



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Systemische Entzündungsforschung
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Jörg Köhl

Klonierung und Produktion antiinflammatorischer sialylierter IgG-Antikörper gegen Insulin und die Glutamatdecarboxylase

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
(Dr. med.)
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Medizin

vorgelegt von
Caroline Stille
aus Münster

Lübeck, Februar 2021

1. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Marc Ehlers
2. Berichtstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. physiol. Katja Bieber

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2021

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 12.05.2021

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Angeborene Immunantwort	1
1.1.2	Adaptive Immunantwort	2
1.1.3	Struktur und Funktion von Antikörpern	3
1.2	Autoimmunität	6
1.2.1	Autoimmunerkrankungen	6
1.2.2	Diabetes mellitus Typ 1	8
1.2.2.1	Pathogenese	9
1.2.2.2	Therapieansätze	11
1.3	Pathogenes und antiinflammatorisches Potential von Antikörpern	13
1.3.1	Intravenöse Immunglobuline (IVIg)	13
1.3.2	Antiinflammatorische Wirkung antigenspezifischer sialylierter IgG-Antikörper	14
1.4	Zielsetzung	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3	Chemikalien	18
2.1.4	Puffer, Lösungen, Medien und Gele	19
2.1.5	Kits	21
2.1.6	Primer	21
2.1.7	Enzyme	21
2.1.8	Zellen	22
2.2	Methoden	22
2.2.1	Identifizierung der variablen anti-GAD Antikörpersequenzen	23
2.2.1.1	RNA-Isolierung aus der Hybridomzelllinie HB-184	23
2.2.1.2	Reverse Transkription	23

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.1.3	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion	24
2.2.1.4	Ligation in den TA-Vektor	25
2.2.1.5	Transformation, Plasmidisolierung und Sequenzierung der V(D)J-Sequenzen	26
2.2.2	Klonierung der V(D)J-Sequenzen des anti-GAD Antikörpers und des anti-Insulin Antikörpers	27
2.2.2.1	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion mit spezifischen Primern	27
2.2.2.2	Restriktionsverdau	28
2.2.2.3	Ligation in den Expressionsvektor	28
2.2.2.4	Herstellung kompetenter E.coli	29
2.2.2.5	Transformation des Expressionsvektors und Plasmidpräparation	29
2.2.3	Produktion und Aufreinigung der beiden murinen IgG1-Antikörper mit unterschiedlicher Glykosylierung	30
2.2.3.1	Kultivierung von HEK 293-Zellen	30
2.2.3.2	Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen	30
2.2.3.3	Aufreinigung der Antikörper	31
2.2.4	Analyse der produzierten Antikörper	31
2.2.4.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	31
2.2.4.2	ELISA	32
2.2.4.3	MALDI-TOF Glykananalyse	32
3	Ergebnisse	35
3.1	Identifizierung und Klonierung der V(D)J-Sequenzen der beiden murinen IgG1-Antikörper und Konstruktion der Expressionsvektoren	35
3.1.1	Klonierung des anti-GAD IgG1-Antikörpers	35
3.1.2	Klonierung des anti-Insulin IgG1-Antikörpers	37
3.2	Plasmidpräparation	39
3.3	Produktion und Aufreinigung der Antikörper	39
3.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	41
3.5	ELISA	45
3.6	IgG-Glykananalyse	47
4	Diskussion	49
5	Zusammenfassung	59
	Literaturverzeichnis	61
	Danksagung	73

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist ständig einer Vielzahl von Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten ausgesetzt und vor diesen potentiellen Krankheitserregern durch eine Reihe verschiedener Effektorzellen und Moleküle, die zusammen das Immunsystem bilden, geschützt. Im Laufe der Evolution haben sich immer wirkungsvollere hochkomplexe Abwehrmechanismen zur Bekämpfung pathogener Strukturen entwickelt, die man in eine angeborene und eine erworbene adaptive Immunität einteilen kann [1, Kapitel 1].

Neben der bedeutenden Funktion, Krankheitserreger und eine damit einhergehende Infektion zu erkennen und effektiv zu bekämpfen sowie ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln, ist es Aufgabe des Immunsystems, sich selbst zu regulieren. Dabei ist es von großer Bedeutung, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden zu können. In einem gesunden Organismus besteht ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Selbsttoleranz, Toleranz gegen harmlose Strukturen und Sensitivität gegenüber Pathogenen. Versagen die regulatorischen Mechanismen, gerät dieses empfindliche Gleichgewicht durcheinander und Autoimmunerkrankungen sowie Allergien können entstehen [1, Kapitel 14 und 15]. Ein großes Ziel bei der Erforschung der hochkomplexen Wirkungsweisen des Immunsystems ist daher, therapeutische Ansätze für Krankheiten derartiger Genese zu entwickeln.

1.1.1 Angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunität dient der ersten Abwehr von Pathogenen und wird überwiegend von Zellen der myeloiden Zelllinie gebildet [1, Kapitel 2]. Sobald eindringende Mikroorganis-

men die Haut und die Schleimhäute als physikalische und chemische Barriere überwunden haben, treffen sie auf Makrophagen und in das entzündete Gewebe gelockte neutrophile Granulozyten, deren Hauptaufgabe die Phagozytose und Zerstörung der Krankheitserreger ist. Zudem sekretieren sie Zyto- und Chemokine, die weitere Entzündungsmechanismen in Gang setzen.

Weiterer Bestandteil der angeborenen Immunantwort ist das Komplementsystem, welches aus einer Gruppe von über 30 Plasmaproteinen mit ganz unterschiedlichen Eigenschaften besteht [2]. Diese können im Rahmen einer Immunantwort auf zahlreichen Oberflächen von Mikroorganismen aktiviert werden und unterstützen bei der ersten Abwehr von Krankheitserregern.

Um Pathogene zu erkennen, verfügen die Zellen der angeborenen Immunantwort über Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRR), die wiederkehrende, konservierte molekulare Strukturen erkennen und binden, sogenannte pathogenassoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) [3], [4]. Sie kommen auf vielen Mikroorganismen, nicht jedoch auf körpereigenen Zellen vor. Zu den PRR gehören unter anderem die Toll-ähnlichen Rezeptoren (toll-like receptor, TLR), welche Strukturen wie Lipopolysaccharid (LPS) in der bakteriellen Zellwand oder unmethylierte DNA erkennen [5]. So sind die Abwehrsysteme der angeborenen Immunität zwar sehr wirksam in der ersten Unterscheidung zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen, aber eingeschränkt durch ihr begrenztes Repertoire an nicht wandlungsfähigen Rezeptoren zur Erkennung von Pathogenen. In Eukaryonten hat sich deshalb zusätzlich ein sehr anpassungsfähiges und hochspezifisches System entwickelt, das adaptive Immunsystem [1, Teil IV].

1.1.2 Adaptive Immunantwort

Das adaptive Immunsystem ist in der Lage, Infektionen viel spezifischer zu bekämpfen, entwickelt sich aber mit einer gewissen zeitlichen Latenz und schließt sich somit der angeborenen Immunantwort an, wenn diese eine beginnende Infektion nicht beseitigen kann [1, Teil IV]. Es lässt sich in eine zelluläre und eine humorale Immunantwort unterscheiden, die entstanden sind, um Krankheitserreger mit unterschiedlichen Lebensweisen erkennen und eliminieren zu können.

Im Rahmen der zellulären Immunantwort werden Zellen, die mit intrazellulären Krankheitserregern infiziert sind, sowie krankhaft veränderte Zellen, zum Beispiel Tumorzellen, durch T-Lymphozyten (T-Zellen) zerstört [1, Kapitel 9]. Diese erkennen Antigenpeptide, die von körpereigenen Zellen über zwei verschiedene Arten von Membranproteinkomplexen, den Haupthistokompatibilitätskomplexen I bzw. II (major histocompatibility complex, MHC, auch

humanes Leukozyten-Antigen-System, HLA), präsentiert werden. MHC I-Moleküle sind auf allen kernhaltigen Körperzellen zu finden und werden von zytotoxischen T-Zellen über den T-Zellrezeptor und den Corezeptor CD8 erkannt, woraufhin eine Zerstörung/Lyse oder Apoptose der antigentragenden Zelle induziert wird. MHC II-Moleküle kommen nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen vor und dienen über den T-Zellrezeptor und den Corezeptor CD4 der Erkennung durch T-Helferzellen, die nach Aktivierung Zytokine sezernieren, die weitere Immunzellen aktivieren.

Die humorale Immunantwort dient der Abwehr von Pathogenen im extrazellulären Raum [1, Kapitel 10]. Sie wird durch B-Lymphozyten (B-Zellen) vermittelt, die nach der Bindung von freiem Antigen über B-Zellrezeptoren und Aktivierung durch T-Helferzellen in Plasmazellen differenzieren und Antikörper mit einer bestimmten Spezifität produzieren und sezernieren. Diese neutralisieren zum Beispiel durch Bindung Viren und markieren Pathogene, die dann durch das Komplementsystem und Makrophagen eliminiert werden können.

Die sehr gezielte Abwehr von Krankheitserregern im Rahmen der adaptiven Immunität basiert auf der klonalen Selektion von Lymphozyten aus einem bestehenden präimmunen Repertoire mit einer immensen Vielzahl hochspezifischer und individueller Rezeptoren [6], [7]. Die Diversität dieser lymphozytischen Antigenrezeptoren entsteht durch eine somatische Genumlagerung und ermöglicht es dem adaptiven Immunsystem, praktisch jedes Antigen eines Krankheitserregers spezifisch zu erkennen und die Immunantwort stark darauf auszurichten.

Eine bedeutende Eigenschaft des adaptiven Immunsystems ist die Fähigkeit, ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln [1, Kapitel 11]. Ein Teil der aktivierten Lymphozyten differenziert zu langlebigen Plasmazellen, die spezifische Antikörper produzieren, bzw. zu Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Kontakt mit dem Pathogen sofort aktiviert werden und in der Lage sind, eine schnellere und ausgeprägtere Immunantwort auszulösen.

Die antigenspezifische Unterdrückung von adaptiven Immunantworten ist das Ziel bei der Therapie bedeutsamer menschlicher Krankheiten, die auf einer unangemessenen Aktivierung des Immunsystems beruhen, und bildet auch bei dieser Arbeit die zentrale Aufgabenstellung.

1.1.3 Struktur und Funktion von Antikörpern

Immunglobuline (Ig) sind die antigenerkennenden Moleküle von B-Zellen und dienen auf der B-Zelloberfläche als Antigenrezeptor der Zelle (B-Zellrezeptor, BCR), wobei jede B-Zelle ein Immunglobulin mit einer individuellen Spezifität synthetisiert [1, Kapitel 4], [8]. Immunglobuline derselben Spezifität werden von differenzierten Plasmazellen als lösliche Antikörper sezerniert, die dann im Rahmen der adaptiven Immunantwort eine bedeutende Rolle spielen.

Es gibt fünf Hauptklassen von Antikörpern, die man als Isotypen bezeichnet: IgM, IgD, IgG1-4, IgA1-2 und IgE [9]. Sie bestimmen die funktionelle Aktivität des Antikörpermoleküls und sind im Körper unterschiedlich verteilt. So ist IgG zum Beispiel der häufigste Isotyp im Blut und in extrazellulären Flüssigkeiten, während IgA vor allem in den Epithelien, die den Darmtrakt und die Atemwege auskleiden, zu finden ist. Das im Rahmen dieser Arbeit wichtige IgG bindet und neutralisiert Antigene, opsoniert diese effizient für die Aufnahme durch Phagozyten über spezifische Antikörperrezeptoren und aktiviert andere Immunzellen und das Komplementsystem.

Antikörper sind Glykoproteine, die aus jeweils zwei identischen schweren (heavy chain, HC) und leichten Ketten (light chain, LC) bestehen [1, Kapitel 4], [8]. Die leichte Kette besteht aus einer N-terminalen variablen (V_L) und einer konstanten Domäne (C_L), die schwere Kette aus einer variablen (V_H) und drei konstanten Domänen (C_{H1-3}) bei IgG, IgA und IgD bzw. vier konstanten Domänen (C_{H1-4}) bei IgM und IgE. Die beiden schweren Ketten des IgG sind durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden und binden jeweils über eine Disulfidbrücke eine leichte Kette. Das so entstehende Y-förmige Molekül kann durch einen Verdau mit der Protease Pappain in drei Fragmente, zwei F_{ab} -Fragmente (fragment antigen binding) und das F_c -Fragment (fragment crystallizable), gespalten werden. Eine leichte Kette bildet zusammen mit der V_H - und C_{H1} -Domäne ein F_{ab} -Fragment, wobei die V_L - und die V_H -Domäne für die Antigenbindung verantwortlich sind. Die C_{H2} - und C_{H3} -Domänen der HC (bei IgM und IgE C_{H2-4}) bilden das F_c -Fragment, welches über spezifische F_c -Rezeptoren mit Effektorzellen und -molekülen wie Komplement interagiert (siehe Abbildung 1.1).

Die variable Domäne, die für die Antigenbindung entscheidend ist, wird bei der HC von drei (VDJ) und bei der LC von zwei (VJ) Gensegmenten gebildet [8]. Die enorm hohe Variabilität in der Antigenbindungsstelle, die es den Antikörpern ermöglicht, nahezu jedes Antigen zu erkennen, entsteht durch einen genetischen Umlagerungsprozess dieser Gensegmente während der frühen Entwicklung der B-Lymphozyten im Knochenmark (somatische Rekombination) [10]. Am Genlocus für die schwere Kette (Chromosom 14) wird bei der VDJ-Rekombination eine von 40 möglichen V-Segmenten (variable) mit einer von 25 möglichen D-Segmenten (diversity) und einer von 6 möglichen J-Segmenten (joining) zu einer rekombinanten variablen Domäne auf DNA-Ebene verbunden. Durch die Kombination mit einer entsprechenden konstanten Domäne (C_μ , C_δ , $C_{\gamma1-4}$, $C_{\alpha1-2}$, C_ϵ) wird die Immunglobulinklasse (IgM, IgD, IgG1-4, IgA1-2, IgE) festgelegt. B-Zellen produzieren aufgrund alternativen RNA-Spleißens anfänglich nur schwere Ketten der Isotypen μ und δ und exprimieren somit B-Zellrezeptoren vom IgM- oder IgD-Isotyp. Durch einen DNA-Umlagerungsprozess, den Isotyp- oder Klassenwechsel, werden später auch andere Isotypen wie IgG als B-Zellrezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert oder als Antikörper sezerniert.

Es gibt zwei Typen der konstanten Region von leichten Ketten, die man als Lambda (λ)- und Kappa (κ)-Kette bezeichnet [8]. Beim Menschen befindet sich der Genlocus für die κ -Kette auf Chromosom 2 und der für die λ -Kette auf Chromosom 22. Ein Immunglobulin hat entweder

nur κ - oder nur λ -Ketten. Die somatische Rekombination der variablen Region findet bei der LC analog zur HC statt, nur fehlt ihr das D-Segment. Dabei wird die κ -Kette aus 40 möglichen V- und fünf möglichen J-Segmenten und die λ -Kette aus 30 möglichen V- und vier möglichen J-Segmenten zusammengesetzt.

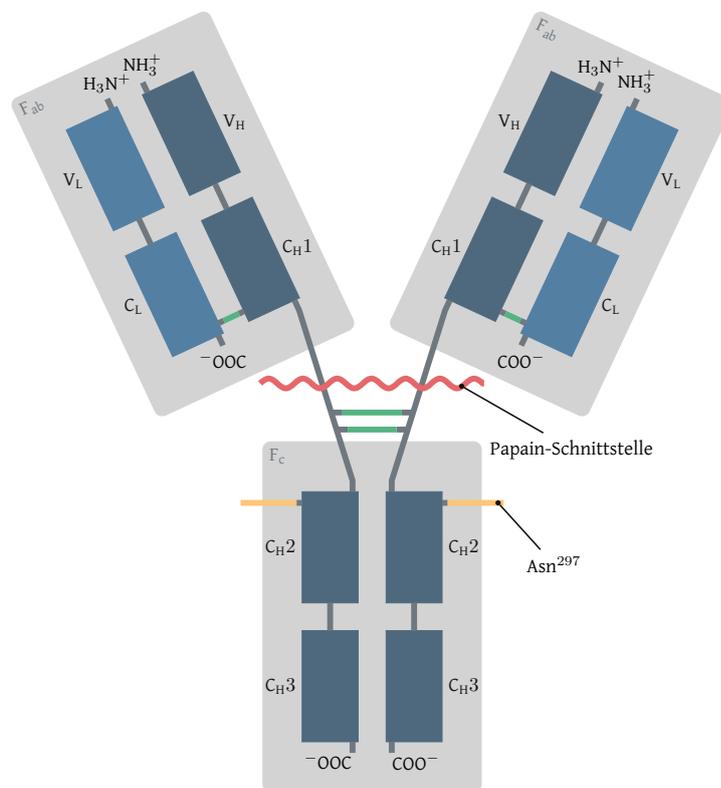


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Antikörperstruktur. Ein IgG-Molekül ist aufgebaut aus zwei schweren Ketten (dunkelblau), die aus je einer variablen Domäne (V_H) und drei konstanten Domänen (C_{H1}-3) bestehen, sowie zwei leichten Ketten (hellblau), die aus je einer variablen (V_L) und einer konstanten Domäne (C_L) bestehen. Die schweren Ketten sind über zwei Disulfidbrücken (grün) verbunden und binden wiederum die leichten Ketten über je eine Disulfidbrücke. Im Bereich der zweiten konstanten Domäne der schweren Ketten befindet sich am Asn²⁹⁷ eine Glykosylierungsstelle (gelb).

Durch somatische Hypermutation, einem Prozess, im Rahmen dessen zufällige Mutationen in den hypervariablen Regionen der V(D)J-Segmente reifer, aktivierter B-Zellen eingefügt werden, um so Klone mit erhöhter Antigenaffinität zu generieren, kann die Variabilität der Antigenbindung nochmals erhöht werden [11].

Antikörper können posttranslational an bestimmten Stellen enzymatisch glykosyliert werden, wobei jede Antikörperklasse sich durch ein eigenes Muster der Positionen und Strukturen der angehefteten Oligosaccharide auszeichnet [12]. IgG-Antikörper haben am F_c-Fragment jeweils

am Asparagin 297 (Asn²⁹⁷) der HC eine Glykosylierungsstelle, über die ein Oligosaccharid N-glykosidisch gebunden ist. Dieses besteht in seiner Grundstruktur aus zwei N-Acetylglucosaminen (GlcNAc) und drei Mannosen (Man), welche die Glykankette in zwei Arme aufspalten. An diese Grundstruktur können verschiedene Zuckereinheiten angefügt werden (siehe Abbildung 1.2), wobei bislang mehr als 30 verschiedene Zuckerketten am Asn²⁹⁷ identifiziert werden konnten. Endständig können Galactosen und Sialinsäuren gebunden sein, deren Anheftung durch Galactosyl- bzw. Sialyltransferasen katalysiert wird. Die Glykosylierung ist nicht nur wichtig für die Struktur und Stabilität, sondern hat entscheidenden Einfluss auf die pro- oder antiinflammatorische Effektorfunktion des Antikörpers (siehe Abschnitt 1.3.2) [13]-[15].

1.2 Autoimmunität

Die adaptive Immunantwort ist ein entscheidender Bestandteil der Körperabwehr gegen Infektionen und essentiell für den Erhalt der Gesundheit. Adaptive Immunantworten werden manchmal jedoch auch gegen Antigene ausgelöst, bei denen es sich nicht um einen Krankheitserreger handelt, sondern um Strukturen, die sich auf den eigenen Zellen und im Gewebe eines Individuums befinden. Diese Reaktion auf körpereigene Antigene bezeichnet man als Autoimmunität und damit einhergehende Erkrankungen als Autoimmunerkrankungen [16]. Die Genumlagerungen, die zu Beginn der Lymphozytenentwicklung in den zentralen lymphatischen Organen stattfinden, erfolgen zufällig, sodass unvermeidlich Lymphozyten entstehen, die eine Affinität zu körpereigenen Antigenen besitzen. Um die körpereigenen Strukturen vor Schäden zu schützen, sind im Laufe der Zeit verschiedene Toleranzmechanismen entstanden, um solche Lymphozyten zu erkennen und zu eliminieren bzw. unter Kontrolle zu halten. Durch negative Selektion werden bereits bei der Entwicklung die B- und T-Lymphozyten im Knochenmark bzw. Thymus aussortiert, die gegen körpereigene Antigene gerichtet sind [1, Kapitel 8]. Reife autoreaktive Lymphozyten, die die zentralen Toleranzmechanismen umgangen haben, können in der Körperperipherie durch Anergie (funktionelle Reaktionslosigkeit) aufgrund fehlender costimulierender Signale, Deletion (Zelltod durch Apoptose) und Unterdrückung durch regulatorische T-Zellen inaktiviert oder beseitigt werden. All diese Mechanismen wirken synergistisch und führen zu einem effizienten Schutz gegen Autoimmunität, ohne dass die Fähigkeit des Immunsystems beeinträchtigt wird, wirksam auf eindringende Krankheitserreger reagieren zu können. Bei einem Versagen dieser regulatorischen Mechanismen der Selbsttoleranz kann Autoimmunität entstehen.

1.2.1 Autoimmunerkrankungen

Eine Autoimmunerkrankung entwickelt sich, wenn die oben beschriebenen Kontrollmechanismen versagen und es als Reaktion auf die körpereigenen Antigene zur Bildung von Effektorzel-

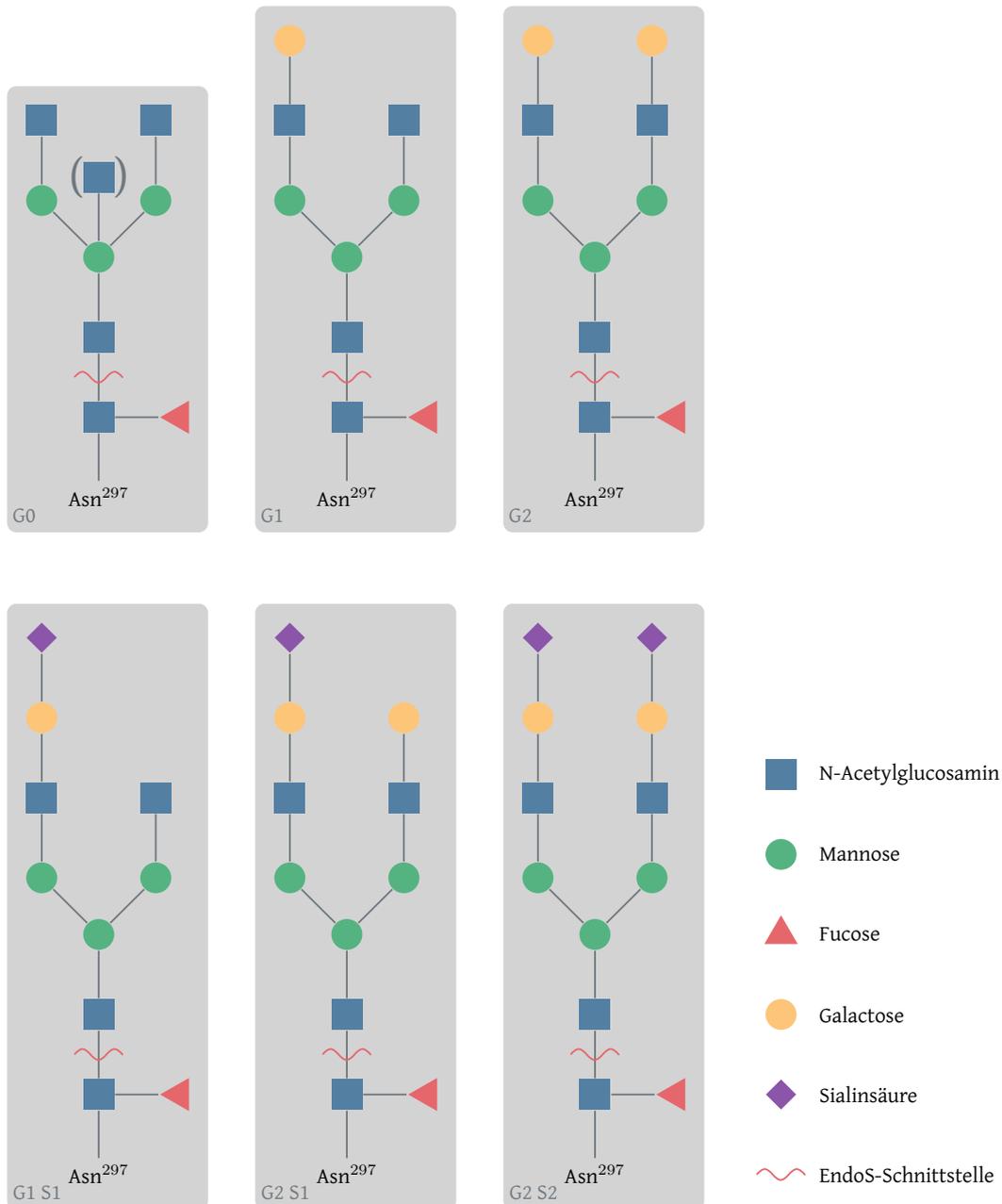


Abbildung 1.2: Beispielhafte F_c -Glykanstrukturen. Am Asn^{297} der HC ist N-glykosidisch ein Oligosaccharid gebunden, das in seiner Grundstruktur aus zwei N-Acetylglucosaminen und drei Mannosen besteht und um weitere Zuckereinheiten ergänzt werden kann. Die Isoformen G0, G1 und G2 haben keine, eine bzw. zwei endständige Galactosen, die Isoformen S1 und S2 zusätzlich eine bzw. zwei endständige Sialinsäuren. Das Enzym Endoglykosidase S (EndoS) aus *Streptococcus pyogenes* spaltet spezifisch zwischen dem ersten und zweiten N-Acetylglucosamin.

len und -molekülen kommt, die Gewebe zerstören. Die genauen Mechanismen zur Entstehung eines solchen Geschehens sind noch nicht vollständig bekannt, es ist jedoch davon auszugehen, dass ein Zusammenwirken verschiedener Faktoren ursächlich ist. So kann Autoimmunität bei einer genetisch bedingten Prädisposition durch das Versagen der natürlichen Toleranzmechanismen und äußere Faktoren wie starken Stress oder Infektionen ausgelöst werden. Praktisch jedes Gewebe und somit jedes Organ des menschlichen Körpers kann durch die fehlerhafte Immunantwort betroffen sein, sodass mehrere hundert Autoimmunerkrankungen bislang bekannt sind [17]. Sie lassen sich in organspezifische und systemische Krankheiten unterscheiden und weisen eine große klinische Variabilität auf.

1.2.2 Diabetes mellitus Typ 1

Die Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus Typ 1A (auch insulinabhängiger Diabetes mellitus, engl. insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM; im Folgenden gemeint, wenn von Diabetes mellitus Typ 1 oder Typ 1-Diabetes die Rede ist) ist eine organspezifische Autoimmunerkrankung und durch einen dauerhaft erhöhten Glukosespiegel im Blut, eine chronische Hyperglykämie, gekennzeichnet [18]. Durch eine Fehlregulation des adaptiven Immunsystems kommt es zu einer als Insulitis bezeichneten entzündlichen Infiltration der Langerhans-Inseln des endokrinen Pankreas, die zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen und letztlich zu einem absoluten Insulinmangel führt. Insulin ist als einziges Hormon in der Lage, den Blutzuckerspiegel zu senken, indem es die Körperzellen dazu anregt, Glukose aus dem Blut aufzunehmen [19]. Neben Glucagon, welches den Blutzuckerspiegel durch Anregung der Bildung von energiereicher Glukose aus Glykogen in der Leber erhöhen kann, stellt Insulin das wichtigste Hormon in der Regulation der Glukosekonzentration im Blut dar. Aufgrund des Mangels sind die betroffenen Patienten ihr Leben lang auf eine exogene Zufuhr von Insulin angewiesen.

Vom Diabetes mellitus Typ 1 sind weitere sehr seltene Diabetesformen sowie der häufige im Erwachsenenalter auftretende Diabetes mellitus Typ 2 zu unterscheiden. Letzterer ist keine autoimmunbedingte Krankheit, sondern entwickelt sich in der Regel im Rahmen eines metabolischen Syndroms und ist durch ein fehlendes Ansprechen der Körperzellen auf Insulin, eine sogenannte Insulinresistenz, charakterisiert.

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist die häufigste Stoffwechselerkrankung im Kindes- und Jugendalter. Auf Basis der Erhebungen von regionalen Registern ergibt sich eine Gesamtzahl von ca. 32.000 erkrankten Kindern und Jugendlichen in Deutschland [20]. Die Inzidenz beträgt laut aktuellen Hochrechnungen ca. 24 je 100.000 Personenjahre, was auf ca. 3.100 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland schließen lässt. Besorgniserregend ist die weltweit steigende Inzidenz der Erkrankung [21]–[24]. Ähnlich wie in anderen europäischen Ländern zeigte sich in den letzten 20 Jahren in Deutschland eine jährliche relative Steigerung der Neuerkrankungen um ca.

4 %, wobei dieser Anstieg vor allem bei Kindern unter 5 Jahren zu verzeichnen ist [23], [25]. Das Alter bei Diagnosestellung hat eine bimodale Verteilung mit einem Peak im Alter von 4 bis 6 Jahren und einem in der frühen Pubertät (10 bis 14 Jahre) [26].

1.2.2.1 Pathogenese

Die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 wird als multifaktorielles Geschehen verstanden, welches noch nicht vollständig geklärt ist. Unumstritten ist, dass der Erkrankung eine Fehlregulation des Immunsystems zugrunde liegt, an der sowohl genetische als auch äußere Faktoren beteiligt sind.

Polymorphismen verschiedenster Gene wurden in diesem Zusammenhang beschrieben, wobei der Großteil der bislang identifizierten Veränderungen in den HLA-Allelen auf Chromosom 6 gefunden wurde [27], [28]. Insbesondere die Genloci für MHC II-Moleküle, die mit CD 4-positiven Zellen interagieren, scheinen in der westlichen Bevölkerung von Relevanz zu sein, was nahelegt, dass diesen Zellen eine Bedeutung in der Pathogenese des Krankheitsbildes zukommt [29]–[31].

Neben der genetischen Prädisposition können Umwelteinflüsse als Trigger die Entstehung der Erkrankung entscheidend mitbeeinflussen, wobei insbesondere perinatale Faktoren und (Virus-) Infektionen (u.a. Coxsackie B-Viren) eine Rolle zu spielen scheinen [27], [32], [33]. Auch ernährungsbedingte Faktoren wie der Einfluss von Vitamin D, Omega-3-Fettsäuren, Kuhmilch und Gluten werden diskutiert [27], [34], [35].

Die beschriebenen Veränderungen durch genetische und äußere Faktoren führen zu einer Dysregulation des Immunsystems, an der verschiedenste zelluläre und humorale Komponenten beteiligt sind.

Grundlage vieler in diesem Zusammenhang relevanter Studien sind Versuche mit der Non Obese Diabetic (NOD)-Maus, einem Inzuchtstamm der Farbmaus mit einer hohen Inzidenz an spontan auftretendem Diabetes mellitus [36], [37]. Sie wurde erstmals 1980 beschrieben und geht auf Versuche in den Shionogi Research Laboratories in Japan zurück. Da hinsichtlich der autoimmunen Ätiologie große Ähnlichkeiten zum Diabetes mellitus Typ 1 des Menschen bestehen, eignet sie sich auf nahezu ideale Weise zur Erforschung der Krankheit und ist neben der Biobreeding (BB)-Ratte das dominierende Tiermodell in der experimentellen Diabetes mellitus Typ 1-Forschung.

Zahlreiche Studien mit NOD-Mäusen belegen die pathogenetische Bedeutung von zytotoxischen CD8-positiven Zellen. Diese scheinen für die Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen

des Pankreas und somit für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 1 obligat zu sein, wobei über den Zeitpunkt der Relevanz im Rahmen der Entwicklung eines Diabetes Uneinigkeit besteht [38], [39]. Sowohl in Mäusen als auch im Menschen konnten CD8-positive T-Zellen nachgewiesen werden, die gegen Epitope des Insulins gerichtet sind [40]–[42].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass neben CD8-positiven T-Zellen auch CD4-positive T-Zellen für die Entwicklung eines Diabetes im NOD-Mausmodell erforderlich sind [43]. Die Depletion dieser Zellen sowie die Behandlung mit nicht-depletierenden anti-CD4 Antikörpern konnten die Entstehung der Erkrankung verhindern [44], [45]. Frühere Untersuchungen zeigten ebenso, dass der Transfer von CD4-positiven T-Zellen in neugeborene NOD-Mäuse einen Diabetes auszulösen vermochte [46]. Es ist anzunehmen, dass die CD4-positiven T-Zellen die zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen unterstützen, die Antikörperproduktion durch B-Zellen stimulieren und Makrophagen aktivieren.

Die Bedeutung der von den CD4-positiven T-Zellen stimulierten B-Zellen und der von ihnen sezernierten Antikörper in der Pathogenese des autoimmunen Geschehens, das zu einem Diabetes mellitus Typ 1 führt, ist seit Jahren Gegenstand der Forschung. Viele Daten implizieren, dass das Vorhandensein von B-Zellen die Entstehung des inflammatorischen Geschehens begünstigt. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Inzidenz von Diabetes Typ 1 in NOD-Mäusen, die aufgrund von Knockouts nicht mehr in der Lage waren, B-Zellen zu bilden, von 80 auf 30 % sank und die Krankheit sich später manifestierte [47]. In einem anderen Experiment wurden B-Zell-defiziente Weibchen mit NOD-Männchen gekreuzt [48]. Da die Mütter aufgrund ihres B-Zellmangels nicht in der Lage waren, Antikörper zu produzieren, konnten sie diese weder transplazentar noch über die Milch an ihre Nachkommen weitergeben. Vergleicht man diese Nachkommen mit Nachkommen, die durch Kreuzen eines NOD-Weibchens mit einem B-Zell-defizienten Männchen entstanden, so entwickelten erstere signifikant weniger Diabetes (25 % gegenüber 50 % im Alter von 40 Wochen). Die Ergebnisse dieses Versuchs deuten darauf hin, dass nicht nur die B-Zellen selbst, sondern auch die (Auto-) Antikörper im Rahmen der Pathogenese des Diabetes Typ 1 von Relevanz sein könnten.

Die Mechanismen, über die B-Zellen Einfluss nehmen, sind noch nicht verstanden, wobei davon auszugehen ist, dass verschiedene Vorgänge eine Rolle spielen und zusammenwirken. Eine wichtige Funktion scheint in diesem Zusammenhang die Antigenpräsentation zu sein. B-Zellen gehören neben dendritischen Zellen und Makrophagen zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC) und sind in der Lage, naiven CD4-positiven T-Zellen über MHC II-Moleküle lösliche Antigene spezifisch zu präsentieren. Unter bestimmten Umständen, in denen zusätzlich costimulierende Moleküle exprimiert werden, ist es B-Zellen möglich, die Ausbildung naiver T-Zellen zu antigenspezifischen Effektorzellen zu stimulieren [49]. Verschiedene Studien konnten die Bedeutung dieser Vorgänge in der Entstehung von Diabetes in NOD-Mäusen belegen [50]–[52]. Welche Rolle allerdings die Autoantikörper in diesem Zusammenhang spielen, ist unklar. Es gibt Hinweise dafür, dass sie die Antigenaufnahme und -präsentation durch APC verstärken. So

konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen durch die Zugabe von Antikörpern deutlich verbessert werden konnte [53]. Verschiedene andere Mechanismen sind zudem denkbar. Die Autoantikörper könnten beispielsweise einen Gewebeschaden verursachen, der Antigene der Inselzellen freisetzt und weitere immunologische Prozesse in Gang setzt.

Abgesehen von der pathogenetischen Bedeutung haben die IgG-Autoantikörper einen großen prädiktiven und diagnostischen Wert, da sie im Serum erkrankter Patienten schon vor der Manifestation eines Diabetes nachzuweisen sind und somit eine Prädiktion und Risikostratifizierung bereits in der prädiabetischen Phase ermöglichen. Bislang konnten folgende gegen Betazellantigene gerichtete Autoantikörper identifiziert werden: Insulin-Autoantikörper (IAA), Autoantikörper, die gegen die Glutamatdecarboxylase gerichtet sind (GADA), sowie welche, deren Antigene Tyrosinphosphatase-ähnliche Proteine (IA-2A) und der Zinktransporter ZnT8 (ZnT8A) sind [54]–[56]. Einer oder mehrere dieser Antikörper sind bei mehr als 95 % der Patienten bereits vor Manifestation des Diabetes nachweisbar. In drei großen Kohortenstudien wurden in den USA ('DAISY'-Studie, Erfassungszeitraum 1993-2006), Finnland ('DIPP'-Studie, Erfassungszeitraum 1994-2009) und Deutschland ('BABYDIAB'-Studie, Erfassungszeitraum 1989-2006) Kinder mit einem erhöhten Diabetes Typ 1-Risiko erfasst, wobei sie durch eine positive Familienanamnese oder ein genetisches Risikoprofil identifiziert wurden [57]–[59]. In einer zusammenfassenden Analyse zeigte sich ein kumulatives 10-Jahres-Risiko für die Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 1 von 69,7 % beim Vorliegen mehrerer Autoantikörper (IAA, GADA und IA-2A) und von 14,5 % beim Vorliegen nur eines Autoantikörpers. Das Manifestationsalter lag niedriger bei denjenigen Kindern, die bereits in den ersten drei Lebensjahren mehrere Autoantikörper aufwiesen [54]. IAA wurden am häufigsten und in der Regel als erstes nachgewiesen [59], [60]. Ähnliche Daten lieferte auch die 'Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study', in der knapp 12.000 Schulkinder aus Norddeutschland ohne positive Familienanamnese auf das Vorliegen von Autoantikörpern (IAA, GADA und/oder IA-2A) gescreent und über 18 Jahre nachuntersucht wurden [61]. Im ersten Follow-up wurden 1,99 % der Schulkinder positiv auf Autoantikörper getestet, wobei 1,52 % einen und 0,46 % mehrere der drei getesteten Autoantikörper aufwiesen. Die Kinder mit einem nachweisbaren Autoantikörper hatten ein 10-Jahres-Risiko von 1,2 % und ein 18-Jahres-Risiko von 22,6 %, an einem Diabetes mellitus Typ 1 zu erkranken. Für die Kinder mit mehreren Autoantikörpern lag das 10- und 18-Jahres-Risiko bei 59,7 % bzw. 75,1 %. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien, in denen IAA als prognostisch am bedeutsamsten beschrieben wurden, waren in der Karlsburg-Kohorte bei den Kindern, die einen Diabetes entwickelten, die Titer von GADA und IA-2A signifikant erhöht.

1.2.2.2 Therapieansätze

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist bislang nicht heilbar. Erkrankte Patienten benötigen eine lebenslange Therapie mit Insulin und sind aufgrund der langen Erkrankungsdauer zudem be-

sonders gefährdet, schwerwiegende Langzeitkomplikationen zu erleiden. Aufgrund der großen psychosozialen Belastung der Betroffenen sowie der enormen gesundheitsökonomischen Relevanz versuchen Arbeitsgruppen weltweit seit Jahrzehnten, Möglichkeiten zur Therapie der Erkrankung zu entwickeln. Ein Ansatz war zunächst, das Entstehen der Insulinitis durch eine unspezifische Unterdrückung des Immunsystems zu verhindern bzw. zu verzögern. So wurden unter anderem anti-CD3 und anti-CD4 Antikörper eingesetzt, welche eine T-Zelldepletion zur Folge haben [45], [62], [63]. Solche und ähnliche Therapien führten zwar zu einer Verminderung des diabetogenen Geschehens, waren allerdings wie bei vielen anderen immunsuppressiven Therapien mit heftigen systemischen Nebenwirkungen verbunden. Diese Erkenntnisse führten dazu, neue Ansätze zu entwickeln, die sich die (Re-) Induktion von Toleranz gegenüber den Autoantigenen zur Aufgabe machten.

Da die bereits oben erwähnten Studien zu der der Erkrankungsmanifestation vorausgehenden Autoimmunität zeigten, dass die gegen das körpereigene Insulin gerichteten Autoantikörper am häufigsten und in der Regel als erstes auftreten, ist Insulin neben der Glutamatdecarboxylase eines der im Fokus der Forscher stehenden Schlüsselantigene [60], [64]. Es ist ein Proteohormon, das in den β -Zellen des Pankreas gebildet wird und aus zwei Peptidketten, der A-Kette mit 21 und der B-Kette mit 30 Aminosäuren, welche durch zwei intermolekulare Disulfidbrücken kovalent verbunden sind, besteht. Da im Rahmen der Entwicklung eines Diabetes die Toleranz gegenüber diesem Hormon gestört zu sein scheint, ist ein Ansatz vieler Studien, Wege zu finden, diese Toleranz wiederherzustellen und eine Zerstörung der β -Zellen des Pankreas zu verhindern. Ziel der Bemühungen ist es, ähnlich wie bei einer Hyposensibilisierungstherapie bei Allergikern, durch die repetitive Gabe von Insulin eine protektive, antiinflammatorische Immunantwort zu induzieren und antigenspezifisch Toleranz wiederherzustellen.

In der bislang größten Diabetespräventionsstudie DPT-1 wurden fast 400 Personen mit positiven Autoantikörpern im Alter zwischen drei und 45 Jahren mit der Gabe von Insulin über die Mukosa behandelt, wobei sich zeigte, dass die Patienten mit hohen Insulinautoantikörpertitern auf die Gabe von Insulin ansprachen und durchschnittlich 4,5 bis 5 Jahre später einen klinisch manifesten Typ 1-Diabetes entwickelten [65], [66]. In der Folge wurden weitere Studien durchgeführt, die den Einfluss von oral und nasal appliziertem Insulin bei Patienten mit bereits vorhandenen Autoantikörpern untersuchten und ebenfalls positive Effekte zeigten [67], [68]. Da ein entscheidender Faktor für den Erfolg einer Behandlung auch der Zeitpunkt der Insulingabe zu sein scheint und die Diabeteswahrscheinlichkeit mit dem Zeitpunkt und der Anzahl der auftretenden Autoantikörper korreliert [60], wurde 2009 die PrePoint-Studie initiiert. Im Rahmen dieser doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie wurde eine kleine Anzahl an Kindern, die noch keine Autoantikörper, aber einen Hochrisikogenotyp aufwiesen und deren Familienanamnese auf eine hohe Erkrankungswahrscheinlichkeit für einen Typ 1-Diabetes hindeutete, mit oralem Insulin behandelt. Es zeigte sich eine schützende Immunantwort gegen Insulin im Sinne einer erhöhten regulatorischen T-Zellantwort bei denjenigen Kindern, die eine hohe Dosis

1.3. PATHOGENES UND ANTIINFLAMMATORISCHES POTENTIAL VON ANTIKÖRPERN

Insulin erhielten (67,5 mg/Tag) [69]. Da Autoimmunität sich oftmals schon in den ersten Lebensmonaten entwickelt und eine Behandlung so früh wie möglich sinnvoll erscheint, laufen aktuell Nachfolgestudien (PrePoint early, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02547519 / POInT, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03364868), die versuchen, die Ergebnisse bei Kindern in der Altersgruppe zwischen sechs Monaten und zwei Jahren (PrePoint early) bzw. vier und sieben Monaten (POInT) zu reproduzieren.

Ähnlich wie Insulin ist auch die Glutamatdecarboxylase (GAD) ein relevantes Autoantigen in der Pathogenese des Typ 1-Diabetes. Das Enzym katalysiert die Decarboxylierung von Glutamat zu γ -Aminobuttersäure (GABA) und CO_2 und kommt hauptsächlich in zwei Isoformen vor, die von zwei verschiedenen Genen codiert und aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts als GAD65 (65 kDa) und GAD67 (67 kDa) bezeichnet werden [70], [71]. Beide Formen werden im menschlichen Gehirn exprimiert, während im Pankreas überwiegend GAD65 (im Folgenden gemeint, wenn von der Glutamatdecarboxylase die Rede ist) zu finden ist.

Analog zu den Versuchen, mit der Gabe von Insulin eine antigenspezifische Toleranz herzustellen, erfolgten Studien zur Immunisierung mit GAD. So erhielten in einer Studie 70 Kinder im Alter von zehn bis 18 Jahren mit neu manifestiertem Typ 1-Diabetes zwei subkutane Injektionen von GAD-Alum (Aluminiumhydroxid als Adjuvans) oder nur Alum als Placebo [72]. Bei den Kindern, die mit GAD behandelt wurden, verzögerte sich die Abnahme der Restfunktion der β -Zellen des Pankreas über einen Zeitraum von 30 Monaten. Zudem konnte bei diesen Kindern ein erhöhter Anteil an regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden. Weitere Studien mit größeren Kohorten konnten diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen [73], [74].

1.3 Pathogenes und antiinflammatorisches Potential von Antikörpern

1.3.1 Intravenöse Immunglobuline (IVIG)

Die Gabe von intravenösen Immunglobulinen G (engl. intravenous immunoglobulin g, IVIG) ist eine bereits seit einigen Jahrzehnten im klinischen Alltag fest etablierte Therapie [75]. IVIG-Präparate enthalten gepoolte, polyvalente IgG, welche aus dem Plasma von bis zu mehreren tausend Spendern extrahiert werden. Ursprünglich wurden IVIG als Antikörperersatztherapie bei immundefizitären Erkrankungen wie zum Beispiel der Hypogammaglobulinämie eingesetzt. Die Erkenntnis, dass IVIG antiinflammatorische Eigenschaften besitzen, führte dazu, dass sie mittlerweile auch im Rahmen der Therapie von verschiedensten Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel dem systemischen Lupus erythematoses angewandt werden und große therapeutische Erfolge in diesem Bereich erzielen. Der immunsuppressive Effekt von IVIG ist noch

nicht vollständig geklärt. Die hohen Dosen von 1-2 g/kg, in denen IVIG alle drei bis vier Wochen eingesetzt werden müssen, deuten darauf hin, dass nur ein kleiner Anteil der präparierten humanen IgG verantwortlich für die therapeutischen Effekte ist. In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass die antiinflammatorische Wirkung auf die Antikörper zurückzuführen ist, die einen sialylierten F_c-Teil aufweisen [13]–[15]. Diese IgG machen ca. 10-15 % der gepoolten Immunglobuline aus. Entfernt man die endständigen Sialinsäuren der F_c-Glykane, zeigt sich ein Verlust der Wirkung der IVIG. Im Gegensatz dazu wird bei einer Erhöhung der sialylierten Fraktion eine geringere Dosis benötigt, um eine gleiche antiinflammatorische Wirkung zu erzielen.

1.3.2 Antiinflammatorische Wirkung antigenspezifischer sialylierter IgG-Antikörper

Basierend auf den beschriebenen Erkenntnissen aus der IVIG-Forschung haben Untersuchungen im Mausmodell gezeigt, dass die Glykosylierung des F_c-Teils von Antikörpern bei der Toleranzentstehung von entscheidender Relevanz ist [76], [77]. Es wurde gezeigt, dass in Abwesenheit inflammatorischer Costimuli sialylierte Antikörper entstehen, die in der Lage sind, inflammatorische Immunreaktionen durch B- und T-Zellen antigenspezifisch zu unterdrücken. Im Gegensatz dazu wurden unter inflammatorischen Bedingungen durch Stimulation mit T-Zell-abhängigen Antigenen Plasmazellen induziert, die nur in geringem Maße die α 2,6-Sialyltransferase exprimieren, somit desialylierte Antikörper produzieren und mit einer inflammatorischen und destruktiven Immunantwort korrelieren (siehe Abbildung 1.3).

Bei einer Hyposensibilisierungstherapie wird Patienten mit einer IgE-vermittelten allergischen Erkrankung das entsprechende Allergen kontrolliert über einen Zeitraum von bis zu fünf Jahren verabreicht [78]. Nach einer erfolgreichen Therapie schließt sich eine Phase an, in der die Patienten bei Allergenexposition keine oder eine deutlich verringerte Immunreaktion zeigen, das Immunsystem also eine gewisse Toleranz gegenüber dem Allergen entwickelt hat [79]. Bei diesen Patienten lässt sich ein deutlich erhöhter allergenspezifischer IgG-Serumspiegel nachweisen. Interessanterweise konnte analog den oben beschriebenen Erkenntnissen gezeigt werden, dass diese IgG-Antikörper eine hohe Sialylierung aufweisen, was die Hypothese unterstützt, dass bei Toleranzentstehung sialylierte Antikörper gebildet werden, die eine Immunreaktion im Sinne einer erhöhten inflammatorischen Aktivität verhindern können [76].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Gabe monoklonaler sialylierter IgG-Antikörper ohne stimulierende Costimuli spezifische Toleranz gegen ein Antigen induzieren kann [76], [77]. So konnte im Mausmodell bei vorheriger Gabe von sialylierten Antikörpern eine inflammatorische T-Zell-abhängige Antwort antigenspezifisch unterdrückt werden.

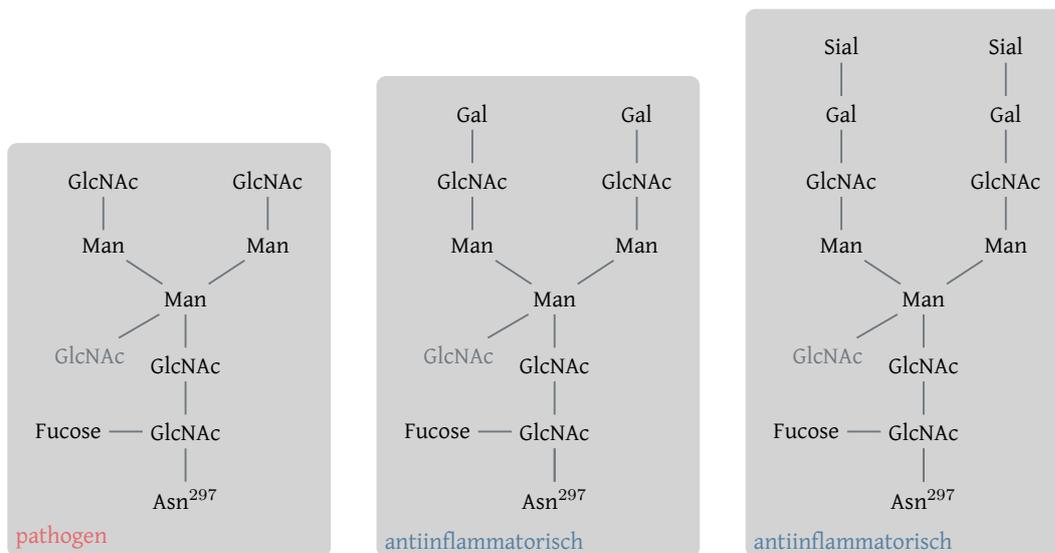


Abbildung 1.3: Unterschiedliche Glykosylierung von pathogen und antiinflammatorisch wirkenden IgG-Antikörpern.

1.4 Zielsetzung

Die Glykosylierung des F_c -Teils von Antikörpern hat entscheidenden Einfluss auf die Modulation des adaptiven Immunsystems in Richtung einer inflammatorischen bzw. einer regulatorischen, toleranzherstellenden Antwort. Diese Erkenntnis legt die Hoffnung nahe, in Zukunft Krankheiten, die mit einer inadäquaten inflammatorischen Immunantwort einhergehen, wie zum Beispiel Autoimmunerkrankungen und Allergien, in einer antigenspezifischen Weise durch den Einsatz sialylierter Antikörper therapieren zu können. Im Gegensatz zu der Behandlung mit IVIG, deren Wirkung sich zumindest überwiegend antigenunspezifisch vollzieht, könnten Antikörper durch ihren F_{ab} -Teil antigenspezifisch an den Ort der inflammatorischen Reaktion gelenkt werden und dort aufgrund des sialylierten F_c -Teils zu einer Inhibition der inflammatorischen Signalwege führen. Neben den sehr viel geringeren Dosen als bei IVIG, die eingesetzt werden müssten, wäre das Ausbleiben systemischer Nebenwirkungen ein großer Vorteil einer solchen Therapie.

Auch beim Diabetes mellitus Typ 1 ist ein Einsatz von sialylierten antigenspezifischen Antikörpern gut denkbar. Diese könnten ihr entsprechendes Antigen binden und dann über ihren F_c -Teil antiinflammatorische Signalwege stimulieren und so die entzündliche Infiltration der Langerhans-Inseln des Pankreas verhindern, im besten Fall noch vor einer Zerstörung der β -Zellen und somit vor Manifestation des Diabetes.

Insulin und die Glutamatdecarboxylase (GAD) sind zwei der Schlüsselantigene im Rahmen der autoimmunen Reaktion, die zur Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 1 führt. Ziel dieser

KAPITEL 1. EINLEITUNG

Arbeit war die Klonierung und Produktion von zwei murinen IgG1-Antikörpern gegen Insulin bzw. die GAD. Beide Antikörper sollten mit unterschiedlicher Glykosylierung hergestellt werden, um sie anschließend im NOD-Mausmodell auf ihre Effektorfunktion untersuchen zu können. Analog den bisherigen Erkenntnissen über die Glykosylierung von IgG-Antikörpern sollte die Gabe der sialylierten Antikörper eine antiinflammatorische und immunsuppressive Reaktion zur Folge haben, die die Toleranz gegenüber den Autoantigenen aufrechterhält bzw. wiederherstellt und somit die Entwicklung eines Diabetes verzögert oder bestenfalls verhindert.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen, DE
Autoklav	Webeco Matachana Group, Selmsdorf, DE
CO ₂ -Inkubator	NuAire, Plymouth, MN, USA
CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Einkanal Pipetten Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Einkanal Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, DE
ELISA-Reader anthos Reader AR 2001	anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe, DE
Gelkammer Compact S / M	Analytik Jena AG, Jena, DE
Gelsystem PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Inkubator	mytron, Heilbad Heiligenstadt, DE
Inkubationsschüttler Ecotron	Infors AG, Bottmingen, CH
Mehrkanal Pipetten	VWR, Radnor, PA, USA
Mikrozentrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Mikrozentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Reinstwassersystem NANOpure	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sterile Werkbank	NuAire, Plymouth, MN, USA
Thermal Cycler C1000	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Tischzentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Tischzentrifuge MiniStar silverline	VWR, Radnor, PA, USA
UV-Dokumentationstisch ImageQuant 350	GE Healthcare, Chalfont Saint Giles, UK
UV-Leuchttisch N90 KW 254 nm	Konrad Benda Laborgeräte, Wiesloch, DE
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Waage	Sartorius AG, Göttingen, DE
Wasserbad	GFL mbH, Burgwedel, DE

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Dialysierschlauch Cellulose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Kryoröhrchen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Mikrotitrierplatten (hochbindend, 96 Well)	Corning Inc., Corning, NY, USA
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
Pipettenspitzen (1 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, mit und ohne Filter)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Polypropylen Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
Reagiergefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Serologische Pipetten (3 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE
Zellkulturflaschen	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT

2.1.3 Chemikalien

Acrylamid 10 %	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Ammoniumperoxodisulfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , APS)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ampicillin (100 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Bacto Agar	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Bacto Tryptone	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Bacto Yeast Extract	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Desoxynukleotide (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DMEM mit stabilem Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Dulbecco's PBS ohne Ca und Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Penicillin Streptomycin (PenStrep)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Polyethylenglykol 20000 (PEG)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Polyethylenimin (PEI)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Primatone	Sheffield Bio-Science, Beloit, WI, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) Base	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE

2.1.4 Puffer, Lösungen, Medien und Gele

ELISA-Puffer	1 g Gelatine 100 ml 10x PBS 10 ml 0,3 M EDTA-Lösung 30 g BSA ad 1000 ml mit Reinstwasser auffüllen
ELISA-Waschpuffer	500 ml 1x PBS 250 µl Tween 20
Glycin, 0,1 M, pH 2,8	3,75 g Glycin 400 ml Reinstwasser pH 2,8 einstellen ad 500 ml mit Reinstwasser auffüllen
LB-Agarplatten mit Ampicillin	12,5 g LB-Medium

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

	7,5 g Bacto Agar ad 500 ml mit Reinstwasser auffüllen autoklavieren Ampicillin hinzufügen (Endkonzentration 50 µg/ml)
LB-Medium mit Ampicillin	12,5 g LB-Medium ad 500 ml mit Reinstwasser auffüllen autoklavieren Ampicillin hinzufügen (Endkonzentration 50 µg/ml)
10x PBS (Phosphat Buffered Saline), pH 7,4	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 900 ml mit Reinstwasser auffüllen pH 7,4 einstellen ad 1000 ml mit Reinstwasser auffüllen
Produktionsmedium	500 ml DMEM 5 ml PenStrep 8 ml Primatone
SDS-Trenngel (10 %)	1,7 ml Acrylamid 30 % 1,3 ml 1,5 M TRIS 50 µl SDS 10 % 50 µl APS 10 % 2 µl TEMED 2 ml Reinstwasser
SDS-Sammelgel	0,67 ml Acrylamid 30 % 0,5 ml 1,5 M TRIS 40 µl SDS 10 % 40 µl APS 10 % 1 µl TEMED 2,7 ml Reinstwasser
S.O.C. (Super Optimal Catabolite) Medium	20 g Bacto Tryptone 3 g Bacto Yeast Extract 0,5 g NaCl 2,5 ml 1 M KCl 20 ml 1 M Glukose ad 900 ml mit Reinstwasser auffüllen pH 7 einstellen ad 990 ml mit Reinstwasser auffüllen

	kurz vor Gebrauch 10 ml 1 M MgCl ₂ hinzufügen
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	4,84 g TRIS Base 1,14 ml Essigsäure 2 ml 0,5 M EDTA-Lösung ad 1000 ml mit Reinstwasser auffüllen
Wachstumsmedium	500 ml DMEM 5 ml PenStrep 10 ml FCS 8 ml Primatone

2.1.5 Kits

Nucleo Bond [®] Xtra Maxi Plus	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE
Nucleo Spin [®] Gel & PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE
Nucleo Spin [®] Plasmid	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE
Nucleo Spin [®] RNA II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE
TOPO [®] TA Cloning Kit	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Z-Competent [™] E.coli Transformation Kit & Buffer Set	Zymo Research, Irvine, CA, USA

2.1.6 Primer

Primer (siehe Tabellen 2.1, 2.3, 2.5, 3.2)	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, DE
Random-Hexamer-Primer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.7 Enzyme

Pfunds (Pfu)-DNA-Polymerase	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, DE
Restriktionsenzym AgeI	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Restriktionsenzym BsiWI	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Restriktionsenzym SalI	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Superscript III Reverse Transkriptase	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Taq-DNA-Polymerase	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA

T4-DNA-Ligase	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
---------------	--

2.1.8 Zellen

HEK 293-Zellen	Institut für Systemische Entzündungsforschung, Universität zu Lübeck, Lübeck, DE
Hybridom HB-184	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
NovaBlue E.coli	Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venereologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck, DE
One Shot® TOP10 competent E.coli	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

2.2 Methoden

Es sollten zwei Antikörper hergestellt werden, ein muriner IgG1-Antikörper spezifisch für Insulin (anti-Insulin, IAA) sowie ein muriner IgG1-Antikörper spezifisch für das Enzym Glutamat-decarboxylase (anti-GAD, GADA).

Methodische Grundlage der Herstellung war die Klonierung der variablen V(D)J-Sequenzen der beiden Antikörper über die Restriktionsschnittstellen AgeI-SalI (HC) bzw. AgeI-BsiWI (LC) in Expressionsvektoren, die die konstanten Regionen der murinen leichten und schweren Ketten (mIg κ bzw. mIg γ 1) bereits enthielten. Nach mehrfacher Sequenzierung zur Überprüfung erfolgte die Transfektion der Expressionsvektoren in HEK 293-Zellen und die Produktion der Antikörper durch diese Zellen. Die Glykosylierung des F_c-Teils wurde dabei über die Cotransfektion der HEK 293-Zellen mit einem Plasmid, das für die Sialyl- und Galactosyltransferase codiert, gesteuert. In einem letzten Schritt wurden das Bindungsverhalten der produzierten Immunglobuline sowie ihr Glykosylierungsmuster untersucht.

Für die Klonierung des anti-Insulin Antikörpers wurden die murinen V(D)J-Sequenzen des Antikörpers benutzt, die in der Literatur beschrieben sind [80]. Den Sequenzen wurde eine Leadersequenz mit AgeI-Schnittstelle vorangestellt sowie eine SalI-Schnittstelle zu Beginn der konstanten mIg γ 1-Region bzw. eine BsiWI-Schnittstelle zu Beginn der konstanten mIg κ -Region angefügt. Die derartig konstruierten Sequenzen der variablen Regionen der schweren und leichten Kette des anti-Insulin Antikörpers wurden von der AgeI- bis zur SalI- bzw. BsiWI-Schnittstelle bei der Firma Mr. Gene GmbH, Regensburg, bestellt.

Zur Herstellung des anti-GAD Antikörpers wurde die kommerziell erhältliche Hybridomzelllinie HB-184 genutzt, welche monoklonale murine IgG1-Antikörper gegen die Glutamatdecarboxylase produziert [81]. Das Hybridom wurde von der Firma ATCC[®], Manassas, VA, USA, bezogen. Die V(D)J-Sequenzen des Antikörpers konnten mithilfe der in den folgenden Abschnitten beschriebenen Verfahren identifiziert werden.

2.2.1 Identifizierung der variablen anti-GAD Antikörpersequenzen

2.2.1.1 RNA-Isolierung aus der Hybridomzelllinie HB-184

Zur Isolierung der RNA wurden ca. 5 ml der Hybridomzellsuspension bei 4 °C und 300 g (~1200 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA aus dem Pellet mithilfe des Nucleo Spin[®] RNA II Kits isoliert. Diese wurde anschließend mit 40 µl RNA-freiem Wasser von der Säule eluiert und die Konzentration photometrisch bei 260 nm am NanoDrop gemessen.

Das benutzte Spectrophotometer misst die Absorption über einen Bereich von 200 bis 350 nm. Da Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen, kann mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes über die gemessene Absorption bei 260 nm die Konzentration ermittelt werden [82]. Zudem ist es möglich, mittels des Absorptionsverhaltens auch die Reinheit der Probe zu beurteilen. Proteine haben aufgrund der Absorption der aromatischen Aminosäuren ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm, sodass der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ($A_{260/280}$) zur Überprüfung der Kontamination mit Proteinen herangezogen werden kann. Bei reiner DNA liegt $A_{260/280}$ bei ca. 1,8 und bei reiner RNA bei ca. 2.

2.2.1.2 Reverse Transkription

Um die instabile mRNA in stabile cDNA umzuschreiben, wurden zu 11 µl der isolierten RNA 1 µl Random-Hexamer-Primer (50 µM) sowie 1 µl dNTPs (je 10 mM) hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei 65 °C und für 3 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 1 µl Superscript III Reverse Transkriptase, 4 µl 5x First Strand Buffer, 1 µl DTT (0,1 M) und 1 µl RNase-Inhibitor versetzt. Im Anschluss wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 25 °C, dann für 45 Minuten bei 50 °C und abschließend für 15 Minuten bei 70 °C inkubiert.

2.2.1.3 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifizierung der spezifischen DNA-Sequenzen wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Mithilfe dieser Methode ist es möglich, einen definierten DNA-Abschnitt in vitro zu vervielfältigen, indem eine Abfolge bestimmter Schritte zyklisch wiederholt wird [83]. Zu Beginn findet die Denaturierung statt, bei der sich die Doppelstränge der Template-DNA trennen. Dann folgt das Annealing, das Anlagern spezifischer Oligonukleotide, der Primer, an die einzelsträngige Template-DNA. Zuletzt wird die DNA enzymatisch verlängert, indem die Polymerase Nukleotide an das 3'-OH-Ende der Primer komplementär zur Matrize anheftet, bis wieder ein Doppelstrang vorliegt. Denaturierung, Annealing und Elongation werden zyklisch wiederholt, sodass die Menge an synthetisierter DNA exponentiell ansteigt.

Für einen PCR-Ansatz wurden folgende Mengen eingesetzt: 50 ng DNA, 1 µl Taq-Polymerase, 2 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer, 1 µl dNTPs (je 10 mM), 0,1 µl Vorwärts-Primer (100 µM) und 0,1 µl Rückwärts-Primer (100 µM) ad 20 µl H₂O.

Die zur PCR verwendeten Primer sind komplementär zu konstanten Regionen, die die V(D)J-Regionen einschließen. Der Vorwärts-Primer bindet an potentiellen Leadersequenzen, der Rückwärts-Primer an die konstante Region der jeweiligen Kette. Da die verschiedenen V-Familien unterschiedliche Leadersequenzen aufweisen, wurde für die Amplifikation der unbekannteren VJ-Sequenz der leichten Kette ein Primermix und für die Amplifikation der unbekannteren VDJ-Sequenz der schweren Kette ein Primer benutzt, der an sehr vielen verschiedenen Leadersequenzen binden kann (siehe Tabelle 2.1) [84].

Kette	Primer Art	Primer Name	Sequenz (5' → 3')
Schwere Kette	Vorwärts-Primer	5'MsVHE	GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGG AGTCTGG
	Rückwärts-Primer	3'Cγ1 outer	GGAAGGTGTGCACACCGCTGGAC
Leichte Kette	Vorwärts-Primer	5'L-Vκ3	TGCTGCTGCTCTGGGTTCCAG
		5'L-Vκ4	ATTWTCAGCTTCCTGCTAATC
		5'L-Vκ5	TTTTGCTTTTCTGGATTYCAC
		5'L-Vκ6	TCGTGTTKCTSTGGTTGTCTG
		5'L-Vκ6,8,9	ATGGAATCACAGRCYCWGGT
		5'L-Vκ14	TCTTGTTGCTCTGGTTYCCAG
		5'L-Vκ19	CAGTTCCTGGGGCTCTTGTTGTTT
		5'L-Vκ20	CTCACTAGCTCTTCTCCTC
		Rückwärts-Primer	3'mCκ

Tabelle 2.1: Sequenzen der Primer für die erste unspezifische PCR der V(D)J-Region. A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, R = Purin (A oder G), Y = Pyrimidin (C oder T) [84].

Die PCR wurde in einem Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) mit 38 Zyklen durchgeführt (siehe Tabelle 2.2). Dem zyklischen Verlauf ging eine fünfminütige Inkubation bei 94 °C voraus, damit die zum Teil auch stark gewundene DNA aufschmelzen konnte. Nach der entsprechenden Anzahl an Zyklen wurde für 10 Minuten bei 72 °C inkubiert, um zu kurze Stränge fertig zu synthetisieren und fehlende Taq-Polymerase-spezifische Adenin-Überhänge zu erzeugen.

Die Annealingtemperatur richtet sich hierbei nach den Schmelztemperaturen der Primer, die Elongationstemperatur nach dem Aktivitätsoptimum der Polymerase und die Elongationszeit nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz.

Schritt	Temperatur	Dauer
1 Initiale Denaturierung	94 °C	5 min
2 Denaturierung	94 °C	30 sec
3 Annealing	52 °C	30 sec
4 Elongation	68 °C	55 sec
5 Finale Elongation	72 °C	10 min

Tabelle 2.2: Protokoll für die DNA-Amplifikation mittels PCR mit der Taq-Polymerase.

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt in einem 1,5 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für das Gel wurden dementsprechend 1,5 g Agarose in 100 ml TRIS-Acetat-Puffer (TAE-Puffer) aufgeköcht. Die Proben wurden mit Glycerin-Ladepuffer (Endkonzentration 1x) versetzt, aufgetragen und für 1,5 Stunden bei 80 V aufgetrennt, wobei als Laufpuffer 1x TAE-Puffer verwendet wurde. Zur Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente wurde zusätzlich zu den Proben ein DNA-Standard (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgetragen. Nachfolgend wurde das Gel für 20 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (0,5 mg/l in TAE-Puffer) gefärbt, sodass die gewünschten Banden auf einem UV-Leuchttisch bei 254 nm detektiert werden konnten. Sie wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, mithilfe des Nucleo Spin® Gel & PCR Clean-up Kits nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel extrahiert und aufgereinigt. Die DNA wurde jeweils in 20 µl Elutionspuffer aufgenommen.

2.2.1.4 Ligation in den TA-Vektor

Die zur PCR verwendete Taq-Polymerase hängt an das 3'-OH-Ende des entstehenden DNA-Strangs templateunabhängig ein einzelnes Desoxyadenosintriphosphat, sodass ein Adenin-Überhang entsteht. Diesen Umstand macht man sich bei der TA-Ligation zu Nutze [85]. Der TA-Vektor liegt in linearer Form vor, wobei sich an den Enden jeweils ein einzelnes Thymin

sowie eine Topoisomerase befinden. Kommt es zwischen den komplementären Enden von TA-Vektor und DNA-Fragment zu einer Basenpaarung, katalysiert die Topoisomerase in einer ATP-unabhängigen Reaktion die Bindung zwischen Vektor und Insert.

Zur Ligation wurde das TOPO[®] TA Cloning Kit verwendet. Nach Herstellerangaben wurden jeweils 4 µl des PCR-Produkts mit 1 µl TOPO-TA-Vektor[®] und 1 µl Salz-Lösung (1,2 M NaCl, 0,6 M MgCl₂) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach bis zur Transformation auf Eis gelagert.

2.2.1.5 Transformation, Plasmidisolierung und Sequenzierung der V(D)J-Sequenzen

Durch Zugabe von 5 µl des TA-Ligationsansatzes zu den ebenfalls im oben beschriebenen Kit enthaltenen TOP10-Bakterien (*E.coli*) und anschließendem 30 Sekunden dauernden Hitzeschock bei 42 °C wurde der Vektor in die Bakterien transformiert. Es wurden 250 µl S.O.C. (Super Optimal Catabolite) Medium hinzugegeben und das Gemisch eine Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler (~150 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Bakterien auf Luria Bertani (LB)-Agarplatten mit Ampicillin (50 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Da die Platten zuvor mit 40 µl einer 40 mg/ml X-Gal Lösung beschichtet wurden, konnte die Blau-Weiß-Selektion zur Identifikation derjenigen Kolonien, die ein rekombinantes Plasmid trugen, verwendet werden [86].

Die Plasmidpräparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [87]. Durch den alkalischen pH-Wert lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären DNA-Strängen sowohl der chromosomalen als auch der Plasmid-DNA, wobei die Plasmid-DNA im Gegensatz zur chromosomalen DNA aufgrund ihrer Konformation in der Lage ist, vollständig zu renaturieren, sodass sie in den Folgeschritten isoliert werden kann.

Für die Plasmidpräparation im Minimaßstab (Nucleo Spin[®] Plasmid) wurden vier bis fünf weiße Kolonien in jeweils 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler (~150 rpm) kultiviert. Die Isolierung der Plasmide wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei die Plasmid-DNA im letzten Schritt in 50 µl Elutionspuffer (5 mM TRIS-HCl (pH 8,5)) aufgenommen wurde.

Die isolierten Plasmide wurden zur Sequenzierung an die Firma Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, geschickt. Die Sequenzierungsergebnisse der verschiedenen Klone wurden mittels eines Alignment-Tools (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) untereinander und mit existierenden murinen V-, D- und J-Sequenzen verglichen, um etwaige Polymerase- und Sequenzierungsfehler der einzelnen Klone auffindig zu machen und die korrekten V-, D- und J-Sequenzen zu identifizieren.

Primer Name	Sequenz (5' → 3')
M13 rev (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC

Tabelle 2.3: Sequenz des Sequenzierungsprimers des TA-Vektors.

2.2.2 Klonierung der V(D)J-Sequenzen des anti-GAD Antikörpers und des anti-Insulin Antikörpers

2.2.2.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion mit spezifischen Primern

Für eine zweite PCR mit dem Ziel der Anlagerung eines definierten Leaders wurden Primer konstruiert, die um eine nicht bindende Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende verlängert wurden. So konnte im Leaderbereich sowohl der schweren als auch der leichten Kette eine AgeI-Schnittstelle sowie zu Beginn der konstanten mIg γ 1-Region eine Sall- und zu Beginn der konstanten mIg κ -Region eine BsiWI-Schnittstelle eingefügt werden.

Statt der üblicherweise verwendeten Taq-Polymerase wurde eine Pfu-Polymerase verwendet. Diese verfügt gegenüber der Taq-Polymerase über eine zusätzliche 3'-5'-Exonukleaseaktivität und hat durch diese Proofreading-Funktion eine um den Faktor 10 höhere Genauigkeit als die Taq-Polymerase [88]. Sie ist eine rekombinante Form der ursprünglich aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* (Pfu) stammenden Polymerase.

Für einen PCR-Ansatz wurden folgende Mengen eingesetzt: 1 μ l DNA, 0,8 μ l Pfu-Polymerase, 5 μ l 10x Taq-Polymerase-Puffer, 1 μ l dNTPs (je 10 mM), 0,1 μ l Vorwärts-Primer (100 μ M) und 0,1 μ l Rückwärts-Primer (100 μ M) ad 50 μ l H₂O.

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer
1 Initiale Denaturierung	94 °C	5 min
2 Denaturierung	94 °C	30 sec
3 Annealing	54 °C	30 sec
4 Elongation	72 °C	55 sec
5 Finale Elongation	72 °C	10 min

Tabelle 2.4: Protokoll für die DNA-Amplifikation mittels PCR mit der Pfu-Polymerase.

2.2.2.2 Restriktionsverdau

In einem ersten Schritt wurden je 1 µg des PCR-Produkts mit dem Restriktionsenzym AgeI geschnitten. Dazu wurde die entsprechende Menge DNA mit 3 µl des zugehörigen 10x Puffers versetzt und mit Wasser auf 30 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 µl des Restriktionsenzym (5 U/µl) wurde das Gemisch für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit dem Nucleo Spin® Gel & PCR Clean-up Kit aufgereinigt, von Salzen und Enzymen befreit und in 30 µl Elutionspuffer aufgenommen.

Die DNA der beiden schweren Ketten wurde jeweils in einem zweiten Schritt mit dem Restriktionsenzym SalI geschnitten. Hierzu wurden dem gesamten Eluat 4 µl des zugehörigen Puffers, 5 µl Wasser sowie 1 µl des Restriktionsenzym (10 U/µl) hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Mit der DNA der beiden leichten Ketten wurde jeweils ähnlich verfahren, wobei hier das Restriktionsenzym BsiWI benutzt wurde. Wiederum wurde das gesamte Eluat mit 4 µl des zugehörigen Puffers, 5 µl Wasser sowie 1 µl des Restriktionsenzym (10 U/µl) versetzt und für eine Stunde bei 55 °C inkubiert.

Analog wurden vorhandene Expressionsvektoren, die bereits einen definierten Leader und die Sequenzen für die schwere mIgγ1- und die leichte mIgκ- Kette enthielten, mit den gleichen Enzymen geschnitten.

Im Anschluss wurden die verschiedenen Ansätze mit entsprechender Menge 6x Ladepuffers versetzt und in einem 1,5 %igen Agarosegel für 1,5 Stunden bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde für 20 Minuten im Ethidiumbromidbad gefärbt, sodass die Banden mit den gewünschten Fragmenten auf dem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht und ausgeschnitten werden konnten. Mithilfe des Nucleo Spin® Gel & PCR Clean-up Kits wurde die DNA aus dem Gel extrahiert, in 30 µl Elutionspuffer aufgenommen und die Konzentration am NanoDrop gemessen.

Bei allen drei verwendeten Enzymen handelte es sich um Restriktionsenzyme vom Typ II, die innerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden und sog. sticky ends produzieren.

2.2.2.3 Ligation in den Expressionsvektor

Anschließend wurden die V(D)J-Regionen beider Antikörper in Expressionsvektoren kloniert, die für die Expression in eukaryontischen Zellen geeignet waren und die murine IgG1 HC (mIgγ1) bzw. die murine kappa LC (mIgκ) bereits enthielten [84], [89]. Zudem verfügten sie über

eine Genkassette für die Ampicillin-Resistenz und den humanen Cytomegalievirus-Promoter für die Transkription der Antikörpersequenzen. Es folgte die Leadersequenz mit einer AgeI-Schnittstelle sowie die mit einer SalI- bzw. BsiWI-Schnittstelle beginnende konstante Region. Über AgeI-SalI (mIg γ 1) bzw. AgeI-BsiWI (mIg κ) konnten die V(D)J-Regionen eingefügt werden (siehe Abbildung 3.2).

Für einen Ligationsansatz wurden 100 ng des geschnittenen Expressionsvektors, die sechsfache molare Menge des V(D)J-Fragments, 1 μ l T4-DNA-Ligase und T4 DNA Ligasepuffer in einfacher Konzentration eingesetzt. Der Ansatz wurde mit Wasser auf ein Volumen von 15 μ l aufgefüllt und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.2.2.4 Herstellung kompetenter E.coli

Um kompetente Zellen zur folgenden Transformation zur Verfügung zu haben, wurden E.coli des E.coli-Stamms NovaBlue mithilfe des Z-Competent™ E.coli Transformation Kit & Buffer Sets nach Herstellerangaben präpariert und bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden freundlicherweise von der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des UKSH, Lübeck, zur Verfügung gestellt.

2.2.2.5 Transformation des Expressionsvektors und Plasmidpräparation

Die kompetenten E.coli wurden auf Eis aufgetaut, zu 100 μ l der Zellen wurden 5 μ l der ligierten Plasmid-DNA gegeben und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (50 μ g/ml) ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Es wurde jeweils eine Negativkontrolle durchgeführt, indem nur der geschnittene Expressionsvektor zu den kompetenten Zellen gegeben und ausgestrichen wurde. Da der intakte Expressionsvektor eine Ampicillin-Resistenzkassette enthielt, waren nur Bakterien, die diesen aufgenommen hatten, in der Lage, auf dem Nährboden Kolonien zu bilden. Es wurde somit auf Ampicillin-resistente Kolonien selektiert, die den Expressionsvektor enthielten.

Jeweils eine Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 μ g/ml) wiederum über Nacht bei 37 °C kultiviert. Aus der Übernachtskultur wurde mithilfe des Nucleo Spin® Plasmid Kits die Plasmid-DNA aufgereinigt und in 50 μ l Elutionspuffer aufgenommen.

Die Plasmidpräparation im Maximaßstab (Nucleo Bond® Xtra Maxi Plus) wurde analog mit 800 ml LB-Medium und 1 ml Elutionspuffer durchgeführt.

Die fertig konstruierten Expressionsvektoren mit eingefügten V(D)J-Regionen wurden zur Sequenzierung an die Firma Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, geschickt. Es wurde ein Primer (ExprVektor-fw) benutzt, der in der Leadersequenz stromaufwärts der V(D)J-Region bindet. Somit konnte die korrekte Insertion der V(D)J-Region überprüft werden. Der mIg γ 1-Expressionsvektor wurde zusätzlich mithilfe eines reversen Primers (ExprVektor-rev) sequenziert, der stromabwärts der konstanten Region bindet, um die korrekte Insertion der konstanten mIg γ 1-Region zu überprüfen.

Primer Name	Sequenz (5' → 3')
ExprVektor-fw	GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC
ExprVektor-rev	GCTTTATTTGTAACCATTATAAGC

Tabelle 2.5: Sequenzen der Sequenzierungsprimer des Expressionsvektors.

2.2.3 Produktion und Aufreinigung der beiden murinen IgG1-Antikörper mit unterschiedlicher Glykosylierung

2.2.3.1 Kultivierung von HEK 293-Zellen

Für die Expression der Antikörper wurde eine immortalisierte Zelllinie humaner embryonaler Nierenzellen (human embryonic kidney, HEK), die HEK 293-Zelllinie, verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen (\varnothing 15 cm) mit 25 ml Wachstumsmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert und alle drei bis vier Tage passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA für 4 Minuten trypsinisiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen, für 6 Minuten bei 4 °C und 1500 g zentrifugiert, das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert, auf neue Kulturschalen verteilt und mit frischem Medium kultiviert.

2.2.3.2 Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen

Die HEK 293-Zellen wurden mithilfe von Polyethylenimin (PEI) transient transfiziert. PEI ist ein durch seine Aminogruppen stark basisches und verzweigtes Molekül, das in wässriger Lösung als Polykation vorliegt und somit Komplexe mit negativ geladener DNA bilden kann [90]. Die komplexierte Plasmid-DNA kann von den Zielzellen aufgenommen werden.

Für die Transfektion einer Zellkulturschale wurden je 20 μ g des Expressionsvektors für die leichte und schwere Kette eingesetzt. Zur Produktion von galactosylierten und sialylierten

Antikörpern wurde ein weiteres Plasmid, das für die Sialyl- und Galactosyltransferase codiert (ST6GAL1-IRES-B4GALT1 Plasmid), verwendet. Hierbei wurden die Zellen mit je 15 µg des Expressionsvektors für die leichte bzw. schwere Kette und 10 µg des ST6GAL1-IRES-B4GALT1 Plasmids transfiziert.

Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und je Zellkulturschale mit 22 ml Produktionsmedium versetzt. Die entsprechende Menge Plasmid-DNA für eine Zellkulturschale wurde mit 100 µl PEI gevortext, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 5 % CO₂ eine Woche lang kultiviert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, bei 4 °C und 1500 g für 6 Minuten zentrifugiert und das Pellet verworfen.

2.2.3.3 Aufreinigung der Antikörper

Die Antikörper aus den Zellkulturüberständen wurden mittels einer Protein G Sepharose-Säule aufgereinigt. Nach der Beladung der Säule mit dem Überstand wurde diese zweimal mit PBS gewaschen und die Antikörper mit 30 ml 0,1 M Glycin (pH 2,7) eluiert. Zur Neutralisation wurde das Eluat in 3 ml 1 mM TRIS-HCl (pH 8,9) aufgefangen. Die Säule wurde anschließend mit Glycin und PBS gewaschen.

Das Eluat wurde in Dialyseschläuchen gegen PBS über Nacht bei 4 °C dialysiert. Zur Aufkonzentrierung wurden die Dialyseschläuche für ca. 1,5 Stunden mit Polyethylenglykol (PEG) bedeckt und so das Volumen auf ca. 5 ml eingengt. Im Anschluss wurden die Antikörper steril filtriert und die Konzentration photometrisch am NanoDrop gemessen.

2.2.4 Analyse der produzierten Antikörper

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit der aufgereinigten Antikörper wurden diese zunächst in einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Dazu wurden 8 µg der Antikörper mit entsprechender Menge 4x Laemmli-Puffer gemischt, für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend auf ein Polyacrylamidgel, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel, geladen. Zusätzlich wurden 10 µl Protein-Marker aufgetragen sowie 4x Laemmli-Puffer in die leeren Taschen gefüllt. Die Gelelektrophorese wurde mit 80 V gestartet und auf 160 V erhöht, sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hatte. Nach Beendigung des Laufs wurde das Sammelgel vom restlichen Gel abgetrennt und für 15 Minuten in Coomassie-Lösung gefärbt. Die Entfärbung des Gelhintergrundes erfolgte über Nacht im Coomassie-Entfärber.

2.2.4.2 ELISA

Um das Bindungsverhalten der Antikörper an Insulin bzw. die Glutamatdecarboxylase (GAD) zu untersuchen, wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt.

Für den GAD-ELISA wurde eine Mikrotiterplatte von EUROIMMUN, Lübeck, verwendet, die bereits mit humaner Glutamatdecarboxylase beschichtet war. Für den Insulin-ELISA wurde eine Mikrotiterplatte (96 Well, hochbindend) mit einem Fragment des humanen Insulins über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es wurden 100 µl je Well einer 50 µg/ml Lösung eingesetzt. Beide Platten wurden anschließend dreimal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen und die freien Bindungsstellen mit 150 µl ELISA-Puffer je Well unter Schwenken für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die Platten wurden wiederum dreimal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen und 100 µl der Antikörperproben (3 µg/ml) sowie davon jeweils sieben serielle 1:3- (anti-Insulin) bzw. fünf 1:5- (anti-GAD) Verdünnungen mit dem ELISA-Puffer auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Bindung der Antikörper erfolgte für 1,5 Stunden unter Schwenken bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,05 % Tween folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 100 µl eines Detektionsantikörpers, an den die Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt war (anti-mouse-IgG1-HRP, 1 mg/ml, 1:5000 verdünnt in ELISA-Puffer). Die Platten wurden anschließend fünfmal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen und 100 µl TMB-Substratlösung (enthält Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid) in jedes Well gegeben. HRP oxidiert das Substrat TMB, wobei Wasserstoffperoxid dabei als Co-substrat und Protonendonator dient. Da die oxidierte Form des TMB eine blaue Färbung hat, wurde die Reaktion nach erfolgtem Farbumschlag durch Zugabe von 100 µl 0,5 M H₂SO₄ gestoppt. Abschließend wurde die Farbintensität bei 450 nm am ELISA-Reader photometrisch gemessen.

2.2.4.3 MALDI-TOF Glykananalyse

Um das Glykosylierungsmuster des F_c-Teils zu untersuchen, wurde eine MALDI-TOF Analyse durchgeführt, eine Kombination aus den Verfahren Matrix-associated Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalyse (engl. time of flight, TOF), die der Massenanalyse chemischer Verbindungen dient [91]. Die zu untersuchende Substanz wird in eine Matrix eingebettet und durch Laserbeschuss ionisiert. Dabei verdampft die Matrix explosionsartig, die Analytmoleküle werden mitgerissen und eine Ionisierung derselben findet statt. Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und von einem Ionendetektor detektiert, der die ankommenden Ionen in ein elektrisches Signal umwandelt. Die Flugzeit ist dabei in folgendem Zusammenhang abhängig von der Masse m und der Ladungszahl z und folgt der Proportionalität

$$\text{TOF} \propto \sqrt{\frac{m}{z}}$$

In dem erhaltenen Massenspektrum wird die relative Intensität der detektierten Molekülionen gegen den m/z -Wert aufgetragen, über den sich auf die vorliegende Glykankette schließen lässt.

Für die Analyse wurden die Antikörper zunächst mit Endoglykosidase S (EndoS) aus *Streptococcus pyogenes* behandelt, um die zu untersuchenden Glykanketten von den Antikörpern abzuspalten. Das Enzym spaltet spezifisch zwischen dem ersten und zweiten N-Acetylglucosamin der N-Glykosylierung am Asparagin 297 [92]. Zuckerketten an anderen möglichen Glykosylierungsstellen werden nicht gespalten und somit auch nicht analysiert. Das Glykosylierungsmuster der geschnittenen Oligosaccharide wurde anschließend mittels der oben beschriebenen MALDI-TOF Analyse untersucht. Die Spektren wurden an einem Ultraflex III Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) im positiven Ionenmodus aufgenommen. Als Matrix diente Dihydroxybenzoesäure (DHB).

Die MALDI-TOF Analyse wurde freundlicherweise vom Labor für Glykodesign und Glykoanalytik, Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité - Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Herrn Dr. Markus Berger durchgeführt.

Kapitel 3

Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung zweier Antikörper, eines murinen IgG1-Antikörpers spezifisch für Insulin (anti-Insulin, IAA) sowie eines murinen IgG1-Antikörpers spezifisch für das Enzym Glutamatdecarboxylase (anti-GAD, GADA). Grundlage der Herstellung war die Klonierung, Expression und Aufreinigung der beiden Antikörper.

3.1 Identifizierung und Klonierung der V(D)J-Sequenzen der beiden murinen IgG1-Antikörper und Konstruktion der Expressionsvektoren

3.1.1 Klonierung des anti-GAD IgG1-Antikörpers

Ausgangspunkt der Herstellung des anti-GAD Antikörpers war das Hybridom HB-184, das monoklonale murine IgG1-Antikörper gegen die Glutamatdecarboxylase produziert und von der Firma ATCC[®], Manassas, VA, USA, bezogen wurde. Um die variablen und somit die für die Antigenpezifität entscheidenden Sequenzen im späteren Verlauf klonieren zu können, mussten diese zunächst identifiziert werden. Dazu wurden die V(D)J-Sequenzen nach Isolation der RNA aus dem Hybridom und reverser Transkription in cDNA mittels PCR amplifiziert. Da Primer benutzt wurden, die an konservierten konstanten Regionen binden - der Vorwärtsprimer an potentielle Leadersequenzen der V-Segmente der schweren und leichten Kette und der Rückwärtsprimer zu Beginn der konstanten mIg γ 1- bzw. mIg κ -Region (siehe Tabelle 2.1) [84] -, geschah diese Amplifikation auf unspezifische Weise.

Die Leadersequenz ist eine Steuerungssequenz, die nicht translatiert wird [93]. Sie enthält die ribosomale Bindungsstelle und ermöglicht somit die Bindung der transkribierten mRNA an das Ribosom.

Zur PCR wurde eine Taq-Polymerase verwendet, die am 3'-OH-Ende des synthetisierten DNA-Strangs einen Adenin-Überhang entstehen lässt, sodass im Anschluss eine TA-Ligation in den sogenannten TOPO-Vektor[®] erfolgen konnte. Nach erfolgreicher Ligation und Transformation wurden mehrere Klone sequenziert, um Polymerase- und Sequenzierungsfehler auszuschließen. Durch einen Vergleich der Sequenzierungsergebnisse über <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/> konnten die Sequenzen der VDJ- sowie der VJ-Region des anti-GAD Antikörpers gefunden werden.

Da der zur TA-Klonierung benutzte Vorwärtsprimer für die schwere Kette über 23 Nukleotide in die V-Region hineinragt, beeinflusst dieser das PCR-Produkt, sodass die Sequenzanfänge komplementär zu diesem Primer sind und nicht die eigentliche Sequenz darstellen. Durch einen Vergleich über <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/> konnte die ursprüngliche Anfangssequenz der V-Region identifiziert werden (siehe Tabelle 3.1), die daraufhin bei der Konstruktion der Primer für die Klonierung der Expressionsvektoren (siehe Tabelle 3.2) berücksichtigt wurde.

Antikörper	Sequenz der variablen V(D)J Region
GADA HC	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTG AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTACTCATTCACTGGCTACAACATGAACTGGG TGAAGCAGAGCAATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTGATCCTTACT ATGGTGGTACTAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAG ACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAAGAGCCTGACATCTGAGGACTC TGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGATTCACTACTACGGCCCGTACTTCGATGTC TGGGACGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
GADA LC	GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG CCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGACACAGTAATGGAAACACCTA TTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAA GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGA CAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATT TCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGA AATAAAA

Tabelle 3.1: Sequenz der variablen VDJ-Region der schweren Kette und der VJ-Region der leichten Kette des anti-GAD Antikörpers. Farblich markiert sind die beiden Nukleotide, die aufgrund des Ig-Blasts korrigiert wurden und somit nicht mehr mit den ursprünglichen Ergebnissen der Sequenzierung übereinstimmen.

Im Anschluss wurden in einer zweiten PCR die V(D)J-Sequenzen spezifisch amplifiziert und mit Restriktionsschnittstellen versehen. Hierzu wurden Primer konstruiert, die die variable Regi-

3.1. IDENTIFIZIERUNG UND KLONIERUNG DER V(D)J-SEQUENZEN

on spezifisch einschließen und um eine nicht bindende Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende des Primers verlängert wurden (siehe Tabelle 3.2). So konnte im Leader sowohl der schweren als auch der leichten Kette eine AgeI-Schnittstelle sowie zu Beginn der konstanten mIg γ 1-Region eine Sall- und zu Beginn der konstanten mIg κ -Region eine BsiWI-Schnittstelle eingefügt werden (siehe Abbildung 3.1). Die bereits vorliegenden Expressionsvektoren enthielten ebenfalls diese Restriktionsschnittstellen, sodass nach erfolgtem Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen die V(D)J-Sequenzen des Antikörpers über AgeI-Sall (mIg γ 1) bzw. AgeI-BsiWI (mIg κ) in die Vektoren eingefügt werden konnten, ohne dass dadurch der Leserahmen verschoben wurde. Hierzu wurde eine T4-DNA-Ligase verwendet, durch die die bei der Restriktion entstandenen 5'-Überhänge komplementär verbunden wurden (siehe Abbildung 3.2). Die Sequenzen der klonierten V(D)J-Regionen des anti-GAD IgG1-Antikörpers im jeweiligen Expressionsvektor sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 zu sehen.

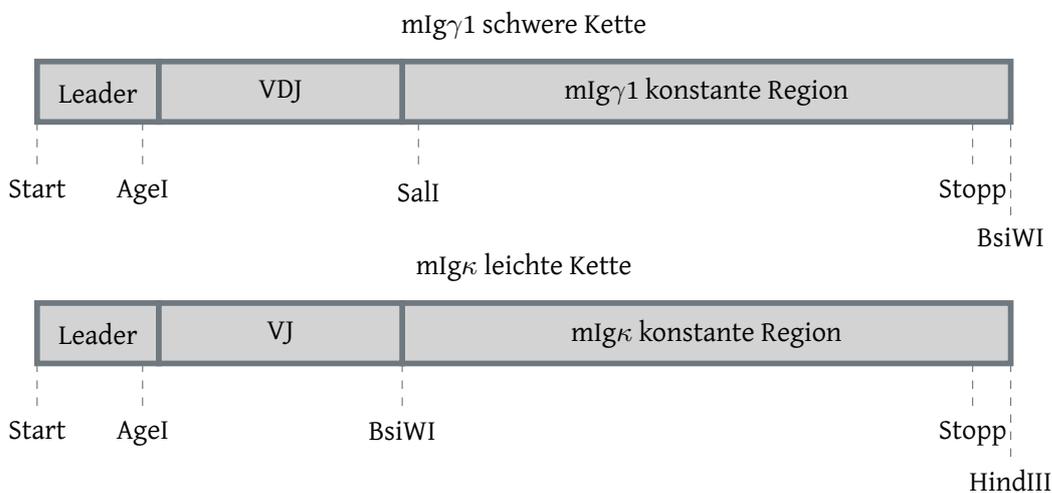


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Sequenzen für die leichte und schwere Kette bei der Antikörper. Markiert sind die Start- und Stoppcodons sowie die Schnittstellen der Restriktionsenzyme.

3.1.2 Klonierung des anti-Insulin IgG1-Antikörpers

Als Grundlage zur Klonierung des anti-Insulin Antikörpers dienten die in der Literatur beschriebenen Sequenzen der variablen V(D)J-Regionen, welche mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen im Leader und am Anfang der konstanten Region versehen bei der Firma Mr. Gene GmbH, Regensburg, bestellt wurden [80]. Die bestellten Sequenzen sind der Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Analog zur Klonierung des anti-GAD Antikörpers konnten die V(D)J-Sequenzen des anti-Insulin Antikörpers über AgeI-Sall (mIg γ 1) bzw. AgeI-BsiWI (mIg κ) in die Vektoren eingefügt werden.

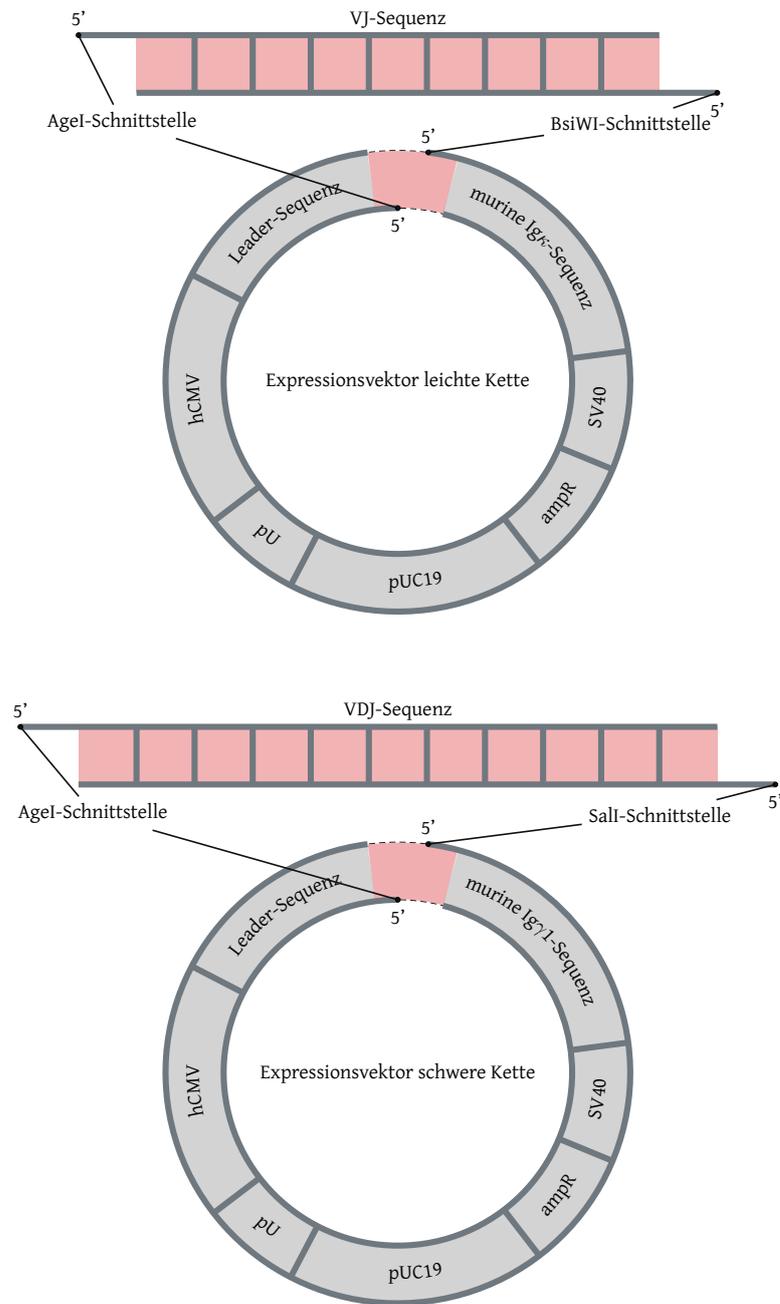


Abbildung 3.2: Schema für die Klonierung der leichten und schweren Kette beider Antikörper in die Expressionsvektoren nach dem Restriktionsverdau. Die Expressionsvektoren enthalten neben dem Leader die konstanten Regionen der leichten ($mIg\kappa$) bzw. schweren ($mIg\gamma1$) Kette sowie den hCMV (humanes Cytomegalievirus)-Promoter [84]. Zudem codieren die Vektoren für Antibiotikaresistenzen als Selektionsfaktor sowie weitere Bereiche, die für die Amplifikation und Expression in anderen Spezies relevant sind.

Antikörper	Primer Art	Sequenz (5' → 3')
GADA HC	Vorwärts-Primer	ATTATT <u>ACCGGT</u> GTACATTCCGAGGTCCAGCT GCAGCAGTCTGGACCTG
GADA HC	Rückwärts-Primer	AATAATGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCG TGGTCCC
GADA LC	Vorwärts-Primer	ATTATT <u>ACCGGT</u> GTACATTCAGATGTTGTGAT GACCCAAACTCCAC
GADA LC	Rückwärts-Primer	AATAATCGTACGTTTTATTTCAGCTTGGTCC CCCCTC

Tabelle 3.2: Primer zur spezifischen Amplifizierung der V(D)J-Sequenzen des anti-GAD Antikörpers und zum Hinzufügen von Restriktionsschnittstellen (AgeI in beiden Vorwärtsprimern, SalI bzw. BsiWI in den Rückwärtsprimern). Die Schnittstellen sind farblich markiert, das erste (im Vorwärtsprimer) und das letzte Codon (im Rückwärtsprimer) der variablen Region sind unterstrichen.

Die Sequenzen der klonierten V(D)J-Regionen des anti-Insulin IgG1-Antikörpers im jeweiligen Expressionsvektor sind in den Tabellen 3.6 und 3.7 zu sehen.

3.2 Plasmidpräparation

Die konstruierten Expressionsvektoren wurden in kompetente E.coli transformiert und aus Übernachtskulturen einzelner Kolonien wurden Plasmidpräparationen durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde sequenziert und mit den zu erwartenden Ergebnissen in einem Alignment (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) verglichen, wobei jeweils ein Plasmid, das zu 100 % übereinstimmte, quantitativ in E.coli vermehrt wurde. Aus je ca. 500 ml Übernachtskultur transformierter E.coli konnten 200 bis 500 µg Plasmide präpariert werden.

3.3 Produktion und Aufreinigung der Antikörper

Zur Produktion der Antikörper wurden HEK 293-Zellen mit den zusammengehörigen HC- und LC-Expressionsvektoren transient cotransfiziert. Beide Antikörper wurden in einer sialylierten (IAA + sial bzw. GADA + sial) und einer desialylierten Form (IAA – sial bzw. GADA – sial) hergestellt, wobei die zusätzliche Glykosylierung durch die Zugabe eines weiteren Plasmids, das für die humane Sialyl- und Galactosyltransferase codiert, gesteuert wurde. Dieses sogenannte ST6GAL1-IRES-B4GALT1 Plasmid wurde im Vorfeld vom Labor kloniert und zur Verfügung gestellt.

Antikörper	Sequenz (5' → 3')
GADA HC	<p> ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCA<u>ACCGGT</u>GTACATT CCGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGT GAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACAACATGAACTGG GTGAAGCAGAGCAATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAATATTGATCCTTAC TATGGTGGTACTAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTA GACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAAGAGCCTGACATCTGAGGACT CTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGATTCACTACTACGGCCCGTACTTCGATGT CTGGGACGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGC<u>GTCGAC</u>GACACCCCATCT GTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAACTAACTCCATGGTGACCCTGG GATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGG ATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTAC ACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCCAGACCGTCA CCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCC CAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTC TTCATCTTCCCCCAAAGCCAAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGG TCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTTCCAGTTCAGCT GGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGAAACCCCGGGAGGAGC AGATCAACAGCACTTTCCGTTCACTCAGTGAAGTCCCATCATGCACCAGGACTG GCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTAC ACCATTCCACCTCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCA TGATAACAAACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGC AGCCAGCGGAGAACTACAAGAACAATCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTT ACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATA CTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAG CCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGACG<u>CGTACG</u> </p>

Tabelle 3.3: Sequenz der klonierten VDJ- und konstanten murinen I γ 1-Region des anti-GAD Antikörpers im Expressionsvektor. Die Restriktionsschnittstellen sind farblich markiert, das erste und letzte Codon der variablen Region sowie das Stoppcodon am Ende der schweren Kette sind unterstrichen.

Antikörper	Sequenz (5' → 3')
GADA LC	<p>ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCA<u>ACCGGT</u>GTACATT CAGAT<u>GTT</u>GTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGTACACAGTAATGGAAACACC TATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACA AAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAG GGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTT ATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCT GGAAATA<u>AAA</u><u>CGTACG</u>GATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGT GAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACC CCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCG TCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCA GCACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTG AGGCCACTCACAAGACATCAACTTACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATG AGTGT<u>TGA</u><u>AAGCTT</u></p>

Tabelle 3.4: Sequenz der klonierten VJ- und konstanten murinen Ig κ -Region des anti-GAD Antikörpers im Expressionsvektor. Die Restriktionsschnittstellen sind farblich markiert, das erste und letzte Codon der variablen Region sowie das Stoppcodon am Ende der leichten Kette sind unterstrichen.

Säugetiere produzieren verschiedene Sialinsäuren; die beiden Hauptformen sind die N-Acetylneuraminsäure (Neu5NAc) und die N-Glycolylneuraminsäure (Neu5NGc), welche sich durch Acetylierung bzw. Glykolierung der Aminogruppe am fünften Kohlenstoffatom unterscheiden [94]. Der Mensch ist durch eine Gendeletion nur zur Synthese der acetylierten Form fähig. Da die HEK-Zelllinie humanen Ursprungs ist, synthetisiert sie in Anwesenheit des ST6GAL1-IRES-B4GALT1 Plasmids nur Proteine mit humaner N-Acetylneuraminsäure, die jedoch auch in Mäusen wirkt [15].

Die produzierten Antikörper wurden aus dem Mediumüberstand der Zellen (je ca. 500 ml) mithilfe einer Protein G Sepharose-Säule gebunden und aufgereinigt. Anschließend wurden sie steril filtriert und die Konzentration am NanoDrop photometrisch gemessen. Die Ergebnisse sind der Tabelle 3.8 zu entnehmen und entsprechen denen anderer im Labor durchgeführten Transfektionen.

3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Analyse der hergestellten Antikörper wurde eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese durchgeführt, welche eine Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse erlaubt [95].

Antikörper	Sequenz der variablen V(D)J Region
IAA HC	<u>ACCGGT</u> GTACATTCCGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGC CTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAAT ACACCATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAG GTATTAATCCTAACAATGGTGGTTCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGG CCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCT GACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATTTGGGGCCCGTTACGTC GGTAGTAGCTACGGAAGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTC ACCGTCTCCTCAGC <u>GTCGAC</u>
IAA LC	<u>ACCGGT</u> GTACATTCCGACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCCACCCTGTCTGTGA CTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAACA ACCTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTA TGCTTCCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGG ACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGGGATGTAT TTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCCTCACACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGG AAATAAAA <u>CGTACG</u>

Tabelle 3.5: Sequenz der variablen VDJ-Region der schweren Kette und der variablen VJ-Region der leichten Kette des anti-Insulin Antikörpers sowie der angrenzenden konstanten Regionen. Die Restriktionsschnittstellen sind farblich markiert, das erste und letzte Codon der variablen Region sind unterstrichen.

Antikörper	Sequenz (5' → 3')
IAA HC	<p> ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCA<u>ACCGGT</u>GTACATT CCGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGT GAAGATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATGCACTG GGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTAA CAATGGTGGTTCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGT AGACAAGTCTCCAGCACAGCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGAT TCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATTTGGGGCCCGTTACGTCGGTAGTAGCTACG GAAGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGC <u>GTCGAC</u>GACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCAAACT AACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGA CAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGT CCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACC TGGCCCAGCCAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGG TGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGATATGTACAG TCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCAC CATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGA TCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAG ACGAAACCCCGGGAGGAGCAGATCAACAGCACTTCCGTTTCAGTCAGTGAACCTC CCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACA GTGCAGCTTTCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACC GAAGGCTCCACAGGTGTACACATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGA TAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTG GAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATC ATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGC AACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCAC AACCACCATACTGAGAAGAGCCTTCCCACTCTCCTGGTAAATGACG<u>CGTACG</u> </p>

Tabelle 3.6: Sequenz der klonierten VDJ- und konstanten murinen Ig γ 1-Region des anti-Insulin Antikörpers im Expressionsvektor. Die Restriktionsschnittstellen sind farblich markiert, das erste und letzte Codon der variablen Region sowie das Stoppcodon am Ende der schweren Kette sind unterstrichen.

Antikörper	Sequenz (5' → 3')
IAA LC	<p>ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCA<u>ACCGGT</u>GTACAT TCC<u>GAC</u>ATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATA GCGTCAGTCTTTCTGCAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGT ATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCCAGT CCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCA CTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTGGGATGTATTTCTGTCAAC AGAGTAACAGCTGGCCTCACACGTTCTGGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA <u>CGTACG</u>GATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAA CATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACA TCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAAC AGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTC ACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACT CACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT<u>TGA</u> <u>AAGCTT</u></p>

Tabelle 3.7: Sequenz der klonierten VJ- und konstanten murinen Igκ-Region des anti-Insulin Antikörpers im Expressionsvektor. Die Restriktionsschnittstellen sind farblich markiert, das erste und letzte Codon der variablen Region sowie das Stoppcodon am Ende der leichten Kette sind unterstrichen.

Antikörper	Menge
IAA – sial	1,46 mg/ml
IAA + sial	1,22 mg/ml
GADA – sial	0,85 mg/ml
GADA + sial	0,66 mg/ml

Tabelle 3.8: Antikörpermenge je ca. 500 ml Mediumüberstand nach Einengung auf ca. 5 ml.

SDS als anionisches Tensid überdeckt die Eigenladung der Proteine, sodass diese eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen und damit im Gel nur nach ihrer Größe getrennt werden. Die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine wird durch Denaturierung mittels SDS und Erhitzen der Probe auf 95 °C aufgebrochen. Zudem schafft der verwendete Laemmli-Puffer ein reduzierendes Milieu, sodass die Disulfidbrücken reduziert werden.

Die beiden Ketten der produzierten Antikörper konnten so ihrer Molekülgröße nach elektrophoretisch aufgetrennt werden. Beide Antikörper zeigten sowohl in der sialylierten als auch in der nicht bzw. kaum sialylierten Form eine Bande bei ca. 25 kDa und 50 kDa. Die Bande bei 25 kDa entspricht der leichten, die bei 50 kDa der schweren Kette [1, Kapitel 4]. Die Ergebnisse waren zu erwarten und sprechen somit für einen korrekten Aufbau der beiden Antikörper.

3.5 ELISA

Das Bindungsverhalten der hergestellten Antikörper mit unterschiedlicher Glykosylierung wurde mit einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) untersucht. Dabei wurde zur Überprüfung des anti-Insulin Antikörpers als Antigen ein Fragment des humanen Insulins und zur Überprüfung des anti-GAD Antikörpers humane rekombinante Glutamatdecarboxylase (Isoenzym 65) verwendet. Die Detektion erfolgte über einen HRP-gekoppelten Zweitantikörper, der murine IgG1-Antikörper bindet. Die Intensität der nach Zugabe von TMB-Substratlösung durch Oxidation entstehenden blauen Färbung ist proportional zur Menge des am Antigen gebundenen Antikörpers, der vom HRP-gekoppelten Zweitantikörper detektiert wurde. Diese wurde abschließend am ELISA-Reader gemessen.

Es zeigte sich, dass beide Antikörper ihr entsprechendes Antigen binden, obwohl es sich bei den beiden Proteinen, die zum Coaten der ELISA-Platten verwendet wurden, um humane und nicht murine Proteinfragmente handelte. Der anti-Insulin Antikörper zeigte eine etwas höhere Bindungsaffinität als der anti-GAD Antikörper. So erreichte letzterer erst bei einer Konzentration von ca. 0,5 µg/ml eine OD bei 450 nm von 0,5. Die beiden anti-Insulin Antikörper erreichten diesen Wert schon bei einer Konzentration zwischen ca. 0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml. Bei der höchstgesetzten Konzentration von 3 µg/ml schienen beide anti-Insulin Antikörper bereits ansatzweise eine Plateauphase zu erreichen. Die beiden anti-GAD Antikörper hatten diese Phase, in der eine Sättigung der möglichen Antigen-Antikörper-Verbindungen stattfindet und somit anschließend keine weitere Steigerung der Antikörperbindungen mehr möglich ist, bei der höchstgesetzten Konzentration noch nicht erreicht. Die Sialylierung des anti-GAD Antikörpers hatte auf die Bindungsaffinität zum Antigen einen nur minimalen Einfluss im Sinne einer dezent verringerten Affinität. Beim anti-Insulin Antikörper schien die Sialylierung die Bindung zum Antigen leicht zu beeinträchtigen.

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

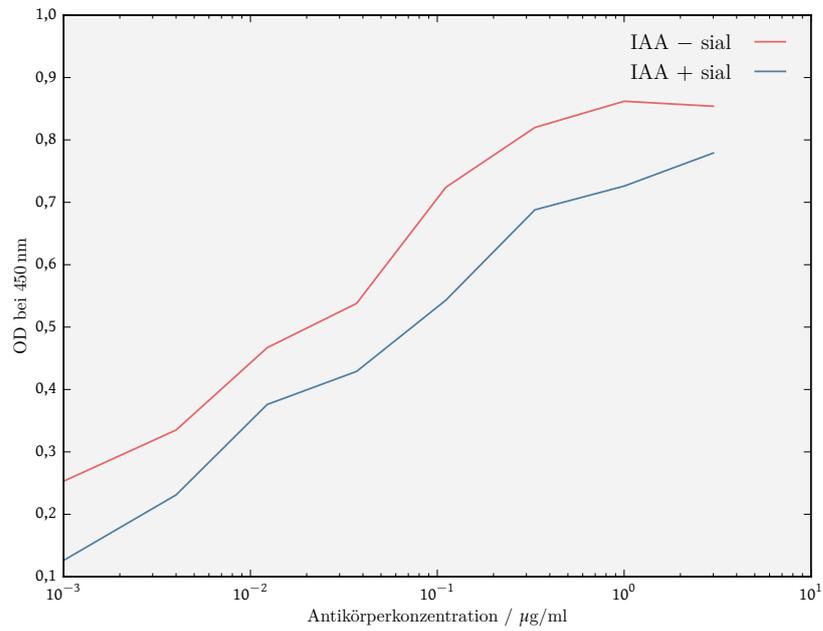


Abbildung 3.3: ELISA zum Nachweis der Bindung der anti-Insulin Antikörper an humanes Insulin.

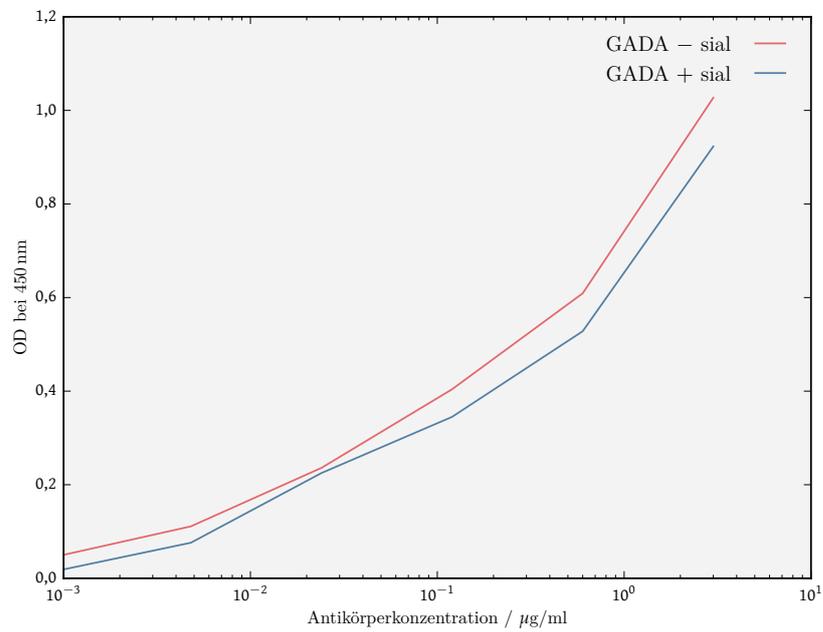


Abbildung 3.4: ELISA zum Nachweis der Bindung der anti-GAD Antikörper an die humane Glutamatdecarboxylase.

3.6 IgG-Glykananalyse

Um das Glykosylierungsmuster der hergestellten Antikörper zu untersuchen, wurden die F_c-Glykanketten enzymatisch durch EndoS von den Antikörpern abgespalten und mittels MALDI-TOF analysiert. Die Auswertung der aufgenommenen Massenspektren erfolgte, indem die ermittelten m/z-Werte über den Vergleich mit den Werten bekannter Glykane den verschiedenen F_c-Glykanketten zugeordnet wurden. Dabei verhielt sich die Intensität der einzelnen Peaks proportional zur Menge der vorliegenden Glykane.

Die F_c-Glykanketten beider Antikörper wurden nach dem Vorhandensein von terminalen Galactosen (G) und Sialinsäuren (S) in verschiedene Gruppen eingeteilt (G0, G1, G2, G1S1, G2S1 und G2S2), deren relative Verteilung in den Abbildungen 3.5 und 3.6 zu sehen ist.

Die anti-Insulin Antikörper, die in den HEK 293-Zellen ohne Hinzugabe des für die Sialyl- und Galactosyltransferase codierenden Plasmids produziert wurden, zeigten am Asparagin 297 in ca. 66 % Glykanstrukturen mit endständigen Mannosen oder N-Acetylglucosaminen ohne terminale Galactosen oder Sialinsäuren (G0). Ca. 32 % der Antikörper wiesen Glykanketten mit einer (G1) und ca. 2 % mit zwei endständigen Galactosen (G2) auf. Sialylierte Antikörper konnten nicht gefunden werden. Die Glykanketten der anti-Insulin Antikörper, die in Anwesenheit des ST6GAL1-IRES-B4GALT1 Plasmids produziert wurden, zeigten in ca. 13 % jeweils eine endständige Galactose und Sialinsäure (G1 S1), in ca. 23 % zwei endständige Galactosen und eine Sialinsäure (G2 S1) und in ca. 1 % jeweils zwei endständige Galactosen und Sialinsäuren (G2 S2). Somit wiesen insgesamt ca. 36 % der Glykane der produzierten glykosylierten anti-Insulin Antikörper eine oder zwei endständige Sialinsäuren auf. Das Ziel, gegen Insulin gerichtete Antikörper mit unterschiedlichen Glykosylierungsmustern zu produzieren, konnte durch die gewählten Methoden erreicht werden.

Die Analyse der Glykanketten der anti-GAD Antikörper in der nativen Variante zeigte zu ca. 75 % keine endständigen Galactosen oder Sialinsäuren (G0), zu ca. 22 % eine endständige Galactose (G1) und zu ca. 0,8 % zwei endständige Galactosen (G2). Ca. 1,5 % der Antikörper wiesen Glykanstrukturen mit einer endständigen Sialinsäure auf (G1 S1, G2 S1). Die Analyse der Glykanketten der produzierten anti-GAD Antikörper, die durch die Cotransfektion mit dem ST6GAL1-IRES-B4GALT1 Plasmid eine deutlich erhöhte Galactosylierung und Sialylierung hätten aufweisen sollen, zeigte entgegen den Erwartungen ein ähnliches Bild wie die Analyse der nativen Variante. So wiesen die Antikörper zu ca. 73 % keine endständigen Galactosen oder Sialinsäuren (G0), zu ca. 23,5 % eine endständige Galactose (G1) und zu ca. 1,2 % zwei endständige Galactosen (G2) auf. Bei ca. 2,1 % der Antikörper konnten Glykanstrukturen mit einer endständigen Sialinsäuren (G1 S1, G2 S1) detektiert werden. Die Cotransfektion mit dem zusätzlichen Plasmid war somit in diesem Fall nicht erfolgreich.

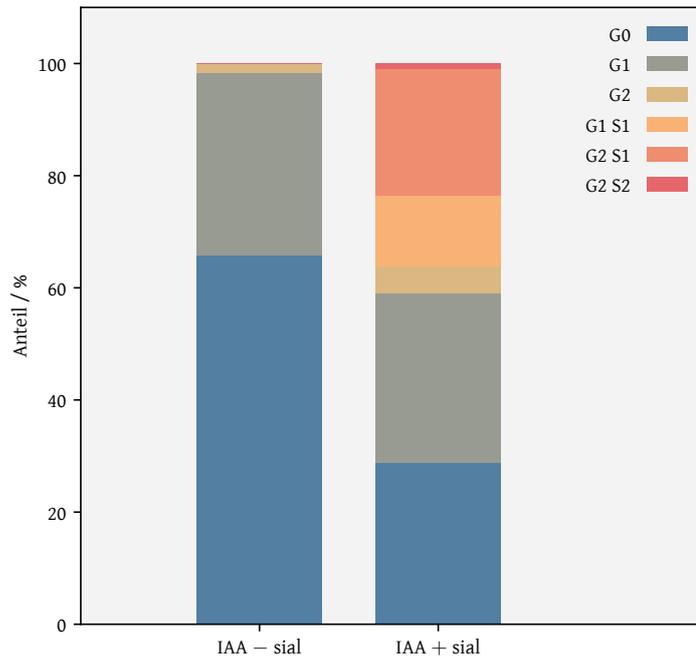


Abbildung 3.5: Relative Verteilung der unterschiedlichen Glykanstrukturen am F_c -Teil der nativen und zusätzlich glykosylierten anti-Insulin Antikörper.

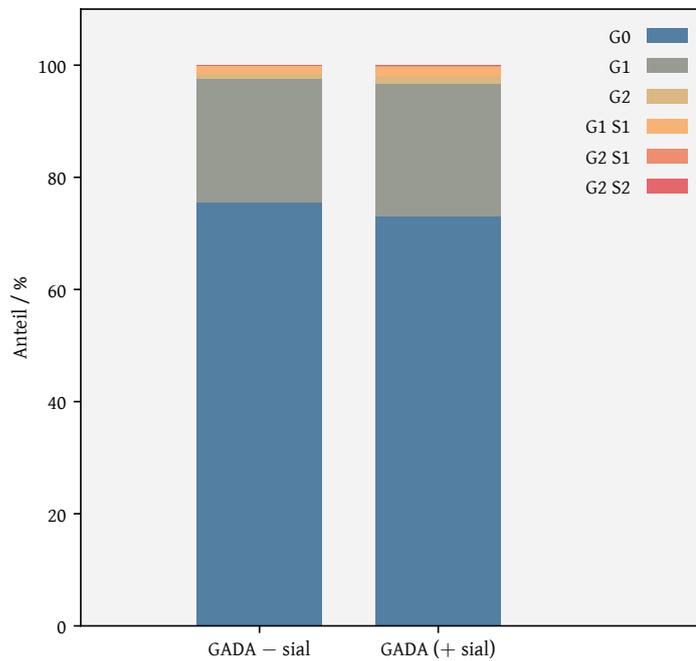


Abbildung 3.6: Relative Verteilung der unterschiedlichen Glykanstrukturen am F_c -Teil der nativen und vermeintlich zusätzlich glykosylierten anti-GAD Antikörper.

Kapitel 4

Diskussion

Die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Inflammation und Toleranz ist eine der wichtigsten Eigenschaften unseres Immunsystems. Sie bestimmt, wie ein Organismus äußeren und inneren Reizen begegnet, und ist unabdingbar für das Überleben. Im Laufe der Evolution hat sich ein hochreguliertes System entwickelt, an dem eine Vielzahl von löslichen und zellulären Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligt ist. Störungen in diesem hochempfindlichen Gleichgewicht haben meist schwerwiegende Folgen für den Organismus. Viele Erkrankungen beruhen auf einer Dysregulation der Inflammations- bzw. Toleranzmechanismen. Ein tieferes Verständnis der hochkomplexen Prozesse, die zu einem Verschieben der Immunantwort in Richtung Inflammation oder Toleranz führen, sind essentiell für die Entwicklung von Ansätzen zur Therapie solcher Erkrankungen. Insbesondere die Inzidenz von Autoimmunerkrankungen und Allergien hat in der westlichen Welt in den letzten Jahrzehnten dramatisch zugenommen [96]–[98]. Möglichkeiten zur Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Toleranz könnten die Behandlung derartiger Erkrankungen revolutionieren.

Neben der zentralen Toleranz, die ein Erkennen und Ausselektieren von selbstreaktiven T- und B-Lymphozyten durch Positiv- und Negativselektion in den zentralen lymphatischen Organen gewährleistet, ist die periphere Toleranz von großer Wichtigkeit. Die Modulation der Immunantwort in der Peripherie ist dabei abhängig von pro- und antiinflammatorischen Stimuli und Signalen [1, Kapitel 7], [99], [100]. So konnte gezeigt werden, dass ein Antigen zusammen mit einem inflammatorischen Costimulus eine starke inflammatorische Reaktion auszulösen vermag [101]–[103]. Selbiges Antigen allein führt dahingegen zu einem Verschieben der Immunantwort in Richtung einer antiinflammatorischen Reaktion und induziert somit Toleranz.

Eine wichtige Rolle im Rahmen dieser peripheren Toleranzentstehung nehmen Antikörper und insbesondere die Glykosylierung ihres F_c -Teils ein [76]. Es konnte gezeigt werden, dass unter

inflammatorischen Bedingungen degalactosylierte und desialylierte Antikörper entstehen. Im Gegensatz dazu werden in Abwesenheit inflammatorischer Costimuli Antikörper produziert, die einen höheren Grad an Galactosylierungen und Sialylierungen aufweisen und eine antiinflammatorische und nicht destruktive Immunantwort einleiten. Durch die Gabe dieser Antikörper kann eine antigenspezifische Toleranz induziert und eine inflammatorische Immunreaktion unterdrückt werden [76], [104].

Die Art und Weise, wie die Glykosylierung des F_c -Teils die Effektorfunktion eines Antikörpers moduliert und beeinflusst, ist noch nicht vollständig verstanden. Verschiedene Erklärungsmodelle sind denkbar und Gegenstand aktueller Forschungen.

Antikörper vermitteln einen großen Teil ihrer Effektorfunktionen über ihren F_c -Teil, der über $F_c\gamma$ -Rezeptoren mit Zellen des Immunsystems interagiert. Die verschiedenen IgG-Subklassen weisen ein unterschiedliches Bindungsverhalten gegenüber diesen Rezeptoren auf, was die heterogenen Wirkungen der IgG-Subklassen erklärt [105], [106]. Die meisten $F_c\gamma$ -Rezeptoren haben eine geringe Affinität zum F_c -Teil der Antikörper, sondern interagieren vornehmlich mit Immunkomplexen, was vor unspezifischen Reaktionen schützt. Neben einer Reihe aktivierender $F_c\gamma$ -Rezeptoren, deren Aktivierung zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und einer Zerstörung des Pathogens führt, gibt es nur einen $F_c\gamma$ -Rezeptor, der eine inhibitorische Signalkaskade auslöst, den $F_c\gamma$ -Rezeptor II B ($F_c\gamma$ RIIB) [107]. Die Aktivierung dieses Rezeptors löst eine Rückkopplungsreaktion aus, welche die Expression des $F_c\gamma$ RIIB erhöht. Der Schwellenwert, um die aktivierenden $F_c\gamma$ -Rezeptoren stimulieren zu können, wird so erhöht, was wiederum eine inflammatorische Immunreaktion erschwert und körpereigene Strukturen vor einer entzündlichen Reaktion schützt.

In verschiedenen Modellen konnte die Bedeutung des $F_c\gamma$ RIIB für die protektive Wirkung von IVIG nachgewiesen werden [108]–[110]. Es konnte gezeigt werden, dass der F_c -Teil sialylierter Antikörper den C-Typ Lektin-Rezeptor SIGN-R1 (specific ICAM-3 grabbing non-integrin-related 1) binden kann, welcher auf regulatorischen Makrophagen in der Marginalzone der Milz von Mäusen exprimiert wird [106], [111]. Die Bindung an den SIGN-R1 Rezeptor führt zur Stimulierung eines antiinflammatorischen Signalwegs, an dessen Ende der inhibitorische $F_c\gamma$ RIIB auf Effektormakrophagen hochreguliert wird. Das Immunsystem wird somit in Richtung einer antiinflammatorischen, nicht destruktiven Antwort verschoben bzw. ein solcher Zustand aufrechterhalten. Der homologe humane Rezeptor zu SIGN-R1 ist DC-SIGN (dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin) [106]. Dieser hat die gleiche Bindungsspezifität, wird jedoch auf dendritischen Zellen exprimiert. Dendritische Zellen sind antigenerkennende und -präsentierende Zellen, die in den Oberflächengewebe des menschlichen Körpers vorkommen und Schlüsselfunktionen in der spezifischen Immunantwort übernehmen [112]–[114].

Zudem gibt es Daten, die darauf hinweisen, dass sialylierte Antikörper auch über $F_c\gamma$ -unabhängige Wege ihre Wirkung entfalten können. So konnte gezeigt werden, dass sialylierte

Antikörper und insbesondere Immunkomplexe mit solchen Antikörpern und den entsprechenden Antigenen in $F_c\gamma$ RIIB-Knockout Mäusen inflammatorische Reaktionen und die Reifung von dendritischen Zellen unterdrücken können [76].

Die Erkenntnis über den bedeutenden Einfluss der Glykosylierung von Antikörpern im Rahmen der Toleranzentstehung ermöglicht die Entwicklung neuartiger Ansätze zur Therapie von Erkrankungen, bei denen eine Dysregulation der Toleranzmechanismen vorliegt. So könnte die Gabe von antigenspezifischen antiinflammatorischen Antikörpern bei Patienten, die unter Autoimmunerkrankungen oder Allergien leiden, ähnlich wie die Gabe von regulatorischen CD4-positiven T-Zellen eine Möglichkeit darstellen, in einem frühen Stadium die Toleranz wiederherzustellen und eine Manifestation der Erkrankung zu verhindern oder den Krankheitsverlauf abzumildern. Krankheiten, bei denen die Strukturen bekannt sind, gegen die sich Autoantikörper bzw. allergenspezifische Antikörper richten, sind für die Erforschung solcher neuen Therapiemöglichkeiten von besonderem Interesse.

Beim Diabetes mellitus Typ I sind die Schlüsselantigene des autoimmunen Prozesses, der zur Inflammation der Inselzellen des Pankreas, zur Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen und zur Manifestation der Erkrankung führt, seit langem bekannt. Die pathogenetische Bedeutung der einzelnen Antigene ist noch nicht vollständig geklärt, sie sind aber zweifelsfrei ein wichtiger Baustein in der letztendlichen Zerstörung der β -Zellen durch zytotoxische CD8-positive T-Zellen.

Ein großer Vorteil, den Diabetes mellitus Typ 1 als Krankheitsmodell zu wählen, ist zudem die Tatsache, dass die Autoantikörper bei einem großen Teil der Betroffenen schon lange vor der Manifestation der Erkrankung im Serum zu finden sind. Die Entwicklung eines Ansatzes zur Wiederherstellung der Toleranz könnte somit zu einer kurativen Therapie führen, die schon vor dem Ausbruch der Erkrankung in den Prozess der beginnenden Autoimmunität eingreift und die Manifestation eines Diabetes verhindert bzw. verzögert. Ziel wäre es, durch die Gabe von antigenspezifischen Antikörpern, die eine hohe Glykosylierung am Asn²⁹⁷ aufweisen, die Immunreaktion in Richtung Toleranz gegenüber den entsprechenden Antigenen zu verschieben.

In der experimentellen Diabetes Typ 1-Forschung ist die NOD-Maus eines der dominierenden Tiermodelle. Wie bereits in Abschnitt 1.2.2.1 beschrieben, ist die NOD-Maus ein Inzuchtstamm der Farbmaus mit einer hohen Inzidenz an spontan auftretendem Diabetes mellitus, der hinsichtlich seiner Pathogenese große Ähnlichkeiten zum autoimmunen Geschehen im Rahmen des Diabetes mellitus Typ 1 des Menschen aufweist [36], [115]. So treten auch bei der NOD-Maus die beim Menschen beschriebenen Inselzellautoantikörper auf und diese sind ebenfalls bereits vor Manifestation der Erkrankung im Serum zu finden.

Um die Hypothese, dass antigenspezifische Antikörper mit einer hohen Sialylierung Toleranz aufrechterhalten bzw. wiederherstellen und das klinische Bild eines Diabetes mellitus hinauszögern können, im NOD-Mausmodell untersuchen zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit Antikörper mit entsprechender Spezifität und unterschiedlicher Glykosylierung hergestellt werden. Als Antigene wurden Insulin und die Glutamatdecarboxylase ausgewählt, da sie Schlüsselantigene bei der Entstehung des autoimmunen Geschehens darstellen, das letztlich zur Manifestation des Diabetes mellitus Typ I führt, und die entsprechenden Antikörper sowohl bei der NOD-Maus als auch beim Menschen zu einem frühen Zeitpunkt in der präsymptomatischen Phase auftreten [36].

Ziel dieser Arbeit war die Klonierung der variablen V(D)J-Sequenzen eines murinen IgG1-Antikörpers gegen Insulin sowie eines murinen IgG1-Antikörpers gegen die Glutamatdecarboxylase sowie die nachfolgende Produktion dieser Antikörper mit jeweils unterschiedlichen Glykosylierungsmustern.

Die Klonierung und anschließende Produktion des anti-Insulin Antikörpers gelangen ohne erwähnenswerte Probleme. Der korrekte Aufbau des Antikörpers sowie die Bindungsaffinität zu Insulin konnten gezeigt werden. Durch die Hinzugabe des zusätzlichen ST6GAL1-IRES-B4GALT1 Plasmids im Rahmen der Transfektion gelang es, neben dem nativen anti-Insulin Antikörper eine glykosylierte Variante zu produzieren, dessen Glykane zu ca. 36 % eine oder zwei terminale Sialinsäuren aufwiesen. Dieser Antikörper zeigte im ELISA eine leicht verringerte Affinität zum Antigen. Da die Glykosylierung keinen Einfluss auf die Antigenbindung haben sollte, wurde dieser Effekt im Anschluss an die Arbeit in weiteren Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe überprüft und bestätigte sich nicht. Die hier dargestellten Daten gehen möglicherweise auf eine ungenaue Verdünnung bei der Durchführung des ELISA zurück.

Ausgangspunkt der Klonierung des anti-GAD Antikörpers war das Hybridom HB-184. Hybridome entstehen durch die Fusion von B-Zellen mit Myelomzellen, sodass immortalisierte Zellen entstehen, die monoklonale Antikörper produzieren [116]. Initial war eine Produktion von anti-GAD Antikörpern durch die Hybridomzellen angedacht. Um Antikörper mit unterschiedlicher Glykosylierung zu erhalten, wäre dann in einem zweiten Schritt eine *in vitro* Galactosylierung und Sialylierung durch entsprechende Enzyme erforderlich gewesen. Da die zur Verfügung stehenden Hybridomzellen allerdings nur sehr geringe Mengen Antikörper produzierten, wurde beschlossen, eine Klonierung der V(D)J-Sequenzen vorzunehmen, was zudem weitere Vorteile bietet. So wäre es zum Beispiel möglich, durch eine Klonierung der variablen Sequenzen den Einfluss der verschiedenen IgG-Subklassen zu untersuchen. Die V(D)J-Sequenzen könnten aus den Expressionsvektoren herausgeschnitten und in solche eingefügt werden, die über die konstanten Regionen der anderen Sub- oder Isotypen verfügen.

Die Identifizierung und Amplifikation der variablen Sequenz der leichten Kette des anti-GAD Antikörpers gestaltete sich anfangs schwierig, da die Hybridomzellen eine aberrante VJ-Sequenz in ihrem Genom aufweisen, die von der Myelomzelle stammt. Diese Sequenz ist in

Hybridomen zu finden, die ursprünglich auf den Tumor MPOC-21 zurückgehen [117]. Die bei der Amplifizierung benutzten Primer 5'L-Vκ und 3'mCκ schlossen die Sequenz ebenfalls ein, sodass ein aberrantes Transkript entstand, das nicht der gesuchten Sequenz entsprach [84]. Spezifische Primer, die nicht in der Leadersequenz bzw. der konstanten Region, sondern in der variablen Region der zu identifizierenden leichten Kette binden, hätten dieses Problem lösen können. In Unkenntnis der DNA-Sequenz wären derartige Primer allerdings nur mit großem Aufwand durch die Ermittlung der Proteinsequenz und der daraus abzuleitenden wahrscheinlichen Nukleotidsequenz zu konstruieren gewesen. Im Rahmen dieser Arbeit ist durch die Sequenzierung vieler Klone letztlich eine Amplifizierung und somit Identifikation der variablen VJ-Sequenz des anti-GAD Antikörpers durch die von Tiller et al. beschriebenen Primern gelungen, sodass ein gegen die Glutamatdecarboxylase gerichteter Antikörper kloniert und produziert werden konnte. Der korrekte Aufbau des Antikörpers sowie die Bindungsaffinität zur Glutamatdecarboxylase konnten gezeigt werden. Analog zum anti-Insulin Antikörper erfolgte zur Produktion einer zusätzlich sialylierten Variante die Cotransfektion mit dem ST6GAL1-IRES-B4GALT1 Plasmid, die in diesem Fall allerdings nicht erfolgreich war. So zeigte die Glykananalyse der beiden Varianten keinen wesentlichen Unterschied. Bei beiden Antikörpern konnten überwiegend keine endständigen Galactosen oder Sialinsäuren (G0) oder eine endständige Galactose (G1) nachgewiesen werden. Sialylierte Antikörper zeigten sich kaum. Die Cotransfektion der HEK 293-Zellen mit dem für die Sialyl- und Galactosyltransferase codierenden Plasmid zur Produktion der sialylierten Variante scheint, nicht funktioniert zu haben, wobei die Transfektion der beiden Expressionsplasmide erfolgreich war, da die gewünschten Antikörper produziert wurden und diese korrekt aufgebaut waren. So ist davon auszugehen, dass die Expression des ST6GAL1-IRES-B4GALT1 Plasmids nicht einwandfrei erfolgte. Das Plasmid wurde im Laufe der Arbeit vom Labor mehrfach nachproduziert, sodass es sein könnte, dass in diesem Fall ein nicht korrektes Plasmid verwendet wurde.

Im Anschluss an die erfolgreiche Klonierung und Produktion der beiden Antikörper wurde von der Arbeitsgruppe begonnen, diese im NOD-Mausmodell zu testen. Dazu wurden in einem ersten Experiment junge NOD-Mäuse vom zweiten bis zum fünften Lebensmonat alle zwei Wochen mit 100 µg der hergestellten anti-Insulin Antikörper behandelt. Eine Gruppe erhielt die sialylierten, eine Vergleichsgruppe die nicht sialylierten Antikörper intraperitoneal gespritzt. Eine Kontrollgruppe wurde nicht mit Antikörpern behandelt. Gemessen wurden in wöchentlichen Abständen das Überleben, das Gewicht sowie der Blutzuckerspiegel der Mäuse. Es zeigte sich bislang kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, die Antikörper erhielten, allerdings war das Überleben beider Gruppen signifikant länger als das der Kontrollgruppe, die gar keine Antikörper erhielten. Ähnliche Ergebnisse zeigte ein weiteres Experiment, in dem erneut junge NOD-Mäuse ab Lebenswoche fünf jede zweite Woche 100 µg der nativen anti-Insulin und 100 µg der nativen anti-GAD oder 100 µg der sialylierten anti-Insulin und 100 µg der vermeintlich sialylierten anti-GAD Antikörper oder als Kontrollgruppe keine Behandlung erhielten. Auch hier ist der Trend zu sehen, dass die mit Antikörpern behandel-

ten Mäuse hinsichtlich der Blutzuckerwerte, des Gewichts und der Mortalität deutlich besser abschnitten als die Mäuse der Kontrollgruppe, die keine Antikörper erhielten (siehe Abbildung 4.1, 4.2, 4.3). Wesentliche Unterschiede zwischen den Mäusen, die mit den nativen Antikörpern behandelt wurden, und denen, die die sialylierte Variante erhielten, zeigten sich nicht. Diese Ergebnisse unterstreichen die Erkenntnis, dass murine IgG1-Antikörper, das funktionale Äquivalent zu humanen IgG4-Antikörpern, generell einen protektiven, antiinflammatorischen Einfluss auf den Organismus haben [118], [119]. So führen sie beispielsweise nicht zur Aktivierung des Komplementsystems und konkurrieren mit aktivierenden IgG-Subklassen um die Antigenbindung.

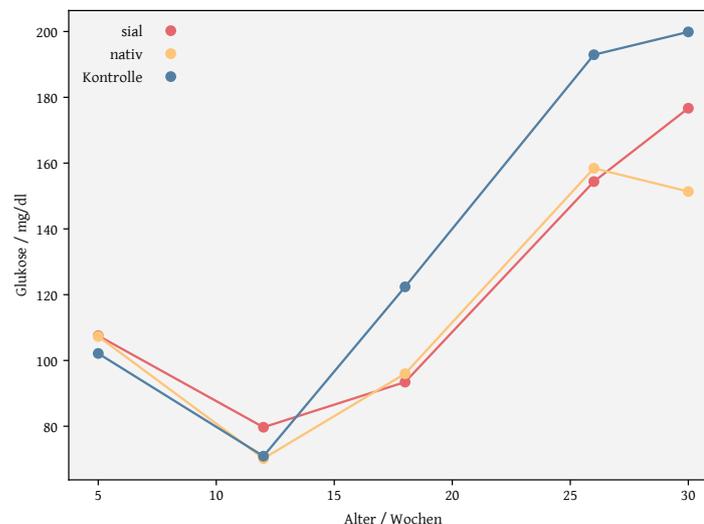


Abbildung 4.1: In dem Versuch erhielten junge NOD-Mäuse ab Lebenswoche fünf jede zweite Woche 100 µg der nativen anti-Insulin und 100 µg der nativen anti-GAD (= nativ) oder 100 µg der sialylierten anti-Insulin und 100 µg der vermeintlich sialylierten anti-GAD Antikörper (= sial) oder als Kontrollgruppe keine Behandlung (= Kontrolle). Gezeigt sind hier die Glukosewerte der Mäuse in mg/dl in den drei untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf.

Ein Grund, warum die Unterschiede in der Glykosylierung der beiden Antikörper bislang keinen deutlichen Unterschied in der Krankheitsaktivität des Diabetes mellitus im NOD-Mausmodell im Sinne einer Krankheitsverzögerung durch die sialylierten Antikörper zeigten, könnte eine nicht ausreichende Sialylierung sein. Diese lag bei den verwendeten anti-Insulin Antikörpern bei ca. 36 % (G1 S1, G2 S1, G2 S2). Wie oben beschrieben, wiesen die anti-GAD Antikörper kaum endständige Sialinsäuren auf. Da die MALDI-TOF Glykananalysen vom Labor für Glykodesign und Glykoanalytik der Charité in Berlin durchgeführt wurden und die Ergebnisse erst mit einer deutlichen zeitlichen Latenz vorlagen, wurde diese Tatsache erst nach Beginn des oben beschriebenen Experiments bekannt. Um die Hypothese des schützenden, antiinflammatorischen Effekts der sialylierten Antikörper auf das Krankheitsgeschehen in NOD-Mäusen weiter zu untersuchen und im besten Fall bestätigen zu können, erscheint es somit sehr sinnvoll, den

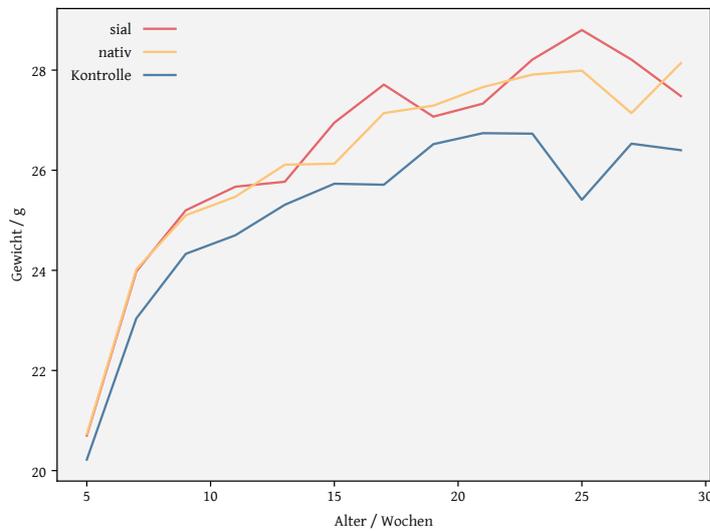


Abbildung 4.2: In dem Versuch erhielten junge NOD-Mäuse ab Lebenswoche fünf jede zweite Woche 100 μg der nativen anti-Insulin und 100 μg der nativen anti-GAD (= nativ) oder 100 μg der sialylierten anti-Insulin und 100 μg der vermeintlich sialylierten anti-GAD Antikörper (= sial) oder als Kontrollgruppe keine Behandlung (= Kontrolle). Gezeigt ist hier die Gewichtsentwicklung der Mäuse in den drei untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf.

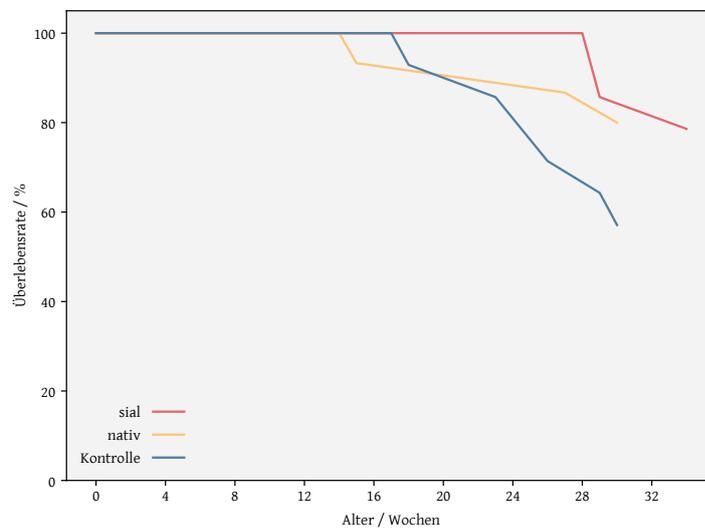


Abbildung 4.3: In dem Versuch erhielten junge NOD-Mäuse ab Lebenswoche fünf jede zweite Woche 100 μg der nativen anti-Insulin und 100 μg der nativen anti-GAD (= nativ) oder 100 μg der sialylierten anti-Insulin und 100 μg der vermeintlich sialylierten anti-GAD Antikörper (= sial) oder als Kontrollgruppe keine Behandlung (= Kontrolle). Gezeigt ist hier die Überlebensrate der Mäuse in den drei untersuchten Gruppen im zeitlichen Verlauf.

Versuch mit Antikörpern, die einen deutlich höheren Sialylierungsgrad aufweisen, zu wiederholen. Da sich dieses Ziel mit der Methodik der Cotransfektion nicht erreichen ließ, hat das Labor mittlerweile begonnen, die produzierten Antikörper im Anschluss an die Produktion *in vitro* enzymatisch zu galactosylieren und sialylieren, womit inzwischen ein Sialylierungsanteil zwischen 70 und 80 % erreicht werden konnte. Um den Unterschied zwischen den beiden Gruppen noch genauer erkennbar zu machen, wäre zudem eine Degalactosylierung der nativen Antikörper sinnvoll, da Studien zeigten, dass auch endständige Galactosen bereits antiinflammatorisches Potential besitzen [120].

Langfristiges Ziel des Forschungsbestrebens im Bereich der Antikörperglykosylierung ist ein Einsatz von sialylierten IVIG oder sialylierten antigenspezifischen IgG-Antikörpern zur Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Toleranz bei Autoimmunerkrankungen des Menschen. Entscheidend im Rahmen eines solchen präventiven bzw. kurativen Ansatzes ist die Selektion der zu behandelnden Personen sowie der Zeitpunkt einer möglichen Therapie. In Bezug auf die Erkrankung des Diabetes mellitus Typ 1 befassen sich aktuell mehrere Studien mit der Frage einer Früherkennung potentieller Typ 1-Diabetiker im Kindesalter. Die Fr1da-Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04039945) screent auf freiwilliger Basis alle Kinder im Bundesland Bayern einmalig im Alter zwischen zwei und fünf Jahren auf die vier spezifischen Inselautoantikörper (IAA, GADA, IA-2A, ZnT8A) und bietet bei positivem Ergebnis Schulungen, Pläne für die Nachbetreuung sowie die Möglichkeit, an der Fr1da-Insulin-Interventionsstudie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02620072) teilzunehmen. Diese untersucht randomisiert, doppelblind und Placebo-kontrolliert bei Kindern zwischen zwei und zwölf Jahren mit mindestens zwei positiven Inselautoantikörpern den Einfluss von oral verabreichtem Insulin auf die Krankheitsmanifestation und -progression des Typ 1-Diabetes. Die Freder1k-Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03316261) hingegen screent Neugeborene und Säuglinge bis zum Alter von vier Monaten in Süddeutschland, Polen, Belgien, Schweden und Großbritannien auf ihr genetisches Risikoprofil anhand der Untersuchung 47 verschiedener SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Bei vorliegender genetischer Prädisposition besteht analog zur Fr1da-Studie die Möglichkeit der Teilnahme an der POInt-Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03364868), die ebenfalls prüft, ob eine präventive Gabe von oralem Insulin eine regulative Immunantwort induzieren und die Entstehung eines Typ 1-Diabetes verhindern kann.

Nach erfolgreicher Verifizierung im Mausmodell erscheint es für die Rekrutierung im Rahmen einer Studie, deren Ziel die Untersuchung des Einflusses von glykosylierten antigenspezifischen humanen IgG4-Antikörpern auf die Immunantwort in der präsymptomatischen Phase des Typ 1-Diabetes wäre, in einem ersten Schritt sinnvoll, ähnlich wie bei der Fr1da-Studie Kinder zu identifizieren, bei denen noch kein klinisch manifester Typ 1-Diabetes besteht, aber bereits Autoantikörper gegen die Antigene im Serum zu finden sind, gegen die die zu verabreichenden Antikörper ebenfalls gerichtet sind. In diesen Fällen ist bereits eine Immunreaktion gegen das entsprechende Antigen erfolgt, aber noch keine deutliche Inflammation vorhanden.

Zu diesem Zeitpunkt sollte, so die Hypothese, die Immunreaktion durch die regelmäßige intravenöse Verabreichung der glykosylierten Antikörper in einem Stadium der Toleranz belassen bzw. in diese Richtung verschoben werden.

Interessant und potentiell relevant im Rahmen einer Risikostratifizierung wäre zudem eine Untersuchung der Patienten mit nachweisbaren Autoantikörpern bezüglich des Glykosylierungsmusters dieser Antikörper. Ähnlich dem Diabetes mellitus Typ 1 ist die rheumatoide Arthritis eine Autoimmunerkrankung, bei der die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems eine wichtige, noch nicht vollständig verstandene Rolle zu spielen scheint. Eine Reihe sogenannter citrullinierter Antigene und gegen diese gerichtete Autoantikörper wurden bislang identifiziert. Vergleicht man das IgG-Glykosylierungsmuster von Patienten mit rheumatoider Arthritis und juveniler idiopathischer Arthritis mit gesunden Kontrollgruppen ist ein signifikanter Unterschied zu erkennen [121]–[125]. Die erkrankten Patienten weisen eine deutlich verminderte endständige Galactosylierung und Sialylierung an den N-Glykanen am Asn²⁹⁷ auf. Diese aberrante Glykosylierung betrifft insbesondere die krankheitsspezifischen Autoantikörper, wobei diese Selektivität die Hypothese stützt, dass antigenassoziierte Mechanismen die posttranslationale Modifikation von Autoantikörpern beeinflussen [126]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass das aberrante Glykosylierungsmuster mit wenig endständigen Galactosen und Sialinsäuren bereits durchschnittlich 3,5 Jahre vor dem ersten Auftreten von Symptomen nachzuweisen ist [126]. Diese Erkenntnis legt nahe, dass die Dysregulation der IgG-Glykosylierung an der Immunpathogenese der rheumatoiden Arthritis beteiligt ist.

Analog zu diesen Ergebnissen wäre eine Untersuchung der Glykosylierungsmuster von Autoantikörpern, die im Rahmen des Diabetes mellitus Typ 1 eine Rolle spielen, von großem Interesse. Insbesondere der Zeitpunkt des Auftretens von aberranten Glykosylierungsmustern mit wenig endständigen Galactosen und Sialinsäuren in Korrelation mit dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome würde zum Verständnis der Bedeutung der IgG-Glykosylierung beitragen. Die Identifikation von Stimuli, die eine solche Änderung beeinflussen und bewirken, wäre von großem klinischen Interesse. Könnten Wege gefunden werden, die Glykosylierung der Antikörper zu beeinflussen bzw. eine Verminderung der endständigen Glykankette zu verhindern, wäre unter Umständen ein Hinauszögern der Krankheitsmanifestation möglich, da das Immunsystem in einem Stadium der Toleranz verbleiben würde.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Das Immunsystem als hochkomplexes Abwehrsystem ist evolutionsbiologisch eine der wichtigsten Errungenschaften höherer Lebewesen. Es ist kontinuierlich damit beschäftigt, zwischen pathogenen und harmlosen äußeren und inneren Reizen zu unterscheiden und idealerweise ein Gleichgewicht zwischen Inflammation und (Selbst-) Toleranz zu schaffen. Eine Dysregulation dieses Gleichgewichtszustands ist Grundlage für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und Allergien. Ein Beispiel ist der Diabetes mellitus Typ 1, bei dem durch eine Fehlregulation des Immunsystems die körpereigenen insulinproduzierenden Zellen des Pankreas angegriffen werden. In der Folge kommt es zu einer Inflammation und Zerstörung dieser Zellen und letztlich zum klinischen Bild des Diabetes. Die Erkrankung wird begleitet durch das Auftreten verschiedener spezifischer Autoantikörper, die unter anderem gegen Insulin und die Glutamatdecarboxylase (GAD) gerichtet sind.

In den letzten Jahren haben Studien gezeigt, dass die Glykosylierung des F_c-Teils von IgG-Antikörpern entscheidenden Einfluss auf die Effektorfunktion des Antikörpers haben kann. So sind galactosylierte und sialylierte Antikörper mit antiinflammatorischen Eigenschaften und somit mit einer regulatorischen, toleranzherstellenden Immunantwort assoziiert. Dahingegen vermögen Antikörper ohne endständige Galactosen oder Sialinsäuren das System in einen Zustand der Abwehr und Inflammation zu versetzen. Studien der Arbeitsgruppe konnten belegen, dass sialylierte IgG-Antikörper in der Lage sind, eine inflammatorische Immunantwort antigenspezifisch zu inhibieren und einen Zustand der (Selbst-) Toleranz wiederherzustellen.

Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass der Einsatz von glykosylierten antigenspezifischen Antikörpern auch im Rahmen der autoimmunen Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 von großer Relevanz sein könnte. Idealerweise würde die Toleranz gegenüber den körpereigenen Strukturen des Pankreas wiederhergestellt und die Krankheit verhindert oder verzögert werden können.

Ziel dieser Arbeit war die Klonierung und Produktion von zwei murinen IgG1-Antikörpern mit jeweils unterschiedlichen Glykosylierungsmustern, wobei der eine gegen Insulin und der andere gegen die Glutamatdecarboxylase gerichtet sein sollte. Beide Proteine stellen Schlüsselantigene im Rahmen der autoimmunen Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 dar. Methodische Grundlage zur Herstellung beider Antikörper war die Klonierung der variablen V(D)J-Sequenzen in Expressionsvektoren, die bereits über die Sequenzen für die konstanten Regionen der leichten und schweren Kette verfügten. Ausgangspunkt zur Identifikation der V(D)J-Sequenzen des anti-GAD Antikörpers war das Hybridom HB-184, zur Klonierung des anti-Insulin Antikörpers wurden die in der Literatur beschriebenen Sequenzen des Antikörpers verwendet. Nach erfolgreicher Klonierung beider Antikörper und Gewinnung von ausreichend Plasmidmaterial erfolgte die Transfektion von HEK 293-Zellen und die Produktion der murinen IgG1-Antikörper. Die Glykosylierung wurde dabei durch die Hinzugabe eines weiteren für die Sialyl- und Galactosyltransferase codierenden Plasmids gesteuert. Abschließend konnte der regelrechte Aufbau sowie die korrekte Bindungsaffinität beider Antikörper nachgewiesen werden.

Nächster Schritt ist eine Testung der beiden Antikörper im Diabetes mellitus Typ 1-Mausmodell mit der Fragestellung, ob die sialylierten Varianten in der Lage sind, antigenspezifische Toleranz und somit einen antiinflammatorischen Zustand aufrechtzuerhalten bzw. wiederherzustellen und damit die Krankheitsmanifestation zu verhindern bzw. zu verzögern. Sollten sich positive Effekte zeigen, wäre die Hoffnung, einen neuen kurativen Ansatz in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 entwickeln zu können, was für die Betroffenen und auch gesundheitsökonomisch von enormer Relevanz wäre.

Literaturverzeichnis

- [1] K. Murphy und C. Weaver, *Janeway's immunobiology*. Garland Science, 2016.
- [2] P. Nesargikar, B. Spiller und R. Chavez, „The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors“, *European Journal of Microbiology and Immunology*, Jg. 2, Nr. 2, S. 103–111, 2012.
- [3] R. S. Mahla, C. M. Reddy, D. Prasad und H. Kumar, „Sweeten PAMPs: role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology“, *Frontiers in Immunology*, Jg. 4, S. 248, 2013.
- [4] H. Kumar, T. Kawai und S. Akira, „Pathogen recognition by the innate immune system“, *International Reviews of Immunology*, Jg. 30, Nr. 1, S. 16–34, 2011.
- [5] K. Takeda, T. Kaisho und S. Akira, „Toll-like receptors“, *Annual Review of Immunology*, Jg. 21, Nr. 1, S. 335–376, 2003.
- [6] S. F. M. Burnet, *The clonal selection theory of acquired immunity*. Vanderbilt University Press Nashville, 1959, Bd. 3.
- [7] K. Rajewsky, „Clonal selection and learning in the antibody system“, *Nature*, Jg. 381, Nr. 6585, S. 751–758, 1996.
- [8] E. A. Padlan, „Anatomy of the antibody molecule“, *Molecular Immunology*, Jg. 31, Nr. 3, S. 169–217, 1994.
- [9] S. H. E. Kaufmann, „Antikörper und ihre Antigene“, in *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Berlin Heidelberg, 2020, S. 69–84.
- [10] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai und D. L. Baker, „Lymphocyte development and the rearrangement and expression of antigen receptor genes“, in *Cellular and Molecular Immunology*, Bd. 6, Elsevier, 2010, S. 153–187.
- [11] Z. Li, C. J. Woo, M. D. Iglesias-Ussel, D. Ronai und M. D. Scharff, „The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination“, *Genes & Development*, Jg. 18, Nr. 1, S. 1–11, 2004.
- [12] M. E. Taylor und K. Drickamer, *Introduction to Glycobiology*. Oxford University Press, 2011.

LITERATURVERZEICHNIS

- [13] R. M. Anthony, F. Nimmerjahn, D. J. Ashline, V. N. Reinhold, J. C. Paulson und J. V. Ravetch, „Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc“, *Science*, Jg. 320, Nr. 5874, S. 373–376, 2008.
- [14] F. Nimmerjahn und J. V. Ravetch, „Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin“, *Annual Review of Immunology*, Jg. 26, S. 513–533, 2008.
- [15] Y. Kaneko, F. Nimmerjahn und J. V. Ravetch, „Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation“, *Science*, Jg. 313, Nr. 5787, S. 670–673, 2006.
- [16] D. A. Smith und D. R. Germolec, „Introduction to immunology and autoimmunity“, *Environmental Health Perspectives*, Jg. 107, Nr. suppl 5, S. 661–665, 1999.
- [17] *ICD-10-GM Version 2020, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision*. Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG), 2019.
- [18] F. H. Epstein, M. A. Atkinson und N. K. Maclaren, „The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus“, *New England Journal of Medicine*, Jg. 331, Nr. 21, S. 1428–1436, 1994.
- [19] P. Sonksen und J. Sonksen, „Insulin: understanding its action in health and disease“, *British Journal of Anaesthesia*, Jg. 85, Nr. 1, S. 69–79, 2000.
- [20] A. Stahl-Pehe und J. Rosenbauer, „Inzidenz und Prävalenz des Typ-1-Diabetes in Deutschland“, *Der Diabetologe*, Jg. 15, Nr. 3, S. 206–216, 2019.
- [21] D. Mamoulakis, E. Galanakis, S. Bicouvarakis, E. Paraskakis und S. Sbyrakis, „Epidemiology of childhood type I diabetes in Crete, 1990–2001“, *Acta Paediatrica*, Jg. 92, Nr. 6, S. 737–739, 2003.
- [22] M. Karvonen, J. Pitkaniemi und J. Tuomilehto, „The onset age of type 1 diabetes in Finnish children has become younger. The Finnish Childhood Diabetes Registry Group.“, *Diabetes Care*, Jg. 22, Nr. 7, S. 1066–1070, 1999.
- [23] C. C. Patterson, G. G. Dahlquist, E. Gyürüs, A. Green, G. Soltész und E. S. Group, „Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study“, *The Lancet*, Jg. 373, Nr. 9680, S. 2027–2033, 2009.
- [24] J. Tuomilehto, „The emerging global epidemic of type 1 diabetes“, *Current Diabetes Reports*, Jg. 13, Nr. 6, S. 795–804, 2013.
- [25] J. Rosenbauer und A. Stahl, „Häufigkeit des Diabetes mellitus im Kindes- und Jugendalter in Deutschland“, *Der Diabetologe*, Jg. 6, Nr. 3, S. 177–189, 2010.

- [26] E. I. Felner, W. Klitz, M. Ham, A. M. Lazaro, P. Stastny, B. Dupont und P. C. White, „Genetic interaction among three genomic regions creates distinct contributions to early- and late-onset type 1 diabetes mellitus“, *Pediatric Diabetes*, Jg. 6, Nr. 4, S. 213–220, 2005.
- [27] M. A. Atkinson und G. S. Eisenbarth, „Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment“, *The Lancet*, Jg. 358, Nr. 9277, S. 221–229, 2001.
- [28] M. A. Atkinson und N. K. Maclaren, „The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus“, *New England Journal of Medicine*, Jg. 331, Nr. 21, S. 1428–1436, 1994.
- [29] F. Pociot und Å. Lernmark, „Genetic risk factors for type 1 diabetes“, *The Lancet*, Jg. 387, Nr. 10035, S. 2331–2339, 2016.
- [30] J. A. Todd, J. I. Bell und H. O. McDevitt, „HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus“, *Nature*, Jg. 329, Nr. 6140, S. 599–604, 1987.
- [31] F. Cucca, R. Lampis, M. Congia, E. Angius, S. Nutland, S. C. Bain, A. H. Barnett und J. A. Todd, „A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins“, *Human Molecular Genetics*, Jg. 10, Nr. 19, S. 2025–2037, 2001.
- [32] G. G. Dahlquist, C. Patterson und G. Soltesz, „Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. The EURODIAB Substudy 2 Study Group“, *Diabetes Care*, Jg. 22, Nr. 10, S. 1698–1702, 1999.
- [33] T. Szopa, P. Titchener, N. Portwood und K. Taylor, „Diabetes mellitus due to viruses—some recent developments“, *Diabetologia*, Jg. 36, Nr. 8, S. 687–695, 1993.
- [34] L. C. Stene und G. Joner, „Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study“, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Jg. 78, Nr. 6, S. 1128–1134, 2003.
- [35] S. Virtanen, T. Saukkonen, E. Savilahti, K. Ylönen, L. Räsänen, A. Aro, M. Knip, J. Tuomilehto, H. Åkerblom und R. Lounamaa, „Diet, cow’s milk protein antibodies and the risk of IDDM in Finnish children“, *Diabetologia*, Jg. 37, Nr. 4, S. 381–387, 1994.
- [36] M. S. Anderson und J. A. Bluestone, „The NOD mouse: a model of immune dysregulation“, *Annual Review of Immunology*, Jg. 23, S. 447–485, 2005.
- [37] E. H. Leiter, M. Prochazka und D. L. Coleman, „The non-obese diabetic (NOD) mouse“, *The American Journal of Pathology*, Jg. 128, Nr. 2, S. 380, 1987.
- [38] T. P. DiLorenzo, R. T. Graser, T. Ono, G. J. Christianson, H. D. Chapman, D. C. Roopenian, S. G. Nathenson und D. V. Serreze, „Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for all but the end stages of diabetes development in nonobese diabetic mice and use a prevalent T cell receptor α chain gene rearrangement“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 95, Nr. 21, S. 12 538–12 543, 1998.

- [39] E. E. Hamilton-Williams, S. E. Palmer, B. Charlton und R. M. Slattery, „Beta cell MHC class I is a late requirement for diabetes“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 100, Nr. 11, S. 6688–6693, 2003.
- [40] F. S. Wong, J. Karttunen, C. Dumont, L. Wen, I. Visintin, I. M. Pilip, N. Shastri, E. G. Pamer und C. A. Janeway Jr, „Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library“, *Nature Medicine*, Jg. 5, Nr. 9, S. 1026–1031, 1999.
- [41] M. Nakayama, N. Abiru, H. Moriyama, N. Babaya, E. Liu, D. Miao, L. Yu, D. R. Wegmann, J. C. Hutton, J. F. Elliott und G. S. Eisenbarth, „Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice“, *Nature*, Jg. 435, Nr. 7039, S. 220–223, 2005.
- [42] B. O. Roep, N. Solvason, P. A. Gottlieb, J. R. F. Abreu, L. C. Harrison, G. S. Eisenbarth, L. Yu, M. Leviten, W. A. Hagopian, J. B. Buse, M. von Herrath, J. Quan, R. S. King, W. H. Robinson, P. J. Utz, H. Garren und L. Steinman, „Plasmid-encoded proinsulin preserves C-peptide while specifically reducing proinsulin-specific CD8⁺ T cells in type 1 diabetes“, *Science Translational Medicine*, Jg. 5, Nr. 191, 191ra82, 2013.
- [43] Y. Wang, L. Hao, R. G. Gill und K. J. Lafferty, „Autoimmune diabetes in NOD mouse is L3T4 T-lymphocyte dependent“, *Diabetes*, Jg. 36, Nr. 4, S. 535–538, 1987.
- [44] J. A. Shizuru, C. Taylor-Edwards, B. A. Banks, A. K. Gregory und C. G. Fathman, „Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes“, *Science*, Jg. 240, Nr. 4852, S. 659–662, 1988.
- [45] P. Hutchings, L. O. Reilly, N. M. Parish, H. Waldmann und A. Cooke, „The use of a non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody to re-establish tolerance to β cells in NOD mice“, *European Journal of Immunology*, Jg. 22, Nr. 7, S. 1913–1918, 1992.
- [46] J. D. Katz, C. Benoist und D. Mathis, „T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes“, *Science*, Jg. 268, Nr. 5214, S. 1185–1188, 1995.
- [47] M. Yang, B. Charlton und A. M. Gautam, „Development of insulinitis and diabetes in B cell-deficient NOD mice“, *Journal of Autoimmunity*, Jg. 10, Nr. 3, S. 257–260, 1997.
- [48] S. A. W. Greeley, M. Katsumata, L. Yu, G. S. Eisenbarth, D. J. Moore, H. Goodarzi, C. F. Barker, A. Naji und H. Noorchashm, „Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice“, *Nature Medicine*, Jg. 8, Nr. 4, S. 399–402, 2002.
- [49] F. S. Wong und L. Wen, „B cells in autoimmune diabetes“, *The Review of Diabetic Studies*, Jg. 2, Nr. 3, S. 121, 2005.
- [50] S. Constant, N. Schweitzer, J. West, P. Ranney und K. Bottomly, „B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4⁺ T cells to protein antigens in vivo“, *The Journal of Immunology*, Jg. 155, Nr. 8, S. 3734–3741, 1995.

- [51] M. Falcone, J. Lee, G. Patstone, B. Yeung und N. Sarvetnick, „B lymphocytes are crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in nonobese diabetic mice“, *The Journal of Immunology*, Jg. 161, Nr. 3, S. 1163–1168, 1998.
- [52] D. V. Serreze, S. A. Fleming, H. D. Chapman, S. D. Richard, E. H. Leiter und R. M. Tisch, „B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice“, *The Journal of Immunology*, Jg. 161, Nr. 8, S. 3912–3918, 1998.
- [53] H. Reijonen, T. L. Daniels, A. Lernmark und G. T. Nepom, „GAD65-specific autoantibodies enhance the presentation of an immunodominant T-cell epitope from GAD65“, *Diabetes*, Jg. 49, Nr. 10, S. 1621–1626, 2000.
- [54] A. G. Ziegler, M. Rewers, O. Simell, T. Simell, J. Lempainen, A. Steck, C. Winkler, J. Ilonen, R. Veijola, M. Knip, E. Bonifacio und G. S. Eisenbarth, „Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children“, *The Journal of the American Medical Association*, Jg. 309, Nr. 23, S. 2473–2479, 2013.
- [55] P. Bingley und E. Gale, „Progression to type 1 diabetes in islet cell antibody-positive relatives in the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial: the role of additional immune, genetic and metabolic markers of risk“, *Diabetologia*, Jg. 49, Nr. 5, S. 881–890, 2006.
- [56] P. Achenbach, K. Warncke, J. Reiter, H. E. Naserke, A. J. Williams, P. J. Bingley, E. Bonifacio und A.-G. Ziegler, „Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics“, *Diabetes*, Jg. 53, Nr. 2, S. 384–392, 2004.
- [57] J. M. Barker, K. J. Barriga, L. Yu, D. Miao, H. A. Erlich, J. M. Norris, G. S. Eisenbarth und M. Rewers, „Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY)“, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Jg. 89, Nr. 8, S. 3896–3902, 2004.
- [58] V. Parikka, K. Näntö-Salonen, M. Saarinen, T. Simell, J. Ilonen, H. Hyöty, R. Veijola, M. Knip und O. Simell, „Early seroconversion and rapidly increasing autoantibody concentrations predict prepubertal manifestation of type 1 diabetes in children at genetic risk“, *Diabetologia*, Jg. 55, Nr. 7, S. 1926–1936, 2012.
- [59] A.-G. Ziegler und E. Bonifacio, „Age-related islet autoantibody incidence in offspring of patients with type 1 diabetes“, *Diabetologia*, Jg. 55, Nr. 7, S. 1937–1943, 2012.
- [60] M. Hummel, E. Bonifacio, S. Schmid, M. Walter, A. Knopff und A.-G. Ziegler, „Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents“, *Annals of Internal Medicine*, Jg. 140, Nr. 11, S. 882–886, 2004.

- [61] A.-M. Till, H. Kenk, I. Rjasanowski, R. Wassmuth, U. Walschus, W. Kerner und M. Schlosser, „Autoantibody-defined risk for Type 1 diabetes mellitus in a general population of schoolchildren: results of the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study after 18 years“, *Diabetic Medicine*, Jg. 32, Nr. 8, S. 1008–1016, 2015.
- [62] K. C. Herold und L. Taylor, „Treatment of type 1 diabetes with anti-CD3 monoclonal antibody: induction of immune regulation?“, *Immunologic Research*, Jg. 28, Nr. 2, S. 141–150, 2003.
- [63] L. Chatenoud, E. Thervet, J. Primo und J.-F. Bach, „Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 91, Nr. 1, S. 123–127, 1994.
- [64] L. C. Harrison, J. M. Wentworth, Y. Zhang, E. Bandala-Sanchez, R. M. Böhmer, A. M. Neale, N. L. Stone, G. Naselli, J. J. Bosco, P. Auyeung, M. Rashidi, P. Augstein und G. Morahan, „Antigen-based vaccination and prevention of type 1 diabetes“, *Current Diabetes Reports*, Jg. 13, Nr. 5, S. 616–623, 2013.
- [65] J. S. Skyler, J. P. Krischer, J. Wolfsdorf, C. Cowie, J. P. Palmer, C. Greenbaum, D. Cuthbertson, L. E. Rafkin-Mervis, H. P. Chase und E. Leschek, „Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial-Type 1“, *Diabetes Care*, Jg. 28, Nr. 5, S. 1068, 2005.
- [66] K. Vehik, D. Cuthbertson, H. Ruhlig, D. A. Schatz, M. Peakman und J. P. Krischer, „Long-term outcome of individuals treated with oral insulin Diabetes Prevention Trial-Type 1 (DPT-1) oral insulin trial“, *Diabetes Care*, Jg. 34, Nr. 7, S. 1585–1590, 2011.
- [67] L. C. Harrison, M. C. Honeyman, C. E. Steele, N. L. Stone, E. Sarugeri, E. Bonifacio, J. J. Couper und P. G. Colman, „Pancreatic β -cell function and immune responses to insulin after administration of intranasal insulin to humans at risk for type 1 diabetes“, *Diabetes Care*, Jg. 27, Nr. 10, S. 2348–2355, 2004.
- [68] J. P. Krischer, D. A. Schatz, B. Bundy, J. S. Skyler und C. J. Greenbaum, „Effect of oral insulin on prevention of diabetes in relatives of patients with type 1 diabetes: a randomized clinical trial“, *The Journal of the American Medical Association*, Jg. 318, Nr. 19, S. 1891–1902, 2017.
- [69] E. Bonifacio, A.-G. Ziegler, G. Klingensmith, E. Schober, P. J. Bingley, M. Rottenkolber, A. Theil, A. Eugster, R. Puff, C. Peplow, F. Buettner, K. Lange, J. Hasford und P. Achenbach, „Effects of high-dose oral insulin on immune responses in children at high risk for type 1 diabetes: the Pre-POINT randomized clinical trial“, *The Journal of the American Medical Association*, Jg. 313, Nr. 15, S. 1541–1549, 2015.
- [70] C. Pinal und A. Tobin, „Uniqueness and redundancy in GABA production“, *Perspectives on Developmental Neurobiology*, Jg. 5, Nr. 2-3, S. 109–118, 1997.
- [71] M. G. Erlander, N. J. Tillakaratne, S. Feldblum, N. Patel und A. J. Tobin, „Two genes encode distinct glutamate decarboxylases“, *Neuron*, Jg. 7, Nr. 1, S. 91–100, 1991.

- [72] J. Ludvigsson, M. Faresjö, M. Hjorth, S. Axelsson, M. Chéramy, M. Pihl, O. Vaarala, G. Forsander, S. Ivarsson, C. Johansson u. a., „GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes“, *New England Journal of Medicine*, Jg. 359, Nr. 18, S. 1909–1920, 2008.
- [73] J. Ludvigsson, D. Krisky, R. Casas, T. Battelino, L. Castaño, J. Greening, O. Kordonouri, T. Otonkoski, P. Pozzilli, J.-J. Robert, H. J. Veeze und J. Palmer, „GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus“, *New England Journal of Medicine*, Jg. 366, Nr. 5, S. 433–442, 2012.
- [74] D. K. Wherrett, B. Bundy, D. J. Becker, L. A. DiMeglio, S. E. Gitelman, R. Goland, P. A. Gottlieb, C. J. Greenbaum, K. C. Herold, J. B. Marks, R. Monzavi, A. Moran, T. Orban, J. P. Palmer, P. Raskin, H. Rodriguez, D. Schatz, D. M. Wilson, J. P. Krischer und J. S. Skyler, „Antigen-based therapy with glutamic acid decarboxylase (GAD) vaccine in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised double-blind trial“, *The Lancet*, Jg. 378, Nr. 9788, S. 319–327, 2011.
- [75] F. A. Bonilla, „Intravenous and subcutaneous immunoglobulin G replacement therapy“, *Allergy & Asthma Proceedings*, Jg. 37, Nr. 6, S. 426–431, 2016.
- [76] C. M. Oefner, A. Winkler, C. Hess, A. K. Lorenz, V. Holeccka, M. Huxdorf, T. Schommartz, D. Petzold, J. Bitterling, A.-L. Schoen, A. D. Stoehr, D. V. Van, Y. Darcan-Nikolaisen, V. Blanchard, I. Schmudde, Y. Laumonier, H. A. Ströver, A. N. Hegazy, S. Eiglmeier, C. T. Schoen, M. M. Mertes, C. Loddenkemper, M. Löhning, P. König, A. Petersen, E. O. Luger, M. Collin, J. Köhl, A. Hutloff, E. Hamelmann, M. Berger, H. Wardemann und M. Ehlers, „Tolerance induction with T cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs“, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Jg. 129, Nr. 6, S. 1647–1655, 2012.
- [77] C. Hess, A. Winkler, A. K. Lorenz, V. Holeccka, V. Blanchard, S. Eiglmeier, A.-L. Schoen, J. Bitterling, A. D. Stoehr, D. Petzold, T. Schommartz, M. M. Mertes, C. T. Schoen, B. Tiburzy, A. Herrmann, J. Köhl, R. A. Manz, M. P. Madaio, M. Berger, H. Wardemann und M. Ehlers, „T cell-independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies“, *The Journal of Clinical Investigation*, Jg. 123, Nr. 9, S. 3788–3796, 2013.
- [78] O. Pfaar, C. Bachert, A. Bufe, R. Buhl, C. Ebner, P. Eng, F. Friedrichs, T. Fuchs, E. Hamelmann, D. Hartwig-Bade, T. Hering, I. Huttegger, K. Jung, L. Klimek, M. V. Kopp, H. Merk, U. Rabe, J. Saloga, P. Schmid-Grendelmeier, A. Schuster, N. Schwerk, H. Sitter, U. Um-pfenbach, B. Wedi, S. Wöhr, M. Worm, J. Kleine-Tebbe, S. Kaul und A. Schwalfenberg, „Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases“, *Allergo Journal*, Jg. 23, Nr. 8, S. 282–319, 2014.
- [79] J. Kleine-Tebbe, K.-C. Bergmann, F. Friedrichs, T. Fuchs, K. Jung, L. Klimek, J. Kühr, W. Lässig, U. Lepp, B. Niggemann, J. Rakoski, W. Rebien, H. Renz, J. Saloga, J. Simon, H. Sitter, C. Virchow und M. Worm, „Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen“, *Allergo Journal*, Jg. 15, S. 56–74, 2006.

LITERATURVERZEICHNIS

- [80] U. Ewulonu, L. Nell und J. Thomas, „VH and VL gene usage by murine IgG antibodies that bind autologous insulin“, *The Journal of Immunology*, Jg. 144, Nr. 8, S. 3091–3098, 1990.
- [81] D. I. Gottlieb, Y.-C. Chang und J. E. Schwob, „Monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 83, Nr. 22, S. 8808–8812, 1986.
- [82] A. Hauk, „Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung“, *Biologie in unserer Zeit*, Jg. 43, Nr. 5, S. 278–278, 2013.
- [83] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich, „Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase“, *Science*, Jg. 239, Nr. 4839, S. 487–491, 1988.
- [84] T. Tiller, C. E. Busse und H. Wardemann, „Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells“, *Journal of Immunological Methods*, Jg. 350, Nr. 1, S. 183–193, 2009.
- [85] D. A. Mead, N. K. Pey, C. Herrnstadt, R. A. Marcil und L. M. Smith, „A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid“, *Nature Biotechnology*, Jg. 9, Nr. 7, S. 657–663, 1991.
- [86] M. Koenen, U. Rüther und B. Müller-Hill, „Immunoenzymatic detection of expressed gene fragments cloned in the lac Z gene of *E. coli*“, *The EMBO Journal*, Jg. 1, Nr. 4, S. 509–512, 1982.
- [87] H. Bimboim und J. Doly, „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA“, *Nucleic Acids Research*, Jg. 7, Nr. 6, S. 1513–1523, 1979.
- [88] K. S. Lundberg, D. D. Shoemaker, M. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge und E. J. Mathur, „High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*“, *Gene*, Jg. 108, Nr. 1, S. 1–6, 1991.
- [89] T. Tiller, E. Meffre, S. Yurasov, M. Tsuiji, M. C. Nussenzweig und H. Wardemann, „Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning“, *Journal of Immunological Methods*, Jg. 329, Nr. 1, S. 112–124, 2008.
- [90] P. A. Longo, J. M. Kavran, M.-S. Kim und D. J. Leahy, „Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI)“, *Methods in Enzymology*, Jg. 529, S. 227–240, 2013.
- [91] F. Hillenkamp und M. Karas, „Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization“, in *Methods in Enzymology*, Bd. 193, Elsevier, 1990, S. 280–295.
- [92] M. Collin und A. Olsén, „Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins“, *Infection and Immunity*, Jg. 69, Nr. 11, S. 7187–7189, 2001.
- [93] R. Knippers, *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, 2006.
- [94] A. Varki, „N-glycolylneuraminic acid deficiency in humans“, *Biochimie*, Jg. 83, Nr. 7, S. 615–622, 2001.

- [95] B. Smith, „SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins“, in *Proteins*, Springer, 1984, S. 41–56.
- [96] U. Langen, R. Schmitz und H. Steppuhn, „Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland“, *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, Jg. 56, Nr. 5-6, S. 698–706, 2013.
- [97] S. Eehalt, K. Dietz, A. M. Willasch und A. Neu, „Prediction model for the incidence and prevalence of type 1 diabetes in childhood and adolescence: evidence for a cohort-dependent increase within the next two decades in Germany“, *Pediatric Diabetes*, Jg. 13, Nr. 1, S. 15–20, 2012.
- [98] E. Myasoedova, C. S. Crowson, H. M. Kremers, T. M. Therneau und S. E. Gabriel, „Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955–2007“, *Arthritis & Rheumatology*, Jg. 62, Nr. 6, S. 1576–1582, 2010.
- [99] K. A. Hogquist, T. A. Baldwin und S. C. Jameson, „Central tolerance: learning self-control in the thymus“, *Nature Reviews Immunology*, Jg. 5, Nr. 10, S. 772–782, 2005.
- [100] J. Sprent und H. Kishimoto, „The thymus and central tolerance“, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Jg. 356, Nr. 1409, S. 609–616, 2001.
- [101] R. M. Steinman, D. Hawiger und M. C. Nussenzweig, „Tolerogenic dendritic cells“, *Annual Review of Immunology*, Jg. 21, Nr. 1, S. 685–711, 2003.
- [102] K. Kretschmer, I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig und H. von Boehmer, „Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen“, *Nature Immunology*, Jg. 6, Nr. 12, S. 1219–1227, 2005.
- [103] S. Yamazaki, D. Dudziak, G. F. Heidkamp, C. Fiorese, A. J. Bonito, K. Inaba, M. C. Nussenzweig und R. M. Steinman, „CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells“, *The Journal of Immunology*, Jg. 181, Nr. 10, S. 6923–6933, 2008.
- [104] Y. C. Bartsch, J. Rahmöller, M. M. M. Mertes, S. Eiglmeier, F. K. M. Lorenz, A. D. Stoehr, D. Braumann, A. K. Lorenz, A. Winkler, G.-M. Lilienthal, J. Petry, J. Hobusch, M. Steinhilber, C. Hess, V. Holecska, C. T. Schoen, C. M. Oefner, A. Leliavski, V. Blanchard und M. Ehlers, „Sialylated autoantigen-reactive IgG antibodies attenuate disease development in autoimmune mouse models of lupus nephritis and rheumatoid arthritis“, *Frontiers in Immunology*, Jg. 9, S. 1183, 2018.
- [105] A. Lux, S. Aschermann, M. Biburger und F. Nimmerjahn, „The pro and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G“, *Annals of the Rheumatic Diseases*, Jg. 69, Nr. Suppl 1, S. i92–i96, 2010.
- [106] R. M. Anthony, F. Wermeling, M. C. Karlsson und J. V. Ravetch, „Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 105, Nr. 50, S. 19 571–19 578, 2008.

LITERATURVERZEICHNIS

- [107] S. Aschermann, A. Lux, A. Baerenwaldt, M. Biburger und F. Nimmerjahn, „The other side of immunoglobulin G: suppressor of inflammation“, *Clinical & Experimental Immunology*, Jg. 160, Nr. 2, S. 161–167, 2010.
- [108] A. R. Crow, S. Song, J. Freedman, C. D. Helgason, R. K. Humphries, K. A. Siminovitch und A. H. Lazarus, „IVIg-mediated amelioration of murine ITP via Fc γ RIIB is independent of SHIP1, SHP-1, and Btk activity“, *Blood*, Jg. 102, Nr. 2, S. 558–560, 2003.
- [109] A. Samuelsson, T. L. Towers und J. V. Ravetch, „Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor“, *Science*, Jg. 291, Nr. 5503, S. 484–486, 2001.
- [110] P. Bruhns, A. Samuelsson, J. W. Pollard und J. V. Ravetch, „Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease“, *Immunity*, Jg. 18, Nr. 4, S. 573–581, 2003.
- [111] R. M. Anthony, T. Kobayashi, F. Wermeling und J. V. Ravetch, „Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel TH2 pathway“, *Nature*, Jg. 475, Nr. 7354, S. 110–113, 2011.
- [112] G. J. Randolph, V. Angeli und M. A. Swartz, „Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels“, *Nature Reviews Immunology*, Jg. 5, Nr. 8, S. 617–628, 2005.
- [113] J. Banchereau und R. M. Steinman, „Dendritic cells and the control of immunity“, *Nature*, Jg. 392, Nr. 6673, S. 245–252, 1998.
- [114] J. K. Tan und H. C. O’Neill, „Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity“, *Journal of Leukocyte Biology*, Jg. 78, Nr. 2, S. 319–324, 2005.
- [115] L. Zhang und G. S. Eisenbarth, „Immunopathogenesis of the NOD Mouse“, in *Immunoendocrinology: Scientific and Clinical Aspects*, Springer, 2011, S. 199–213.
- [116] G. Köhler und C. Milstein, „Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity“, *Nature*, Jg. 256, Nr. 5517, S. 495–497, 1975.
- [117] W. L. Carroll, E. Mendel und S. Levy, „Hybridoma fusion cell lines contain an aberrant kappa transcript“, *Molecular Immunology*, Jg. 25, Nr. 10, S. 991–995, 1988.
- [118] G.-M. Lilienthal, J. Rahmüller, J. Petry, Y. C. Bartsch, A. Leliavski und M. Ehlers, „Potential of murine IgG1 and human IgG4 to inhibit the classical complement and Fc γ receptor activation pathways“, *Frontiers in Immunology*, Jg. 9, S. 958, 2018.
- [119] R. T. Strait, M. T. Posgai, A. Mahler, N. Barasa, C. O. Jacob, J. Köhl, M. Ehlers, K. Stringer, S. K. Shanmukhappa, D. Witte, M. M. Hossain, M. Khodoun, A. B. Herr und F. D. Finkelmann, „IgG1 protects against renal disease in a mouse model of cryoglobulinaemia“, *Nature*, Jg. 517, Nr. 7535, S. 501–504, 2015.

- [120] C. M. Karsten, M. K. Pandey, J. Figge, R. Kilchenstein, P. R. Taylor, M. Rosas, J. U. McDonald, S. J. Orr, M. Berger, D. Petzold, V. Blanchard, A. Winkler, C. Hess, D. M. Reid, I. V. Majoul, R. T. Strait, N. L. Harris, G. Köhl, E. Wex, R. Ludwig, D. Zillikens, F. Nimmerjahn, F. D. Finkelman, G. D. Brown, M. Ehlers und J. Köhl, „Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of Fc γ RIIB and dectin-1“, *Nature Medicine*, Jg. 18, Nr. 9, S. 1401–1406, 2012.
- [121] R. B. Parekh, R. A. Dwek, B. J. Sutton, D. L. Fernandes, A. Leung, D. Stanworth, T. W. Rademacher, T. Mizuochi, T. Taniguchi, K. Matsuta, F. Takeuchi, Y. Nagano, T. Miyamoto und A. Kobata, „Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG“, *Nature*, Jg. 316, Nr. 6027, S. 452–457, 1985.
- [122] R. Parekh, D. Isenberg, G. Rook, I. Roitt, R. Dwek und T. Rademacher, „A comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG“, *Journal of Autoimmunity*, Jg. 2, Nr. 2, S. 101–114, 1989.
- [123] D. Van Zeben, G. Rook, J. Hazes, A. Zwinderman, Y. Zhang, S. Ghelani, T. Rademacher und F. Breedveld, „Early agalactosylation of IgG is associated with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis: results of a follow-up study“, *Rheumatology*, Jg. 33, Nr. 1, S. 36–43, 1994.
- [124] M. Watson, P. M. Rudd, M. Bland, R. A. Dwek und J. S. Axford, „Sugar printing rheumatic diseases: a potential method for disease differentiation using immunoglobulin G oligosaccharides“, *Arthritis & Rheumatology*, Jg. 42, Nr. 8, S. 1682–1690, 1999.
- [125] J. Axford, P. Lydyard, D. Isenberg, L. Mackenzie, F. Hay und I. Roitt, „Reduced B-cell galactosyltransferase activity in rheumatoid arthritis“, *The Lancet*, Jg. 330, Nr. 8574, S. 1486–1488, 1987.
- [126] A. Ercan, J. Cui, D. E. W. Chatterton, K. D. Deane, M. M. Hazen, W. Brintnell, C. I. O’Donnell, L. A. Derber, M. E. Weinblatt, N. A. Shadick, D. A. Bell, E. Cairns, D. H. Solomon, V. M. Holvers, P. M. Rudd und D. M. Lee, „Aberrant IgG galactosylation precedes disease onset, correlates with disease activity, and is prevalent in autoantibodies in rheumatoid arthritis“, *Arthritis & Rheumatology*, Jg. 62, Nr. 8, S. 2239–2248, 2010.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater Marc Ehlers für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Laborplatzes und aller Materialien, die großartige Betreuung während der gesamten Zeit und die endlose Geduld über die vielen Jahre. Danke!

Mein Dank gilt zudem dem gesamten Team des Instituts für Systemische Entzündungsforschung für die Einführung in die experimentelle Laborarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich Josephine Bitterling, Yannic Bartsch und Tim Schommartz danken - ihr habt mir immer mit praktischen Ratschlägen zur Seite gestanden und die vielen Stunden im Labor in vielerlei Hinsicht sehr bereichert. Außerdem gilt mein Dank dem Team des Labors für Glykodesign und Glykoanalytik der Charité in Berlin für die Durchführung der MALDI-TOF Glykananalysen.

Des Weiteren danke ich Christoph Härtel und Melchior Lauten, die meinen beruflichen Werdegang entscheidend mitbeeinflusst haben und mich bei der Erstellung dieser Arbeit unermüdlich motiviert haben. Danke!

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken: meinen vier Elternteilen, meiner Schwester und meinem Mann. Ihr begleitet meinen Weg mit endloser Liebe und immer vollstem Vertrauen in mich und dafür danke ich euch zutiefst.

Caroline Stille

Curriculum Vitae



PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsname Hagemann
Geburtsdatum 15. Februar 1989
Geburtsort Münster, Deutschland
Nationalität deutsch

SCHULAUSBILDUNG

1995–1999 Wartburg Grundschule, Münster
1999–2007 Marienschule, Bischöfliches Mädchengymnasium, Münster
2004 Überspringen der Jahrgangsstufe 10
2007 Bilinguales Abitur (Englisch)

BERUFSAUSBILDUNG

2007–2014 Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck
Herbst 2009 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2011 Erasmus-Semester, Medizinische Universität Wien
2013–2014 Praktisches Jahr (Wahlfach Pädiatrie)
Frühjahr 2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit Herbst 2014 Assistenzärztin, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck

STIPENDIEN

2003 Stipendium der von Detten-Stiftung für besondere schulische Leistungen
2011 Auslandsstipendium im Rahmen des Erasmus-Programms
2012 Promotionsstipendium im Rahmen der Promotionsförderung der ‚Lübecker Exzellenzmedizin‘