]. Entsprechend würde durch bestimmte, vielleicht proinflammatorische Signale, dieser Expressionsweg erst induziert und die immuninhibitorische Wirkung SIGIRRs im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus induziert.

Wie im Ergebnisteil aufgeführt, zeigten die durchgeführten Experimente mit B-Zellen keinen Hinweis darauf, dass die Funktion SIGIRRs sich durch die gewählten Vorinkubationen beeinflussen lässt.

Als Nebenbefund zeigte diese Arbeit eine geringe Stimulierbarkeit muriner B-Zellen auf die initial mitgeführten Stimuli TNFα und Pam3Cys. TNFα bindet an den TNFR Rezeptor, Pam3Cys ist ein synthetisches Lipopeptid und ein TLR-2 Ligand. Die schwache Antwort der B-Zellen auf diese Liganden zeigte: Beide Rezeptoren haben in dem verwendeten B-Zell Modell (und der gemischten Population der Milzzellen) kaum Einfluss auf die Rezeptorvermittelte IL-6 Antwort. Diese schwachen IL-6 Signale lassen eine Aussage über einen SIGIRR spezifischer Effekt in dem durch TLR-2 genutzten Signalweg nur eingeschränkt zu. Anders als humane B-Zellen exprimieren murine B-Zellen neben TLR-9 auch TLR-4 [83]. Daher wäre eine stärkere LPS Antwort zu erwarten gewesen. Sie blieb aber

über alle Experimente hinweg gleich schwach. Ein möglicher Grund dafür ist, dass eine Zytokinantwort naiver B-Zellen, anders als eine Reifung zur Plasmazelle, nur wenig durch den TLR4-Liganden LPS beeinflusst wird.

3.2.4. Diskussion der mDC Stimulation

Myeloide dendritische Zellen spielen, als „klassische“ dendritische Zellen eine entscheidende Rolle in der Induktion der T-Zellantwort [1, S. 119].

In dieser Arbeit wurden myeloide dendritische Zellen aus Knochenmark von SIGIRR defizienten Mäusen und Wildtypmäusen unter Verwendung von GM-CSF gewonnen (vgl. 2.2.4) und im FACS untersucht (Färbung auf MHCII, CD11c, TO-PRO).

Hier zeigten sich keine Unterschiede in der Entwicklung SIGIRR defizienter mDCs und WT mDCs: Sowohl der Anteil gewonnener mDCs an der gemessenen Gesamtzellzahl, als auch die Größe der MHCII^{high} Population in Kultur waren jeweils vergleichbar groß für WT und SIGIRR-ko (vgl. S. 3.1.3).

So verlief die Entwicklung zu dendritischen Zellen (definiert als CD11c^{+}, MHCII^{+} Population) bei gleichen Kulturbedingungen sowohl für SIGIRR Knockout wie auch für WT in gleicher Größenordnung: In Abhängigkeit der Versuchsreihe waren dies etwa 60-80 % aller Zellen. Auch die Anzahl in den Kulturschalen anhaftender (und verworfener) Makrophagen zeigte bei mikroskopischer Begutachtung (Dichte des Zellrasens) keine wesentlichen Unterschiede.

Nach diesen Ergebnissen gibt es keinen Anhaltspunkt für einen Einfluss SIGIRRs auf Reifung und Entwicklung myeloider dendritischer Zellen im Vergleich von SIGIRR-ko und

Wildtyp.

Der jeweils vergleichbare Anteil an MHCII^{high} Population (s.u.) deutet weiter darauf hin, dass SIGIRR defiziente Zellen nicht leichter als Wildtypzellen durch unspezifische Reize, wie das Handhaben der Kulturschalen oder die Zugabe von Kulturmedium (vgl. Methoden: 2.2.4), aktiviert wurden.

Diese Feststellung ist in Zusammenhang zu sehen mit der von Liew *et al.* 2005 formulierten Vermutung über die Rolle SIGIRRs in der Reifung dendritischer Zellen, nach der SIGIRR in dendritischen Zellen, aber nicht in Makrophagen, hochgradig exprimiert sei und damit eine große Rolle in der Regulation der Reifung dendritischer Zellen zu spielen habe [53].

In mehreren Arbeiten zu SIGIRR und dendritischen Zellen wurden neben der Stimulierbarkeit dendritischer Zellen auf verschiedene Reize auch auf Verhältnisse in der Zellzahl und Marker des Reifungsprozesses (wie MHCII) Bezug genommen:

So zeigten Garlanda *et al.* 2007 bei der Untersuchung zellulärer Infiltrate in den Lungen von M. tuberculosis infizierten Mäusen, dass sich die Zahl dendritischer Zellen (F4/80$^-$ CD11c$^+$) im Infiltrat zwischen SIGIRR$^{+/+}$ und SIGIRR$^{-/-}$ Tieren 2-4 Wochen nach Infektion nicht unterschied.[20]

Noris *et al.* beschrieben 2009, dass sich nach Nierenzelltransplantation bei Mäusen die Anzahl CD11b$^+$ bzw. CD11b$^+$CD11c$^+$ Zellen, wie auch die MHCII Expression sowohl in SIGIRR$^{+/+}$ als auch in SIGIRR$^{-/-}$ bis zu 6 Tagen nach Transplantaten stieg, jedoch jeweils stärker in SIGIRR$^{-/-}$ Transplantaten, wobei die meisten Zellen MHCII des Spenders zeigten. Der SIGIRR Knockout war somit assoziiert mit verstärkter Reifung und Expansion ortsständiger myeloider Vorläuferzellen [70].

Im Unterschied zu Noris und Garlanda stammten die in dieser Arbeit untersuchten dendritischen Zellen aus der Zellkultur. Diese aus Knochenmark differenzierten Zellen waren zum Zeitpunkt der FACS Untersuchung noch unstimuliert und allenfalls unvermeidbaren unspezifischen Reizen in der Handhabung, wie beschrieben, ausgesetzt.

Die Auswertung der FACS Analysen zeigt über alle Experimente hinweg Populationen mit unterschiedlich starker MHCII Expression. Alle myeloiden dendritischen Zellen exprimieren MHCII (vgl. [2, S.114]), aber die Höhe der MHCII Expression unterscheidet den Reifungsgrad der Zellen (vgl. 1.1.2). In den Auswertungen der FACS Ergebnisse wurde deutlich, dass der MHCII^{high} Anteil, sich zwar nicht zwischen SIGIRR-Knockout oder Wildtyp, wohl aber zwischen einzelnen Versuchsreihen zum Teil deutlich unterschied (zwischen 5% und 12%). Als Einflussfaktor ist am ehesten Erschütterungen in der Handhabe der Proben zu nennen. Eine Verunreinigung, z.B. mit LPS in der Kultivierungsphase ist bei Arbeit unter sterilen Bedingungen unwahrscheinlich. Auf den Einfluss hoher MHCII-Expression auf die Stimulationsexperimente wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

Problematisch in der Auswertung der Ergebnisse ist, dass die Reifung der Zellen nur nach ihrer Expression von MHCII beurteilt wurde (vgl. unten). Andere Reifungsmarker myeloider Zellen, wie beispielsweise CD86 oder CD80 [28] wurden nicht untersucht.

Die am Boden der Kulturschalen anhaftenden Zellen wurden verworfen und entsprechend in FACS-Analysen nicht miterfasst. Die Dichte des Zellrasens wurde unter dem Mikroskop begutachtet, die Anzahl dieser Zellen und deren Anteil an

der Gesamtpopulation der geernteten Zellen wurde dabei aber nicht evaluiert. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den anhaftenden Zellen um Makrophagen handelte, da diese die Eigenschaft besitzen, an Plastikoberflächen anzuhaften (vgl. auch [37]), in diesem Fall verstärkt durch die Verwendung von speziellen Kulturschalen mit sogenannter nunclon-Oberfläche (ThermoFisherScientific, Waltham(MA), USA)[94]. Diese Negativselektion von Makrophagen war wegen der Stimulationsexperimente erwünscht (s.u.), aber eine separate Untersuchung dieser Zellpopulation wurde nicht durchgeführt. Damit kann nicht abschließend beurteilt werden, ob sich bei SIGIRR Knockout die Entwicklung myeloider Vorläuferzellen zu Makrophagen oder myeloiden dendritischen Zellen vom Wildtyp quantitativ unterscheidet, wie in der Arbeit von Liew *et al.* (s.o.) vorgeschlagen.

Bezüglich der von Liew *et al.* 2005 vermuteten regulatorischen Rolle SIGIRRs in der Reifung myeloider dendritischer Zellen gibt es also unterschiedliche Ergebnisse: Als Beispiele wurden hier die Ergebnisse von Garlanda 2007 den Daten von Noris 2009 gegenübergestellt.

Meinen Ergebnissen zufolge gibt es bei in vivo differenzierten mDCs keinen Hinweis auf einen Einfluss SIGIRRs in der Differenzierung der Zellen.

Zusammenfassend ist aus den FACS-Ergebnissen dieser Arbeit zu schließen, dass sich die Entwicklung SIGIRR defizienter myeloider dendritischer Zellen bei der Differenzierung mit GM-CSF nicht von der Entwicklung der Wildtypzellen in Bezug auf Anzahl der Zellen und dem Anteil an MHCII positiven Zellen unterscheidet.

Die Umgebung der dendritischen Zellen hat aber sicher starken Einfluss darauf, wie dendritische Zellen aktiviert werden und reifen. Entsprechend kann sich das Eingreifen inhibitorischer Faktoren wie SIGIRR in den Reifungsprozess, je nach Umfeld, stark unterscheiden.

In murinen, wie auch in humanen, dendritischen Zellen wird SIGIRR stark exprimiert, wie es zu ihrem Vorkommen an Stellen des Körpers mit besonderem Kontakt zu Fremdantigenen, wie dem Darm, und ihre Funktion bei der Präsentation von Anitgenen passt [26, 15, 14].

In der Stimulation aus Knochenmark differenzierter muriner myeloider dendritischer Zellen mit TLR-Agonisten war diesen Eigenschaften entsprechend eine erhöhte IL-6 Produktion SIGIRR defizienter mDCs zu erwarten (vgl. 3.1.3). Es zeigten sich hier aber *keine* Unterschiede zwischen myeloiden dendritischen Zellen vom Wildtyp gegenüber solchen mit SIGIRR Knockout bei der Stimulation mit dem TLR-9 Liganden 1668PTO (CpG-DNA). Auch in der Stimulation mit LPS zeigten sich keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen Wildtyp und SIGIRR-Knockout in Bezug auf die IL-6 Reaktion. Die Ergebnisse aus der Stimulation mit LPS sind jedoch nur eingeschränkt verwertbar, wie später im Detail erklärt werden soll.

Insbesondere überraschte das Ergebnis der Stimulation in Bezug auf bisher veröffentlichte Arbeiten. Im Folgenden seien Arbeiten zu dendritischen Zellen und SIGIRR, insbesondere im Hinblick auf Stimulationen, und deren Ergebnisse im Vergleich zur vorliegenden Arbeit kurz dargestellt. Wenn nicht anders benannt, handelt es sich bei den beschriebenen Studien um Arbeiten am Mausmodell.

Im Jahr 2004 beschrieben Garlanda *et al.* eine erhöhte IL-6 Produktion unreifer knochenmarksstämmiger DC bei SIGIRR Knockoutmäusen, wenn sie in Beisein von LPS oder CpG-DNA kultiviert wurden. Weiter zeigte sich in unreifen, aus dem Knochenmark gereiften dendritischen Zellen die Expression von SIGIRR, während reife dendritische Zellen, die über die Exposition zu LPS gewonnen wurden, geringere Mengen an SIGIRR-Transkripten enthielten. Die Differenzierung erfolgte aus $CD34^+$ Knochenmarkzellen mit GM-CSF und Flt3-Ligand.[21]

Eine Arbeit von Lech *et al.* 2007 zeigte, dass SIGIRR defiziente $CD11b^+$ myeloide Zellen, im Gegensatz zu tubulären Epithelzellen eine erhöhte Chemokin (CCL2) Antwort auf LPS Stimulation zeigten. In der getesteten $CD11b^+$ Population waren 45 % der Zellen auch $CD11c^+$. Weiter wurde in der Arbeit von Lech *et al.* auch CpG-DNA (1668PTO) zur Stimulation verwendet, eine dort dargestellte Grafik zeigt unter Berücksichtigung der Standardabweichung aber nur geringe Unterschiede zwischen WT und ko der $CD11b^+$ Monozyten, anders als eine Regulation von TLR-9 durch SIGIRR erwarten ließe. [49]

Auch in einer Arbeit von 2009 beschrieben Lech *et al.* Unterschiede SIGIRR-defizienter myeloider Zellen ($CD11b^+$ APC) der Niere gegenüber SIGIRR-defizienten tubulären Epithelzellen der Niere in dem Sinne, dass SIGIRR die Zytokin- und Chemokinfreisetzung in $CD11b^+$ APCs nach Nierenzellschaden supprimiert. [51]

2010 beschrieben Lech *et al.* in einem Modell für (Erd)ölwasserstoff induzierten Lupus Erythematodes in Mäusen für SIGIRR-defiziente $CD11c^+$ dendritische Zellen der Milz

eine erhöhte Expression des Kofaktor CD40 im Vergleich zum Wildtyp (ohne vorherige Stimulation) in vivo, sowie erhöhte TLR-7 mRNA Level SIGIRR-defizienter dendritischer Zellen in vitro. In der Stimulation mit Imiquimod unterdrückte SIGIRR die Aktivierung dendritischer Zellen über TLR-7. [50]

Noris *et al.* zeigten 2009 höhere IL-6 mRNA Expression in SIGIRR-defizienten Nierentransplantaten und für SIGIRR-defiziente $CD11b^+$ DC Vorläuferzellen in Nierentransplantaten eine höhere IL-6 Produktion bei Stimulation mit einem TLR-4 Liganden (HA) und TNFα im Vergleich zum Wildtyp. [70]

Drexler *et al.* beschrieben 2010 die Bedeutung von SIGIRR in einem Überexpressionsmodell mit *humanen* unreifen dendritischen Zellen [15]. Dabei beschreiben sie, dass die Expression von SIGIRR in mit GM-CSF und IL-4 differenzierten (humanen) DC abnahm, wie ähnlich bereits von Garlanda *et al.* 2004 im Mausmodell beschrieben (s.o.).

Davies *et al.* berichteten 2010 über eine Hochregulation von sigirr-RNA in dendritischen Zellen aus Peyer-Plaques, nicht dagegen in dendritischen Zellen der Milz bei Exposition zu LPS: Dendritische Zellen ($CD11c^+$, $MHCII^+$) aus Peyer-Plaques reagierten bei in vitro LPS Exposition über 18 Stunden mit einer verminderten Bandbreite von Zytokinen im Vergleich zu dendritischen Zellen der Milz ($CD11c^+$, $MHCII^+$). Dies ließ sich nicht auf einen signifikanten Unterschied in der Expression von Toll-like-Rezeptoren, sondern auf eine Hochregulation von sigirr, tollip und tmed1 (m-RNA) in LPS-stimulierten Peyer-Plaques zurückführen.[12]

Bisherige Veröffentlichungen zu dendritischen Zellen zeigen damit, dass SIGIRR eine wichtige Rolle in der Regulation der

TLR-Antwort spielt. Sie zeigen aber auch, dass der regulatorische Einfluss SIGIRRs variiert, beispielsweise zwischen unterschiedlichen DC-Populationen oder in verschiedenen Reifestadien. Unterschiede ergeben sich auch durch die eingesetzten Stimuli, wie z.B. CpG-DNA oder LPS oder durch unterschiedliche Glykosilierung SIGIRRs.

Entsprechend ist es relevant, zu betrachten, welche Einflussfaktoren in den hier dargestellten Experimenten existieren und wie sie die unerwarteten fehlenden Unterschiede zwischen SIGIRR Knockout und Wildtyp in den Stimulationsexperimenten erklären können:

In den oben zitierten Publikationen zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit davon, welche dendritischen Zellen stimuliert wurden, vgl. z.B. Davies *et al.* 2010 [12]. Unterschiedliche Populationen dendritischer Zellen besitzen eine unterschiedliche Ausstattung an Toll-like Rezeptoren und werden durch unterschiedliche Kulturfaktoren in ihrem Wachstum beeinflusst [39, 28].

Für die Herstellung myeloider dendritischer Zellen wurde in dieser Arbeit GM-CSF als Zellkulturzusatz verwendet. Die Zugabe weiterer Faktoren, wie Flt3-Ligand zum Kulturmedium, ist zur Generation dendritischer Zellen nicht notwendig [37, 85]. Neuere Studien haben aber gezeigt, dass die hier entstehenden dendritischen Zellen sogenannten inflammatorischen dendritischen Zellen entsprechen, wie sie in vivo beispielsweise bei Infektionen entstehen [90]. Die Zugabe von Flt3-Ligand ist dagegen entscheidend für das Entstehen sogenannter „steady state“ mDCs [90]. Aufgrund der Differenzierungsmodalitäten ist also zunächst davon auszugehen, dass es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten dendritischen Zellen um inflammatori-

sche dendritische Zellen handelte [67]. Eine Charakterisierung der gewonnenen Zellen fand in dieser Arbeit aber nur über die Oberflächenmarker CD11c (Reinheit) und MHCII (Reife) statt.

Inflammatorische dendritische Zellen sind charakterisiert über eine mittlere CD11c Expression ($CD11c^{mid}$), eine hohe Expression von CD11b ($CD11b^{high}$), die Expression von macrophage differentiation antigen 3 (MAC3) und die fehlende Expression von CD4 und CD8 [90]. Zur Beurteilung des Reifegrades der Zellen können neben MHCII beispielsweise auch CD80 oder CD86 herangezogen werden [89].

Da in dieser Arbeit nur MHCII und CD11c beurteilt wurden und darüber hinaus eine Einteilung in $CD11c^{high}$, $CD11c^{mid}$ und $CD11c^{low}$ durch einen fehlenden Vergleichsrahmen schwer möglich ist, kann eine endgültige Einordnung letztlich nicht erfolgen.

Durch die Verwendung von GM-CSF im Kulturmedium sind die gewonnen dendritischen Zellen am ehesten der myeloiden Zelllinie zuzuordnen, da die Zugabe von GM-CSF zum Kulturmedium präferentiell zur Entwicklung myeloider dendritischer Zellen führt [4, 1]. Es wird aber auch diskutiert, ob inflammatorische dendritische Zellen statt durch GM-CSF eher durch den Einfluss von Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (M-CSF) entstehen und die bisherige Annahme, dass GM-CSF zur Generation dendritischer Zellen der myeloiden Zellreihe überhaupt notwendig sei, wird infrage gestellt [28, 24].

Eine genauere Charakterisierung wäre hier für eine bessere Interpretation der Ergebnisse in Hinsicht auf die verwendete

DC-Spezies (da unterschiedliche Spezies dendritischer Zellen unterschiedliche Eigenschaften, z.B. auch in Hinsicht auf ihre Ausstattung mit TRL-Rezeptoren aufweisen), als auch für die Vergleichbarkeit mit anderen Autoren daher hilfreich gewesen. In vielen Studien wird zwar ebenfalls keine weitere Zuordnung der dendritische Zellen getroffen, jedoch ist vermerkt, unter welchen Kulturbedingungen in vitro, oder welche Organe in vivo zur Gewinnung der Zellen verwendet wurden. Daneben wird meist die Expression von CD11b, oft aber nicht explizit die Expression von CD11c beschrieben.

Handelt es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten dendritischen Zellen tatsächlich um sogenannte inflammatorische dendritische Zellen, so ist, angesichts der Ergebnisse dieser Arbeit, die keine Unterschiede in der Zytokinausschüttung zwischen WT und SIGIRR-ko zeigen konnte, obgleich solche zu erwarten waren (s.o.), zu diskutieren, ob inflammatorische dendritische Zellen die richtige Zellspezies waren, um solche Unterschiede darzustellen.

Nach Differenzierung humaner dendritischer Zellen mit GM-CSF und IL-4 zeigten Drexler *et al.* 2010 eine verminderte SIGIRR Expression [15] dieser Zellen. Dem gegenüber steht eine Arbeit von Garlanda *et al.* von 2004, in der zur Kultivierung GM-CSF und Flt3-Ligand ($CD34^+$ Knochenmarkzellen mit GM-CSF und Flt3-Ligand) eingesetzt wurden und in denen unreife dendritische Zellen SIGIRR deutlich exprimierten [21]. Ein entscheidender Unterschied beider Arbeiten ist die Art, in der die Differenzierung zu dendritischen Zellen durchgeführt wurde: Die Differenzierung mit GM-CSF und IL-4 führt im humanen System, wie die Verwendung von reinem GM-CSF in der Maus, zur Entwicklung inflammatorischer dendritischer

Zellen [90].

Auch wenn beide Arbeiten nicht direkt vergleichbar sind, deutet dies darauf hin, dass inflammatorische dendritische Zellen weniger SIGIRR exprimieren, als sogenannte „steady state“ dendritische Zellen. Da inflammatorische dendritische Zellen die dominante DC-Spezies in einer systemischen Entzündungsreaktion darstellen, ergibt es Sinn, dass hier regulatorisch Proteine, wie beispielsweise SIGIRR, herunter geregelt sind, beziehungsweise eine solche starke Entzündungsreaktion erst durch verminderte Expression regulatorischer Proteine zustande kommen kann.

Da die hier dargestellten Stimulationsexperimente am ehesten, wie dargestellt, bei inflammatorischen dendritischen Zellen durchgeführt wurden, ist dies eine gute Erklärung, warum keine Unterschiede zwischen SIGIRR-Knockout und Wildtyp deutlich wurden, wenn auch die Wildtypzellen nur geringe Mengen SIGIRR exprimieren.

Neben bisher Genanntem kommen weitere Einflussfaktoren infrage, die das Experiment beeinflussen. Diese stehen sich dabei nicht als Gegensätze gegenüber, sondern können im Gegenteil auch gemeinsam das Ergebnis beeinflussen:

Wie bereits dargestellt ist SIGIRR nicht in allen Zellarten gleich stark exprimiert (vgl. 1.1.3 „SIGIRR“). Insofern kann die fehlende Nachweisbarkeit einer immun-regulatorischen Wirkung SIGIRRs im übermäßigen Vorliegen einer Zellpopulation mit nur geringer SIGIRR Expression der Wildtypzellen liegen.

Bei der Differenzierung myeloider dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark unter der Verwendung von GM-CSF entstehen so beispielsweise auch Makrophagen und Granulo-

zyten [37].

Makrophagen hafteten am Boden der Kulturschalen an und wurden mit diesen verworfen (s.o.). Granulozyten sind dagegen nur leicht adhärent und konnten auf diese Weise nicht von dendritischen Zellen getrennt werden. Dies bedeutet, dass bei Stimulation der isolierten Zellen vermutlich auch Granulozyten miterfasst wurden.

Myeloide Zellen, die unter Zugabe von GM-CSF zum Kulturmedium entstehen, wie Makrophagen und Granulozyten exprimieren CD11c als Oberflächenmarker [2]. Granulozyten exprimieren im Vergleich zu dendritischen Zellen jedoch geringere Mengen CD11c ($CD11c^{low}$) [1, S. 339][64, S. 333].

Myeloide dendritische Zellen lassen sich im FACS also (theoretisch) durch die hohe Expression von CD11c ($CD11c^{high}$) (vgl. auch Einleitung 1.1.2) und die Expression von MHCII auf der Zelloberfläche [2, S. 115] von Granulozyten oder Makrophagen unterscheiden. Einschränkend ist anzumerken, dass für die hier vermutlich vorliegenden inflammatorischen dendritischen Zellen eher eine durchschnittliche Expression von CD11c (sog. $CD11c^{mid}$beschrieben ist (s.o.). Die Granulozytenpopulation wurde in den FACS Färbungen nicht gesondert berücksichtigt. Eventuell wurden also neben dendritischen Zellen auch Granulozyten stimuliert. Dies kann den Ausgang der Experimente beeinflusst haben.

Eine mögliche Methode, die entstehenden Granulozyten aus der Kultur zu entfernen, ist bei *Inaba et al.* 1992 beschrieben. Hier wurden Dendritische Zellen aus einer murinen Knochenmarkskultur unter GM-CSF Einfluss kultiviert. Die zuerst entstehenden, leicht-adherenten Zellen wurden als Granulozyten (hauptsächlich Neutrophile) identifiziert und durch leichte

Drehung der Platten gelöst und durch Abpipettieren aus der Kultur entfernt [37].

Bei einem solchen Schritt wäre aber zu befürchten gewesen, dass die sich entwickelnden dendritischen Zellen durch die Bewegung zu reifen dendritischen Zellen (mit hoher Expression von MHCII, s.u.) heranwachsen. Daher wurde jede nicht-notwendige Bewegung der Platten vermieden und neues Zellkulturmedium direkt zugegeben, ohne vorher Medium zu entfernen.

Eine andere Lösung, die zur Vermeidung der Entstehung anderer Zellen der myeloiden Zellreihe zum sogenannten „steady state“ dendritischer Zeller führt, ist die Verwendung von Flt3-Ligand ohne Zugabe von GM-CSF als Kulturmedium, wie von Hammer *et al.* 2013 im Rahmen eines Reviews vorgeschlagen [28]. Zum Durchführungszeitpunkt der hier dargestellten Experimente war dieses Review noch nicht erschienen, für zukünftige Experimente ist dieser Ansatz aber in Erwägung zu ziehen, da er zwei Probleme löst: Das Vorkommen von Makrophagen und v.a. Granulozyten in der Zellkultur und die vermutlich geringe SIGIRR Expression inflammatorischer dendritischer Zellen.

Die hohe Expression von MHCII an der Oberfläche dendritischer Zellen ist eine Eigenschaft reifer dendritischer Zellen [1, S. 121] und vollzieht sich in vivo nach Aktivierung unreifer dendritischer Zellen in der Peripherie [97]. Trotz vorsichtiger Handhabe und erschütterungsfreier Kultivierung war der Anteil der als MHCII^{high} definierten Population nur bis auf 5 % bis 12 % zu reduzieren (vgl. Abb.3.12).

Dies ist relevant, da sich nach Ergebnissen von Drexler *et*

al. 2010 (s.o.) die Expression von sigirr mRNA, und damit vermutlich auch das Vorkommen von SIGIRR in der Zellmembran, bei der Reifung dendritischer Zellen verringert [15]. Wie für die Granulozyten bereits beschrieben, kann eine schwache Expression SIGIRRs wiederum Ursache dafür sein, dass sich keine Unterschiede in der Stimulierbarkeit des SIGIRR-Knockout gegenüber dem Wildtyp myeloider dendritischer Zellen zeigen.

Nach Ergebnissen von Davies *et al.* ist es auch denkbar, dass die Verwendung bestimmter konditionierender Faktoren, wie z.B. LPS in vivo oder in vitro, notwendig ist, um einen Unterschied zwischen SIGIRR Knockout und Wildtyp in der Reifung zu zeigen. Als Mechanismus wäre denkbar, dass Exposition gegenüber LPS zum Zeitpunkt der Zelldifferenzierung zu einer erhöhten Expression von SIGIRR auf dendritischen Zellen führt und damit die Unterschiede im Phänotyp zwischen WT und ko, wo eine solche Hochregulation nicht möglich ist, erhöht. Andererseits könnte auch die vermehrte Expression von Toll-like Rezeptoren an der Zelloberfläche (ausgelöst durch unterschiedliche Reize, wie z.B. unter ischämischen Bedingungen wie beispielsweise bei Lech *et al.* 2009) eine vermehrte regulatorischer Aktivität SIGIRRs, sofern vorhanden, bedingen, ohne dass SIGIRR an sich in erhöhtem Maße exprimiert wird. Während in den B-Zellexperimenten eine solche Vorinkubation versucht wurde (vgl. S.3.2.3) und sich hier keine Unterschiede zeigten, möglicherweise weil eben eine Differenzierung aus Vorläuferzellen zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen war, wurden in den Experimenten mit dendritischen Zellen keine Versuche in dieser Richtung unternommen. Auch sprechen gegen einen solchen Mechanismus Ergebnisse von Garlanda *et*

al. 2004, wonach dendritische Zellen, die unter Exposition zu LPS gewonnen wurden, im Vergleich zu unreifen dendritischen Zellen geringere Mengen an SIGIRR exprimierten [21].

In den hier dargestellten Stimulationsexperimenten myeloider dendritischer Zellen wurden als Stimuli der TLR-9 Ligand 1668PTO und der TLR-4 Ligand LPS gewählt. Die Regulation des TLR-9 Signalweges über SIGIRR ist in der Literatur gut belegt [98, 21, 78] und wird über eine Bindung an das Signalpeptid MyD88 gesteuert [78, 14]. Damit war der Einsatz von CpG-DNA (1668PTO) als Stimulanz naheliegend.

MyD88 spielt auch in der Signalkaskade über TLR-4 eine wichtige Rolle. Auch hier ist eine Regulation über SIGIRR beschrieben. Für TLR-4 ist daneben aber noch ein anderer Signalweg, über TIR domain–containing adaptor-inducing IFN-ß (TRIF), beschrieben, der nicht über MyD88 vermittelt wird [3] (vgl. auch 1.1.3). Damit diente der Einsatz von LPS in den dendritischen Zellexperimenten zunächst als Positivkontrolle. Die IL-6 Antwort fiel dabei jeweils stärker aus als in B-Zellexperimenten. Dies ist konsistent mit der Hauptfunktion von mDCs, die in der Induktion einer T-Zellantwort über die Ausschüttung von IL-6 liegt [1, S.119][25].

Dennoch wird in vielen Studien zu SIGIRR in B-Zellen, wie auch in dendritischen Zellen, LPS als Stimulanz eingesetzt und es ist, trotz dem Vorhandensein eines MyD88 unabhängigen Signalweges, eine Regulation über SIGIRR beschrieben. Das führt zu zwei möglichen Schlüssen: Entweder nimmt SIGIRR auch im TRIF-Signalweg eine regulatorische Position ein, oder der MyD88 vermittelte, SIGIRR-kontrollierte Signalweg wird bevorzugt.

In den hier dargestellten Experimenten zu myeloiden den-

dritischen Zellen (ohne MACS-Sorting) lag die IL-6 Antwort bei Stimulation mit LPS häufig über Reichweite des eingesetzten Standards. Die ermittelten Werte für die IL-6 Antwort auf LPS sind entsprechend Hochrechnungen aus der mit der Standardreihe bestimmten Konzentrationskurve und werden umso mehr vom realen Wert abweichen, je weiter sie von dem von der Standardreihe abgedeckten Bereich entfernt liegen. Dies wiederum bedeutet eine gewaltige Schwankungsbreite, sodass die erhaltenen Werte kaum genutzt werden können, kleine Abweichungen zwischen WT und SIGIRR-ko zu detektieren. Soweit lässt sich nur feststellen, dass keine ausgeprägten Unterschiede bestanden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf einer Beurteilung der Regulierung der TLR-9 Regulation durch SIGIRR, aber es ist ein wichtiges Versäumnis, dass nicht in allen Experimenten Anstrengungen unternommen wurden, die Standardreichweite anzupassen.

Für die Experimente in denen das geschehen ist, lassen sich keine Unterschiede zwischen SIGIRR-ko und WT in der Stimulation myeloider dendritischer Zellen mit dem TLR-4 Liganden LPS nachweisen.

Die IL-6 Antwort dendritischer Zellen wurde allein auf Stimuli des TLR-4 und TLR-9 Rezeptoren getestet. Da in murinen myeloiden dendritischen Zellen aber ein weites Spektrum an TLR-Rezeptoren exprimiert wird (vgl. 1.1), kommen als Stimuli weitere Faktoren wie beispielsweise Pamp3Cys als TLR-2 Stimulus, in Betracht (vgl. B-Zellstimulation 3.1.2). In vielen Studien wurde des weiteren TNFα als Stimulus eingesetzt, wie auch Unterschiede zwischen Zellen aus SIGIRR-WT gegenüber Zellen SIGIRR-ko Mäusen beschrieben. TNFα aktiviert unter anderem NFκB über Tumornekrosefaktor-Rezeptor

(TNFR), eigentlich ein MyD88 unabhängiger Signalweg [8]. Nach aktuellem Kenntnisstand spielt die Regulation über SIGIRR aber vor allem in MyD88 *abhängigen* Signalkaskaden eine Rolle. Demnach sollte sich TNFα nicht zur Untersuchung SIGIRR abhängiger Regulationswege eignen, es sei denn, als Einsatz im Sinne einer Negativkontrolle.
Bei den vorgestellten Ergebnissen wird in dieser Arbeit eine hohe SIGIRR Expression dendritischer Zellen entsprechend der publizierten Daten zu dieser Zellreihe unterstellt. Damit bleibt aber die Frage offen, wie hoch die Expression von SIGIRR in den Zellen zum Zeitpunkt der Stimulationsexperimente war. Damit hätte beispielsweise sigirr mRNA via PCR gemessen werden können, oder, sofern SIGIRR an der Oberfläche der Zellen exprimiert wird, auch Färbung mit SIGIRR spezifischen Antikörpern im FACS. Dies wäre insbesondere auch interessant gewesen bei Betrachtung der MHCII^{high} Subspezies. Die Expression von sigirr mRNA bedeutet ohnehin nicht unbedingt eine erhöhte Produktion von funktionsfähigem SIGIRR und ist als Methode daher ungenauer.

Auch andere regulatorische Proteine wie beispielsweise toll interacting protein (tollip), IRAK-M oder SOCS-1 können einen Einfluss auf das Stimulationsergebnis haben [12, 28]: Wie auch bei B-Zellen (s. 3.2.3), so besteht auch bei dendritischen Zellen die Möglichkeit, dass ein Ausfall SIGIRRs durch andere regulatorisch wirksame Proteine kompensiert wird. Eine Untersuchung anderer regulatorischer Faktoren kann hier möglicherweise Hinweise liefern.

Als Ursache für Unterschiede im Verhalten gegenüber Stimulation bei verschiedenen dendritischen Zellen nennen Lech *et al.* 2007 unterschiedliche Glykosilierungen an SIGIRR [49]. Ei-

ne Untersuchung von Glykosylierungsmustern bei WT mDCs wäre vor allem dann sinnvoll, wenn sich eine starke SIGIRR Expression, trotz fehlender Unterschiede in der Stimulation nachweisen ließe. Auf die mögliche Bedeutung von Glykosilierungen bei SIGIRR wird im zweiten Teil dieser Arbeit zur Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern (s. S. 134 ff) eingegangen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in vielen Studien Unterschiede zwischen WT und SIGIRR-ko in der Stimulation gezeigt werden konnten, während sich in dieser Versuchsreihe mit aus dem Knochenmark unter Zugabe von GM-CSF differenzierten $CD11c^+$ myeloiden dendritischen Zellen keine solchen Unterschiede darstellten.

Diese Ergebnisse stehen sich dabei aber nicht widersprüchlich gegenüber. Denn dendritische Zellen zeigen, wie erläutert, ein unterschiedliches Verhalten, je nach Ausstattung mit Toll-like Rezeptoren und anderen Oberflächenproteinen (CD8, CD11b, CD11c, MHCII, CD80, usw.), wiederum beeinflusst von Kulturfaktoren wie LPS oder Flt3-Ligand und der Wahl der eingesetzten Stimuli. Nicht zuletzt spielt natürlich auch eine Rolle, auf welche Weise die Reaktion der Zellen gemessen wurde (IL-6, mRNA, usw.) und ob es weitere Regulationsmechanismen (Glykosilierung, andere regulatorische Proteine) gibt, die hier Einfluss nehmen.

Die Problematik besteht darin, den- oder die- entscheidenden Einflussfaktoren zu isolieren. Eine Elimination dieses Faktors sollte dann entsprechend zu nachweisbaren Unterschieden zwischen SIGIRR-Knockout und Wildtyp myeloider dendritischer Zellen in der Stimulation führen. Durch den Vergleich

mit anderen Arbeiten zum Thema wurde erklärt, welche Methoden als Lösung dieser Problematik in Frage kommen.

Stimulation MACS separierte CD11c$^+$ mDCs

Da für mDCs wie dargestellt keine Unterschiede in der IL-6 Produktion zwischen Wildtyp und SIGIRR-Knockout bei Stimulation nachzuweisen waren, wurde an die Differenzierung von mDCs aus Knochenmark eine Positivselektion CD11c$^+$ Zellen im MACS angeschlossen (vgl. 2.2.5, 3.1.3).

Dies geschah vor dem Hintergrund, eine höhere Reinheit an dendritischen Zellen (CD11c$^+$) zu gewinnen und solche Zellen, die eine andere Differenzierung aufwiesen (Zelldetritus, Makrophagen, Granulozyten (CD11c^{low})), aus der Kultur zu entfernen.

Auffällig ist in beiden Experimenten, dass sich ein SIGIRR spezifischer Effekt vor allem im Bezug auf den TLR-4 Liganden LPS zeigt. Während für SIGIRR-ko bei den aufgereinigten CD11c$^+$-dendritischen Zellen die IL-6 Produktion in der Stimulation mit LPS, wie in den bisherigen Experimenten mit dendritischen Zellen, wieder sehr hoch ist, zeigen Wildtyp-Zellen im Vergleich nur eine schwache Reaktion. Unterschiede zeigen sich zwar auch für den TLR-9 Liganden 1668PTO, jedoch ist die Reaktion insgesamt schwächer und die Unterschiede stellen sich im Vergleich zu LPS geringer dar (s. S. 98). Dies überrascht, denn auf TLR-4 war, wie bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert, nicht das Augenmerk gerichtet. Ein Vergleich zu anderen mDC Experimenten ohne Aufreinigung fällt daher schwer, weil dort die Standardreichweite aus erklärten Gründen nicht immer angepasst wurde. Ein solches Ergebnis ist aber konsistent mit Ergebnissen anderer Arbeits-

gruppen die ebenfalls eine regulatorische Aktivität SIGIRRs im TLR-4 Signalweg dendritischer Zellen nachweisen konnten [21, 49, 15].

Als problematisch ist bei den Experimenten mit aufgereinigten $CD11c^+$ dendritischen Zellen die geringe Zellzahl in den Ansätzen anzusehen. In der Stimulation betrug die Anzahl der stimulierten Zellen pro Well hier nur $0,065 * 10^6$, gegenüber $0,2 * 10^6$ bei den Versuchen ohne Aufreinigung. Durch die Verwendung einer geringen Zellzahl ist die IL-6 Produktion insgesamt geringer als in den bisherigen Versuchen. Sie kann jedoch gegenüber der Mediumkontrolle gut abgegrenzt werden.

Dennoch erschweren geringe Zellzahlen die Handhabung und die Möglichkeiten, die gewonnenen Zellen ausführlich zu untersuchen. So konnten beispielsweise nicht alle geplanten Ansätze durchgeführt werden, da nach MACS-Aufreinigung nicht genug Zellen verfügbar waren.

Eine Möglichkeit, die verfügbare Zellzahl zu erhöhen besteht darin, die Zellen mehrerer genetisch identischer Mäuse zu „poolen“. Ein solches „Pooling“ wurde auch in anderen Studien zu SIGIRR und dendritischen Zellen verwendet, wie beispielsweise bei Garlanda *et al.* 2004 und 2007 beschrieben [21, 20]. Ein Nachteil gepoolter Zellen ist, dass trotz genetisch gleichen Hintergrundes der Tiere individuelle Unterschiede bestehen, wie sie auch in den Stimulationsexperimenten zur Darstellung kamen. Auch waren zum Zeitpunkt der Durchführung nicht ausreichend Mäuse verfügbar, die für ein Zusammenlegen in Frage gekommen wären.

Die MACS-Separation CD11c positiver Zellen wurde als Po-

sitivselektion durchgeführt: Diese führt in der Regel zu einem sehr hohen Reinheitsgrad der sortierten Zellen, hat aber den Nachteil, dass die eingesetzten Antikörper an den Oberflächenstrukturen verbleiben. Dies kann sich störend auswirken, da es unter anderem so zu einer Aktivierung der markierten Zellen kommen kann [56].

Die Analyse der FACS-Daten nach MACS-Separation ergab, dass auch nach Positivselektion mit CD11c-FITC/α-FITC-MACS-Beads noch CD11c positive Zellen im Durchlauf waren. Diese waren CD11c-FITC gefärbt, waren im magnetischen Feld aber nicht zurückgeblieben. Dies lässt schließen, dass die MACS-Antikörper unter Umständen nicht ausreichend gebunden, oder nicht in ausreichender Menge verfügbar waren. Eine Verbesserung dieses Schrittes in der Aufreinigung kann ebenfalls zu besseren Zellzahlen im Ergebnis führen.

Eine Separation mit FACS, wie z.B. durch Noris *et al.* 2009 zur Separation dendritischer Zellen aus der Milzzellsuspension verwendet (CD11c/CD11b) [70], war zum Zeitpunkt der Experimente nicht verfügbar. Gegenüber der MACS-Separation hat sie den Vorteil, dass die Zellen in weniger Arbeitsschritten gefärbt, untersucht und separiert werden können.

Neben CD11c existieren andere Oberflächenmarker, die für myeloide dendritische Zellen typisch sind, wie beispielsweise CD11b. So wurden in einer Arbeit von Lech *et al.* 2007 eine MACS Separation für den Oberflächenmarker CD11b durchgeführt, während Davies *et al.* 2010 Zellen nach dem Oberflächenmarker CD11c separierten. Beide Marker sind typische Oberflächenmarker dendritischer Zellen, in beiden Arbeiten wurden, anders als in dieser Arbeit, durch diese Marker dendritische Zellen aus einer gemischten Zellsuspension (aus Niere

oder Milz) gewonnen [12, 49]. Dagegen war in dieser Arbeit durch die Differenzierung aus murinem Knochenmark bereits eine große Menge dendritischer Zellen in der Kultur anzunehmen. Die gezeigten Unterschiede zwischen SIGIRR Knockout und Wildtyp nach CD11c Separation lassen darauf schließen, dass der Differenzierungsgrad der Zellen in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt. Die Tatsache, dass nach dem in dieser Arbeit genutzten Stimulationsschema vor allem Inflammatorische Zellen mit nur geringer beschriebener CD11c Expression zu erwarten sind, kann damit Ursache sein für die fehlende Darstellbarkeit relevanter Unterschiede zwischen SIGIRR ko und WT in den eingangs gezeigten Experimenten.

Da entsprechende Experimente nur in zwei unabhängigen Ansätzen durchgeführt wurden und die Anzahl der stimulierten Zellen gering war, sind weitere Experimente zur Bestätigung dieser These notwendig.

Die zuletzt beschriebenen Experimente mit Stimulation von $CD11c^+$ Zellen nach MACS-Separation sind durch die gegebenen Bedingungen als Vorexperimente anzusehen. Da hier Unterschiede zwischen WT und SIGIRR-Knockout zu beobachten waren, erscheint eine Durchführung in einem größeren Ansatz, unter Beachtung der oben genannter Vorschläge und Hintergründe sinnvoll. Neben CD11c und MHCII könnten beispielsweise weitere Marker, wie z.B. CD40 oder CD11b im FACS untersucht und zur besseren Auswertung herangezogen werden. Auch sinnvoll wäre eine MACS Aufreinigung nach CD11b positiven Zellen in gleicher Manier (s.a. 3.2.4).

4. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen humanes SIGIRR

4.1. Ergebnisse

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Antikörper gegen humanes SIGIRR (hSIGIRR) in Hybridomazellkulturen hergestellt und charakterisiert: α-hSIGIRR-AK wurden im ELISA (vgl. 2.2.7), Westernblot (vgl. 2.3.11) und FACS (vgl. 2.2.8) getestet und konnten mit Hilfe von FPLC (vgl. 2.3.1) aufgereinigt werden.

4.1.1. Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes SIGIRR

Die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes SIGIRR erfolgte wie im Methodenteil unter 2.3.6 „Generierung von Hybridoma-Zellen“ beschrieben. Ausplattiert wurde auf insgesamt sechs 96-well Flachbodenplatten. Die Namensgebung der Antikörper erfolgte nach dem Namen der Platte (1-4, 9, 10) und der Position auf der 96-well Platte (A-H, 1-12). Die

Überstände wurden im ELISA, wie unten beschrieben, auf Antikörper gegen humanes SIGIRR getestet. War dieses deutlich gegeben und war makroskopisch nur eine Zellkolonie in der Vertiefung der Flachbodenplatte zu erkennen wurde der entsprechende Klon expandiert.

4.1.2. Antikörper im ELISA: Antikörperauswahl, Antikörperklassen und Kreuzreaktivität

Im ELISA wurde die Bindung der Antikörper an hSIGIRR-Fc mit der Bindung an Kontrollprotein und Negativkontrollen (Kontrolle 1: hSIGIRR-Fc mit Medium; Kontrolle 2: Medium mit α-hSIGIRR Antikörper) verglichen.

Aus 576 Klonen zeigten 45 im ELISA eine deutlich nachweisbare Antikörperspezifität gegen humanes SIGIRR. Davon wurden 29 expandiert und ausgetestet, da sie jeweils in der Flachbodenplatte nur eine makroskopisch erkennbare Kolonie zeigten. In Abb. 4.1 sind exemplarisch Ergebnisse aus drei Antikörperaustestungen gezeigt.

Die Zellklone wurden, bei regelmäßigem Austausch von Zellkulturmedium sowie Einfrieren von Klonen, weiter in Kultur gehalten und expandiert. In regelmäßigen Abständen wurden ihre Zellkulturüberstände erneut getestet, wobei die Überstände auch in 1:5 und 1:25 Verdünnung getestet wurden. Für alle in Abbildung 4.1 gezeigten antikörperhaltigen Zellkulturüberstände gilt, dass die gemessene Antikörperbindung an humanes SIGIRR im Zeitverlauf (y-Achse) abfällt, bis sie nicht stärker nachzuweisen ist als die Bindung an das Kontrollprotein (V-), bzw. an Proteine des Zellkulturmediums (Kontrolle 2) und damit dem Hintergrund des ELISA entspricht. Zu Beginn der Messreihe gilt für 2-G11 und 4-A10, dass auch bei Verdünnung

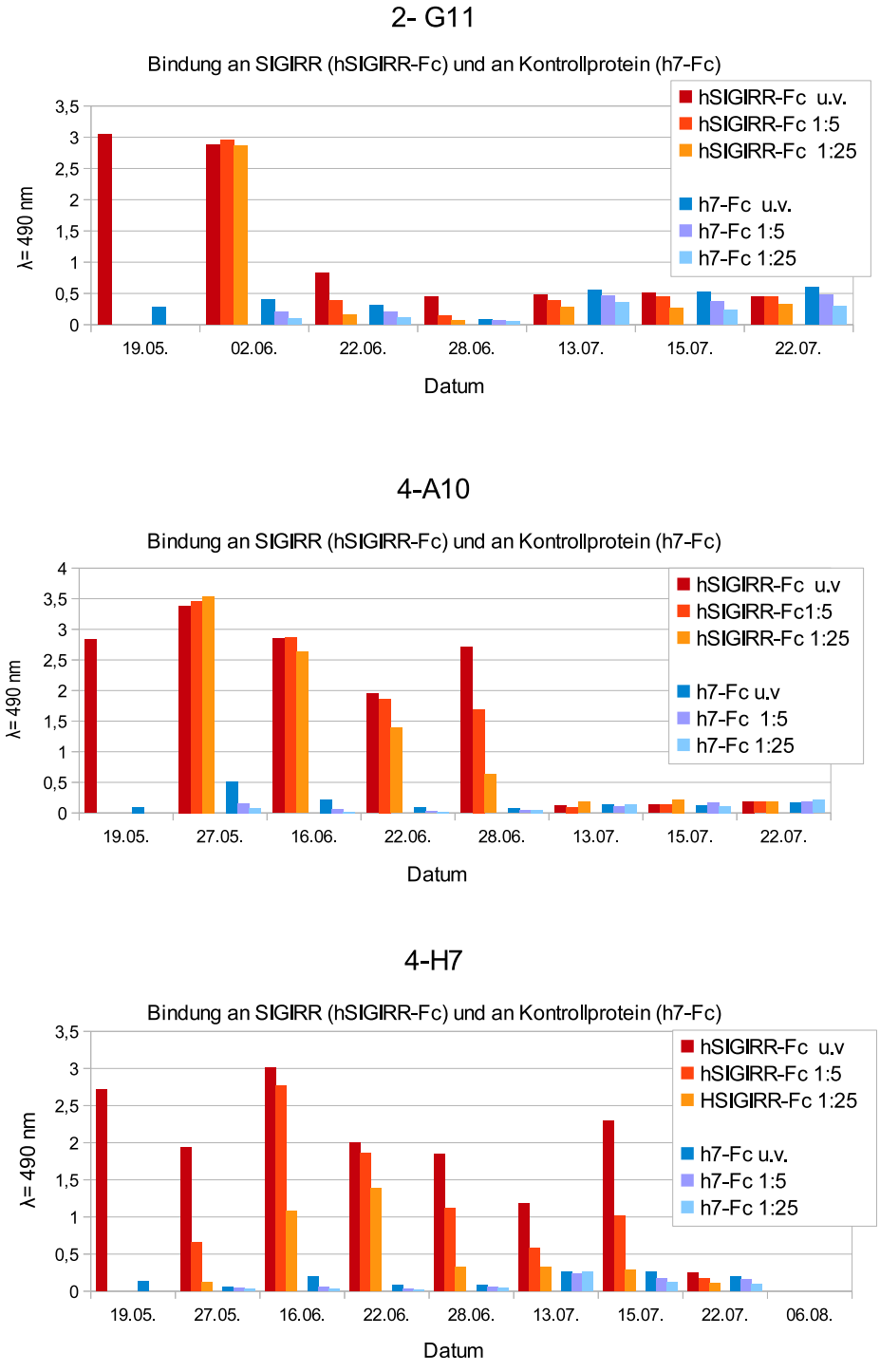

Abb. 4.1.: **Fc-ELISA ausgewählter α-hSIGIRR Antikörper.** Dargestellt ist die Bindung an humanes SIGIRR-Fc (hSIGIRR-Fc) gegenüber einem humanem Kontrollprotein mit Fc-Teil (h7-Fc) im Zeitverlauf. x-Achse: Datum der Austestung; y-Achse: Absorption (λ) bei 490 nm.

um 1:5 und 1:25 die gemessene Absorption nicht geringer wird. Dies entspricht einer hohen Konzentration an Antikörpern im getesteten Überstand zu diesen Zeitpunkten.

Für gezeigte Antikörper und weitere Antikörper mit spezifischer Bindung an SIGIRR wurden Subklonierungen durchgeführt. Diese Subklonierungen führten zu drei Klonen mit spezifischen Antikörpern: 4-A10(5)A3, 4-A10(5)B4 und 4-A10(5)C2.

Antikörperklassen

Vielversprechende SIGIRR-spezifische Antikörper wurden auf ihre Antikörperklassen hin, wie auf Seite 2.2.7 beschrieben, getestet. Das Ergebnis zeigt Tabelle 4.1.

Antikörper	**Antikörperklasse**
9-D7	IgG1
4-A10	IgG2b
2-A4	IgG2b
2-G11	IgG2b
4-H7	IgG2b
4-A10(5)B4	IgG3

Tab. 4.1.: **Antikörperklassen.**

Kreuzreaktivität

Da die Myelomazellen mit B-Zellen SIGIRR defizienter Mäuse fusioniert wurden, bestand die Möglichkeit einer Kreuzre-

aktivität mit murinem SIGIRR der resultierenden Antikörper. Darauf wurde unter Verwendung eines murinen SIGIRR-Fusionsproteins (mSIGIRR-Fc) mithilfe eines Fc-ELISA getestet. Die Vorgehensweise beim Fc-ELISA ist im Methodenteil auf Seite 2.2.7 beschrieben.

Abbildung 4.2 zeigt exemplarisch das Ergebnis für den Antikörper 4-A10. Im ELISA zeigt sich eine gute Bindung des Antikörpers an humanes SIGIRR. Dagegen ist keine spezifische Bindung an murines SIGIRR nachzuweisen: Die gemessene Absorption unterscheidet sich nicht wesentlich vom Hintergrund, also einer unspezifischen Reaktion im ELISA, wie gegenüber den Kontrollen ersichtlich.

Wie 4-A10 zeigte auch keiner der anderen ausgetesteten Antikörper dieser Immunisierung eine Kreuzreaktivität mit murinem SIGIRR. Eine Übersicht der hierzu durchgeführten Experimente zeigt Tabelle 4.3.

4.1.3. Antikörper im Western Blot

α-hSIGIRR-Antikörper, die im ELISA ein gutes Bindungsverhalten gezeigt hatten, wurden im Western Blot getestet (vgl. 2.3.11 „Test der Antikörper“). Diese Versuche zeigen, ob ein Antikörper im Western Blot verwendet werden kann. Dies ist der Fall, wenn er Regionen erkennt, die durch Denaturierung nicht verändert werden.

Die Versuche wurden mit humanem SIGIRR (nach Thrombinverdau von hSIGIRR-Fc) und mit Fusionsproteinen mit Fc Markierung (humanes SIGIRR-Fc, murines SIGIRR-Fc) oder mit HA Markierung (humanes SIGIRR-HA mit Signalpeptid, humanes SIGIRR-HA ohne Signalpeptid) durchgeführt.

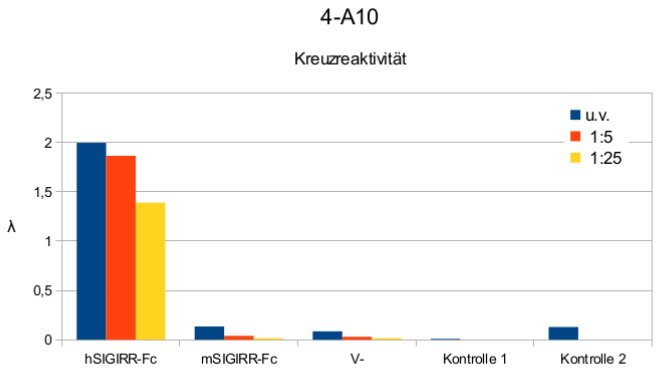

Abb. 4.2.: **Test auf Kreuzreaktivität gegenüber murinem SIGIRR am Beispiel von 4-A10. Fc-ELISA.** hSIGIRR-Fc: humanes SIGIRR-Fusionsprotein mit Fc-Teil und Antikörper 4-A10; mSIGIRR-Fc: Murines SIGIRR-Fusionsprotein mit Fc-Teil und Antikörper 4-A10; V-: humanes Kontrollprotein mit Fc-Teil („h7-Fc“) und 4-A10; Kontrolle 1: hSIGIRR-Fc mit Medium; Kontrolle 2: Medium mit Antikörper 4-A10; λ: Absorption bei 490 nm.

SIGIRR-Fc im Western Blot

Abb. 4.3 zeigt als Beispiel das Ergebnis aus der Austestung der Antikörper 10-B5 und 9-D7 mit hSIGIRR-Fc und mSIGIRR-Fc und im Vergleich zu einer Positivkontrolle (goat α-hIgG, Fc Fragment spezifisch). Für 10-B5 ist eine Doppelbande auf der Höhe von 55 kD bei hSIGIRR-Fc zu erkennen. Auch 9-D7 zeigt eine Doppelbande bei 55 kD mit hSIGIRR-Fc. Es zeigt sich jeweils kein Signal mit mSIGIRR-Fc. Die Positivkontrolle weist sowohl für hSIGIRR-Fc, als auch mSIGIRR-Fc ein deutliches Signal auf Höhe von ca. 55 kD auf, daneben auch weitere Banden bei geringerem Molekulargewicht bei beiden Proteinen.

Ebenso wurden weitere Antikörper ausgetestet. Die Ergebnisse einer Auswahl dieser Versuche sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

SIGIRR-HA im Western Blot

Abb. 4.4 zeigt das Ergebnis eines Western Blots von Lysaten aus HEK-Zellen die nicht transfiziert (Negativkontrolle) oder mit hSpSIGIRR-HA (humanes SIGIRR mit Signalpeptid und HA-Markierung) und hSIGIRR-HA(humanes SIGIRR mit HA-Markierung) transfiziert waren. Die Expressionskontrolle des transfizierten Vektors erfolgte zuvor im Western Blot durch Nachweis der HA-Markierung (HA-Tag) mit α-HA-Pox (s. Abb. 4.4 (A)).

SIGIRR-HA wurde mit HA-Sepharose Beads aus den Zelllysaten isoliert und anschließend für SDS-Page mit konsekutivem Western Blot vorbereitet. Nach dem Blotten wurden die PVDF-Membranen mit Antikörpern inkubiert und mit Peroxidase gekoppeltem Zweitantikörper detektiert wie im Me-

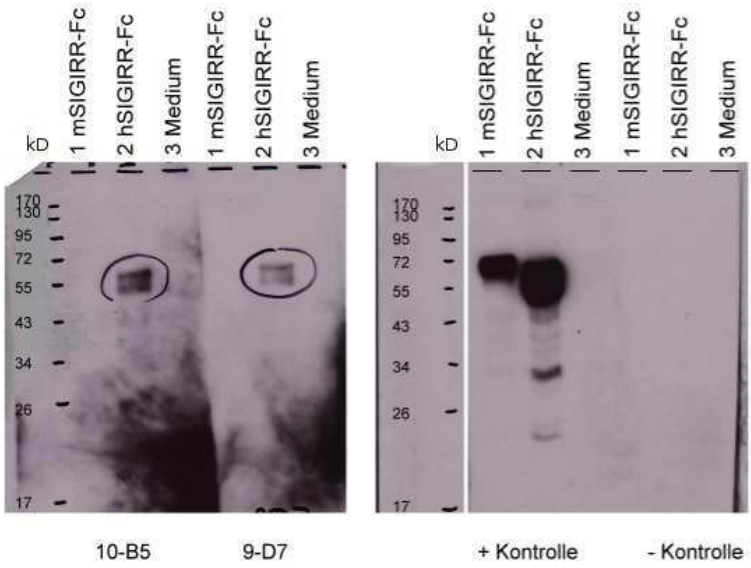

Abb. 4.3.: **Test von α-hSIGIRR Antikörpern im Western Blot.** Murines oder humanes SIGIRR-Fc mit den Antikörpern 10-B5 und 9-D7 und Detektion mit α-mouse-POX .
+ Kontrolle: Positivkontrolle mit goat α-hIgG (Fc Fragment spezifisch) und Detektion mit α-goat-POX; - Kontrolle: Negativkontrolle ohne Erstantikörper, nur α-goat-POX;
kD: Molekulargrößen Marker (in kD).

thodenteil auf S. 70 („Test der Antikörper im Western Blot“) beschrieben. Ausgetestet wurden die Antikörper 9-D7 und 10-B5.

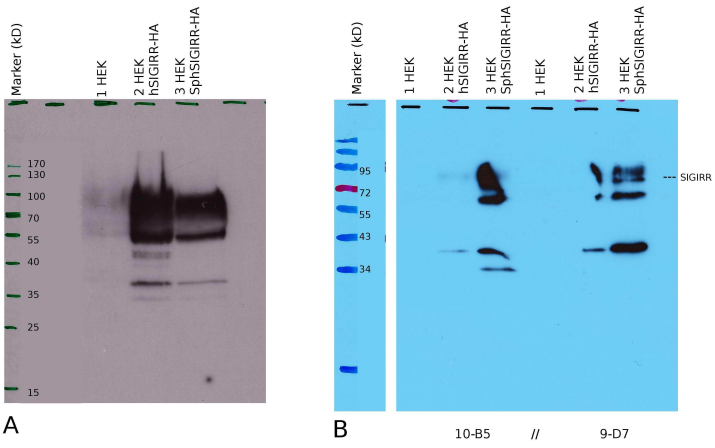

Abb. 4.4.: **(A) Nachweis von HA-Tag in transfizierten HEK-Zellen.** Nicht transfizierte HEK-Zellen (= HEK), mit humanem SIGIRR mit HA-Tag transfizierte HEK-Zellen (= HEK hSIGIRR-HA) und mit humanem SIGIRR, Signalpeptid und HA-Tag transfizierte HEK Zellen (= HEK SphSIGIRR-HA). Nachweis mit α-HA-Pox. **(B) Test von α-hSIGIRR Antikörpern im Western Blot.** Humanes SIGIRR-HA mit oder ohne Signalpeptid (aus HEK- Zellen) und Negativkontrolle aus nicht transfizierten HEK-Zellen mit den Antikörpern 10-B5 und 9-D7.
kD: Molekulargrößen Marker (in kD).

10-B5 zeigt in der Spur ohne Signalpeptid (Sp) bei ca. 87 kD und bei etwa 40 kD je eine Einfachbande. In der Spur mit Signalpeptid zeigt sich fleckförmig ein Signal bei ca. 87 kD, sowie Einfachbanden auf Höhe von 72 kD, 40 kD und 34 kD. Für 9-D7 zeigt sich entsprechend in der Spur mit Signalpeptid eine Doppelbande bei etwas 87 kD, eine Einfachbande bei 72 kD sowie

eine kräftige Bande bei ca. 40 kD. In der Spur ohne Signalpeptid ist auf Höhe 95 kD und 72 kD keine Bande auszumachen, sondern nur ein strichförmiges Signal. Eine deutliche Bande ergibt sich bei ca. 40 kD.

Die vorhergesagte Größe für SIGIRR liegt bei 39 kD. Für SIGIRR-Fc im WesternBlot (z.B. im Rahmen der Proteinaufreinigung) laborintern regelhaft beobachtet wird eine Doppelbande bei etwa 55 kD.

Im Western Blot mit SIGIRR-HA ist auffällig, dass sich die charakteristische Doppelbande bei einem hohen Molekulargewicht von ca. 95 kD findet und zusätzlich weitere Banden (insbesondere bei 34-44 kD) zu erkennen sind. Auf diesen Sachverhalt wird in der Diskussion weiter eingegangen.

4.1.4. Antikörper im FACS

α-hSIGIRR-Antikörper waren nicht fluoreszenzmarkiert, konnten aber mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpers in FACS-Färbungen verwendet werden. Untersucht wurden mit humanem SIGIRR-HA mit HA-Markierung (hSIGIRR-HA) und humanem SIGIRR mit Signalpeptid und HA-Markierung (hSpSIGIRR-HA) transfizierte HEK-Zellen gegenüber unveränderten HEK-Zellen als Negativkontrolle in der Oberflächenfärbung (vgl. auch 2.2.8). Für das gezeigte Experiment wurden der Antikörper 10-B5 aus Hybridomazellkulturüberständen verwendet (vgl. auch Abb. 4.5).

Die HEK-Zellen wurden entsprechend dem laborinternen FACS-Protokoll für Oberflächenfärbungen gefärbt (vgl. 2.2.8) und im FACS (Calibur, BD) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software Flowjo (8.10, Tree Star Inc.).

Abb. 4.5 zeigt den Ansatz für den Antikörper 10-B5 (C)

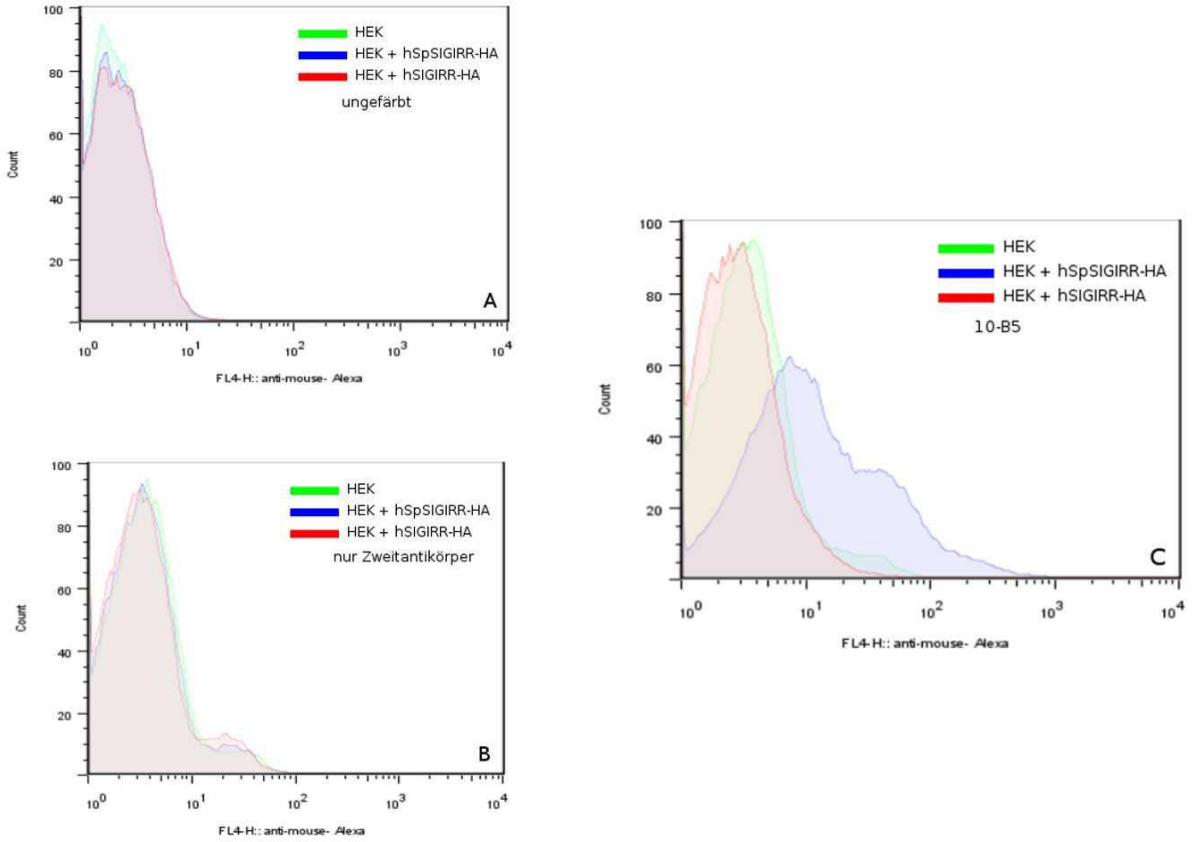

Abb. 4.5.: **Oberflächenfärbung für FACS.** Färbung von HEK-Zellen, hSpSIGIRR-HA HEK-Zellen und hSIGIRR-HA HEK-Zellen mit 10-B5 und fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper (C). Kontrollen: ungefärbt (A) oder nur Zweitantikörper (B). Verwendeter Zweitantikörper: α-mouse-ALEXA (Fc-Fragment spezifisch).

sowie zwei Kontrollen, eine nur mit Zweitantikörper gefärbt (B), die andere ungefärbt (A). Die grüne Kurve zeigt jeweils das Ergebnis für nicht transfizierte HEK-Zellen, die rote Kurve stellt den Ansatz mit hSIGIRR-HA dar. Der Ansatz mit hSpSIGIRR-HA ist mit der blauen Kurve beschrieben. Aufgetragen sind auf der y-Achse die gezählten Zellen, auf der x-Achse jeweils die Bindung des Fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpers entsprechend der ermittelten Signalstärke. Es zeigt sich für die Kontrollfärbungen (A, B) ein paralleler Verlauf aller Kurven, wohingegen in C eine Verschiebung der blauen Kurve gegenüber rot und grün deutlich wird.

Der Antikörper 10-B5 zeigt damit eine deutliche Bindung an HEK Zellen die mit humanem SIGIRR und Signalpeptid transfiziert waren, zu sehen an der Rechtsverschiebung der Kurve, aber keine Bindung an nicht transfizierte oder mit humanem SIGIRR ohne Signalpeptid transfizierten Zellen.

4.1.5. Endstand der Antikörperherstellung

Wie im Abschnitt „Antikörper im ELISA“ beschrieben, produzierten die meisten Zellklone nicht länger als circa (ca.) zwei Monate SIGIRR spezifische Antikörper. Für viele Hybridomazellklone war diese Zeit kürzer. Nach Ablauf dieser Zeit konnten keine SIGIRR spezifischen Antikörper mehr aus den Zellkulturüberständen gewonnen werden.

Im Verlauf der Antikörperherstellung mussten viele Klone aufgegeben werden. Dies geschah, wenn kein Zellwachstum mehr stattfand, keine oder nur unspezifische Antikörper nachzuweisen waren oder in seltenen Fällen, weil die Zellkultur verunreinigt war. Wenn es in flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellen dieses Klons gab, so wurde diese nun aufgetaut. Die

Rekultivierung gelang dabei häufig nicht, z.B. da die Zellen nicht anwuchsen (z.B. 2-G11). In einigen Fällen proliferierten die Zellen zwar, produzierten aber keine Antikörper mehr (z.B. 4-A10(5)B4) (vgl. auch Tab. 4.2).

Dies führte dazu, dass die Zahl verfügbarer Hybridomazellklone mit zufriedenstellender α-h-SIGIRR Produktion beständig abnahm.

Tabelle 4.3 gibt eine Übersicht über zum Abschluss des praktischen Teils dieser Arbeit vorhandene (bei 4 °C) gelagerte Zellkulturüberstände, aufgereinigte bei -80 °C lagernde Antikörper und in flüssigem Stickstoff konservierte Zellklone.

Als stabil und mit einer guten Antikörperproduktion stellte sich der Klon 9-D7 heraus. Die Antikörper zeigten gute Ergebnisse in ELISA und Western Blot. Zellkulturüberstände von 9-D7 wurden daher gesammelt und mithilfe FPLC wurden die Antikörper aus diesen Überständen isoliert (vgl. auch 2.3.1). Der Proteingehalt aufgefangener Fraktionen wurde mit Nanodrop ermittelt, gepoolt, ankonzentriert, zu 5 Portionen *à* 200 µl (c= 0,66 mg/ml) aliquotiert und bei -80 °C gelagert, er steht für weitere Tests zur Verfügung. Auf gleiche Weise wurde mit den antikörperhaltigen Zellkulturüberständen der Zellreihe 10-B5 verfahren.

4.2. Diskussion

4.2.1. Problematiken bei der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes SIGIRR

Die im Methodenteil beschriebene Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper beruht auf der von Köhler und Mil-

Zellklon	**Bemerkung**
1-G1	
3-G1	
4-B1	
2-D5	
2-E3	
2-E3	
4-H7	
4-A10(5)B3	Subklon von 4-A10
4-A10(5)B4	Subklon von 4-A10
4-A10(5)C2	Subklon von 4-A10

Tab. 4.2.: **Kryokonservierte Hybridoma-Zellklone mit Spezifität gegen hSIGIRR.** Von nicht aufgeführten Zellklone (z.B. 9-D7, 10-B5) sind *keine* Zellen kryokonserviert.

stein 1975 veröffentlichten Arbeit [47]. Unter Berücksichtigung neuerer Veröffentlichungen wurde die Methode, wie unter 2.3.6 beschrieben, durchgeführt [91, 96].

Wie ebenfalls im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben, kamen zwei unterschiedliche Methoden der Immunisierung („footpad“ vs. „intraperitoneal“) zum Einsatz (vgl. 2.3.5). Beide Methoden zeigten sich ähnlich erfolgreich. Da die Methode der intraperitonealen Immunisierung aber mit geringerem zeitlichem Aufwand (zwei statt drei Injektionen) verbunden und auch leicht durchführbar ist, empfiehlt sie sich für zukünftige Experimente, soweit nach diesem einmaligen Vergleich beurteilbar.

Die hergestellten Hybridomazellen wuchsen im Selektionsmedium gut an, was für einen guten Erfolg der Hybridisierung

ID		9-D7	10-B5	4-A10	2-A4	2-G11	4-H7	4-A10(5)B4
IgG		IgG1	⊗	IgG2b	IgG2b	IgG2b	IgG2b	IgG3
ELISA	mSIGIRR-Fc	-	-	-	-	-	-	⊗
	hSIGIRR-Fc	+	+	+	+	+	+	+
WB	mSIGIRR-Fc	-	-	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	hSIGIRR-Fc	+++	+++	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	hSIGIRR-HA	+	+	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
	hSpSIGIRR-HA	++	++	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
FACS	mit Sp	-	+	⊗	⊗	⊗	-	⊗
	ohne Sp	-	-	⊗	⊗	⊗	-	⊗
Bemerkung		aufgereinigt aliquotiert -80 ℃	aufgereinigt aliquotiert -80 ℃				Zellklone kryo-konserviert	Zellklone kryo-konserviert

Tab. 4.3.: **Eigenschaften ausgewählter α-hSIGIRR-Antikörper.** ⊗= nicht untersucht, Reaktion: - = negativ, + bis +++ = schwach bis sehr stark positiv; ID: α-hSIGIRR-Antikörper aus antikörperhaltigen Hybridoma-Zellkulturüberständen; ELISA: Humanes oder murines SIGIRR-Fc wurde im ELISA mit α-SIGIRR-Antikörpern detektiert (vgl. 4.1.2). Western Blot (WB): Humanes oder murines SIGIRR-FC wurde geblottet und mit α-SIGIRR-Antikörpern detektiert; humanes SIGIRR mit HA-Tag wurde via Immunpräzipitation aus lysierten HEK-Zellen isoliert, geblottet und mit α-SIGIRR-Antikörpern detektiert (vgl. 4.1.3). FACS: FACS-Oberflächenfärbung von hSIGIRR-HA oder hSpSIGIRR-HA transfizierten HEK-Zellen mit α-hSIGIRR-Antikörpern plus α-mouse-Fc Fluoreszenzantikörpern (vgl. 4.1.4).

spricht. So konnte im initialen Screening eine Auswahl der Zellklone getroffen werden, deren Antikörper im ELISA eine besonders gute Bindung an SIGIRR zeigten. Die Verwendung von ELISA zum Screening spezifischer Antikörper gehört zu den Standardmethoden in der Herstellung monoklonaler Antikörper [9].

Antikörper produzierende Hybridomaklone wurden also unter der Bedingung weiter kultiviert, dass sie im Screening deutlich positiv waren. Die so ausgewählten Hybridomaklone wurden so vereinzelt, dass statistisch betrachtet nur 1 Zelle pro Well ausplattiert wurde. Entsprechend wurden sie weiter kultiviert, wenn sich danach makroskopisch in der Mikrotiterplatte nur eine Zellkolonie fand und die Produktion SIGIRR-spezifischer Antikörper gegeben war. Damit sollte sichergestellt werden, dass die hergestellten Antikörper monoklonalen Ursprunges waren.

Nach anfänglich guten Ergebnissen zeigte sich über die Zeit eine deutlich abschwächende Produktion h-SIGIRR spezifischer Antikörper der in Kultur befindlichen Zellklone (vgl. 4.1). Versuche, diese Entwicklung durch wiederholte Subklonierungen zur Identifikation stabiler h-SIGIRR AK produzierender Zellklone, zu unterbinden, waren nicht erfolgreich: In den Subklonierungen wuchsen entweder keine Klone an oder die anwachsenden Klone zeigten keine nennenswerte Antikörperproduktion. Einzig Subklone des Klons 4-A10 konnten erfolgreich in Kultur genommen werden (= 4-A10(5)A3, 4-A10(5)B4, 4-A10(5)C2), sie produzierten SIGIRR-spezifische Antikörper, bis sich die Problematik bereits nach kurzer Zeit wiederholte.

Ein Problem der kontinuierlichen Zellkultur ist die Gefahr von Überwachsen einer Kultur mit Mykoplasmen, bzw. Bak-

terien. Insbesondere ein hoher Verbrauch frischen Mediums (Substrat) kann Hinweis darauf sein. Um dies zu verhindern wurden die Zellkulturen steril gehandhabt und dem Medium Antibiotikum zugesetzt.

Der wahrscheinlichste Grund der sich insgesamt vermindernden Antikörperproduktion ist die Vermehrung von Zellen, die keine bzw. nicht spezifische Antikörper produzierten.

Damit liegt die Vermutung nahe, dass die vorher durchgeführten Vereinzelungen der Zellen nicht ausreichend waren. So wird empfohlen, nach Isolierung der Hybridomazellklone zwei Subklonierungen („Reklonierungen“) der Zellklone durchzuführen, um eine Monoklonalität zu gewährleisten [56, S.21]. Dies wurde in dieser Phase der Herstellung der Antikörper damit einmal zu wenig durchgeführt.

Auf der anderen Seite ist denkbar, dass die Subklonierung zwar ausreichend war, die Zellen ihre gewonnen Eigenschaften, (Immortalität und Antikörperproduktion) aber wieder verloren:

So ist eine weitere Beobachtung der Zellkultur, dass je schneller die Zellen in Kultur wuchsen, gemessen an dem Bedarf frischen Mediums und der Zeit bis zum nächsten Umsetzen der Zellklone, desto geringer wurde die Konzentration an Antikörpern in den Zellkulturüberständen, trotz einem etwa gleich bleibenden Verhältnis von Zellen zu Medium. Statistische Daten wurden in diesen Experimenten zu diesem Sachverhalt nicht erhoben, jedoch deckt sich die Beobachtung mit Veröffentlichungen von Miller *et al.* 1988 [61] und Suzuki *et al.* 1990 [92] in denen ein negativer Zusammenhang zwischen der Rate des Zellwachstums und Antikörperproduktion beschrieben ist:

Hybridoma-Zellklone, die im Laufe der Zeit keine Antikör-

per mehr herstellen, haben einen Selektionsvorteil gegenüber solchen mit Antikörperproduktion, da sie, ohne Energie in die Produktion von Antikörpern zu verlieren, zu einer erhöhten Wachstums- und Teilungsrate befähigt sind.

Eine weitere Beobachtung war, dass das Wachstum der Zellklone, wenn sie in sehr kurzen Abständen expandiert wurden, also in größere Platten oder Falkons mit neuem Kulturmedium gegeben wurden, stagnierte. Die vorhandenen Zellen starben ab und die Zelllinie musste als Quelle für Antikörper aufgegeben werden. Als Grund für dieses Problem ist am ehesten die Vereinzelung der Zellen zu sehen, da zellkulturspezifische Stoffwechselprodukte der Zellen wichtig für ein gutes Anwachsen der Zellen sind [86, S.98]. Bei starker Verdünnung und Vereinzelung der Zellen ist dies nicht ausreichend gegeben, was das Absterben dieser Klone erklärt.

Während die Hybridoma-Zellklone in kontinuierlicher Kultur fortgeführt wurden, wurden auch Zellklone für eine spätere Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert (Kryokonservierung). Da, wie beschrieben, die in Zellkultur befindlichen Zellklone nach anfangs guter AK-Produktion zuletzt nur noch wenige Antikörper produzierten, wurde versucht, diese aus den zurückgelegten Zellen erneut in Kultur zu nehmen. Dies gelang selten. Grund dafür kann sein, dass die Hybridomazellklone beim Einfrieren oder aber beim Auftauen geschädigt wurden. In anderen Fällen ließen sich die Zellen zwar wieder in Kultur nehmen, produzierten aber keine Antikörper. Zu vermuten ist, dass die eingefrorenen Klone bereits die Fähigkeit zur Antikörperproduktion verloren hatten oder eben nur solche Zellen die Prozedur des Einfrieren und Auftauens überstanden. Von den ursprünglich kryokonservierten Hybridomazellklonen mit An-

tikörperspezifität gegen humanes SIGIRR stehen die in Tab. 4.2 aufgeführten Zellklone noch zur Verfügung, ob diese beim erneuten Kultivieren wieder Antikörper produzieren, kann nur der Versuch der Rekultivierung zeigen.

Mögliche Kulturmediumzusätze, die zur Erhöhung der Antikörperproduktion in verschiedenen Publikationen vorgeschlagen werden, wie beispielsweise LPS [57] oder DMSO [54], wurden in dieser Arbeit nicht verwendet.

Obwohl viele Klone nicht stabil blieben, konnten die antikörperhaltigen Überstände gesammelt und zur Charakterisierung dieser Antikörper und damit auch zur Untersuchung SIGIRRs herangezogen werden. Eine Aufreinigung der Antikörper aus den Zellkulturüberständen mit FPLC (vgl. 2.3.1) konnte nur für 9-D7 und 10-B5 durchgeführt werden, da hier größere Mengen an antikörperhaltigem Überstand verfügbar waren.

Die Charakterisierung der hergestellten Antikörper erfolgte auch dann, wenn Antikörperüberstände nicht in den Mengen verfügbar waren, um eine Aufreinigung durchzuführen, wie im Ergebnisteil dargestellt. Im folgenden Abschnitt soll diese Charakterisierung und die daraus zu ziehenden Schlüsse diskutiert werden.

4.2.2. Diskussion zur Charakterisierung von Antikörpern gegen humanes SIGIRR

Antikörper im ELISA: Antikörperauswahl, Antikörperklassen und Kreuzreaktivität

Wie bereits dargestellt ist der ELISA im Screening der Antikörperspezifität eine bewährte Methode [9]. Im Ergebnisteil sind dazu exemplarisch die Bindung der α-h-SIGIRR an SI-

GIRR und Kontrollprotein im Zeitverlauf aufgeführt (vgl. 4.1). Die Tatsache, dass zu Beginn der Messreihen bei 2-G11 und 4-A10 eine ähnliche Absorption gemessen wurde spricht, auch im Gegensatz zur Messreihe bei 4-H7, für eine hohe Konzentration der Antikörper im Überstand, die zu einer vollen Sättigung der Antikörperbindungsstellen führt. Beobachten lässt sich hier ein Verdünnungseffekt, bei dem die Konzentration der Antikörper im Überstand sinkt und so bei höherer Verdünnung keine volle Sättigung der Antikörperbindungsstellen im ELISA mehr erreicht wird. Im Zeitverlauf verstärkt sich dieser Verdünnungseffekt. Das zeigt, dass die Konzentration an Antikörpern im gewonnenen Überstand abnimmt. Zwei Mechanismen kommen für diesen Effekt in Frage: Eine geringere Zelldichte im Medium (z.B. durch Expandieren in neuem Medium) oder ein Überwachsen der in Kultur befindlichen Zellen mit nicht AK-produzierenden Zellen. Da die Konzentration der Zellen im Medium nicht konstant war (z.B. für 4-A10 am 21.05.10 ca. 265000 Zellen/ml, am 14.06.10 10000 Zellen/ml, am 30.7.10 ca. 140000 Zellen/ml), sondern schwankte und zum Zeitpunkt der AK-Austestung nicht erhoben wurde -sondern nur für die Subklonierungen- lässt sich die Ursache dieses Effekt nicht genau eruieren.

Wie im Ergebnisteil dargestellt, wurden für ausgewählte Klone die Antikörperklassen mit ELISA bestimmt, s. Tab. 4.1. Hier zeigt sich eine Häufung der Antikörperklasse IgG2b, während in keinem Fall IgM Antikörper nachgewiesen wurden. Dies kann mit dem Zeitpunkt der Fusionierung zusammenhängen: Die resultierende Antikörperklasse ist zufällig und wird vermutlich bedingt durch das zur Immunisierung eingesetzten Protein und die Immunreaktion der Maus, insbesondere aber

davon, welche B-Zellen zufällig eine erfolgreiche und stabile Fusion eingehen. Daneben ist auch für Hybridomas die, sehr geringe, Möglichkeit eines Isotypenwechsels beschrieben (mit einer Frequenz von ca. $10^{-5} - 10^{-6}$, Ausnahmen bilden sog. „fast-switch“ Varianten) [93, 79, 36]. Nur in diesem seltenen Fall ist der Zeitpunkt der Austestung ebenfalls von Bedeutung.

Eine solcher Isotypenwechsel von Hybridomazellen zeigte sich scheinbar für 4-A10(5)B4 (IgG3) gegenüber seinem parentalen Klon 4-A10 (IgG2b). Da ein solcher Isotypenwechsel aber nur in einer Richtung und in der Reihenfolge der Konstanten Regionen der Schweren Ketten (μ, δ, γ_3, γ_1, γ_{2b}, γ_{2a}, ϵ, α) erfolgt [30, S.238], ist dies nicht schlüssig. Wahrscheinlicher ist somit, dass eine Monoklonalität für die 4-A10 Kultur nicht gegeben war und damit die Antikörper der Überstände von 4-A10 bzw. 4-A10(5)B4 nicht nur unterschiedliche Isotypen, sondern auch eine andere Spezifität der variablen Regionen aufweisen. Dies wurde nicht weiter untersucht, da wie eingangs beschrieben, beide Zellkulturen aufgegeben werden mussten und keine Überstände aus den Kulturen mehr verfügbar sind.

Auffällig ist in den hier gezeigten Ergebnissen auch die Tendenz zu IgG2b. Dies kann eine zufällige Häufung sein, da nur sechs Antikörper produzierende Zellklone auf ihre Antikörperklasse getestet wurden, oder durch oben beschriebene, nicht genau zu identifizierende Einflussfaktoren bedingt sein.

IgG Antikörper besitzen gegenüber IgM Antikörpern den Vorteil, dass sie sich besser einsetzten lassen, z.B. im Western Blot. Weiterhin gelten für die Verwendung in vitro solche Antikörper als erwünscht, die eine stärkere Bindung zum häufig eingesetzten Reagenz Protein A aufweisen, also beispielsweise IgG2a anstelle von IgG1 [30, S.231]. In vivo unterscheiden

sich die Untergruppen der IgG Antikörper beispielsweise in ihrer zytotoxischen Aktivität [42]. IgG2a und IgG2b sind in der Maus die Antikörper mit den größten protektiven aber auch krankheitsaktivitätsfördernden Eigenschaften [68].

Insofern weisen die getesteten Antikörper ein insgesamt günstiges Profil auf. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente spielt die Untergruppe der Antikörper, außer bei der Aufreinigung mit FPLC bezüglich der Bindungsstärke an die Protein A-Säule (s. 2.5), keine weitergehende Rolle.

Die Kreuzreaktivität auf murines SIGIRR wurde ebenfalls im ELISA untersucht (vgl. 4.1.2). Kreuzreaktivität ist für Antikörper eine erwünschte Eigenschaft, da sie die Einsatzmöglichkeiten der Antikörper erweitert. Durch die Nutzung von SIGIRR-Knockoutmäusen in der Immunisierung war diese Eigenschaft für die hergestellten Antikörper denkbar.

Es zeigten sich im ELISA für die getesteten AK (9-D7, 10-B5, 4-A10, 2-A4, 2-G11, 4-H7 und 4A10(5)B4 jedoch keine Kreuzreaktivität gegenüber murinem SIGIRR.

Kreuzreaktivität wurde für die Antikörper 9-D7 und 10-B5 auch im Western Blot getestet, wie im folgenden Abschnitt beschrieben. Sinnvoll ist dies, da im Western Blot durch den Einsatz von SDS in ihrer tertiären Struktur aufgespaltene Proteine getestet werden und sich das Bindungsverhalten der Antikörper entsprechend unterscheiden kann (siehe auch 2.3.10)

Antikörper im Western Blot

Der Test der Antikörper im Western Blot diente verschiedenen Zielen: Zum einen sollte die prinzipielle Verwendungsmöglichkeit der hergestellten Antikörper für Western Blot überprüft werden. Zum anderen sollten spezifische Eigenschaften der An-

tikörper getestet werden, darunter die Kreuzreaktivität gegenüber murinem SIGIRR sowie der Ausschluss einer Bindung an Fc-Teil oder an Signalpeptid der getesteten SIGIRR-Proteine. Letzteres ist auch in Zusammenhang mit den FACS-Färbungen zu sehen und wird dort erläutert.

Im Western Blot wurden vornehmlich 10-B5 und 9-D7 getestet (vgl. 4.1.3). Andere getestete Antikörper waren Subklone von 4-A10 und 2-G11, die hier aber nur schwache oder keine Ergebnisse zeigten und sich aufgrund nur geringer Mengen antikörperhaltigen Überstandes nicht zur Aufreinigung eigneten. Sie werden nicht separat diskutiert.

Für 10-B5 und 9-D7 zeigte sich im Western Blot mit humanem SIGIRR-Fc eine charakteristische Doppelbande auf Höhe von ca. 55 kD. Daraus wird erkenntlich, dass sowohl 9-D7 als auch 10-B5 im Western Blot humanes SIGIRR (mit Fc-Markierung) erkennen. Die Höhe der Doppelbande des SIGIRR-Fc Fusionsproteins bei 55 kD, obwohl laborintern regelmäßig so beobachtet, ist dabei ungewöhnlich: Nach Thomassen *et al.* findet sich das SIGIRR-Glykoprotein in einer Höhe von 50-80 kD, in der reduzierten Form bei 48 kD, wobei eine Bande von 38 kD eine teilweise abgebaute Form von SIGIRR repräsentieren kann [95]. Bei Lech *et al.* 2007 werden zwei SIGIRR spezifische Banden mit je einem Molekulargewicht von 75 und 90 kD beschrieben [49]. Fc-Fragment besitzt eine vorhergesagte Größe von ca. 25 kD. Damit wäre für das Fusionsprotein (SIGIRR mit Fc-Teil) eine wesentlich höheres theoretisches Gewicht zu erwarten, als tatsächlich beobachtet. In Abbildung 2.5 im Abschnitt Methoden ist beispielhaft aufgeführt, wie sich SIGIRR-Fc gegenüber SIGIRR im für diese Arbeit durchgeführten Thrombinverdau verhält. Hier liegt SIGIRR nach

Verdau mit ca. 34 kD auf der selben Höhe wie Thrombin (= 36 kD). Während Doppelbanden für SIGIRR beschrieben sind (s.o.) zeigt sich das molekulare Gewicht von SIGIRR-Fc im Western Blot mit Antikörpern gegen humanes SIGIRR, wie auch zuvor in unspezifischen Coomassie-Färbungen gleich bleibend, aber deutlich geringer als theoretisch zu erwarten.

So zeigt sich im Western Blot mit Lysaten SIGIRR exprimierender HEK293 Zellen (transfiziert mit humanem SIGIRR-HA mit oder ohne Signalpeptid, aufgereinigt mit Immunpräzipitation an HA-Beads) für SphSIGIRR-HA ein anderes als das zuvor beschriebene Bandenmuster (vgl. Abb. 4.4. Die Position der typischen Doppelbande stimmt hier eher mit der von Thomassen *et al.* und Lech *et al.* vorhergesagten Position überein (s.o.). Dies kann auf eine unterschiedliche Glykosylierung des Zellproduktes zurückzuführen sein, wobei sich in der Arbeit von Lech *et al.* das molekulare Gewicht von SIGIRR (isoliert aus Nierenzellen) mit PNGase u.a. von 66 kD auf 45 kD reduzieren ließ und sich sowohl Art (O- vs. N-Glykosylierung) wie auch die Größenordnung der Glykosylierung als vom untersuchten Zelltyp (myeloide renale Zellen versus tubuläre Epithelzellen) abhängig herausstellten [49]. In den hier dargestellten Experimenten wurde SIGIRR-Fc aus Zellkulturüberständen (als sezerniertes Protein) isoliert, wohingegen SIGIRR-HA aus Zelllysaten stammte. Neben einer unterschiedlichen Glykosilierung dieser Zellprodukte, die durch einen unterschiedlichen Expressionsweg in der Zelle zustande kommen kann, können auch unterschiedliche Splice-Varianten oder andere Modifikationen des eukaryontischen Proteinexpressionssystems für die genannten Unterschiede in Frage kommen.

Zusätzliche Banden, wie hier durch die eingesetzten Antikör-

per detektiert, können degradierte Formen eines Proteins darstellen oder aber Ausdruck einer unspezifischen Bindung der Antikörper oder Zweitantikörpers (= α-m-IgG-POX) sein: Zur Vermeidung einer Degradierung des SIGIRR Proteins nach Lyse der Zellen durch unspezifische Proteasen wurde unter Verwendung von Proteinaseinhibitor gearbeitet (vgl. Material S. 29), ein Proteinabbau ist aber dennoch nicht ausgeschlossen. Aus Gründen der Praktikabilität wurden des weiteren die α-HA gecoateten Granulate (α-HA-Beads) nicht vor Auftragen auf die Gele aus den Proben entfernt. Durch die Denaturierung in Probenpuffer wurde das HA-markierte Fusionsprotein von der Antikörperbindungsstelle gelöst, die gecoateten Antikörper (schwere und leichte Kette des murinen α-HA Antikörpers, 25 kD und 50 kD) können sich aber ebenfalls gelöst und damit vom eingesetzten Zweitantikörper (= α- m-IgG-POX) erkannt worden sein [38]. Gegen Letzteres spricht, dass generell keine Banden im Lysat nicht transfizierter HEK Zellen und speziell keine Banden bei 25 oder 50 kD nachzuweisen sind.

Die Ergebnisse für hSIGIRR-HA ohne Signalpeptid sind insgesamt nicht eindeutig, da insbesondere bei Detektion mit 10-B5 keine Doppelbande auszumachen ist. Für 9-B7 ist vermutlich eine Luftblase im Gel Grund für die verzogene Struktur der Bande bei 95 kD. Möglicherweise war die Menge an isoliertem Fusionsprotein aus HEK-Zellen Lysat insgesamt zu gering, um durch die Antikörper deutlicher detektiert zu werden.

Der Test der Antikörper 9-D7 und 10-B5 im Westernblot, wie hier gezeigt, macht keine Aussage darüber, ob die Antikörper statt an SIGIRR evtl. auch, oder ausschließlich, an den Fc-Teil des Fusionsproteins binden. Die Experimente zur Anti-

genspezifität im ELISA (keine Bindung an das Kontrollprotein h7-Fc) und die Möglichkeit des Einsatzes der Antikörper in der Immunpräzipitation bei Fusionsproteinen mit HA-Markierung (s.u.) spricht aber für eine SIGIRR-Spezifität der Antikörper.

Weiter ergibt sich aus den Experimenten im Western Blot kein Anhalt auf eine Kreuzreaktivität der Antikörper 9-D7 und 10-B5. Vermutungen zu einer Kreuzreaktivität des Antikörper 10-B5 mit murinem SIGIRR im Westernblot bestätigten sich nicht, entsprechend den ELISA-Ergebnissen.

Antikörper im FACS

In den FACS Experimenten wurden HEK-293 Zellen mit Hilfe von zuvor hergestellten Antikörpern gegen humanes SIGIRR und Fluoreszenzgekoppeltem Zweitantikörper gefärbt. Untersucht wurden HEK-Zellen (Negativkontrolle) im Vergleich mit hSpSIGIRR-HA (humanes SIGIRR mit Signalpeptid und HA-Markierung) oder hSIGIRR-HA (humanes SIGIRR mit HA-Markierung) transfizierten HEK-Zellen. Dabei zeigte sich nur für mit Signalpeptid transfizierten Zellen eine Bindung des Antikörpers an der Oberfläche und damit ein Vorkommen SIGIRRs an der Zelloberfläche (vgl. 4.1.4).

Wird SIGIRR mit einem Sp zellintern produziert, wie es im natürlichen Zustand nicht vorkommt, so wird dieses über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat an der Oberfläche von Zellen exprimiert und ist so für SIGIRR-spezifische Antikörper zugänglich. Insofern ist hier interessant, dass der α-h-SIGIRR AK 10-B5 nicht an mit hSIGIRR-HA transfizierte Zellen bindet (vgl. Abb. 4.5). Dies könnte darauf hindeuten, dass SIGIRR ohne Signalpeptid nicht an der Oberfläche von Zellen exprimiert wird. Für diesen Fall ist es denk-

bar, dass SIGIRR als intrazelluläres Protein TLR regulatorisch wirksam wird, z.B. als Membranprotein von Endosomen, wie z.B. TLR-9 [63, S.85].

Entsprechend müsste eine Intrazellularfärbung auch bei SIGIRR ohne Signalpeptid ein Signal zeigen, ähnlich wie in der Arbeit von Lydia Dyck für mit *murinem* SIGIRR transfizierten HEK-Zellen gezeigt [16]. Diese Ansätze wurden durchgeführt, führten aber nicht zu aussagekräftigen Ergebnissen (Ergebnisse nicht gezeigt). Wahrscheinlich wurden zum Zeitpunkt dieser Experimente die eingefügten Vektoren in der transfizierten HEK-Zelllinien nach langer Kulturzeit nicht mehr exprimiert [62, S. 212]. Weitere Transfektionen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht erneut angesetzt werden.

Gegen dieses Szenario spricht, zumindest im murinen System, das Ergebnis einer Arbeit von Lech *et al.* 2007 in der durch Immunfluoreszenzfärbungen muriner Nierenzellen mit polyklonalem Antikörper gegen murines SIGIRR eine deutliches Signal an der Zelloberfläche gezeigt werden konnte.

Denkbar ist bei diesen unterschiedlichen Ergebnissen, dass SIGIRR ohne artifiziell eingefügtes Signalpeptid nur unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. bei Stimulation mit TLR-Liganden, oder nur in bestimmten Zelllinien vom Intrazellularraum an die Zelloberfläche verlagert wird.

Als Membranprotein mit Transmembrandomäne, jedoch ohne Signalpeptid [95], ist für SIGIRR auch ein alternativer Expressionsweg denkbar. Beispielsweise durch eine Aktivierung über Caspase 1, wie für IL1β beschrieben [43].

4.2.3. Diskussion zum Endstand der Antikörperherstellung

Zellkulturüberstände der Hybridoma-Zellklone 9-D7 und 10-B5 wurden wie beschrieben aufgereinigt und stehen aliquotiert für Versuche zur Verfügung. Problematisch ist jedoch, dass keine Zellklone mehr kryokonserviert sind, sodass ein erneutes Herstellen von Antikörpern dieser Zelllinien nicht möglich ist. Sollten weitere Antikörper gegen humanes SIGIRR benötigt werden bleibt damit die Option, die unter Tab. 4.2 aufgeführten Zellklone zu rekultivieren. Zu beachten ist dabei, dass möglichst schnell, sobald die Zellen stabil angewachsen sind, Subklonierungen unternommen werden, da, wie diskutiert, zu erwarten ist, dass besonders solche Klone das Einfrieren überstehen, die keine Antikörper produzieren. Die höchsten Erfolgsaussichten versprechen dabei die Klone 4-H7 und 4-A10(5)B4. Alle kryokonservierten Klone waren zum Zeitpunkt der Kryokonservierung im ELISA spezifisch für humanes SIGIRR. Gelingt für keine der Hybridomazellklone eine Rekultivierung mit Produktion spezifischer Antikörper gegen humanes SIGIRR bleibt nur der umständliche Weg einer erneuten Hybridisierung oder aber der Kauf kommerziell hergestellter Antikörper mit entsprechender Spezifität.

Zu Beginn dieser Arbeit waren Antikörper gegen humanes SIGIRR nur als IgM-Antikörper oder als polyklonale Antikörper erhältlich. Die Herstellung monoklonaler Antikörper mit guter Spezifität gegen humanes SIGIRR und mit der Chance für IgG Antikörper war damit ein wichtiges Anliegen, um geplante Experimente wie Immunfluoreszenzfärbungen laborintern durchführen zu können. Unter den aktuellen Bedingungen ist durch die Sicherheit und große Bandbreite der kommerziell

angebotenen Antikörper eine entsprechende Entscheidung in Bezug auf Zeitersparnis und Kosten abzuwägen.

5. Zusammenfassung / Abstract

Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden immuninhibitorische Eigenschaften SIGIRRs in der Stimulation primärer muriner Zellen untersucht. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes SIGIRR.

Fragestellung der Arbeit war es, eine Beteiligung SIGIRRs an der Immunregulation muriner Milzzellen, B-Zellen und myeloiden dendritischen Zellen in Bezug auf unterschiedliche Toll-like Rezeptoren aufzuzeigen und zu charakterisieren, wann und ggf. durch welche Mechanismen eine solche zustande kommt. Hergestellte und auf ihre Eigenschaften hin untersuchte monoklonale Antikörper gegen humanes SIGIRR sollten genutzt werden um die Expression SIGIRRs mithilfe Immunfluoreszenz zu untersuchen.

Dazu wurden zum Einen aus der Maus isolierte Zellen von Wildtypmäusen im Vergleich zu SIGIRR-Knockoutmäusen stimuliert und in ihrem Reaktionsmuster verglichen. Zum Anderen wurden, nach Immunisierung von SIGIRR-Knockoutmäusen mit SIGIRR, Hybridoma-Zellen generiert. Diese wurden auf die Produktion brauchbarer Antikörper getestet und die

resultierenden Antikörper auf ihre Anwendbarkeit in ELISA, Westernblot und FACS untersucht.

In den Stimulationsexperimenten zeigt sich entgegen der Hypothese keine Unterschiede zwischen WT-Mäusen und SIGIRR-Knockoutmäusen bei der Stimulation mit unterschiedlichen LPS Liganden für Milzzellen, B-Zellen und myeloide dendritische Zellen. Eine Einfluss SIGIRRs auf die Immunregulation dieser Zellen konnte damit, entgegen der Aussage einschlägiger Literatur, unter den hier angewandten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Lediglich Vorexperimente mit MACS separierten $CD11c^+$ konnten Hinweise auf einen solchen Sachverhalt liefern. Die Antikörperherstellung lieferte spezifische Antikörper gegen humanes SIGIRR mit guten Bindungseigenschaften in ELISA und Westernblot. Im FACS konnte in der Oberflächenfärbung SIGIRR an der Oberfläche von mit SIGIRR und Signalpeptid transfizierten HEK-Zellen nachgewiesen werden.

Damit ist in den Stimulationsexperimenten insbesondere die Abweichung von der gestellten Hypothese und den meisten bisherigen Publikationen bemerkenswert, wodurch die Diskussion möglicher Ursachen, wie sie in der vorliegenden Arbeit unternommen wird, entscheidend für mögliche zukünftige Ansätze ist. Problematisch in der Antikörperherstellung zeigte sich die in fortlaufender Kultur beständig nachlassende Antikörperproduktion, bzw. eine verminderte Spezifität der produzierten Antikörper. Es konnten mit den bereits gewonnenen Antikörpern jedoch einige Aufschlüsse zu SIGIRR erzielt werden.

In zukünftigen Experimenten bietet sich die Verwendung von MACS separierten CD11c positiver dendritischer Zellen in Stimulationsexperimenten mit SIGIRR-Knockoutmäusen an.

Die laborinterne Herstellung SIGIRR-spezifischer Antikörper ist eine zeitintensive aber erfolgversprechende Methode, wenn ausreichend früh Subklonierungen durchgeführt werden, muss aber gegen die Möglichkeit eines käuflichen Erwerbs abgewogen werden. Mit SIGIRR-spezifischen Antikörpern könnte insbesondere, z.B. mit fluroeszenzmarkierten Antikörpern, das Expressionsmuster von SIGIRR in Zellen untersucht werden.

Abstract

The first part of this thesis focuses on the immuninhitory properties of SIGIRR in the stimulation of primary murine cells. The second part describes the production of monoclonal antibodies against human SIGIRR.

The central question of this theses was to distinguish the role of SIGIRR regarding the immunregulation of murine spleen cells, B-cells and myeloid Dendritic Cells via toll-like receptors and the circumstances under which those would come to pass. Monoclonal antibodies against human SIGIRR were to be raised, characterised and used in immunfluorescence-aided expression studies on SIGIRR.

For this purpose, for one, different stimuli were used on wildtype versus SIGIRR-knockout mouce cells comparing the resulting IL-6 reaction. Secondly, SIGIRR-knockout mice were inoculated with SIGIRR and hybridoma cells producing SIGIRR-specific antibodies were generated. Antibodies were then tested for usage in ELISA, Western Blot and FACS.

In violation of the original hypotheses, the stimulation experiments with different TLG-ligands showed not differences in the IL-6 production between wildtype or SIGIRR-knockout in spleen cells, B-cells or myeloid Dendritic Cells.

Hence no immunregulative influence of SIGIRR on TLR-signaling was evident in this experimental environment, though most current studies would suggest otherwise. Solely preliminary tests with MACS-separated $CD11c^+$ mDCs were in favour of the stated theses.

The raising of antibodies resulted in SIGIRR-specific antibodies with good binding-properties in ELISA and Western blot. FACS results showed SIGIRR on the surface of HEK cells transfected with SIGIRR and signalpeptide.

The results obtained in the stimulation experiments deviated remarkably from the stated thesis and current publications. Therefore the reflection of probable causes as discussed here might be essential for future endeavour. Though some results could be achieved from SIGIRR-specific antibodies, raising SIGIRR-specific antibodies was limited by the ability of hybridoma cells to produce antibodies in continous culture and stable hybridoma cell clones could not be obtained.

In future stimulation experiments with SIGIRR-knockout mice the use of MACS-separated CD11c positive myeloid Dendritic Cells seems to be most promising. The raising of SIGIRR-specific antibodies in the laboratory is a time-consuming but promising method, if early subcloning is respected, but purchasing antibodies on the market should also be taken in consideration. SIGIRR-specific antibodies could be used e.g. via fluorescence-marking in studies on the expressionpattern of SIGIRR in different cell lines.

Literatur

[1] Abdul K. Abbas, Andrew H. Lichtmann und Shiv Pillai. *Cellular and molecular immunology*. 6. Aufl. Philadelphia(PA): Saunders Elsevier, 2007.

[2] Abdul K. Abbas, Andrew H. Lichtmann und Shiv Pillai. *Cellular and molecular immunology*. 7. Aufl. Philadelphia(PA): Saunders Elsevier, 2012.

[3] S. Akira, S. Uematsu und O. Takeuchi. „Pathogen recognition and innate immunity“. In: *Cell* 124.4 (2006). Akira, Shizuo Uematsu, Satoshi Takeuchi, Osamu Research Support, Non-U.S. Gov't Review United States Cell Cell. 2006 Feb 24;124(4):783-801., S. 783–801.

[4] J. Banchereau u. a. „Immunobiology of dendritic cells“. In: *Annu Rev Immunol.* 18 (2000), S. 767–811.

[5] G. M. Barton und J. C. Kagan. „A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization“. In: *Nat Rev Immunol.* 9.8 (2009), 535–42. Epub 2009 Jun 26.

[6] BD Biosciences. *Human and Mouse CD Marker Handbook*. 2010. URL: http://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf. Letzter Zugriff 12.05.2015.

[7] K. Bulek u. a. „The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response“. In: *J Immunol.* 182.5 (2009), 2601–9. doi: 10.4049/jimmunol.0802729. ISSN: 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking).

[8] L. Cabal-Hierro und P. S. Lazo. „Signal transduction by tumor necrosis factor receptors“. In: *Cell Signal.* 24.6 (2012), 1297–305. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.02.006. Epub 2012 Feb 20. ISSN: 1873-3913 (Electronic) 0898-6568 (Linking).

[9] R. Charlermroj u. a. „Comparison of techniques to screen and characterize bacteria-specific hybridomas for high-quality monoclonal antibodies selection“. In: *Anal Biochem.* 421.1 (2012), 26–36. Epub 2011 Oct 6.

[10] Life Technologies Corporation. *OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium modification of MEM (Eagle's), Form No. 2017.* 2001. URL: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/2017.pdf. letzter Zugriff 16.08.2013.

[11] S. Danese und A. Mantovani. „Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer“. In: *Oncogene.* 29.23 (2010), 3313–23. Epub 2010 Apr 19.

[12] J. M. Davies, J. Macsharry und F. Shanahan. „Differential regulation of Toll-like receptor signalling in spleen and Peyer's patch dendritic cells“. In: *Immunology* 10 (2010). Using Smart Source Parsing Jun, S. 10.

[13] C. A. Dinarello. „Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist“. In: *Int Rev Immunol* 16.5-6 (1998), S. 457–99. ISSN: 0883-0185 (Print) 0883-0185 (Linking).

[14] S. K. Drexler u. a. „Evidence for a DC-specific inhibitory mechanism that depends on MyD88 and SIGIRR“. In: *Scand J Immunol.* 71.6 (2010), S. 393–402.

[15] S. K. Drexler u. a. „SIGIRR/TIR-8 is an inhibitor of Toll-like receptor signaling in primary human cells and regulates inflammation in models of rheumatoid arthritis“. In: *Arthritis Rheum.* 62.8 (2010), S. 2249–61.

[16] Lydia Dyck. „Testen von monoklonalen Antikörpern gegen den TLR-Inhibitor SIGIRR und Charakterisierung von SIGIRR-Liganden“. Bachelorarbeit. Philipps Universität Marburg, 2010.

[17] Klaus Elgert. *Immunobiology Understanding the Immune System.* 2. Aufl. New Jersey: John Wiley und Sons Inc. Hoboken, 2009.

[18] S. Fillatreau und R. A. Manz. „Tolls for B cells“. In: *Eur J Immunol.* 36.4 (2006), S. 798–801.

[19] C. Garlanda, H. J. Anders und A. Mantovani. „TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization“. In: *Trends Immunol* 30.9 (2009), S. 439–46.

[20] C. Garlanda u. a. „Damping excessive inflammation and tissue damage in Mycobacterium tuberculosis infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling“. In: *J Immunol.* 179.5 (2007), S. 3119–25.

[21] C. Garlanda u. a. „Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101.10 (2004), 3522–6. Epub 2004 Mar 1.

[22] Miltenyi Biotec GmbH. *Magnetic cell sorting- CD43(Ly-48) MicroBeads mouse.* 2006. URL: https://www.miltenyibiotec.com/~/media/Images/Products/Import/0001200/IM0001263.ashx. Letzter Zugriff 11.09.2013.

[23] J. Gong u. a. „Inhibition of Toll-like receptors TLR4 and 7 signaling pathways by SIGIRR: a computational approach“. In: *J Struct Biol.* 169.3 (2010), 323–30. Epub 2009 Dec 16.

[24] M. Greter u. a. „GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells“. In: *Immunity.* 36.6 (2012), 1031–46. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.027. ISSN: 1097-4180 (Electronic) 1074-7613 (Linking).

[25] P. Guermonprez u. a. „Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells“. In: *Annu Rev Immunol* 20 (2002), 621–67. Epub 2001 Oct 4.

[26] M. F. Gulen u. a. „The receptor SIGIRR suppresses Th17 cell proliferation via inhibition of the interleukin-1 receptor pathway and mTOR kinase activation“. In: *Immunity.* 32.1 (2010), 54–66. Epub 2010 Jan 7.

[27] H. Gultekin und K. H. Heermann. „The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix“. In: *Anal Biochem.* 172.2 (1988), S. 320–9.

[28] G. E. Hammer und A. Ma. „Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis“. In: *Annu Rev Immunol* 31:743-91.doi (2013), 10.1146/annurev–immunol–020711–074929. Epub 2013 Jan 17. ISSN: 1545-3278 (Electronic) 0732-0582 (Linking).

[29] M. P. Hardy und L. A. O'Neill. „The murine IRAK2 gene encodes four alternatively spliced isoforms, two of which are inhibitory“. In: *J Biol Chem.* 279.26 (2004), 27699–708. Epub 2004 Apr 13.

[30] Ed Harlow und David Lane. *Antibodies- A Laboratory Manual.* 1. Aufl. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, S. 298.

[31] D. R. Harper, M. L. Kit und H. O. Kangro. „Protein blotting: ten years on“. In: *J Virol Methods.* 30.1 (1990), S. 25–39.

[32] H. P. Hauri und K. Bucher. „Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution“. In: *Anal Biochem.* 159.2 (1986), S. 386–9.

[33] Douglas Hayworth und Thermo Fisher Scientific Inc. *Antibody Fragmentation.* 2013. URL: http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4E03B016-5056-8A76-4ECA-982DA6CAAC8A. letzter Zugriff 04.09.2013.

[34] GE Healthcare. *Instructions 71-7002-00 AP HiTrap affinity columns- HiTrapProttein A HP, 1ml and 5ml.* 2009. URL: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS / Related % 20Content / Files / 1314787424814 / litdoc71700200AP_20110831134941.pdf. letzter Zugriff 07.09.2013.

[35] X. Hu und L. B. Ivashkiv. „Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases“. In: *Immunity.* 31.4 (2009), S. 539–50.

[36] M. D. Iglesias-Ussel, J. Zavadil und M. D. Scharff. „Molecular characterization of hybridoma subclones spontaneously switching at high frequencies in vitro“. In: *J Immunol Methods.* 350.1-2 (2009), 71–8. doi: 10.1016/j.jim.2009.07.003. Epub 2009 Jul 17. ISSN: 1872-7905 (Electronic) 0022-1759 (Linking).

[37] K. Inaba u. a. „Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor“. In: *J Exp Med.* 176.6 (1992), S. 1693–702.

[38] Thermo Fisher Scientific Inc. *Instructions- Pierce® Anti-HA Agarose.* 2011. URL: http://www.piercenet.com/instructions/2162289.pdf. letzter Zugriff 07.09.2013.

[39] B. Jacobs u. a. „Dendritic cell subtypes and in vitro generation of dendritic cells“. In: *Horm Metab Res.* 40.2 (2008), S. 99–107.

[40] S. Janssens u. a. „Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88“. In: *Curr Biol.* 12.6 (2002), S. 467–71.

[41] D. Jarrossay u. a. „Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells“. In: *Eur J Immunol.* 31.11 (2001), S. 3388–93.

[42] M. S. Kaminski u. a. „Importance of antibody isotype in monoclonal anti-idiotype therapy of a murine B cell lymphoma. A study of hybridoma class switch variants“. In: *J Immunol.* 136.3 (1986), S. 1123–30. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).

[43] M. Keller u. a. „Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion“. In: *Cell.* 132.5 (2008), 818–31. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.040. ISSN: 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking).

[44] I. Kinjyo u. a. „SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation“. In: *Immunity.* 17.5 (2002), S. 583–91.

[45] T. Kishimoto. „IL-6: from its discovery to clinical applications“. In: *Int Immunol.* 22.5 (2010), 347–52. Epub 2010 Apr 21.

[46] K. Kobayashi u. a. „IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling“. In: *Cell.* 110.2 (2002), S. 191–202.

[47] G. Kohler und C. Milstein. „Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity“. In: *Nature.* 256.5517 (1975), S. 495–7.

[48] H. Kumar, T. Kawai und S. Akira. „Pathogen recognition in the innate immune response“. In: *Biochem J* 420.1 (2009). Kumar, Himanshu Kawai, Taro Akira, Shizuo Research Support, Non-U.S. Gov't England The Biochemical journal Biochem J. 2009 Apr 28;420(1):1-16., S. 1–16.

[49] M. Lech u. a. „Different roles of TiR8/Sigirr on toll-like receptor signaling in intrarenal antigen-presenting cells and tubular epithelial cells“. In: *Kidney Int.* 72.2 (2007), 182–92. Epub 2007 May 2.

[50] M. Lech u. a. „Lack of SIGIRR/TIR8 aggravates hydrocarbon oil-induced lupus nephritis“. In: *J Pathol.* 220.5 (2010), S. 596–607.

[51] M. Lech u. a. „Resident dendritic cells prevent postischemic acute renal failure by help of single Ig IL-1 receptor-related protein“. In: *J Immunol.* 183.6 (2009), 4109–18. Epub 2009 Aug 19.

[52] M. Lech u. a. „Tir8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens“. In: *J Exp Med* 205.8 (2008), S. 1879–88.

[53] F. Y. Liew u. a. „Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses“. In: *Nat Rev Immunol.* 5.6 (2005), S. 446–58.

[54] W. L. Ling u. a. „Improvement of monoclonal antibody production in hybridoma cells by dimethyl sulfoxide“. In: *Biotechnol Prog.* 19.1 (2003), S. 158–62.

[55] T. W. Lovenberg u. a. „Cloning of a cDNA encoding a novel interleukin-1 receptor related protein (IL 1R-rp2)“. In: *J Neuroimmunol.* 70.2 (1996), S. 113–22. ISSN: 0165-5728 (Print) 0165-5728 (Linking).

[56] Werner Luttmann u. a. *Der Experimentator:Immunologie.* 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009.

[57] A. Martin-Lopez u. a. „Enhanced monoclonal antibody production in hybridoma cells by LPS and Anti-mIgG“. In: *Biotechnol Prog.* 23.6 (2007), 1447–53. Epub 2007 Nov 17.

[58] F. Martin und J. F. Kearney. „B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory"“. In: *Immunol Rev.* 175 (2000), S. 70–9.

[59] A. F. McGettrick und L. A. O'Neill. „Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation“. In: *Curr Opin Immunol.* 22.1 (2010), 20–7. Epub 2010 Jan 7.

[60] A. Meyer-Bahlburg und D. J. Rawlings. „B cell autonomous TLR signaling and autoimmunity“. In: *Autoimmun Rev.* 7.4 (2008), 313–6. Epub 2008 Jan 8.

[61] W. M. Miller, H. W. Blanch und C. R. Wilke. „A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH“. In: *Biotechnol Bioeng.* 32.8 (1988), S. 947–65.

[62] Cornel Mülhardt. *Der Experimentator- Molekularbiologie/Genomics.* 7. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2013, 212ff.

[63] Kenneth Murphy. *Janeway's immunobiology.* 8. Aufl. New York und London: Garland Science, 2012, S. 85.

[64] Kenneth Murphy, Paul Travers und Mark Walport. *Janeway's immunobiology.* 7. Aufl. New York und London: Garland Science, 2008, S. 48–48,339–340,368–372.

[65] K. Nakashima u. a. „An association study of asthma and related phenotypes with polymorphisms in negative regulator molecules of the TLR signaling pathway“. In: *J Hum Genet.* 51.4 (2006), 284–91. Epub 2006 Jan 24.

[66] W. Nickel und C. Rabouille. „Mechanisms of regulated unconventional protein secretion“. In: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10.2 (2009), 148–55. doi: 10.1038/nrm2617. Epub 2008 Dec 24. ISSN: 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking).

[67] T. Nikolic u. a. „Developmental stages of myeloid dendritic cells in mouse bone marrow“. In: *Int Immunol.* 15.4 (2003), S. 515–24. ISSN: 0953-8178 (Print) 0953-8178 (Linking).

[68] F. Nimmerjahn u. a. „FcgammaRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity“. In: *Immunity.* 23.1 (2005), S. 41–51. ISSN: 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking).

[69] C. A. Nold-Petry u. a. „IL-37 requires the receptors IL-18Ralpha and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction“. In: *Nat Immunol.* 16.4 (2015), 354–65. doi: 10.1038/ni.3103. Epub 2015 Mar 2. ISSN: 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking).

[70] M. Noris u. a. „The Toll-IL-1R member Tir8/SIGIRR negatively regulates adaptive immunity against kidney grafts“. In: *J Immunol.* 183.7 (2009), 4249–60. Epub 2009 Sep 4.

[71] M. Oldenburg u. a. „TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification“. In: *Science.* 337.6098 (2012), 1111–5. doi: 10.1126/science.1220363. Epub 2012 Jul 19. ISSN: 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).

[72] L. A. O'Neill. „SIGIRR puts the brakes on Toll-like receptors“. In: *Nat Immunol.* 4.9 (2003), S. 823–4.

[73] L. A. O'Neill. „When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction“. In: *Immunity.* 29.1 (2008), S. 12–20.

[74] V. Palanisamy u. a. „Control of cytokine mRNA expression by RNA-binding proteins and microRNAs“. In: *J Dent Res* 91.7 (2012), S. 651–8. ISSN: 0022-0345. DOI: 10.1177/0022034512437372.

[75] C. Pasare und R. Medzhitov. „Control of B-cell responses by Toll-like receptors“. In: *Nature.* 438.7066 (2005), S. 364–8.

[76] L. C. Platanias. „Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling“. In: *Nat Rev Immunol.* 5.5 (2005), S. 375–86.

[77] N. Polentarutti u. a. „Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8/SIGIRR“. In: *Eur Cytokine Netw.* 14.4 (2003), S. 211–8.

[78] J. Qin u. a. „SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms“. In: *J Biol Chem.* 280.26 (2005), 25233–41. Epub 2005 May 2. ISSN: 0021-9258 (Print)0021-9258 (Linking).

[79] A. Radbruch u. a. „Control of immunoglobulin class switch recombination“. In: *Immunol Rev.* 89 (1986), S. 69–83. ISSN: 0105-2896 (Print) 0105-2896 (Linking).

[80] Hubert Rehm und Thomas Letzel. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteonomics.* 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2010.

[81] F. Riva u. a. „The expression pattern of TIR8 is conserved among vertebrates“. In: *Vet Immunol Immunopathol.* 131.1-2 (2009), 44–9. Epub 2009 Mar 24.

[82] F. Riva u. a. „TIR8/SIGIRR is an Interleukin-1 Receptor/Toll Like Receptor Family Member with Regulatory Functions in Inflammation and Immunity“. In: *Front Immunol* 3:322.doi (2012), 10.3389/fimmu.2012.00322. Epub 2012 Oct 29. ISSN: 1664-3224 (Electronic) 1664-3224 (Linking).

[83] C. R. Ruprecht und A. Lanzavecchia. „Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells“. In: *Eur J Immunol.* 36.4 (2006), S. 810–6.

[84] S. Sato u. a. „Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis“. In: *Mol Immunol.* 41.12 (2004), S. 1123–33.

[85] C. Scheicher u. a. „Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“. In: *J Immunol Methods.* 154.2 (1992), S. 253–64.

[86] Sabine Schmitz. *Der Experimentator- Zellkultur.* 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011, S. 98.

[87] M. Schnare u. a. „Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses“. In: *Nat Immunol.* 2.10 (2001), S. 947–50.

[88] Heike Schreiner. „Einfluss von Strukturen probiotischer Bakterien auf die Aktivität von Toll-like Rezeptoren“. Diplomarbeit. Philipps Universität Marburg, 2008.

[89] K. Shortman und Y. J. Liu. „Mouse and human dendritic cell subtypes“. In: *Nat Rev Immunol.* 2.3 (2002), S. 151–61.

[90] K. Shortman und S. H. Naik. „Steady-state and inflammatory dendritic-cell development“. In: *Nat Rev Immunol.* 7.1 (2007), 19–30. Epub 2006 Dec 15. ISSN: 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking).

[91] S. F. de StGroth und D. Scheidegger. „Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics“. In: *J Immunol Methods.* 35.1-2 (1980), S. 1–21.

[92] E. Suzuki und D. F. Ollis. „Enhanced antibody production at slowed growth rates: experimental demonstration and a simple structured model“. In: *Biotechnol Prog.* 6.3 (1990), S. 231–6.

[93] P. Thammana und M. D. Scharff. „Immunoglobulin heavy chain class switch from IgM to IgG in a hybridoma“. In: *Eur J Immunol.* 13.8 (1983), S. 614–9. ISSN: 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking).

[94] ThermoScientific. *Thermo Scientific Nunclon Delta Treated.* 2013. URL: http://www.thermoscientific.com/ecomm/servlet/newsdetail?storeId=11152&contentId=54587. Letzter Zugriff 06.08.2013.

[95] E. Thomassen, B. R. Renshaw und J. E. Sims. „Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily“. In: *Cytokine.* 11.6 (1999), S. 389–99.

[96] J. Thommes u. a. „Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein A coated adsorbent in expanded beds“. In: *J Chromatogr A.* 752.1-2 (1996), S. 111–22.

[97] H. Ueno u. a. „Dendritic cell subsets in health and disease“. In: *Immunol Rev.* 219 (2007), S. 118–42.

[98] D. Wald u. a. „SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling“. In: *Nat Immunol.* 4.9 (2003), 920–7. Epub 2003 Aug 17.

[99] H. Xiao u. a. „The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis“. In: *Immunity.* 26.4 (2007), 461–75. Epub 2007 Mar 29.

A. Anhang

A.1. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren Adamkiewicz, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Becker, Cordes, Czubayko, Daut, Del Rey, Efe, Eilers, Feuser, Graz, Grosse, Grundmann, Grzeschik, Hassan, Hertl, Hilt, Kircher, Klose, Koolman, Lill, Lohoff, Maier, Mandrek, Moll, Mueller, Müller, Neubauer, Oertel, Opitz, Plant, Plöger, Renz, Richter, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Schütz, Schofer, Schrader, Sekundo, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf in Marburg und Rißе in Gießen.

A.2. Danksagung

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. S. Bauer für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Immunologie anfertigen zu dürfen. Vielen Dank auch Dr. Andreas Kaufmann als Leiter der Arbeitsgruppe Kaufmann für seine Unterstützung und Geduld. Ich denke auch allen anderen im Institut, allen voran Stephi, für die dringend benötigte Einführung in die Labortätigkeit, die vielen hilfreichen Hinweise und die psychisch-moralische Unterstützung, wenn es mal wieder nicht klappen wollte: Danke für eine tolle Zeit. Ich danke allen die geholfen haben, diese Arbeit in Rechtschreibung und Leserlichkeit zu korrigieren und auf den Weg in den Druck zu bringen, insbesondere meiner Mutter und Natalie. Ganz besonders danke ich meinen Eltern, meiner Schwester, meiner ganzen Familie und allen Freunden für die Unterstützung während des Studiums, für die Ermunterung weiterzumachen, die mahnenden Worte, aber auch den Glauben in mich, insbesondere dann, wenn es wieder etwas länger gedauert hat.