

"Anwendung von anti-MCP1 N1pE-Antikörpern zur Untersuchung des Einflusses der Pyroglutamat-Bildung in physiologischen Modellen"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

*(Dr. rer. nat.)*

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl.-Biol. Kathrin Gans

geb. am 02.05.1980 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. PD Dr. H. Lilie
2. Prof. Dr. H.-U. Demuth
3. Prof. Dr. R. Brandt

Halle (Saale), 20. Mai 2010

Tag der öffentlichen Verteidigung: 25. März 2011



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	IV
<b>1 Einleitung und Aufgabenstellung</b> .....	1
1.1 Chemokine.....	1
1.2 MCP1 (CCL2).....	2
1.3 Die Rolle von MCP1 in verschiedenen Krankheitsbildern.....	5
1.4 Die Glutaminylzyklasen QC und isoQC.....	7
1.4 Monoklonale Antikörper.....	9
1.5 Therapeutische Ansätze zur Behandlung inflammatorischer Erkrankungen mit anti-MCP1-Antikörpern.....	12
1.6 Aufgabenstellung.....	15
<b>2 Methoden</b> .....	17
2.1. Molekularbiologische Methoden.....	17
2.1.1 Sterilisation.....	17
2.1.2 Lagerung von Bakterien- und Hefestämmen.....	17
2.1.3 Isolation von RNA.....	17
2.1.4 cDNA-Synthese.....	17
2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
2.1.6 Agarosegelelektrophorese.....	21
2.1.7 Ligation in pJET1.2/blunt.....	21
2.1.8 Transformation ( <i>E. coli</i> ).....	22
2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA.....	23
2.1.10 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	23
2.1.11 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen.....	23
2.1.12 Deglykosylierung.....	24
2.1.13 Sequenzierung.....	24
2.1.14 Verwendete Programme zur Auswertung der Sequenzen.....	24
2.2 Methoden zur Proteinexpression in <i>P. pastoris</i> und <i>E. coli</i> .....	24
2.2.1 Bestimmung der Zellkonzentration.....	24
2.2.2 Expression von SENP2 <sup>363-589</sup> in <i>E. coli</i> .....	24
2.2.3 Proteinexpression in <i>P. pastoris</i> .....	25
2.3 Zellbiologische Methoden.....	26
2.3.1 Verwendete Zelllinien.....	26
2.3.2 Langzeitlagerung von Hybridomazellen.....	26
2.3.3 Auftauen von Hybridomazellen.....	27
2.3.4 Immunisierung von Mäusen zur Gewinnung antikörperproduzierender Hybridomazellen.....	27
2.3.5 Kultivierung von Hybridomazellen.....	28
2.3.6 Optimierung der Hybridomazell-Kultivierung.....	28
2.3.7 Glukose-Konzentrationsbestimmung im Zellkulturüberstand.....	29
2.3.8 Untersuchung des Einflusses der QC-Inhibierung in Zellkulturmodellen.....	29
2.3.9 THP1-Migrationsassay.....	30
2.4 Proteinchemische Methoden.....	32
2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	32
2.4.2 Western Blot.....	33
2.4.3 UV/VIS-Spektroskopie.....	34
2.4.4 Methoden zur Isolierung und Konzentrierung von rekombinanten Proteinen.....	36
2.4.5 Ermittlung der Aktivität des SENP2 <sup>363-589</sup> -Fragments.....	39

2.4.6 Durchflusszytometrie.....	40
2.5 Methoden zur biophysikalischen Charakterisierung .....	42
2.5.1 Bindungsanalysen der Antikörper mittels Plasmonresonanz .....	42
2.5.2 PepSpot-Analyse.....	44
2.5.3 Epitopmapping.....	45
2.5.4 Bestimmung thermodynamischer Parameter mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC).....	46
2.6 Methoden zur Durchführung und Etablierung des Sandwich-ELISA .....	49
2.6.1 Zyklisierung des MCP1-Standardproteins.....	49
2.6.2 Etablierung und generelles Protokoll der hMCP1 N1pE, mMCP1 N1pE und rMCP1 N1pE ELISAs .....	50
2.6.3 Erstellung von Standardkurven zur quantitativen Analyse der MCP1 und MCP1 N1pE-Level mit Hilfe des ELISAs .....	55
2.6.4 Validierung der hMCP1 (N1pE), mMCP1 (N1pE) und rMCP1 (N1pE) ELISAs.....	55
2.7 Tierexperimentelle Methoden.....	57
2.7.1 Thioglykolat induzierte Peritonitis in der Maus .....	57
<b>3 Ergebnisse</b> .....	59
3.1 Expression, Reinigung und Charakterisierung der verwendeten Proteine .....	59
3.1.1 Herstellung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper.....	59
3.1.2 Charakterisierung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper.....	60
3.1.3 Expression und Reinigung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper.....	71
3.1.4 Expression und Reinigung von SUMO-MCP1.....	76
3.1.5 Expression und Reinigung von SENP2 <sup>363-589</sup> .....	81
3.2 Entwicklung von ELISAs zum quantitativen Nachweis von total MCP1 und MCP1 N1pE.....	81
3.2.1 Entwicklung von ELISAs zum quantitativen Nachweis von total hMCP1 und hMCP1 N1pE .....	82
3.2.2 Entwicklung von ELISAs zum quantitativen Nachweis von MCP1 und MCP1 N1pE aus Ratte und Maus .....	85
3.2.3 Epitopmapping der Detektionsantikörper des total h-, m- und rMCP1 ELISAs.....	87
3.2.4 Untersuchung des Einflusses des N-terminalen Pyroglutamats auf den total h-, m- und rMCP1 ELISA .....	89
3.2.5 Validierung der ELISAs zur Detektion von MCP1 und MCP1 N1pE aus Maus, Ratte und Mensch .....	91
3.3 Untersuchungen zur physiologischen Funktion von MCP1 N1pE.....	99
3.3.1 Untersuchung des Einflusses der N-terminalen Zyklisierung von MCP1 in <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Tiermodellen .....	99
3.3.2 Untersuchung der neutralisierenden Wirkung der anti-MCP1 N1pE- Antikörper mittels des THP1-Migrationsassays.....	105
3.3.3 Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung der anti-MCP1 N1pE- Antikörper im Peritonitis-Maus-Modell .....	107
<b>4 Diskussion</b> .....	111
4.1 Expression, Reinigung und Charakterisierung der verwendeten Proteine .....	111
4.1.1 Genotypisierung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper.....	111
4.1.2 Untersuchung von Kreuzreaktivitäten der anti-MCP1 N1pE-Antikörper.....	113
4.1.3 Ermittlung thermodynamischer Parameter der anti-MCP1 N1pE- Antikörper mit Hilfe der ITC.....	115
4.1.4 Optimierung der Antikörperproduktion in Hybridomazellen.....	116
4.1.5 Expression von SUMO-MCP1 .....	117

4.2 Entwicklung von ELISAs zum quantitativen Nachweis von MCP1 und MCP1 N1pE aus Mensch, Maus und Ratte .....	119
4.2.1 Epitopmapping der Detektionsantikörper des total h-, m- und rMCP1 ELISAs .....	120
4.2.2 Untersuchung des Einflusses des N-terminalen Pyroglutamats auf den total h-, m- und rMCP1 ELISA .....	122
4.2.3 Validierung der ELISAs zur Detektion von MCP1 und MCP1 N1pE aus Maus, Ratte und Mensch .....	123
4.3 Untersuchungen zur physiologischen Funktion von MCP1 N1pE.....	125
4.3.1 Beeinflussung der MCP1 N1pE-Bildung durch QC-Inhibitoren in Zellkulturmodellen.....	125
4.3.2 Untersuchung des Einflusses der QC/isoQC-Inhibierung im Peritonitis-Maus-Modell.....	127
4.3.3 Untersuchung der neutralisierenden Wirkung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper im THP1-Migrationsassay .....	129
4.3.4 Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper im Peritonitis-Maus-Modell .....	130
<b>5 Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>133</b>
5.1. Zusammenfassung .....	133
5.2 Ausblick .....	134
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>136</b>

## Abkürzungen

Symbole	Erklärung
AD	Alzheimer-Demenz
AMC	7-Amido-4-Methylcoumarin
AMP	Adenosinmonophosphat
AOX	Alkoholoxidase
AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BAL	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BMG	gepuffertes minimal Medium mit Glycerol
BMM	gepuffertes minimal Medium mit Methanol
Bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serum-Albumin
CDR	<i>Complementary Determining Region</i>
cDNA	<i>Complementary DANN</i>
C <sub>H</sub>	Konstante Domäne der schweren Antikörperkette
C <sub>L</sub>	Konstante Domäne der leichten Antikörperkette
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CV	Variationskoeffizient
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DP4	Dipeptidylpeptidase IV
DTT	Dithiothreitol
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanath
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure]
hIL1 $\beta$	Humanes Interleukin 1 $\beta$
His <sub>6</sub>	6 x Histidin
h-isoQC	humane iso-Glutaminylylzyklase
hMCP1	Humanes <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
hQC	humane Glutaminylylzyklase
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
Ig	Immunglobulin
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
KDa	Kilodalton
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante des Antigen-Antikörper-Komplexes
LB-Medium	Luria-Bertani Medium

LK	Leichte Kette
LPS	Lipopolysaccharide
MCI	Mild Cognitive Impairment
MCP1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
MCP1 N1pE	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i> mit N-terminalem Pyroglutamat
MCP1 N1Q	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i> mit N-terminalem Glutamin
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
Min	Minuten
mMCP1	Maus <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
mQC	murine Glutaminylzyklase
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
N1Q	<i>N-terminales Glutamin</i>
N1pE	<i>N-terminales Pyroglutamat</i>
ND	<i>Neutralisierungsdosis</i>
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PE	Phycoerythrin
pE	Pyroglutamat
PLF	Peritoneal-Lavageflüssigkeit
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
QC	Glutaminylzyklase
isoQC	Isoenzym der Glutaminylzyklase
RFU	Relative Fluoreszenz Units
rIFN $\gamma$	Ratten Interferon $\gamma$
rMCP1	Ratten <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
rTNF $\alpha$	Ratten Tumornekrosefaktor $\alpha$
RA	Rheumatoide Arthritis
RU	Response Units
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SENP	<i>Sentrin specific protease</i>
SF	<i>Synovial-Flüssigkeit</i>
SK	Schwere Kette
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
STD	Standardabweichung
T	Temperatur
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
THP1	<i>Human acute monocytic leukemia cell line</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
hTNF $\alpha$	Humaner Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon

---

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheiten) in $\mu\text{M}/\text{min}$
UV	ultraviolett
VIS	sichtbares Licht
V <sub>H</sub>	Variable Domäne der schweren Antikörperkette
V <sub>L</sub>	Variable Domäne der leichten Antikörperkette
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Medium</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

---

# 1 Einleitung und Aufgabenstellung

## 1.1 Chemokine

Zytokine sind von Zellen gebildete Signalproteine oder -peptide, die als örtliche Vermittler bei der Zell-Zell-Kommunikation fungieren. Chemokine sind eine Gruppe der Zytokine, die chemotaktisch agieren und somit bei Zellen eine Wanderungsbewegung auslösen (Baggiolini *et al.*, 1994, Balkwill, 2004). Der Name Chemokin widerspiegelt die funktionelle Eigenschaft Chemotaxis induzieren zu können und die Zugehörigkeit zu den zellstimulierenden Hormonen, den Zytokinen (*chemotactic cytokines*) (Charo *et al.*, 2004). Die Expression der Chemokine wird hauptsächlich durch inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und pathogene Substanzen induziert (Rossi *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2000; Zlotnik *et al.*, 2000). Funktionell sind sie in 2 Unterfamilien gegliedert: inflammatorische und homöostatische Chemokine (Deshmane *et al.*, 2009). Inflammatorische Chemokine induzieren die Rekrutierung von Leukozyten entlang eines Konzentrationsgradienten zur Quelle der Chemokinproduktion (Callewaere *et al.*, 2007). Homöostatische Chemokine erfüllen eher *housekeeping* Funktionen, d.h. sie navigieren Leukozyten zu und innerhalb von lymphoiden Organen, dem Knochenmark und dem Thymus (Wagner *et al.*, 2007). Einige Chemokine sind weiterhin an der Bildung (Angiogenese) oder dem Erhalt (Angiostase) von Blutgefäßen beteiligt (Mackay, 2001). Vor allem durch die Beeinflussung der Angiogenese spielen sie eine wichtige Rolle beim Tumorwachstum. Chemokine beeinflussen außerdem die Degranulation von Leukozyten und die Aktivierung von Integrinen während der Leukozyten-Endothel-Interaktion, was die Anlagerung der Leukozyten an die Endothelzellen der Blutgefäße ermöglicht (Mackay, 2001).

Obwohl die Chemokine so vielfältig in ihrer Funktion sind, besitzen sie vor allem strukturelle Gemeinsamkeiten, weshalb sie zu einer Familie zusammengefasst werden. Sie sind alle kleine, extrazelluläre Proteine und bestehen aus 75 - 125 Aminosäuren. Chemokine besitzen eine ähnliche genetische Struktur, bestehend aus drei Exons und zwei Introns (Graves *et al.*, 1995). Sie ähneln sich sehr in ihrer Tertiärstruktur, auch wenn sie in ihrer Primärstruktur zum Teil wenig homolog sind (Clowse und Gronenborn, 1995). Die Mehrheit der Chemokine besitzt vier Cysteinreste in ihrer Aminosäuresequenz, wobei zwei von diesen nahe dem N-Terminus lokalisiert sind (Rossi *et al.*, 2000). Anhand ihrer Primärstruktur werden die Chemokine in 4 Gruppen eingeteilt: CXC-, CC-, C- und CX3C-

Chemokine. Die CXC-Chemokine, auch  $\alpha$ -Chemokine genannt, sind dadurch gekennzeichnet, dass die Cysteinreste durch eine Aminosäure voneinander getrennt sind (Loetscher *et al.*, 1994). Die C-Chemokine besitzen nur zwei Cysteinreste, von denen sich einer am N-Terminus befindet (Kelner *et al.*, 1995). Ein charakteristisches Merkmal der CX3C-Chemokine sind drei Aminosäuren, die die ersten beiden Cysteinreste voneinander trennen (Zlotnik *et al.*, 2000). Bei den Vertretern der CC-Chemokinen, auch  $\beta$ -Chemokine genannt (Ernst *et al.*, 1994), liegen die ersten beiden von vier Cysteinresten nebeneinander (Loetscher *et al.*, 1994). Zu den Vertretern der CC-Chemokine zählen CCL2 (MCP1), CCL8 (MCP2), CCL7 (MCP3) und CCL13 (MCP4) (Proost *et al.*, 2006), welche eine hohe Sequenzhomologie, bis hin zu 71 %, untereinander aufweisen (Van Coillie *et al.*, 1999).

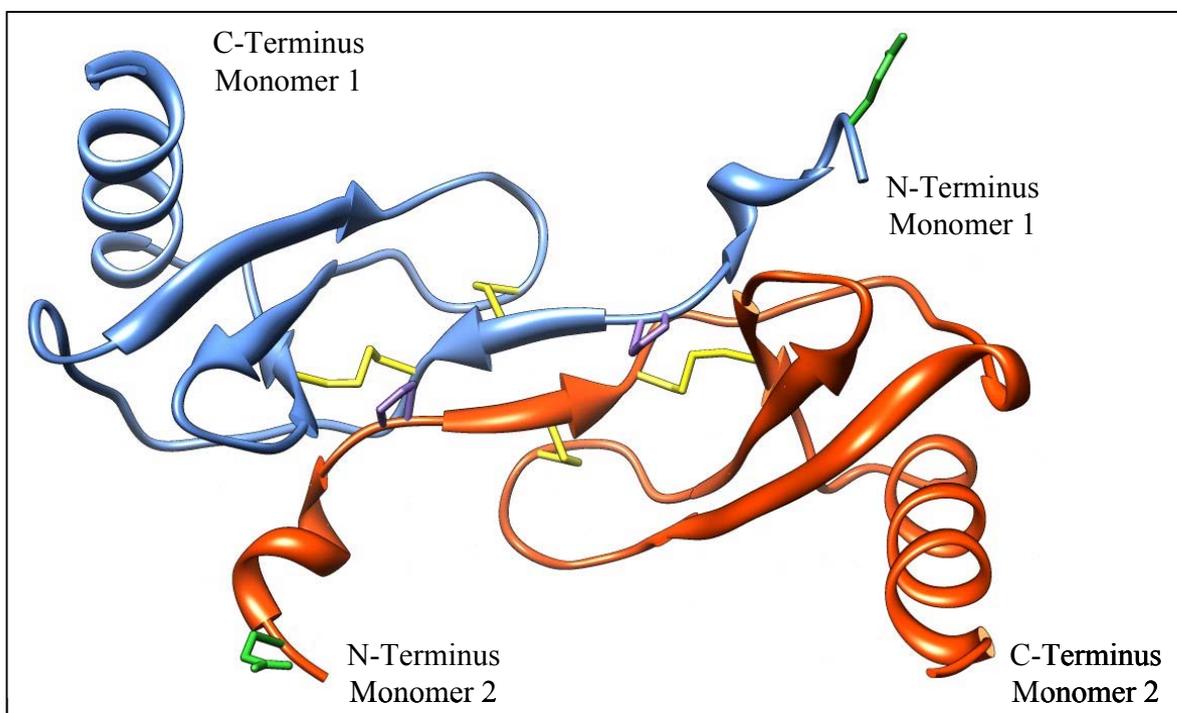
## 1.2 MCP1 (CCL2)

MCP1 (*monocyte chemoattractant protein 1*, auch CCL2, CC chemokine ligand; MCAF, monocyte chemotactic and activating factor) gehört zu den am besten charakterisierten CC-Chemokinen. Es wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen exprimiert, dazu gehören Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen, Zellen der glatten Muskulatur, mesangiale Zellen, Astrozyten, Monozyten und Mikrogliazellen (Cushing *et al.*, 1990; Standiford *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1992; Barna *et al.*, 1994). Dabei stellen Monozyten und Makrophagen eine Hauptquelle für MCP1 dar (Yoshimura *et al.*, 1989 a,b). Die Expression geschieht entweder konstitutiv, oder nach Induktion durch oxidativen Stress, Zytokine oder Wachstumsfaktoren (Deshmane *et al.*, 2009). MCP1 reguliert die Migration und Infiltration von Monozyten, Gedächtnis-T-Zellen und Natural Killer Zellen (Loetscher *et al.*, 1994; Deshmane *et al.*, 2009). Nach der Sekretion in den extrazellulären Raum wird MCP1 von Glukosaminoglykanen der extrazellulären Matrix gebunden. So baut sich mit zunehmender Entfernung vom Sekretionsort ein MCP1-Gradient auf, der in Richtung der entzündeten Stelle zunimmt und so darauf hinweist (Proudfoot *et al.*, 2003; Lau *et al.*, 2004). Des Weiteren wird MCP1 am Endothel der Blutgefäße gebunden und vermittelt somit die Rekrutierung von Immunzellen aus der Blutzirkulation (Ni *et al.*, 2004).

Durch seine Rolle innerhalb des Immunsystems ist das Chemokin vermutlich in eine Vielzahl von Krankheiten involviert. Zur Untersuchung der physiologischen Funktion von MCP1 und seinem Rezeptor CCR2 wurden MCP1- bzw. CCR2 *knock out* Mäuse generiert. Diese *knock out* Mäuse vermehren sich entsprechend der Mendelschen Regeln, sind fertil und entwickeln sich normal. Mit Hilfe dieser Tiere konnte gezeigt werden, dass sowohl MCP1 als auch CCR2 essentiell für die Rekrutierung von Monozyten zum Ort der

Entzündung sind (Boring *et al.*, 1997; Kurihara *et al.*, 1997; Henderson *et al.*, 2003; Brodmerkel *et al.*, 2005; Tsou *et al.*, 2007).

Der Aufklärung der Tertiärstruktur dienten bisher zwei NMR-Strukturen (Handel und Domaille, 1996, pbd Code: 1DON und 1DOM) sowie zwei Röntgen-Kristallstrukturen (Lubkowski *et al.*, 1997, pbd Code: 1DOL und 1DOK) des in *E. coli* exprimierten rekombinanten humanen MCP1 (hMCP1). Weiterhin konnte im Jahr 2006 die Röntgenkristallstruktur von hMCP1 im Komplex mit dem neutralisierenden Antikörper 11K2 gelöst werden (Reid *et al.*, 2006, pbd Code: 2BDN). Abbildung 1.1 zeigt die Röntgen-Kristallstruktur des hMCP1-Homodimers von Lubkowski *et al.* (pbd Code: 1DOK). Dargestellt sind die Sekundärstrukturelemente beider Monomere (rot und blau).



**Abbildung 1.1.:** Schematische Darstellung des Strukturmodells eines hMCP1-Homodimers. Blau: Monomer 1, Rot: Monomer 2. Der Glutaminrest an Position 1 ist grün markiert, die Cysteinreste und deren intramolekularen Disulfidbrücken gelb. Es ist zu beachten, dass die Proteine aufgrund der Expressionsbedingungen am N-Terminus nicht das N-terminale Glutamin, sondern einen Methionin-Rest aufweisen. Die Prolinreste an Position 8, welches essentiell für die Dimerisierung von hMCP1 sind, wurden lila hervorgehoben. Nach Lubkowski *et al.*, 1997 (PDB-Code: 1DOK), erstellt mit dem Strukturdisplayprogramm Chimera.

Die Sekundärstruktur eines hMCP1-Monomers besteht aus 4  $\beta$ -Faltblättern und 2  $\alpha$ -Helices. Die Expression des hMCP1 erfolgte in *E. coli* ohne das Signalpeptid zur Sekretion. Die kodierende Sequenz des Proteins wurde so kloniert, dass die Sequenz des reifen hMCP1 (kodiert für die Aminosäuren 24-99) direkt auf das Startcodon folgt,

welches für Methionin kodiert. Aus diesem Grund starten die Proteine in dem Modell der dreidimensionalen Struktur nicht mit dem typischen N-terminalen Glutamin.

Durch Mutationsstudien konnten 3 Regionen in der Primärstruktur von hMCP1 identifiziert werden, die für dessen biologische Aktivität essentiell sind. So konnten Ebiwasa *et al.* zeigen, dass die Mutation der Aminosäuren 10-13 in einem Aktivitätsverlust des Zytokins resultiert (Ebiwasa *et al.*, 1994). Die Aktivität von hMCP1 wird ebenfalls durch Veränderung der Aminosäuren 34 und 35 beeinflusst (Beall *et al.*, 1996). Auch die Deletion der ersten 10 N-terminalen Aminosäuren von hMCP1 führt zu einer massiven Reduktion der chemotaktischen Aktivität (Gong und Clark-Lewis, 1995). Es stellte sich weiterhin heraus, dass diese N-terminal verkürzten Formen des hMCP1 antagonistisch wirken, d.h. sie binden an CCR2, sind aber nicht in der Lage diesen zu aktivieren. Für diese CCR2-Antagonisten wird eine physiologische antiinflammatorische Funktion diskutiert (Gong *et al.*, 1997; McQuibban *et al.*, 2002). Paavola *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass die Aminosäure Prolin 8 essentiell für die Bildung von hMCP1-Homodimeren ist (Paavola *et al.*, 1998).

Das Vorläuferprotein des hMCP1 besteht aus 99 Aminosäuren. Nach Abspaltung des Signalpeptides geht daraus das reife, aus 76 Aminosäuren zusammengesetzte Protein mit einem Molekulargewicht von 13 kDa hervor (Van Coillie *et al.*, 1999). Durch diesen Prozess wird die Aminosäure Glutamin N-terminal frei, welche zu Pyroglutamat (pE) zyklisieren kann (Ruggiero *et al.*, 2003).

Maus MCP1 (mMCP1) und Ratten MCP1 (rMCP1) sind die homologen Proteine zu hMCP1 in Mäusen und Ratten. Sie unterscheiden sich von hMCP1 vor allem durch zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus (Rollins *et al.*, 1989). Die Vorläuferproteine bestehen aus 148 Aminosäuren und nach Abspaltung des Signalpeptides entstehen 125 Aminosäuren lange Proteine mit N-terminalem Pyroglutamat. Besonders die C-terminalen Aminosäuren von mMCP1 und rMCP1 weisen viele O-Glykosilierungsstellen auf, weshalb sie im Vergleich zu hMCP1 einen höheren Glykosilierungsgrad besitzen (Ernst *et al.*, 1994).

Die Zyklisierung der freien N-terminalen Glutaminreste von hMCP1, mMCP1 und rMCP1 wird vermutlich von den Glutaminyl Zyklasten QC und isoQC katalysiert (Messer, 1963; Cynis *et al.*, 2008; Cynis *et al.*, 2010 in Vorbereitung). Allerdings kann dies unter bestimmten physikochemischen Bedingungen, wie z.B. der Anwesenheit von hohen

Konzentrationen an Phosphationen, auch spontan erfolgen (Blombäck, 1967; Fischer und Spiess, 1987).

### 1.3 Die Rolle von MCP1 in verschiedenen Krankheitsbildern

Sowohl MCP1 als auch sein Rezeptor CCR2 sind in einer Vielzahl von Krankheiten induziert und involviert.

So wird MCP1 zum einen als potentiell Zielprotein der Wirkstoffforschung für Arteriosklerose diskutiert. Boring *et al.* konnten zeigen, dass die Ablagerung von Blutfetten in den Arterien von CCR2- und MCP1 *knock out* Mäusen erheblich reduziert ist (Boring *et al.*, 1998). Eine Ursache für Arteriosklerose ist z.B. die erhöhte Konzentration von Cholesterin im Blut. Dieses kann in Form von LDL-Cholesterin an Proteoglykane von Gefäßwänden binden und dort oxidiert werden. Oxidiertes LDL-Cholesterin stellt einen inflammatorischen Stimulus für Makrophagen und Zellen der Gefäßwand dar, so dass es zur Ausschüttung von Chemokinen, insbesondere MCP1, kommt. Dies wiederum führt zu einer vermehrten Einwanderung von Immunzellen, z.B. Monozyten, in die Gefäßwand (Libby *et al.*, 2002), welche dort zu Makrophagen differenzieren und verstärkt Cholesterin aufnehmen. Mit Cholesterin und Fettsäuren gefüllte Makrophagen werden als Schaumzellen bezeichnet und sind ein Hauptmerkmal arteriosklerotischer Plaques. Durch die Akkumulation von Schaumzellen wird das betroffene Gefäß bis hin zum vollständigen Verschluss verengt bzw. durch Ruptur geschädigt, was wiederum den Blutfluss verhindert. Neben der Stimulation der Epithelzellen durch oxidierte Lipide können auch mechanische Reize an der Gefäßwand zu Entzündungsreaktionen führen. Eine chirurgische oder minimalinvasive Behandlung der verengten Blutgefäße führt zu Endothelverletzungen. Daraufhin kommt es häufig zu Entzündungsreaktionen, bei denen MCP1 offenbar eine wichtige Rolle spielt. Monozyten und andere Immunzellen wandern dann in das betroffene Gewebe ein. Die Folge ist ein Wiederverengen (Restenose) des geweiteten Gefäßsegments. Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von Restenose mit einer erhöhten Menge zirkulierendem MCP1 korreliert. Eine Restenose trat vor allem bei Patienten auf, bei denen sich die MCP1-Konzentration 14 Tage nach dem Eingriff nicht normalisiert hatte (Cipollone *et al.*, 2001).

Chemokine und ihre Rezeptoren sind in den meisten Tumoren überexprimiert (Conti und Rollins, 2004). So wurde z.B. eine erhöhte MCP1-Expression in Krebszellen von Brustkrebspatientinnen beschrieben (Ueno *et al.*, 2000). Weiterhin zeigten Loberg *et al.*,

dass MCP1 in die Rekrutierung von Monozyten involviert ist, welche die Tumorentwicklung unterstützen (Loberg *et al.*, 2007). Es wurde zudem beschrieben, dass Endothelzellen des Knochenmarks vermehrt MCP1 sezernieren, was wiederum die Migration und Proliferation von Prostata-Krebs-Zellen reguliert (Loberg *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006). Monozyten spielen eine essentielle Rolle bei der Tumor-Angiogenese (Polverini *et al.*, 1977; Connolly und Rose, 1998), was MCP1 durch seine Monozyten rekrutierende Funktion zu einem wichtigen Faktor im Laufe dieses Geschehens macht. So konnte ein Zusammenhang zwischen der MCP1-Expression und fortschreitender Angiogenese und damit einhergehend einer schlechten Prognose bei Brustkrebspatientinnen beschrieben werden (Ueno *et al.*, 2000).

Das human immunodeficiency virus (HIV) infiziert Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen durch Bindung an den CD4-Rezeptor. Da Monozyten und Makrophagen die Hauptquellen für MCP1 darstellen und durch dessen vermehrte Produktion weitere Immunzellen anlocken, werden diese infizierten Zellen – und das von ihnen sekretierte MCP1 - als bedeutender Faktor zur Verbreitung der Krankheit angesehen (Cinque *et al.*, 1998). So konnte festgestellt werden, dass die Plasma MCP1-Level mit der Stärke der Virus-Level korrelieren (Weiss *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass die MCP1-Level in Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) von HIV-Patienten, die an einer Enzephalitis leiden, signifikant erhöht sind (Cinque *et al.*, 1998).

Weiterhin sind erhöhte MCP1-Level in Serum und CSF ein frühes Ereignis im Zuge der Entwicklung der Alzheimerschen Erkrankung (Alzheimer-Demenz, AD). So konnte gezeigt werden, dass sowohl die MCP1-Level im Serum als auch in CSF von Patienten mit leichter kognitiver Störung (*Mild Cognitive Impairment*, MCI) und in einem frühen Stadium der AD erhöht sind (Galimberti *et al.*, 2006 a, b). Patienten mit fortgeschrittener AD zeigen keine erhöhten MCP1-Serum-Level (Galimberti *et al.*, 2003; Fenoglio *et al.*, 2004). Allerdings konnten in CSF von MCI-Patienten und auch von Patienten mit fortgeschrittener AD vermehrte MCP1-Level nachgewiesen werden (Galimberti *et al.*, 2006 b). Sowohl im Serum als auch in CSF von MCI- oder AD-Patienten korreliert die MCP1-Menge umgekehrt proportional mit der Schwere der Erkrankung (Galimberti *et al.*, 2006 a, b).

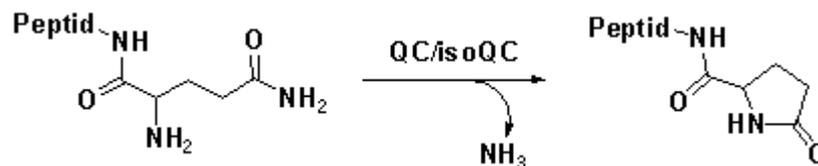
Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MCP1 *in vitro* die Migration von Mikrogliazellen induziert (Luster, 1998). Mikrogliazellen sind Zellen des Nervengewebes, deren Aufgabe

in der Erkennung und Beseitigung potentieller pathogen wirkender Substanzen im Gehirn besteht, da Antikörper die Blut-Hirn-Schranke kaum passieren können (Lassmann *et al.*, 1990). MCP1 konnte sowohl in Mikrogliazellen als auch in senilen Plaques von AD Patienten immunohistochemisch nachgewiesen werden (Ishizuka *et al.*, 1997).

#### 1.4 Die Glutaminylzyklasen QC und isoQC

Glutaminylzyklasen (QCs) sind im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet. Die erste QC wurde 1963 aus der tropischen Pflanze *Carica papaya* isoliert (Messer, 1963) und später konnte das Enzym auch in Säugetieren nachgewiesen werden (Fischer und Spiess, 1987). Die fehlenden Sequenzhomologien (Dahl *et al.*, 2000) weisen auf separate evolutionäre Ursprünge der pflanzlichen und tierischen QCs hin. Dennoch sind sie in ihrer Funktionsweise ähnlich, werden auf sekretorischem Wege exprimiert und besitzen ein Molekulargewicht von 33-40 kDa (Pohl *et al.*, 1991).

QCs katalysieren die intramolekulare Zyklisierung von N-terminalem Glutamin (N1Q) zu Pyroglutamat (N1pE) (Abbildung 1.2) und sind unter anderem an der Reifung von Peptidhormonen beteiligt.



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der Zyklisierung eines N-terminalen L-Glutaminrestes zu L-Pyroglutamat.

Die im Zuge der Zyklisierungsreaktion entstehende Lactamgruppe ist im physiologischen pH-Bereich nicht protoniert. Aminopeptidasen und einige Exoproteasen benötigen eine protonierte Aminogruppe für die Substratbindung, so dass der entstehende 5-Oxo-L-Prolin-Rest den N-Terminus eines Proteins vor proteolytischer Degradierung schützt (Morty *et al.*, 2006). Weiterhin beeinflusst die Bildung eines N-terminalen Pyroglutamats beispielsweise die Faltung einiger Proteine, wie z.B. von Onconase (Liao *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2006). Für einige andere Proteine, wie dem Thyreotropin Releasing Hormon (TRH) oder MCP2 konnte gezeigt werden, dass der aminoterminal Pyroglutamatrest die Bindung an spezifische Rezeptoren vermittelt (Goren *et al.*, 1977; Van Coillie *et al.*, 1998). Analysen von Genpolymorphismen in verschiedenen Patientenpopulationen deuten auf eine Verbindung des QC-Gens (QPCT) mit der Entstehung von Osteoporose (Ezura *et*

*al.*, 2004) und Bluthochdruck (Yamada *et al.*, 2007) hin. Zudem konnte eine signifikant erhöhte QC-Genexpression in Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden (Batliwalla *et al.*, 2005). N-terminal zyklisierte Peptide sind weiterhin in eine Reihe von neuropathologischen und inflammatorischen Prozessen involviert (Saido *et al.*, 1995; Ogata *et al.*, 1997; Charo und Taubman, 2004).

Im Jahre 2008 wurde ein Isoenzym der humanen QC identifiziert, welches nicht in löslicher Form sezerniert wird, sondern als Typ2-Transmembranprotein im Golgi-Apparat verbleibt (Cynis *et al.*, 2008). Dieses Enzym, isoQC oder auch QPCTL (*glutaminyl peptide cyclotransferase-like enzyme*) genannt, wird ubiquitär exprimiert. Zwischen der humanen isoQC (h-isoQC) und der humanen QC (hQC) besteht eine 45 %ige Sequenzidentität. Zu den unterschiedlichen Funktionen von QC und isoQC bei der Zyklisierung von physiologischen Proteinen ist noch nicht viel bekannt. Beide Enzyme katalysieren den Umsatz eines breiten Substratspektrums, unterscheiden sich aber in Bezug auf ihre Gewebeverteilung. Genexpressionsanalysen in Geweben der Maus zeigten eine differentielle Expression der QC mit einer erhöhten Konzentration in neuronalen Geweben. Im Gegensatz dazu wird die isoQC der Maus relativ gleichmäßig in allen getesteten Organen und Geweben exprimiert (Cynis *et al.*, 2008). So kann spekuliert werden, dass beide Enzyme innerhalb verschiedener Gewebe unterschiedliche Funktionen erfüllen und aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation in der Zelle den Umsatz verschiedener Substrate katalysieren.

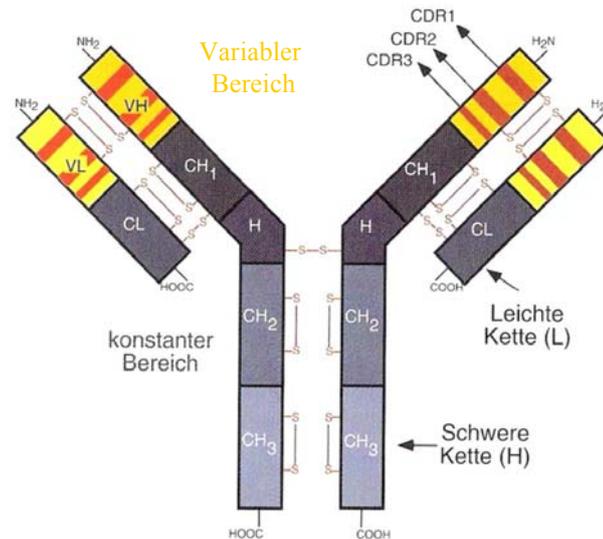
Während isoQC konstitutiv exprimiert wird, ist eine erhöhte QC-Expression in Monozyten zu verzeichnen, wenn diese mit inflammatorischen Stimuli behandelt werden (unveröffentlichte Daten, Dr. Astrid Kehlen, Probiobdrug AG). Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt wurde, sind Monozyten die Hauptproduzenten der CC-Chemokine und deren Expression wird ebenfalls durch inflammatorische Stimuli induziert (Deshmane *et al.*, 2009). So kann postuliert werden, dass aufgrund eines vermehrten Substratangebotes die QC-Expression unter bestimmten, gegebenenfalls pathophysiologischen Bedingungen erhöht wird.

Zur Analyse der QC- und isoQC-Aktivität an einem ausgewählten Substrat, wie z.B. MCP1, kann man sich spezifische Antikörper zu Nutze machen, die eine Unterscheidung zwischen dem Protein mit N-terminalem Glutamin (MCP1 N1Q) bzw. Pyroglutamat (MCP1 N1pE) ermöglichen.

#### 1.4 Monoklonale Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, sind von B-Lymphozyten produzierte Proteine, die den Körper wirksam gegen Viren, bakterielle Toxine, Mikroorganismen und auch größere Parasiten schützen. Sie sind eine der Haupt-Protein-Komponenten des Bluts, wo sie etwa 20 % des Massenanteils aller Plasma-Proteine ausmachen. Heute sind Antikörper außerdem zu einem wichtigen Werkzeug in Industrie und Forschung geworden. Aus der medizinischen Forschung, der Diagnostik und Therapie sind Antikörper nicht mehr wegzudenken. So wurde z.B. die Behandlung von Krebspatienten und Personen, die an chronischen Entzündungen wie Rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn leiden, durch den Einsatz monoklonaler Antikörper revolutioniert. Aber auch in der Diagnostik, z.B. durch deren Einsatz im *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), sind sie unverzichtbar.

Antikörper bestehen aus je zwei identischen leichten und schweren Ketten, welche durch nicht-kovalente Wechselwirkungen und intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 1.3). Die einzelnen Domänen einer Kette werden zusätzlich durch intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Die beiden leichten Ketten besitzen ein Molekulargewicht von ca. 25 kDa, die beiden schweren Ketten von ca. 55 kDa. Jede Immunglobulin-Kette trägt am aminoterminalen Ende eine etwa 110 Aminosäuren lange variable Region. Bei den leichten Ketten folgt eine etwa ebenso lange konstante Region, die der schweren Ketten ist drei- bis viermal so lang. Jede Kette besteht aus mehreren Domänen: eine leichte Kette besitzt eine variable Domäne ( $V_L$ ) und eine konstante Domäne ( $C_L$ ). Eine Schwere Kette weist eine  $V_H$ -Domäne und 3 (IgG, IgA, IgD) bzw. 4 (IgM, IgE)  $C_H$ -Domänen auf. Die Spezifität eines Antikörpers wird hauptsächlich durch drei hypervariable Sequenzabschnitte, die sogenannten *complementary determining regions* (CDRs), innerhalb der variablen Region definiert.



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der Struktur eines IgG-Antikörpers. Der Antikörper besteht aus je zwei identischen leichten und schweren Ketten, die durch intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die einzelnen Domänen einer Kette werden zusätzlich durch intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Jede Antikörperkette besteht aus einer variablen Domäne (gelb) und einer bzw. drei- bis vier konstanten Domänen (grau). Die CDRs innerhalb des variablen Bereiches sind rot gekennzeichnet. (Geändert aus: Dingermann, T. (1999): Gentechnik, Biotechnik).

Die leichten Antikörperketten sind entweder vom Typ  $\lambda$  oder  $\kappa$ , wohingegen die schweren Ketten in fünf verschiedenen Varianten vorkommen:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  und  $\epsilon$ . Anhand der Art der schweren Kette lassen sich die Immunglobuline der Klasse IgM, IgD, IgG, IgA oder IgE zuordnen. IgG-Antikörper sind die Hauptklasse der Immunglobuline im Blut. Sie werden in großen Mengen während der sekundären Immunantwort, d.h. ca. 3 Wochen nach der Erstinfektion, produziert. Die humanen IgG-Immunglobuline setzen sich aus vier verschiedenen Subklassen zusammen: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Maus-IgG-Antikörper werden dagegen in die Subklassen IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 differenziert. IgG-Antikörper sind in der Lage das Complement-System zu aktivieren und binden über den Fc-Teil an spezifische Fc-Rezeptoren z.B. auf Makrophagen und Neutrophilen Zellen.

Polyklonale Antikörper sind ein Gemisch aus verschiedenen Antikörpern, die von verschiedenen B-Zellen produziert wurden und gegen unterschiedliche Epitope desselben Antigens gerichtet sind. Monoklonale Antikörper dagegen stammen vom selben B-Lymphozyten, tragen denselben Subtypen und erkennen dasselbe Epitop.

Für die meisten Anwendungen ist die Verwendung eines polyklonalen Antikörpergemisches nicht geeignet, da es aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Immunglobuline auch zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen kann. Es ist zwar möglich, einen bestimmten Antikörper aus einem polyklonalen Gemisch zu isolieren, jedoch erwies sich ein solches Verfahren als sehr aufwendig. Milstein und Köhler beschrieben 1975 erstmals ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper (Köhler und Milstein, 1975). Dabei werden Mäuse zunächst mit dem entsprechenden Antigen immunisiert, nach Entwicklung der Immunantwort erfolgt dann die Isolierung der B-Lymphozyten aus der Milz. Um diese *in vitro* vermehren zu können, werden sie durch Fusion mit Myelomzellen immortalisiert. Einige der so gewonnenen Hybridomazellen produzieren den Antikörper der gewünschten Spezifität. Nach Identifizierung dieser Zellen können sie kultiviert und zur Herstellung einer theoretisch beliebigen Menge der gewünschten Immunglobuline verwendet werden.

Einige auf diesem Weg hergestellte monoklonale Maus-Antikörper wurden bereits gut charakterisiert und haben im Tiermodell therapeutische Effekte z.B. gegen Tumorzellen gezeigt. Eine Therapie im Menschen ist jedoch problematisch, da das Immunsystem eines Patienten humane anti-Maus-Antikörper bildet (HAMA-Immunantwort) (Schroff *et al.*, 1985). Diese verhindern eine nochmalige Behandlung, da die Antikörper des Patienten die Maus-Antikörper neutralisieren würden, noch bevor diese ihr Ziel erreichen. Um die Spezifität der monoklonalen Antikörper dennoch nutzen zu können, werden in vielen Anwendungen chimäre Antikörper eingesetzt. Hier wurden die konstanten Regionen des Maus-Antikörpers durch humane Sequenzen ersetzt, der variable Teil des murinen Antikörpers bleibt dagegen unverändert (Boulianne *et al.*, 1984). So werden heute z.B. die chimären Antikörper „Erbix“ zur Behandlung von Darmkrebs (Saltz *et al.*, 2004) oder „Rituxan“ gegen das Non-Hodgkin's Lymphom (Vose *et al.*, 2001) eingesetzt. Im Jahre 1986 wurde weiterführend dazu ein Verfahren zur Herstellung humanisierter Antikörper entwickelt (O'Brien und Jones, 1986). Solche Antikörper bestehen nahezu vollständig aus der humanen Antikörpersequenz, lediglich die CDRs werden gegen die der Maus-Antikörper ausgetauscht. Die so generierten chimären oder humanisierten Antikörper können bei unveränderter Spezifität therapeutisch im Menschen eingesetzt werden, ohne eine Immunreaktion gegen den Antikörper auszulösen. Beispiele hierfür sind die humanisierten Antikörper „Avastin“ zur Behandlung von Darmkrebs (Miller *et al.*, 2005) oder „Herceptin“ zur Behandlung von Brustkrebs (Marty *et al.*, 2005).

### **1.5 Therapeutische Ansätze zur Behandlung inflammatorischer Erkrankungen mit anti-MCP1-Antikörpern**

Durch seine Rolle innerhalb des Immunsystems ist MCP1 in eine Vielzahl entzündlicher Krankheiten involviert. In diesem Kapitel sollen ausgewählte Erkrankungen vorgestellt werden, in denen erste Behandlungsansätze mit anti-MCP1-Antikörpern durchgeführt wurden und erfolgsversprechend erscheinen.

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) ist ein Sammelbegriff für Erkrankungen der Lunge mit ähnlicher Symptomatik. Mediziner sprechen von einer COPD, wenn eine oder mehrere der folgenden Lungenkrankheiten vorliegen: chronisch obstruktive Bronchitis, Lungenemphysem oder eine chronische Bronchitis mit asthmatischer Komponente. Die meisten COPD-Patienten sind Raucher. Als weitere Auslöser sind Infektionen, die zunehmende Verschmutzung der Atemluft durch organischen oder anorganischen Staub sowie Dämpfe von Biokraftstoffen zu nennen. Eine seltene Ursache für das Lungenemphysem ist ein vererbter Gendefekt, welcher einen Mangel an Alpha-1-Antitrypsin bedingt. Zur medikamentösen Behandlung einer COPD stehen derzeit Bronchodilatoren, Kortison, schleimlösende Mittel, Antitussiva oder Antibiotika zur Verfügung. In fortgeschrittenen Stadien der COPD hat außerdem eine Sauerstoff-Therapie lebensverlängernde Wirkung bewiesen. Zurzeit ist die COPD weltweit die fünfthäufigste Todesursache, Schätzungen zufolge wird die Erkrankung allerdings im Jahre 2020 vermutlich die dritthäufigste Todesursache sein.

Genexpressionsanalysen zeigten eine vermehrte MCP1-Expression in dendritischen Zellen und alveolären Makrophagen im Zuge einer COPD (D'hulst *et al.*, 2005; Woodruff *et al.*, 2005; Heguy *et al.*, 2006). Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die MCP1-Protein-Level in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BAL) und im Auswurf von COPD-Patienten erhöht sind (Capelli *et al.*, 1999; Traves *et al.*, 2002). Zudem sind die BAL und der Auswurf von COPD-Patienten durch eine vermehrte Anzahl an Leukozyten und Makrophagen gekennzeichnet (Keatings und Barnes, 1997; Barnes, 2000). Die erhöhte MCP1-Expression ist vermutlich der entscheidende Auslöser für die Anlockung von Immunzellen, vor allem Makrophagen. Die vermehrte Makrophagen-Konzentration wiederum intensiviert die inflammatorische Reaktion durch den Ausstoß chemotaktischer Faktoren, die Neutrophile anlocken (Traves *et al.*, 2002). Schließlich konnte in einer Studie des Fraunhofer Instituts gezeigt werden, dass der monoklonale anti-MCP1-Antikörper ABN912 den Endotoxin-vermittelten Einstrom von Monozyten in den

bronchoalveolären Raum um 50 % verringern kann (Jahresbericht 2006, Fraunhofer ITEM).

Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der körpereigene Immunzellen die Myelinscheiden der Nervenzellfortsätze angreifen. Da das gesamte zentrale Nervensystem (ZNS) befallen sein kann, werden durch die Krankheit ganz unterschiedliche neurologische Symptome hervorgerufen, wie z.B. Sehstörungen, Taubheitsgefühle in Armen und/oder Beinen sowie Lähmungserscheinungen. Bei ca. 80 % der MS-Fälle treten zu Beginn typische akute Schübe auf, die sich daraufhin jeweils vollständig oder unvollständig wieder zurückbilden. Deutschlandweit geht man von 122.000 MS-Patienten aus (Hein und Hopfenmüller, 2000). MS ist nicht heilbar, zur Linderung der Symptome werden derzeit vor allem Immunsuppressiva verabreicht um die Entzündungsreaktionen im ZNS zu mildern.

Die Pathologie von MS ist durch Läsionen der Blut-Hirn-Schranke gekennzeichnet, woraufhin Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten in das ZNS eindringen und inflammatorische Prozesse induzieren. Dabei scheinen vor allem Makrophagen eine wesentliche Rolle bei der Zerstörung der Myelinscheiden zu spielen (De Groot *et al.*, 1997). In immunohistochemischen Untersuchungen von Astrozyten der Läsionen von MS-Patienten konnte ein hohes MCP1-Vorkommen nachgewiesen werden, was vermutlich für die Infiltration der Immunzellen verantwortlich ist (McManus *et al.*, 1998; Van der Voorn *et al.*, 1999). Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine der menschlichen MS ähnliche Erkrankung des ZNS, die in Labor-Tieren durch Injektion von Bestandteilen des Myelins hervorgerufen wird. So konnte in einem Ratten-EAE-Modell gezeigt werden, dass eine vermehrte MCP1- und CCR2-Genexpression im ZNS in engem Zusammenhang mit EAE-Schüben steht (Jee *et al.*, 2002). Karpus und Kennedy bewiesen in einem Maus-EAE-Modell, dass die Applikation eines polyklonalen anti-MCP1-Antikörpers die Schwere eines EAE-Schubes signifikant mildert (Karpus und Kennedy, 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CCR2- und MCP1 *knock out* Mäuse resistent gegen die Induktion einer EAE sind (Izickson *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001).

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung. Für diese Krankheit wird eine autoimmune Ursache angenommen, wobei körpereigene Immunzellen Gelenkstrukturen wie z.B. Knorpelgewebe angreifen. Weltweit sind etwa 0,5-1 % der Bevölkerung betroffen, in Deutschland schätzt man die Zahl der Erkrankungen

auf 800.000. RA ist nicht heilbar, zur medikamentösen Behandlung werden derzeit Schmerzmittel, cortisonfreie Entzündungshemmer, Glukokortikoide und Basistherapeutika eingesetzt. Zudem erwies sich die Therapie mit monoklonalen anti-TNF $\alpha$ -Antikörpern, wie dem chimären Antikörper „Remicade (Infliximab)“ (Maini *et al.*, 1999) oder dem humanen Antikörper „Adalimumab (Humira)“ (Schiff *et al.*, 2006) als erfolgreich.

Die Krankheit ist durch eine vermehrte Infiltration von Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten in die Gelenke gekennzeichnet, was zu einer Aktivierung der dortigen synovialen Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoklasten führt. Diese sekretieren wiederum weitere inflammatorische Mediatoren, was letztendlich zur Zerstörung von Knorpel- und Knochengewebe führt. Eine erhöhte MCP1-Expression ist vermutlich ein wesentlicher Auslöser für die Infiltration von Immunzellen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die MCP1-Proteinkonzentration in den Kniegelenken von Ratten, in denen eine Arthritis induziert wurde, erhöht ist (Liu *et al.*, 2005). In weiteren Tiermodellen konnte durch Applikation der antagonistischen MCP1-Mutante P8A-MCP1 (Shahrara *et al.*, 2008), eines monoklonalen anti-MCP1-Antikörpers (Ogata *et al.*, 1997) und des MCP1-Antagonisten MCP1(9-76) (Gong *et al.*, 1997) mehrfach bewiesen werden, dass die Inhibierung von MCP1 die RA-Symptomatik deutlich verbessert. Weiterhin wurde gezeigt, dass RA-Patienten erhöhte MCP1-Level in Synovial-Flüssigkeit (SF) und Serum aufweisen (Yao *et al.*, 2006). Rantapää-Dahlqvist *et al.* haben eine Studie durchgeführt, in welcher die MCP1-Level in Seren von Personen bestimmt wurden, die Jahre später eine RA entwickelten. Dabei entdeckte man bei diesen Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen eine signifikant erhöhte MCP1-Expression (Rantapää-Dahlqvist *et al.*, 2007).

Eine klinische Studie mit dem anti-MCP1-Antikörper ABN912 zeigte allerdings keinen bis hin zu einem nachteiligen Einfluss auf das Fortschreiten von RA (Haringman *et al.*, 2006). Dieser hoch affine anti-MCP1-Antikörper bindet wahrscheinlich neben den freien MCP1-Mengen auch die Proteine, die an die extrazelluläre Matrix der vaskulären Kompartimente gebunden und somit immobilisiert vorliegen. Dies resultierte innerhalb von 30 Minuten in einem bis zu 2000fachen Anstieg der löslichen MCP1-Level im Blut.

Die bisher durchgeführten Antikörper-basierenden Behandlungsansätze der hier vorgestellten Krankheiten wurden mit neutralisierenden Antikörpern durchgeführt, die nicht spezifisch an den zyklisierten N-Terminus des Proteins binden. Die besondere Struktur am N-Terminus von MCP1 ist vermutlich essentiell für dessen proteolytische

Stabilität und Rezeptorbindung. Dipeptidylpeptidase IV (DP4) ist eine prolinspezifische Exoprotease, welche als potentielles Enzym für den Abbau von MCP1 N1Q in humanem Serum identifiziert wurde (Cynis *et al.*, 2010, in Vorbereitung). Es konnte gezeigt werden, dass MCP1 nach Entstehung des N-terminalen Pyroglutamats vor Proteolyse durch DP4 geschützt ist (Cynis *et al.*, 2010, in Vorbereitung). Wie in Abschnitt 1.2 bereits erwähnt wurde, ist der N-Terminus von MCP1 von entscheidender Bedeutung für die Rekrutierung von Immunzellen (Gong und Clark-Lewis, 1995). Jede artifizielle Verlängerung bzw. Verkürzung führte zu einer Einschränkung oder zum Verlust der chemotaktischen Potenz. Um die biologische Funktion des zyklisierten N-Terminus von MCP1 zu untersuchen sind zwei völlig neue Ansätze interessant. Zum Einen könnte die Inhibierung der N-terminalen Zyklisierung von MCP1 zu einer vermehrten proteolytischen Spaltung am N-Terminus führen, was wiederum in einem Verlust der chemotaktischen Aktivität resultiert. Zum Anderen ist die Untersuchung des therapeutischen Potentials eines anti-MCP1 N1pE-Antikörpers von Interesse. Solch ein Antikörper blockiert gezielt die Interaktion der N-terminalen Aminosäuren des MCP1 mit seinem Rezeptor CCR2. Die anti-MCP1 N1pE-Antikörper können sowohl diagnostisch als auch therapeutisch Verwendung finden.

### 1.6 Aufgabenstellung

Obwohl MCP1 eines der am besten charakterisierten CC-Chemokine darstellt, ist über die Funktion des zyklisierten N-Terminus hinsichtlich proteolytischer Stabilität und Rezeptorbindung wenig bekannt. Der N-Terminus von MCP1 ist von entscheidender Bedeutung für dessen Rezeptorbindung und somit für die Rekrutierung von Immunzellen, wie z.B. Monozyten. Er entsteht durch Abspaltung des Signalpeptides, woraus ein reifes Protein mit der N-terminalen Aminosäure Glutamin (MCP1 N1Q) hervorgeht. Dieses Glutamin kann entweder auf enzymatischem Weg durch QCs oder unter bestimmten physikochemischen Bedingungen auch spontan zu Pyroglutamat zyklisieren, wodurch MCP1 N1pE entsteht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des N-terminalen Pyroglutamats von MCP1 auf dessen Aktivität *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Dazu war es zunächst notwendig, Informationen über den Einfluss von QCs auf die Zyklisierung von MCP1 zu erhalten. Dies geschah durch den Einsatz eines QC/isoQC-Inhibitors in geeigneten *in vitro* Zellkulturmodellen. Weiterführend dazu war die Anwendung des QC/isoQC-Inhibitors *in vivo* in einem inflammatorischen Maus-Modell geplant.

Sowohl zum quantitativen Nachweis der zyklisierten Form von MCP1 als auch zur

Anwendung in funktionellen/therapeutischen Fragestellungen war geplant, anti-MCP1 N1pE-spezifische Antikörper zu generieren. Diese Antikörper sollten in Vorbereitung auf deren Einsatz in *in vitro* und *in vivo* Experimenten hinreichend charakterisiert werden. Dies betrifft im Einzelnen 1. deren Genotypisierung, 2. die Untersuchung von Kreuzreaktivitäten und 3. die Ermittlung thermodynamischer Parameter der Antigen-Antikörper-Bindung. Voraussetzung für die Durchführung der geplanten Experimente war die Herstellung genügend großer Mengen der anti-MCP1 N1pE-Antikörper. Aus diesem Grund sollten die Kultivierungsbedingungen der antikörperproduzierenden Hybridomazellen optimiert werden, um eine maximale Ausbeute an Antikörper zu erzielen. Zudem sollte die Isolierung des Antikörpers aus dem Hybridomazellkulturüberstand etabliert und optimiert werden.

Die so erhaltenen anti-MCP1 N1pE-Antikörper wurden dann hinsichtlich ihrer neutralisierenden Wirkung *in vitro* und *in vivo* analysiert. Dazu war deren Einsatz im THP1-Migrationsassay sowie im inflammatorischen Maus-Modell geplant. Sollten sich die anti-MCP1 N1pE-Antikörper als wirksamer Inhibitor der MCP1-CCR2-Rezeptorinteraktion erweisen, so würde dies die Möglichkeit einer therapeutischen Anwendung in MCP1 relevanten Krankheitsbildern wie z.B. Arteriosklerose und Krebs eröffnen.

Weiterhin stellen die anti-MCP1 N1pE-Antikörper eine Grundlage zur Etablierung von ELISAs zur quantitativen Detektion von MCP1 N1pE in biologischen Proben aus Mensch, Maus und Ratte dar. Um den prozentualen Gehalt von MCP1 N1pE einer Probe bestimmen zu können, sollte zudem ein vergleichbarer ELISA zur Ermittlung der jeweiligen Gesamt-MCP1-Konzentration etabliert werden. Um zu bestätigen, dass die entwickelten ELISAs zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse liefern, war weiterhin eine Validierung der Assays notwendig. Zudem war geplant ein Epitopmapping der Detektionsantikörper des total MCP1 ELISAs durchzuführen. So lassen sich Rückschlüsse darauf ziehen, welche Sequenzen von MCP1 im total MCP1 ELISA erkannt werden.

Sowohl für die ELISAs als auch für weitere in dieser Arbeit durchzuführenden Experimente werden die Proteine hMCP1, mMCP1 und rMCP1 benötigt. Aus diesem Grund sollte die Expression und Reinigung der Proteine SUMO-hMCP1, SUMO-mMCP1 und SUMO-rMCP1 etabliert und optimiert werden.

## 2 Methoden

Die verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte, Enzyme, Kits, Marker, Softwareprogramme, Puffer, Lösungen, Medien und Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet.

### 2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Sterilisation

Geräte, Kulturgefäße und Medien wurden vor ihrer Benutzung für 20 Minuten (Min) bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzeempfindliche Medien und Chemikalien, wie z.B. Biotin wurden sterilfiltriert. Nach Beendigung der Versuche erfolgte eine Sterilisation aller Geräte und Medien, die mit rekombinanten Tier-, Hefe- oder Bakterienzellen in Kontakt gekommen waren.

#### 2.1.2 Lagerung von Bakterien- und Hefestämmen

Nach Anzucht der *P. pastoris*-Klone über Nacht in BMGY-Medium, wurden diese mit 20 % (v/v) Glycerol versetzt. *E. coli*-Klone wurden mit 8 % (v/v) Glycerol versetzt, nachdem eine Über-Nacht-Kultur in LB-Medium angelegt wurde. Die Glycerolsuspensionen wurden bei – 80 °C eingefroren.

#### 2.1.3 Isolation von RNA

Die Isolierung der Hybridomazell-RNA erfolgte aus  $2 \times 10^6$  Zellen analog dem Protokoll des *NucleoSpin® RNA II Purification Kit* von Macherey Nagel.

#### 2.1.4 cDNA-Synthese

Bei der Synthese von cDNA wird aus RNA mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* eine komplementäre DNA-Kopie (engl.: *complementary DNA* oder cDNA) hergestellt. Diese spezifische RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt wie andere Polymerasen zum Start der Synthese einen Primer, welcher an die RNA bindet. Oligo(dT)-Primer verpaaren sich mit dem langen Poly(A)-Abschnitt, den man am 3'-Ende der meisten mRNAs findet. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Oligo(dT)-Primer verwendet, um gezielt die Gene zu amplifizieren, die in mRNA transkribiert werden. Da die ursprüngliche Matrize eine prozessierte RNA war, die u.a. das *Splicing* schon durchlaufen hat, finden sich auf der cDNA im Gegensatz zu natürlichen eukaryotischen DNAs keine

Introns.

Zur cDNA-Synthese wurden zunächst folgende Komponenten zusammengegeben:

**Tabelle 2.1a:** Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur Synthese von cDNA

Komponente	Menge
Template-RNA (1 µg)	x µl
Oligo(dT)-Primer (500 µg/ml)	1 µl
Nukleotidmix (10 mM)	1,5 µl
H <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 12 µl

Nach Inkubation für 5 Min bei 65 °C und anschließend 60 Sekunden (s) bei 4 °C wurden weiterhin zugegeben:

**Tabelle 2.1b:** Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur Synthese von cDNA

Komponente	Menge
5 x <i>First-Strand Buffer</i> (Invitrogen)	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
H <sub>2</sub> O	1 µl
SuperScript™ II Reverse Transkriptase (200 Units/µl)	1 µl

Dieser Ansatz wurde zur Synthese des cDNA-Stranges für 50 Min bei 42 °C inkubiert. Durch einen anschließenden Inkubationsschritt für 15 Min bei 70 °C erfolgte die Deaktivierung der Polymerase. Sämtliche Inkubationsschritte wurden in einem PCR-Sprint-Gerät der Firma Hybaid durchgeführt.

### 2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Methode der PCR (*polymerase chain reaction*; Mullis *et al.*, 1986) wird eine ausgewählte DNA-Sequenz gezielt amplifiziert. Der zu amplifizierende Bereich der DNA wird dabei von zwei bekannten Sequenzen flankiert, an welche sich während der Reaktion komplementäre Primer anlagern. Die verwendeten Primer stammen von der Firma Metabion (Martinsried) und sind im Anhang aufgelistet. Zur Amplifikation der variablen Kettenfragmente der anti-MCP1 N1pE-Antikörper kam je ein Primer zum Einsatz, der am konstanten Bereich der schweren bzw. leichten Kette bindet (MKC für die leichte Kette, MHCG1 bzw. MHCG2b für die schwere Kette). Dieser wurde mit verschiedenen Primern

kombiniert, die an die variablen Bereiche der Antikörperketten binden (MKV1 - MKV11 für die leichte Kette, MHV1 – MHV12 für die schwere Kette). Da die Antikörper 4B8 und 2C9 einen unterschiedlichen Isotyp besitzen, kamen zur Amplifikation des konstanten Bereiches der schweren Antikörperketten unterschiedliche Primer zum Einsatz (MHCG1 für 4B8, MHCG2b für 2C9). Die Sequenzen der variablen Antikörper-Regionen, an die sich die Primer anlagern, sind nicht vollständig konserviert. Aus diesem Grund wurden zur Amplifikation der variablen Fragmente sogenannte degenerierte Primer verwendet. Diese Primer bestehen an bestimmten Positionen aus einem Mix aus ähnlichen, aber nicht identischen Oligonukleotiden. Die *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) hat zur Beschreibung der variierenden Basen eine Code-Tabelle erstellt, die es ermöglicht, die Variation von 2 bis 4 Nukleinsäuren mit einem Buchstaben zu beschreiben. Tabelle 2.2 zeigt die Code-Tabelle der Nukleobasen.

**Tabelle 2.2:** Symbole der fünf Nukleobasen der DNA und RNA, sowie weitere Symbole variierender Nukleobasen. Herausgegeben von der IUPAC (Quelle: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html> )

Code	Beschreibung
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
R	Purine (A oder G)
Y	Pyrimidine (C, T oder U)
M	C oder A (Aminogruppe)
K	T, U oder G (Ketogruppe)
W	T, U oder A
S	C oder G
B	C, T, U oder G (nicht A)
D	A, T, U oder G (nicht C)
H	A, T, U oder C (nicht G)
V	A, C oder G
N	Jede Base (A, C, G, T, oder U)

Bei der Amplifizierung der Antikörperketten kam die Phusion-Polymerase aus dem Phusion High-Fidelity PCR Kit (Fa. NEB, Schwalbach) zur Anwendung. Diese Polymerase bildet PCR-Produkte mit glatten Enden, was die anschließende Klonierung des PCR-Produktes in pJET1.2/blunt ermöglicht (siehe 2.1.7). Zunächst wurde in einem kleinen Volumen (15  $\mu$ l) überprüft, welche Primerpaare für die Amplifizierung geeignet sind. Diejenigen Primerpaare, mit denen ein PCR-Produkt erhalten werden konnte, wurden dann für eine erneute Amplifizierung im 50  $\mu$ l Maßstab eingesetzt. Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4 zeigen die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das Programm für die DNA-Amplifikation im 50  $\mu$ l Volumen. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem Master Cycler von Eppendorf bzw. einem Cycler der Firma Bio-Rad durchgeführt.

**Tabelle 2.3.:** Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur Amplifikation der variablen Antikörper-Regionen

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Template-DNA (50 ng/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
5'-Primer (forward-Primer) (20 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
3'-Primer (reverse-Primer) (20 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Nukleotidmix 10 mM	1 $\mu$ l
5 x Phusion HF Puffer	10 $\mu$ l
Phusion-Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	36 $\mu$ l

Für unterschiedliche PCR-Reaktionen wurden auch verschiedene Temperaturprogramme gewählt (Tabelle 2.2.).

**Tabelle 2.4.:** Exemplarisches PCR-Temperaturprogramm für eine Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der Phusion-Polymerase.

\* Die Annealing-Temperaturen wurden variiert, die optimalen Temperaturen wurden zum Teil mittels Gradienten-PCR ermittelt

<b>Zyklen</b>	<b>Schritt</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
1 Zyklus	Denaturierung	30 s	98 °C
15-30 Zyklen	Denaturierung	10 s	98 °C
	Annealing der Primer	30 s	60 °C*
	Extension	1 Min	72 °C
1 Zyklus	Finale Elongation	10 Min	72 °C

Nach der Polymerase-Kettenreaktion schloss sich eine Aufreinigung des PCR-Produkts an, welche mit dem *PCR Product Purification Spin Kit 50* von Genomed (Bad Oeynhausen) durchgeführt wurde.

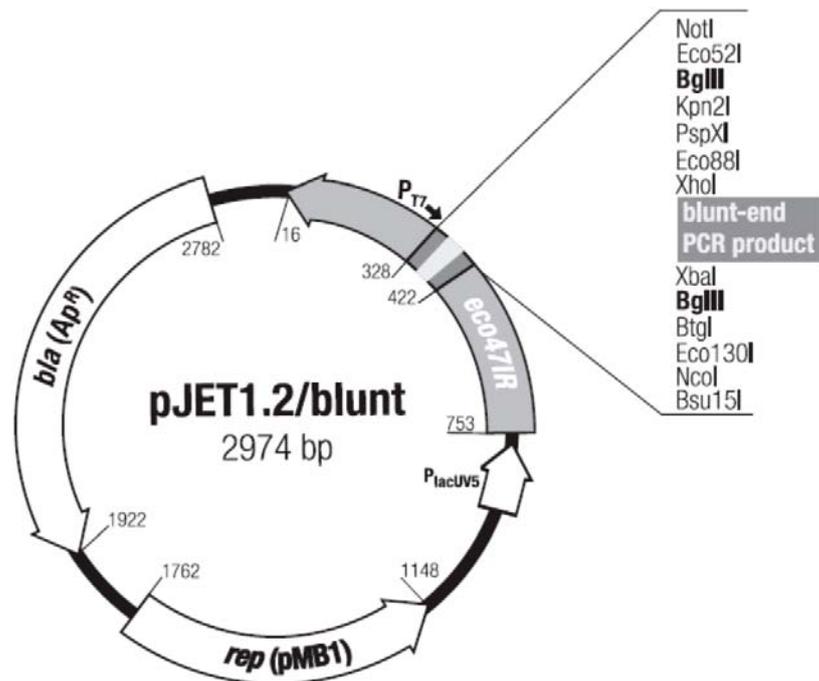
Das gereinigt PCR-Produkt wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

### **2.1.6 Agarosegelelektrophorese**

Für die Gelelektrophorese von DNA wurden je nach Größe des PCR-Produktes 0,8 %ige bis 2 %ige Agarosegele angefertigt. Für ein 0,8 %iges Agarosegel wurden 0,8 % (w/v) Agarose in 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. In die auf ca. 50-60 °C abgekühlte Agaroselösung wurde eine 1 %ige Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) im Verhältnis 1:50000 gegeben und daraufhin das Gel gegossen. Vor dem Auftragen der DNA in die Geltaschen wurde zu den Proben 6 x Beladungspuffer gegeben. Zusätzlich wurde als Referenz und Größenmarker immer ein 1 kb-Marker mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x TBE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 95 V über einen Zeitraum von ca. 30 Min. Die DNA-Banden wurden dann auf einem Transluminator sichtbar gemacht und fotografiert.

### **2.1.7 Ligation in pJET1.2/blunt**

Im Anschluss an die Polymerasekettenreaktion wurde die codierende Sequenz des variablen Antikörperbereichs in den linearisierten Vektor pJET1.2/blunt ligiert (Fa. Fermentas, St. Leon-Roth). Dieser Vektor ist 2974 Basenpaare groß und ermöglicht die Insertion eines DNA-Fragmentes mit glatten Enden, wie es nach Amplifikation mit der Phusion-Polymerase entsteht.



**Abbildung 2.1:** Vektorkarte des pJET1.2/blunt end – Vektors von Fermentas (CloneJet™ PCR Cloning Kit). Der Vektor beinhaltet diverse Restriktionsschnittstellen innerhalb der *Multiple Cloning Site* (MCS), unter anderem zwei für *Bgl* II auf beiden Seiten des Inserts. Zusätzlich befindet sich ein Ampicillin-Resistenzgen im Vektor (*bla*(Ap<sup>R</sup>)). Quelle: Instruction Manual CloneJet™ PCR Cloning Kit #1231, #1232, Fermentas.

Die Ligation erfolgte mittels CloneJet™ PCR Cloning Kit nach Protokoll des Herstellers. Der dafür verwendete Ligationsansatz ist in Tabelle 2.5 dargestellt.

**Tabelle 2.5:** Ligationsansatz für die Klonierung der variablen Antikörper-Regionen in den Vektor pJET1.2/blunt (CloneJet™ PCR Cloning Kit, Fermentas)

Komponente	Menge
PCR-Produkt (100ng/μl)	3 μl
pJET1.2/blunt Vektor (50ng/μl)	1 μl
T4-DNA Ligase (5 U/μl)	1 μl
2x Ligationspuffer	10 μl
H <sub>2</sub> O	5 μl

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte für 5-15 Min bei Raumtemperatur (RT).

### 2.1.8 Transformation (*E. coli*)

Nach der Ligation schloss sich die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen des

Stammes DH5 $\alpha$  mit dem entstandenen, rekombinanten Plasmid an. Dafür wurden 5  $\mu$ l Ligationsansatz in ein 50  $\mu$ l Aliquot an kompetenten Zellen gegeben und für 30 Min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 30-sekündiger Hitzeschock im 42 °C Wasserbad, eine 2-minütige Inkubation auf Eis und die Zugabe von 500  $\mu$ l vorgewärmten LB-Medium. Im Anschluss inkubierten die Zellen 1-2 h bei 37 °C im Schüttelinkubator. Danach wurden 100  $\mu$ l der Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit dem Selektiv-Antibiotikum Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

### 2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA

3 ml einer Bakteriensuspension wurden bei ca. 10000 x g für 3 Min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit dem „*QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit*“ von QIAGEN aufgearbeitet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 50  $\mu$ l sterilem Wasser aufgenommen.

### 2.1.10 DNA-Konzentrationsbestimmung

DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bei 260 nm bestimmt (Doppelsträngige DNA hat bei einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml eine OD<sub>260nm</sub> von 1,0).

### 2.1.11 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Nachdem die Plasmid-DNA isoliert wurde, fand ein Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *Bgl* II statt, um festzustellen, ob die Insertion der gewünschten DNA in den pJET-Vektor tatsächlich erfolgte. Es befinden sich zwei *Bgl* II Schnittstellen in der *multiple cloning site* (MCS) des pJET1.2/blunt-Vektors, jeweils kurz hinter dem 5'Ende und hinter dem 3'Ende des klonierten Inserts (siehe Abbildung 2.1). Die Ansätze für den Restriktionsverdau (siehe Tabelle 2.6) wurden für 1 h im 37 °C Brutschrank inkubiert.

**Tabelle 2.6.:** Ansatz für den Restriktionsverdau des Vektors pJET1.2/blunt (CloneJet™ PCR Cloning Kit, Fermentas) mit dem Enzym *Bgl* II

Komponente	Menge
Plasmid-DNA (80ng/ $\mu$ l)	3 $\mu$ l
<i>Bgl</i> II (10 000 U/ml)	0,3 $\mu$ l
10x NEBuffer 3 (NEB)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	5,7 $\mu$ l

### 2.1.12 Deglykosylierung

Deglykosylierungen wurden mittels *GlycoPro*<sup>TM</sup> *Enzymatic Deglycosylation Kit* (Fa. Prozyme) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### 2.1.13 Sequenzierung

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech AG in Konstanz durchgeführt.

### 2.1.14 Verwendete Programme zur Auswertung der Sequenzen

Zur Auswertung der Sequenzen wurden anschließend verschiedene Programme verwendet: Zum einen diente das *ExPASy Translate Tool* (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) der Übersetzung der Basen- in die Aminosäuresequenz. Zum anderen wurde der *ClustalW-Server* (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) zur *Alignment* der Sequenzen genutzt. Um DNA-Sequenzen in den jeweiligen reversen und/oder komplementären Strang umzuwandeln, wurde das Programm auf der Internetseite <http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html> verwendet. Weiterhin wurden im *NCBI Protein Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) die Identität der Basenfolge bestimmt. Zur Ermittlung der Aminosäuresequenz der konstanten Regionen wurden die Proteindatenbank <http://www.uniprot.org> verwendet. Verschiedene Proteinparameter, wie z.B. das Molekulargewicht und der molare Extinktionskoeffizient konnten mit Hilfe des Programmes auf <http://us.expasy.org/tools/protparam.html> bestimmt werden.

## 2.2 Methoden zur Proteinexpression in *P. pastoris* und *E. coli*

### 2.2.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Das Wachstum von *E. coli*- und Hefezellen wurde über die optische Dichte der Zellsuspension mit Hilfe des SmartSpec 3000 Spectrophotometers bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600nm</sub>) verfolgt.

### 2.2.2 Expression von SENP2<sup>363-589</sup> in *E. coli*

Die BL21-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid zur Expression des SENP2<sup>363-589</sup>-Fragmentes, wurden von David Ruiz-Carillo (Probiodrug AG) zur Verfügung gestellt. Zur Produktion der Protease SENP2<sup>363-589</sup> wurden 25 ml LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) in

einem 100 ml Schüttelkolben direkt aus einer Glycerinkultur angeimpft. Diese erste Vorkultur wurde bei 37 °C und 175 rpm für ca. 8 h geschüttelt. Anschließend wurde eine 2. Vorkultur, 200 ml LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) in einem 1 l Schüttelkolben, mit 1 ml aus der 1. Vorkultur überimpft und über Nacht bei 37 °C und 175 rpm inkubiert. Die Hauptkultur, 6 l LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) verteilt auf sechs 5 l Schüttelkolben, wurde so angeimpft, dass die  $OD_{600}$  ca. 0,2 betrug. Nachdem in der Hauptkultur eine  $OD_{600nm}$  von 0,8 erreicht wurde, erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von je 1 ml 1 M IPTG pro Kolben. Die Zellen wurden 4h nach der Induktion durch Zentrifugation (8000 rpm, 20 Min, 4 °C, Rotor JLA 8.1000, Beckman) geerntet und bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

### **2.2.3 Proteinexpression in *P. pastoris***

Die codierenden Sequenzen für SUMO-hMCP1, SUMO-mMCP1 und SUMO-rMCP1 wurden in den Hefeexpressionsvektor pPICZ $\alpha$ A cloniert. Der AOX1 (Alkoholoxidase 1)-Promotor, welcher den Genen der rekombinanten Proteine vorgeschaltet ist, ermöglicht deren Methanol-induzierte Expression. Zum Anlegen einer Vorkultur wurde BMGY – Medium mit dem jeweiligen Glycerolstock angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 120 rpm. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) bestimmt. Die Zellen wurden daraufhin so in BMMY-Medium gegeben, dass die  $OD_{600} = 1$  betrug. Durch das im BMMY enthaltene Methanol wird der AOX1-Promotor und somit die Expression der rekombinanten Proteine induziert. Die Schüttelkolbenexpression erfolgte bei 30 °C und 120 rpm. Nach 24 h und 48 h wurden jeweils 100 % Methanol so hinzugegeben, dass eine Endkonzentration von 0,5 % Methanol im Schüttelkolben erreicht wurde.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Verwendete Zelllinien

**Tabelle 2.7:** In dieser Arbeit verwendete Zelllinien, deren Spezies, Zelltyp, Herkunft und Kultivierungsmedium. Die MADB-Zellen wurden freundlicherweise von Stefan von Hörsten, Tierärztliche Hochschule Hannover, Abteilung für funktionelle und angewandte Anatomie, zur Verfügung gestellt. DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; CLS: Cell Lines Service, Eppelheim; ATCC: The Global Bioresource Center, Wesel

Zelllinie	Spezies	Art der Zellen	Herkunft	Kultivierungsmedium
THP1	Mensch	Monozyten	DSMZ, Braunschweig	RPMI 1640
A549	Mensch	Lungen- Adenokarzinom	CLS, Eppelheim	RPMI 1640
Hybridomazellen	Maus	Hybrid aus B- Lymphozyten- Tumorzellen und gesunden B- Lymphozyten	UNICUS OHG, Karlsburg	D-MEM
RAW264.7	Maus	Monozyten/ Makrophagen	CLS, Eppelheim	D-MEM
MADB	Ratte	Brustdrüsen- Adenokarzinom	Tierärztliche Hochschule Hannover, Abteilung für Funktionelle und Angewandte Anatomie	RPMI 1640

### 2.3.2 Langzeitlagerung von Hybridomazellen

Sobald Zellkulturen etabliert sind und die Verdopplungsrate stabil ist, können diese eingefroren werden. Dazu sollten sie eine Vitalität von ca. 90 % haben und frühestmöglich mit niedriger Passagennummer eingefroren werden. Hybridomazellen wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in 45 % *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (D-MEM), 45 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FBS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt, welches in ein mit Isopropanol befülltes Kryo-Einfriergerät von QUALIFREEZE gegeben wurde, um ein langsames Einfrieren von 1°/Min zu gewährleisten. Das Kryo-Einfriergerät wurde für maximal 48 h bei  $-80$  °C gelagert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

### **2.3.3 Auftauen von Hybridomazellen**

Tierzellen werden so schnell wie möglich im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in 5 ml vorgewärmtes Medium gegeben und sofort 5 Min bei 300 x g zentrifugiert. Durch Absaugen des Überstandes wurde das zellschädigende Frostschutzmittel DMSO entfernt werden. Das entstandene Zellpellet wurde in 5 ml frischem Medium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup> T-Flasche überführt.

### **2.3.4 Immunisierung von Mäusen zur Gewinnung antikörperproduzierender Hybridomazellen**

Hybridomazellen entstehen aus der Fusion von Zellen, die aus „unsterblichen“ Myelomzellen stammen mit einem monoklonalen Antikörper produzierenden B-Lymphozyten aus einer immunisierten Maus (Köhler und Milstein, 1975). Zur Produktion der monoklonalen anti-MCP1 N1pE-Antikörper wurden Hybridomazellen verwendet, die von der Firma UNICUS OHG (Fa. Karlsburg) bereitgestellt wurden.

Da die resultierenden Antikörper ausschließlich mit dem zyklisierten N-Terminus von MCP1 N1pE interagieren sollen, wurde zur Immunisierung das Antigen hMCP1 N1pE(1-9) verwendet. Um niedermolekulare Peptide, die selbst wenig oder nicht immunogen sind, in einen immunogenen Zustand zu überführen, ist die Kopplung an geeignete Trägerproteine notwendig. Aus diesem Grund wurde dem Antigen zusätzlich ein C-terminales Cystein angefügt (pE-P-D-A-I-N-A-P-V-C), um über dessen freie SH-Gruppe eine gerichtete Kopplung an das immunogene Trägerprotein BSA zu ermöglichen. Mit dem so generierten Antigen wurden weibliche BALB/c-Mäuse für 30 Tage (Kurzzeitimmunisierung) bzw. 120 Tage (Langzeitimmunisierung) immunisiert. Zur Gewinnung der Hybridoma-Primärkulturen wurden dann die Milzzellen der immunisierten Mäuse entnommen und durch Fusion mit der Myelomzelllinie SP2/0 immortalisiert. Die Selektion antikörperproduzierender Hybridomazellen erfolgte dabei durch Kultivierung in HAT-Selektionsmedium. Dieses Medium enthält die Substanzen Hypoxanthin (H), Aminopterin (A) und Thymidin (T). Hypoxanthin ist ein Purin-Derivat und kann für den Aufbau von Desoxyribonukleinsäure (DNA) verwendet werden. Dafür ist das Enzym HRPT essentiell. Es katalysiert die Synthese von Hypoxanthin und 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat zu Inosinat, einer Vorstufe von Adenosinmonophosphat (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP). Aminopterin inhibiert die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und blockiert damit die Purin-Neusynthese. Da dadurch auch das essentielle Thymin nicht mehr hergestellt werden kann, muss es dem Medium zugegeben werden. Die

Myelomzelllinie SP2/0 weist einen Defekt im Gen für HPRT auf und ist in Anwesenheit von Aminopterin nicht zur Purin-Synthese fähig. Die Milzzellen dagegen besitzen zwar das intakte Enzym HPRT, können allerdings in Zellkultur nicht lange überleben. So wird sichergestellt, dass sich ausschließlich Hybridomazellen in HAT-Medium vermehren können.

Die Überstände der Hybridoma-Primärkulturen wurden anschließend bezüglich ihrer Fähigkeit zur Bindung an das Antigen hMCP1 N1pE (1-38) mittels Oberflächenplasmonresonanz (siehe 2.5.1) getestet. Dabei wurden die Klone ausgewählt, die an hMCP1 N1pE (1-38), aber nicht an hMCP1 (3-38) binden.

### **2.3.5 Kultivierung von Hybridomazellen**

Die Hybridomazellen wurden in T-Flaschen beziehungsweise in Schüttelkolben bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Dem Kulturmedium D-MEM (+ L-Glutamin, + Na-Pyruvat, 4,5 g/l Glukose, Fa. Gibco) wurde vor Verwendung 15 % FBS, 1 % MEM-NEA (*non essential amino acids*, Fa. Gibco), 50 µg/ml Gentamycin (Fa. Gibco) sowie 50 µM β-Mercaptoethanol beigefügt. β-Mercaptoethanol wurde dazu jeweils frisch aus einer 50 mM Stammlösung entnommen, die mit D-MEM angefertigt wurde. Das Passagieren der Zellen fand in Abhängigkeit von der Zelldichte 2 mal wöchentlich statt. Die Zelldichte sollte nicht unterhalb  $0,3 \times 10^6$  Zellen/ml liegen und einen Wert von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml nicht überschreiten. Beim Passagieren von Hybridomazellen in T-Flaschen wurden adhärierende Zellen zunächst durch vorsichtiges Klopfen der Zellkulturflasche abgelöst. Nach Resuspendieren der Zellen konnte die Suspension zur Bestimmung der Zellzahl eingesetzt werden. Die Zellzahlbestimmung erfolgte am Casy<sup>®</sup> Zellzähler (Fa. Schärfe System GmbH). Hierfür wurden die Zellen zunächst 1 zu 10 in D-MEM verdünnt und 100 µl der Zellsuspension in 9900 µl Casyton (physiologische Kochsalzlösung) überführt. Mit einem elektronischen Zellzähler konnte dann der Anteil an toten und lebenden Zellen sowie die Gesamtzellzahl pro ml ermittelt werden. Die Zellen wurden dann mit einer Zelldichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml je nach Bedarf in T-Flaschen oder Schüttelkolben unterschiedlichen Volumens eingesät.

### **2.3.6 Optimierung der Hybridomazell-Kultivierung**

Zur Optimierung der Hybridomazell-Kultivierung erfolgte die Erstellung verschiedener Wachstumskurven. Dabei wurden die Zellen in 8 Wells einer 24-Wellplatte mit einer Zelldichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml in einem Volumen von 500 µl ausgesät. Die am Rand

befindlichen Wells wurden zum Schutz vor Verdunstung mit Medium befüllt. Anschließend wurde jeden Tag ein Well geerntet und die Zellzahl mittels Casy<sup>®</sup> Zellzähler bestimmt. Zusätzlich wurden Proben für die Glukosemessung und die Bestimmung der Antikörpermenge im Überstand entnommen.

Für die Wachstumskurven in Suspensionskultur erfolgte die Animpfung von einem 100 ml-Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen von 30 ml Zellsuspension, aus denen jeden Tag ca. 300 µl Proben entnommen wurden. Die Zelldichte betrug bei der Einsaat  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml, analog zur Wachstumskurve in der 24-Well-Platte.

Zur Medienoptimierung wurden verschiedene Medien (D-MEM, D-MEM/F12, RPMI von Invitrogen, Hybridomed von Biochrom) sowie Supplemente (L-Glutamin, Insulin, essentielle Aminosäuren, Vitamine) zu den Zellen gegeben und anschließend Wachstumskurven aufgenommen.

### **2.3.7 Glukose-Konzentrationsbestimmung im Zellkulturüberstand**

Zur Messung des Glukosegehalts im Zellkulturüberstand wurde der YSI 2700 SELECT<sup>™</sup> Biochemistry Analyzer von YSI Life Sciences (Yellow Springs, Ohio, USA) genutzt. Das Gerät benötigte dafür eine ca. 50 µl umfassende, zellfreie Probe des Überstandes. Die Bestimmung des Glukosegehaltes beruht dabei auf einer Enzym-Substrat-Reaktion. Vorhandene Glukose wird von dem Enzym Glukose-Oxidase in D-Glucono-β-Lacton sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt. Eine Elektrode im Gerät misst die dabei entstehende Spannungsänderung, welche proportional zum Glukosegehalt der Probe ist.

### **2.3.8 Untersuchung des Einflusses der QC-Inhibierung in Zellkulturmodellen**

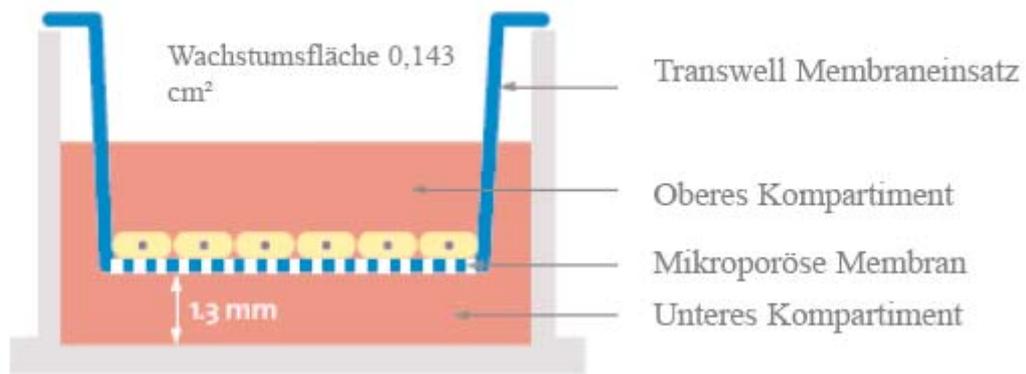
Zur Untersuchung der Wirksamkeit von QC-Inhibitoren in Mensch-, Maus- und Rattenzellen wurden die humane Zelllinie A549, die Maus-Zelllinie RAW264.7 und die Ratten-Zelllinie MADB verwendet. Die Zellen wurden in einer 96-Well-Platte mit einer Zellzahl von 40000 Zellen/Well (RAW264.7) bzw. 30000 Zellen/Well (A549 und MADB) in einem Endvolumen von 150 µl eingesät. Die Kultivierung von MADB- und A549-Zellen erfolgte in RPMI 1640-Medium (Fa. Invitrogen) mit 10 % FBS (Fa. Invitrogen) und 50 µg/ml Gentamycin (Fa. Invitrogen). RAW264.7-Zellen wurden in D-MEM (Fa. Invitrogen) mit 10 % FBS und 50 µg/ml Gentamycin inkubiert. Die Zellen wurden bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Der QC-Inhibitor wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in DMSO gelöst und je 1,5 µl zu den Zellen gegeben. Den Kontrollproben (ohne QC-Inhibitor) wurde ebenfalls 1,5 µl DMSO

appliziert. Dreißig Minuten nach der Inhibitorapplikation erfolgte die inflammatorische Stimulation der Zellen durch Zugabe von 10 ng/ml Lipopolysaccharide (LPS, Sigma) zu RAW264.7-Zellen, je 10 ng/ml Ratten Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (rTNF  $\alpha$ ) und Ratten Interferon  $\gamma$  (rIFN  $\gamma$ ) zu MADB-Zellen sowie je 10 ng/ml humanes Interleukin1  $\beta$  (hIL1  $\beta$ ) und humaner Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (hTNF  $\alpha$ ) zu A549-Zellen. Die inflammatorischen Stimulanzen wurden in Medium (RPMI 1640 bzw. D-MEM) auf eine Konzentration von 1  $\mu$ g/ml verdünnt und jeweils 1,5  $\mu$ l zur Zellsuspension gegeben. Nach 24 h erfolgte die Ernte des Zellüberstandes. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (5 Min, 300 x g, Swing Out Rotor, Beckman) wurde dieser von den Zellen getrennt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der total MCP1- bzw. MCP1 N1pE-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen nach den Protokollen in Tabelle 2.12, 2.13 und 2.14.

### **2.3.9 THP1-Migrationsassay**

MCP1 wirkt chemotaktisch auf Monozyten und stimuliert diese, entlang eines MCP1-Gradienten zum Ort der Entzündung zu migrieren. Aus diesem Grund wurde zur Überprüfung der biologischen Funktion des MCP1 im Migrationsassay die myelomonozytäre Zelllinie THP1 (*Human acute monocytic leukemia*) verwendet.

Zur Durchführung des Migrationsassays wurden Corning® Transwell™-Platten verwendet. Die Transwell-Platten ermöglichen durch eine mikroporöse Polycarbonatmembran (Porengröße 5,0  $\mu$ M) die räumliche Trennung der THP1-Zellsuspension im oberen Kompartiment von der hMCP1 N1pE-Suspension im unteren Kompartiment (siehe Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung des Aufbaus einer Transwell-Platte. Die Zellen befinden sich im oberen Kompartiment und werden durch ein stimulierendes Agens im unteren Kompartiment zur Migration durch die mikroporöse Membran angeregt.  
Quelle: User Manual Corning<sup>®</sup> HTS Transwell<sup>®</sup> -96 Zellkultursysteme

Humanes MCP1 wurde zunächst durch Zugabe von hQC, wie in 2.6.1 beschrieben, zu hMCP1 N1pE zyklisiert. Eine 100 µg/ml hMCP1 N1pE-Stammlösung wurde daraufhin auf verschiedene Konzentrationen zwischen 750 ng/ml - 1 ng/ml in RPMI Zellkulturmedium verdünnt. Diese hMCP1 N1pE-Lösungen wurden im Migrationsassay eingesetzt, um die hMCP1 N1pE-Konzentration zu ermitteln, die die maximale Zellmigration induziert. Je 600 µl dieser Lösungen wurden in das untere Kompartiment der Transwell-Platten gegeben und anschließend die Membraneinsätze darauf gesetzt. Auf die Membraneinsätze wurden dann 100 µl einer THP1-Zellsuspension mit  $1 \times 10^7$  Zellen/ml gebracht. Während einer folgenden Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C migrierten die Zellen zur hMCP1 N1pE-Quelle und passierten dabei aktiv die 5 µm großen Poren der Polycarbonatmembran. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl einer 70 mM EDTA-Lösung zur hMCP1 N1pE-Lösung gestoppt. Nach 15 minütiger Inkubation wurden die in das untere Kompartiment der Transwell-Platte migrierten Zellen am Casy<sup>®</sup> Zellzähler ermittelt.

Wirkt ein Antikörper neutralisierend, so wird die Bindung des MCP1 an den Rezeptor auf der THP1-Zelloberfläche verhindert. Dies unterbindet wiederum die Migration der Zellen zum Ort höchster MCP1 N1pE-Konzentration. Für die Bestimmung von ND<sub>50</sub>-Werten wurden verschiedene Verdünnungen der anti-MCP1 N1pE-Antikörper zu 20 ng/ml hMCP1 N1pE in RPMI gegeben und für 30 Min bei RT inkubiert. In dieser Zeit kam es zur Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe. Die Antigen-Antikörper-Lösungen wurden dann in das untere Kompartiment der Transwell-Platten gegeben und die Migrationsreaktion anschließend durch Zugabe der THP1-Zellen in das obere

Kompartiment gestartet.

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch das Detergenz SDS werden die Proteine denaturiert. Zudem wird die Eigenladung der Proteine durch die Anlagerung von SDS (ca. 1 Molekül pro 1,6 Aminosäuren) überdeckt, so dass die Bewegungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld weitgehend von der Molekülgröße abhängt. Für die reduzierende Elektrophorese wurden die Proben mit 4 x SDS-Probenpuffer (Roti®-Load 1, BioRad) im Verhältnis 1:3 (v/v) versetzt und einige Minuten bei 95 °C inkubiert.

Zur Durchführung der nicht-reduzierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese kam ein Probenpuffer ohne Reduktionsmittel (250 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau) zur Anwendung. Dieser war 5fach konzentriert und wurde im Verhältnis 1:5 (v/v) mit der Probe versetzt. Vor Probenauftrag auf das Polyacrylamidgel wurden die Proben für 30 Min bei 30 °C leicht geschüttelt.

Die Proteintrennung erfolgte in einem 12 % bzw. 17,5 % igen Polyacrylamidgel, in einer mit Laufpuffer gefüllten Gelkammer bei einer konstanten Spannung von 200 V.

**Tabelle 2.8.:** Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels

Chemikalien	Sammelgel (3 %)	Trenngel (12 %)	Trenngel (17,5 %)
H <sub>2</sub> O	4,85 ml	3,95 ml	1,9 ml
500 mM Tris/HCl, pH 6,8	1,85 ml	-	-
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	-	2,80 ml	2,80 ml
Acrylamid	0,75 ml	4,50 ml	6,50 ml
10 % SDS	150 µl	225 µl	225 µl
10 % APS	40 µl	60 µl	60 µl
TEMED	12 µl	18 µl	18 µl

Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte durch Inkubation (10-60 Min) in einer Färbelösung (Serva Blue W), anschließend wurde das Gel in 10 % Essigsäure entfärbt.

### 2.4.2 Western Blot

Die Methode des Western Blottings bietet den großen Vorteil, dass das gesuchte Zielprotein samt zugehörigem Molekulargewicht aus einer komplexen Proteinmischung detektiert werden kann (Towbin *et al.*, 1979). Beim Western Blot wird die Proteinmischung zunächst über SDS-PAGE aufgetrennt und daraufhin mit Hilfe einer halbtrocken arbeitenden Blot-Apparatur auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Bevor der Nachweis der auf der Membran gebundenen Proteine mittels Antikörper erfolgt, werden freie Bindungsstellen der Membran durch Inkubation mit Blocking-Lösung (5 % Milchpulver (w/v) in TBS-Tween) gesättigt. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an das Antigen. Danach wurde ein sekundärer Antikörper zugegeben, welcher spezifisch an den konstanten Bereich des primären Antikörpers bindet und mit Meerrettich-Peroxidase (*Horse radish Peroxidase*, HRP) bzw. Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt ist. In Abhängigkeit vom verwendeten Enzym gibt es zwei Detektionsmöglichkeiten, colorimetrisch oder chemilumineszent. Bei der colorimetrischen Detektion katalysiert die alkalische Phosphatase die Umsetzung der Farbsubstrate BCIP und NBT. Bei der chemilumineszenten Detektion katalysiert die Peroxidase die Umsetzung von Luminol zu seiner oxidierten Form, wobei Lumineszenz nachgewiesen werden kann.

In Tabelle 2.9 sind die einzelnen Arbeitsschritte zur Durchführung eines Western Blots übersichtlich zusammengestellt.

**Tabelle 2.9:** Zusammenstellung der Arbeitsschritte zur Durchführung eines Western Blots

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Dauer / Bedingungen</b>	
SDS-PAGE	Siehe 2.4.1	
Blotten	90 Min bei 0,8 mA / cm <sup>2</sup>	
	Aufbau: 1 Filterpapier äquilibriert in Anoden-Puffer 1 1 Filterpapier äquilibriert in Anoden-Puffer 2 Nitrozellulosemembran äquilibriert in H <sub>2</sub> O SDS-Gel 1 Filterpapier äquilibriert in Kathoden-Puffer	
Blocken	1 h bis über Nacht in 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-Tween	
Primärer Antikörper	1 h bis über Nacht, gelöst in 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-Tween, Konzentration nach Empfehlung des Hersteller (2 µg/ml – 100 ng/ml)	
Waschen	3 x 10 Min mit TBS-Tween	
Sekundärer Antikörper	1 h Inkubationszeit, gelöst in 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-Tween, Verdünnung nach Angaben des Herstellers	
Waschen	3 x 10 Min mit TBS-Tween	
Entwicklung	<b>Alkalische Phosphatase</b>	<b>Meerrettich-Peroxidase</b>
	5 Min Äquilibrieren mit AP-Puffer	in Dunkelkammer: Auflegen eines Röntgenfilmes auf die Nitrocellulosemembran, den Film in Entwickler tauchen, mit H <sub>2</sub> O waschen und dann in Fixierer tauchen, danach nochmals mit H <sub>2</sub> O waschen und trocknen
	66 µl NBT + 33 µl BCIP in 10 ml AP-Puffer lösen, auf Nitrocellulosemembran auftragen und im Dunkeln entwickeln	

### 2.4.3 UV/VIS-Spektroskopie

Proteine absorbieren im ultravioletten Spektralbereich Licht, bedingt durch die Peptidbindungen, aromatische Seitenketten und Cysteinreste. Für die Absorption bei 280 nm spielen nur die beiden aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie Disulfidbrücken eine Rolle. Obwohl Lage und Intensität des Absorptionsspektrums auch von der Umgebung abhängen in der sich die aromatischen Aminosäuren befinden, lässt sich der Absorptionskoeffizient eines Proteins mit hinreichender Genauigkeit aus der

Aminosäuresequenz berechnen. Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280\text{nm}}$  eines Proteins ergibt sich nach Wetlaufer *et al.*, 1962 aus folgender Summe:

$$\epsilon_{280\text{nm}} [\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}] = a \cdot \epsilon_{\text{Tyr}} + b \cdot \epsilon_{\text{Trp}} + c \cdot \epsilon_{\text{Cys-S-S-Cys}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

$$\epsilon_{\text{Tyr}} = 1280 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{Trp}} = 5690 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{Cys-S-S-Cys}} = 120 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

a, b und c sind die Anzahl der im Protein vorhandenen Tyrosin- und Tryptophanreste sowie Disulfidbrücken.

Die Konzentrationen gereinigter Proteine wurden mit Hilfe eines UV-Spektrometers UV 1 von Thermo Spectronic bestimmt. Dabei wurde das UV-Spektrum für den Wellenlängenbereich von 240 nm bis 340 nm aufgenommen. Die Proteinkonzentration ließ sich aus der Absorption bei 280 nm unter Zuhilfenahme des Extinktionskoeffizienten ermitteln. Dabei sollte allerdings beachtet werden, dass die tatsächliche Absorption einer Proteinlösung bei 280 nm durch Streulichteffekte beeinträchtigt werden kann, welche z.B. durch Aggregatbildung hervorgerufen werden. Ist dies der Fall, so macht sich das entstehende Streulicht bei einer Wellenlänge von 320 nm bemerkbar, da das Protein hier nicht mehr absorbiert. Aus diesem Grund wurde der  $A_{280}$ -Wert um den  $A_{320}$ -Wert korrigiert.

Der molare Extinktionskoeffizient lässt sich aus der Aminosäuresequenz mit Hilfe des ExPASy-Tools Prot Param errechnen ([us.expasy.org](http://us.expasy.org)). Die molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{280\text{nm}}$  aller im Verlauf dieser Arbeit exprimierten Proteine sind in Tabelle 2.10 zusammengestellt.

**Tabelle 2.10:** Zusammenstellung der molaren Extinktionskoeffizienten der im Verlauf dieser Promotionsarbeit exprimierten Proteine.

Protein	$\epsilon_{280\text{nm}} [\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}]$
SUMO-hMCP1	9970
SUMO-mMCP1	11460
SUMO-rMCP1	12950
hMCP1	8480
mMCP1	9970
rMCP1	11460
Anti-MCP1 N1pE-Antikörper 2C9	247710
Anti-MCP1 N1pE-Antikörper 4B8	244480
SEN2 <sup>363-589</sup>	41160

#### 2.4.4 Methoden zur Isolierung und Konzentrierung von rekombinanten Proteinen

##### 2.4.4.1 Zellaufschluss von Bakterien

Der Zellaufschluss wurde mittels Hochdruckdispersion mit dem Gerät *French*<sup>®</sup> *Press* von Thermo Scientific durchgeführt. Dazu wurde das Zellmaterial aus 6 Liter Schüttelkultur in 50 ml Puffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 7,6) gelöst und die Zellen mit einem Druck von 1000 bar aufgeschlossen. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (20.000 rpm, 60 Min, 4 °C, Rotor JA 25.50, Beckman) konnte das rekombinante Protein SEN2<sup>363-589</sup> aus dem Überstand gereinigt werden.

##### 2.4.4.2 Metall-Chelatchromatographie über NiNTA-Säulenmaterial

Die Isolierung der in *P. pastoris* exprimierten Proteine SUMO-hMCP1, SUMO-mMCP1, SUMO-rMCP1 und SEN2<sup>363-589</sup> erfolgte mittels Metall-Chelatchromatographie über NiNTA-Säulenmaterial. Dabei ermöglicht der *His*<sub>6</sub>-*Tag* am N-Terminus des SUMO-Proteins die Bindung an immobilisierte Nickel-Ionen. Die gesamte Affinitätschromatographie, sowie der Probenauftrag fanden am Äkta<sup>™</sup>Purifier (Fa. GE Healthcare, Uppsala) statt.

Zum Kulturüberstand wurden 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> zugegeben und ein pH-Wert von 7,5 - 7,8 eingestellt. Vor dem Probenauftrag wurde die NiNTA-Säule mit einem dreifachen Säulenvolumen Bindungspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 7,6) äquilibriert. Die Auftragung der Probe erfolgte mit einer Flussrate von 8 ml/Min. Nach Probenauftrag

wurden zunächst ungebundene Bestandteile durch einen Waschschrift mit Bindungspuffer entfernt. Anschließend wurden durch eine Imidazol-Konzentration von 50 mM (10 % Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,6)) unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die Elution des Zielproteins erfolgte im Fall von SUMO-hMCP1, SUMO-mMCP1, SUMO-rMCP1 in mehreren Stufen, d.h. die Imidazol-Konzentration wurde von 50 mM, über 250 mM auf 500 mM Imidazol schrittweise durch vermehrte Zugabe des Elutionspuffers (50 % und 100 % Puffer B) erhöht. Die Elution von SENP2<sup>363-589</sup> erfolgte bei 250 mM Imidazol (50 % Puffer B).

#### **2.4.4.3 Pufferaustausch mittels Entsalzungssäule**

Die Fraktionen, die das saubere Zielprotein nach Elution vom NiNTA-Säulenmaterial enthalten, weisen Imidazol-Konzentrationen zwischen 250 – 500 mM Imidazol auf. Zur Freisetzung von hMCP1, mMCP1 und rMCP1 werden die Fusionsproteine SUMO-hMCP1, SUMO-mMCP1, SUMO-rMCP1 später mit SENP2<sup>363-589</sup> behandelt. Um das Spaltprodukt SUMO und die Protease SENP2<sup>363-589</sup> von den reifen MCP1-Proteinen abzutrennen, müssen diese auf HisSpinTrap-Säulchen gegeben werden. In Vorbereitung dieses Arbeitsschrittes ist es notwendig, das in den Fraktionen enthaltene Imidazol vollständig zu entfernen. Die Entsalzung geschah mit Hilfe einer Entsalzungssäule (HiPrep 26/10 Desalting, GE Healthcare) am Äkta<sup>TM</sup>Purifier. Die Entsalzungssäule funktioniert nach dem Prinzip einer Gelfiltration, d.h. die kleinen Moleküle, wie z.B. Imidazol und Puffermoleküle, dringen in die Matrix ein und brauchen dadurch länger, um durch das Säulenmaterial zu gelangen, eluieren also später. Die Proteinmoleküle, die ein großes Molekulargewicht haben, umfließen die Matrix und eluieren damit früher.

Die Säule wurde vor dem Probenauftrag mit 1,5 Säulenvolumen Puffer (Für h-, m- und rMCP1: 20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6,0; für SENP2<sup>363-589</sup>: 50 mM Tris, 75 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 8,0) äquilibriert. Dieser Schritt ist wichtig, damit das Zielprotein gemeinsam mit dem gewünschten Puffer eluiert. Dann wurde die Probe aufgetragen und anschließend die Säule mit Puffer gespült. Die ersten Fraktionen, die dabei gesammelt wurden, enthielten das entsalztes Protein. In den danach folgenden Fraktionen waren die Moleküle des alten Puffers, z.B. Imidazol enthalten.

#### **2.4.4.4 Isolierung von monoklonalen Antikörpern über Protein G-Säulenmaterial**

Die im Zellkulturüberstand befindlichen Antikörper wurden mittels Affinitätschromatographie über eine Protein G-Säule (GE Healthcare, Uppsala)

aufgereinigt. Bei diesem Säulenmaterial ist das rekombinante Protein G an das Trägermaterial Agarose gekoppelt. Die gesamte Affinitätschromatographie fand am Äkta™Purifier (Fa. GE Healthcare) statt.

Protein G ist ein TypIII Fc-Rezeptor aus der Zellwand von Bakterien, welcher IgG-Moleküle an der Fc-Region und Albuminproteine binden kann. Dem rekombinanten Protein G im Säulenmaterial fehlt die Bindungsstelle für Albumin, was eine Antikörperreinigung aus FBS-haltigem Zellkulturüberstand möglich macht. Allerdings bindet Protein G neben Maus-IgG auch an die Fc-Region von Rinder-IgG. Aus diesem Grund wurde zur Kultivierung der Hybridomazellen *Ultra low IgG-FBS* (Fa. Invitrogen) verwendet, welches weniger als 5 µg/ml IgG enthält.

Um den Zellkulturüberstand für die Bindung an die Protein G-Säule vorzubereiten, wurde dieser zunächst 1:1 mit 2x Bindungspuffer (40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0) gemischt. Anschließend wurde die Protein G-Säule mit 1 x Bindungspuffer (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0) äquilibriert. Das Auftragen der Probe auf die Säule erfolgte durch die Probenauftragspumpe des Äkta™Purifiers P-950 mit einem Fluss von 4-8 ml/Min. Nachfolgend wurden durch Zugabe steigender Konzentrationen von Waschpuffer B (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, pH 7,0) zu Waschpuffer A (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0) über einen NaCl-Gradienten unspezifisch gebundene Komponenten von der Säule gewaschen. Im Anschluss daran fand die Elution des Antikörpers mit 0,1 M Glycin-HCl-Lösung (pH 2,7) statt. Durch die pH-Änderung lösten sich die gebundenen Immunglobuline vom Protein G. Um den pH-Wert in der Elutionsfraktion wieder zu neutralisieren, wurde nach der Elution sofort mit 1 M Tris-HCl, pH 9,0 gegentitriert.

#### **2.4.4.5 Pufferaustausch durch Dialyse**

Um den gereinigten Antikörper in den Aufbewahrungspuffer (150 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM KCl, pH 7,13) zu überführen, wurden ausgewählte Fraktionen dialysiert. Die Proteinlösung wurde dafür in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa gegen das 100fache an Puffervolumen über Nacht bei 8 °C unter ständigem Rühren inkubiert.

#### **2.4.4.6 Proteinkonzentrierung**

Nach Analyse der isolierten Proteine im SDS-Gel wurden ausgewählte Fraktionen vereinigt und mittels „VIVASPIN 20 ml CONCENTRATOR“-Röhrchen der Firma VIVASCIENCE (Ausschlussvolumen 30 kDa für Antikörper, bzw. 5 kDa für SUMO-

hMCP1, SUMO-mMCP1, SUMO-rMCP1 und SENP2<sup>363-589</sup>) durch Zentrifugation auf das gewünschte Volumen aufkonzentriert. Die Zentrifugation erfolgte bei 4 °C und 3500 x g in einem Swing-Out-Rotor der Firma Beckman (Fa. Palo Alto, USA).

#### **2.4.5 Ermittlung der Aktivität des SENP2<sup>363-589</sup>-Fragments**

Die Aktivitätsbestimmung des SENP2<sup>363-589</sup>-Fragments beruht auf der SENP2<sup>363-589</sup>-katalysierten Abspaltung von AMC von dem Substrat Acetyl-QTGG-AMC. Nach Abspaltung von Acetyl-QTGG wird AMC frei, welches bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm fluoresziert. Der zeitliche Verlauf der AMC-Freisetzung wurde am Plattenphotometer FLUOstar OPTIMA verfolgt. Zunächst wurde eine 20 mM Stammlösung des lyophilisierten Substrates durch Lösen in 100 % DMSO hergestellt. Diese wurde dann im Messpuffer (50 mM Tris, 5 mM DTT, 1 M Na<sub>2</sub>Citrat, pH 8,0) auf 500 µM verdünnt. Mikolajczyk *et al.*, konnten zeigen, dass die SENP2-Aktivität durch Zugabe von 1 M Na<sub>2</sub>Citrat bis zu 80fach erhöht wird (Mikolajczyk *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurde dem Messpuffer 1 M Na<sub>2</sub>Citrat beigelegt. Vor dem Starten der Messung im FLUOstar OPTIMA wurde die SENP2<sup>363-589</sup> zunächst mit Messpuffer verdünnt und bei 37 °C vorinkubiert. Die Enzymkonzentration sollte dabei so gewählt werden, dass während der gesamten Messzeit (15 Min) ein linearer Anstieg der AMC-Konzentration zu beobachten ist. Nach einer 10minütigen Inkubationszeit bei 37 °C wurde die 500 µM Substratlösung so zugegeben, dass die Endkonzentration 100 µM betrug und die Messung daraufhin sofort gestartet. Während der Messung im FLUOstar OPTIMA wird über 15 Min der zeitliche Verlauf der freigesetzten relativen fluoreszierenden Einheiten (RFU) bei 380/460 nm verfolgt.

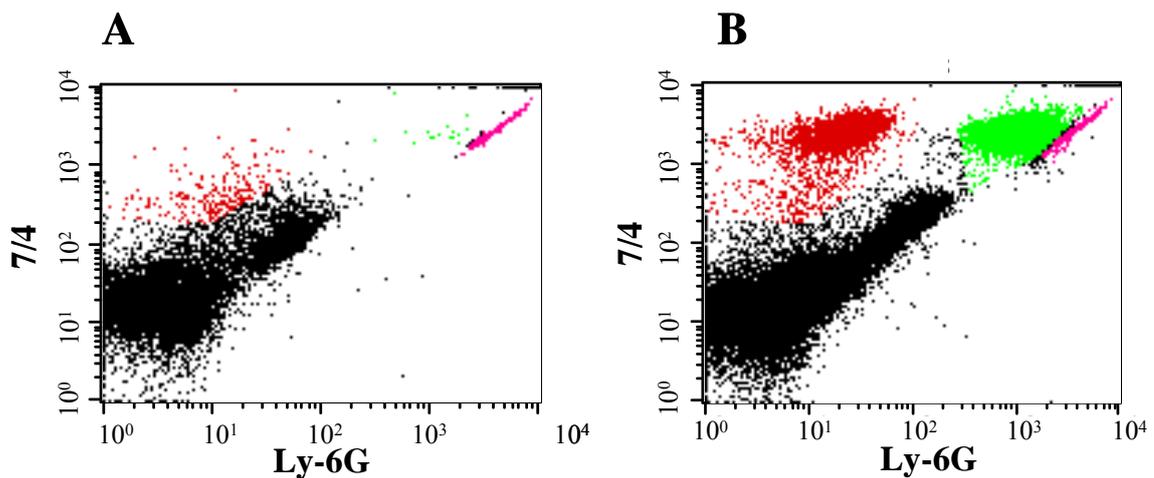
Mit Hilfe einer AMC-Standardkurve ließen sich aus den RFU die freigesetzten Mole AMC berechnen. Zur Erstellung dieser Standardkurve wurde die Fluoreszenz verschiedener AMC-Konzentrationen im Messpuffer ermittelt. Dafür wurde eine 0,1 M Stammlösung AMC in 100 % DMSO hergestellt und mit dem Puffer 50 mM Tris, 5 mM DTT, 1 M Na<sub>2</sub>Citrat, 0,5 % DMSO, pH 8,0 1:5000 verdünnt. Die AMC-Standardkurve wurde im Konzentrationsbereich zwischen  $2 \cdot 10^{-5}$  M und  $9,8 \cdot 10^{-9}$  M erstellt. 1 Unit ist diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen in 1 Min 1 µmol Substrat umsetzt. So ließen sich mit Hilfe der Standardkurve aus den erhaltenen RFU die Units und damit die spezifische Aktivität des SENP2<sup>363-589</sup>-Fragments berechnen.

### 2.4.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (auch FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Analyse) wurde am Gerät FACSCalibur™ (Fa. BD Biosciences) durchgeführt. Dieses Gerät ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. In dieser Arbeit wird die FACS-Analyse dazu verwendet, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern typische Strukturen auf der Zelloberfläche von Monozyten auf Einzelzellebene zu dokumentieren. Für die Analyse werden die Zellen in einer Einzelzellsuspension an einem Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm vorbeigeleitet, welcher die Fluoreszenz bestimmter Farbstoffe anregt. Mit der Durchflusszytometrie ist eine gleichzeitige Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische, Emissionsspektren verfügen.

Zur Bestimmung der Monozytenzahl pro ml Peritoneal-Lavageflüssigkeit (PLF) wurde zunächst 1 ml der Probe für 5 Min bei 300 x g zentrifugiert. Das entstehende Pellet, welches die Zellen aus dem Peritoneum enthält, wurde anschließend in 90 µl PBS, 3 % Rattenserum (Fa. PAA) gelöst. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 10 µl *FcR Blocking Reagent mouse* (Fa. Miltenyi Biotec), um die Antikörperbindungsstellen der Fc-Rezeptoren auf der Monozytenoberfläche abzusättigen. Nach 15minütiger Inkubation bei 4 °C erfolgte die Zugabe von je 10 µl der Antikörper 7/4-FITC (MCA771F, AbD Serotec, 0,1 mg/ml) und anti-Ly-6G-PE (Fa. Miltenyi Biotec). Dabei steht FITC für den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiocyanat und PE für Phycoerythrin. Ly-6G ist ein Zelloberflächen-Glycoprotein, welches besonders auf Maus-Granulozyten, aber in geringeren Mengen auch auf Maus-Monozyten vorhanden ist. So wird die Möglichkeit gegeben, aufgrund der unterschiedlich starken Färbung durch den anti-Ly-6G-Antikörper, zwischen Granulozyten- und Monozytenpopulationen zu unterscheiden (siehe Abbildung 2.3). Der Antikörper 7/4-FITC interagiert mit einem Antigen auf der Zelloberfläche von Neutrophilen und Monozyten. Durch die gemeinsame Anwendung beider Antikörper in der FACS-Analyse lassen sich aus dem heterogenen Immunzell-Gemisch in der PLF gezielt die Monozytenpopulationen identifizieren (Henderson *et al.*, 2003; Tsou *et al.*, 2007). Die Zellen wurden anschließend für 15 Min bei RT im Dunkeln inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe 10 x konzentrierter *FACS Lysing Solution* (Fa. BD Biosciences), um die eventuell in der Lavageflüssigkeit enthaltenen Erythrozyten zu lysieren. Nach 10minütiger Inkubation bei RT im Dunkeln wurde das Gemisch für 7 Min

bei 300 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und in ein Trucount-Gefäß (BD TruCOUNT Tubes, Fa. BD Biosciences) überführt. In diesem Gefäß befindet sich eine bekannte Menge an fluoreszierenden Beads. Durch Resuspendieren der Beads in der Probe erhält diese einen internen Standard. Die Monozytenzahlen in der PLF können dann durch Normierung der zellulären Fluoreszenzereignisse auf die Bead-Fluoreszenzereignisse quantitativ ermittelt werden. Die Messung erfolgt so lange, bis 5000 fluoreszierende Beads erfasst wurden. Die bis zu diesem Zeitpunkt detektierte Monozytenzahl entspricht demnach der Zellzahl in 1 ml Lavagflüssigkeit pro 5000 Beads. Abbildung 2.3 zeigt exemplarisch das Ergebnis der FACS-Analyse von Monozyten in Maus-PLF nach Markierung durch die Antikörper 7/4-FITC und anti-Ly-6G-PE. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit dem Programm CellQuest™Pro (Fa. BD Biosciences).



**Abbildung 2.3:** Diagramm einer FACS-Analyse von Monozyten in Maus-PLF nach Markierung durch die Antikörper 7/4-FITC und anti-Ly-6G-PE. **A** – unbehandeltes Tier, **B** – Intraperitoneale Injektion von 2 g/kg Thioglykolat. Die rot dargestellte Zellpopulation entspricht den Monozyten ( $7/4^{\text{high}}$ ,  $\text{Ly-6G}^{\text{medium}}$ ). Bei der grün dargestellten Zellpopulation handelt es sich um Granulozyten ( $7/4^{\text{high}}$ ,  $\text{Ly-6G}^{\text{high}}$ ). Die rot dargestellten Punkte entsprechen den fluoreszierenden Beads aus den Trucount-Gefäßen.

## 2.5 Methoden zur biophysikalischen Charakterisierung

### 2.5.1 Bindungsanalysen der Antikörper mittels Plasmonresonanz

Die Analyse der Aktivität der anti-MCP1 N1pE-Antikörper erfolgte mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Technik (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) unter Benutzung des Biacore 3000. Dieses Gerät ermöglicht die Messung der Bildung und Auflösung biologischer Komplexe aufgrund der Änderung des Brechungsindex in einer dünnen Pufferschicht oberhalb des Sensorchips. Die Oberflächenplasmonresonanz-Technik wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die Bindung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper an hMCP1 N1pE(1-38) und weitere humane Peptide zu untersuchen. Im Zuge der Optimierung der Antikörperproduktion wurden die Antikörper-Mengen im Hybridoma-Zellkulturüberstand quantifiziert sowie in den Elutionsfraktionen nach der Antikörperaufreinigung detektiert.

#### 2.5.1.1 Kopplung eines CM5-Chips

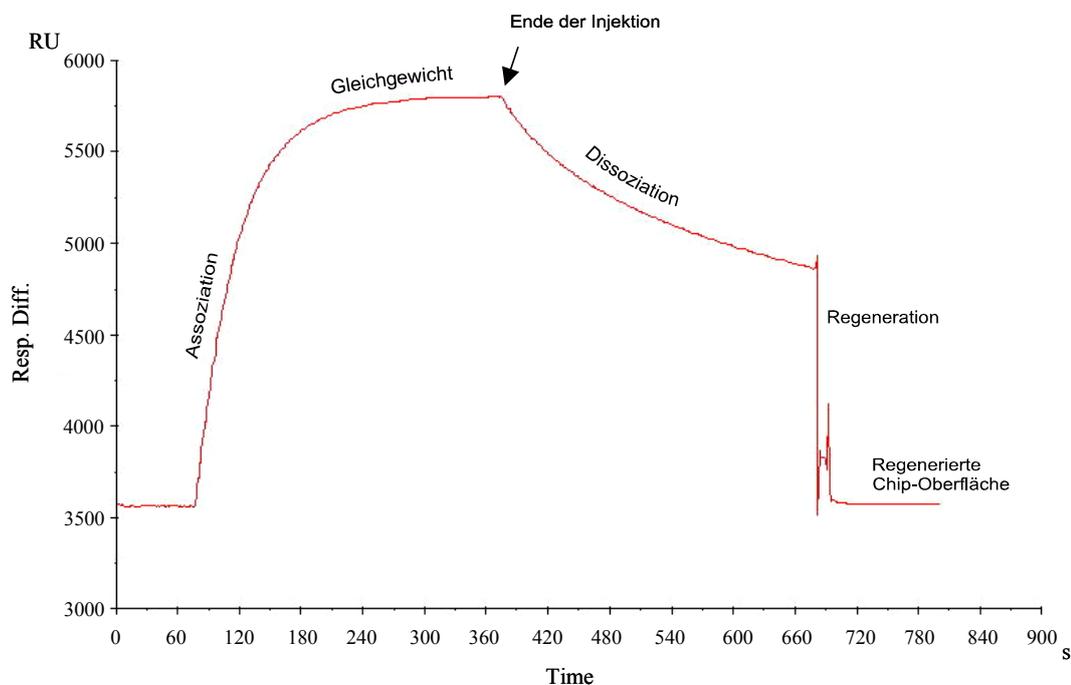
Um ein Peptid wie hMCP1 N1pE(1-38) an einen CM5-Sensorchip zu koppeln, muss dieser zunächst aktiviert werden. Dazu wurden die Amin-Kopplungsreagenzien 0.4 M 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid (*EDC*) und 0.1 M N-Hydroxysuccinimid (*NHS*) im Verhältnis 1:1 gemischt und mit einem Fluss von 10 µl/Min für 8 Min über den CM5-Chip gegeben. Danach erfolgte die kovalente Bindung von ca. 100 *Response Units* (RU) des Antigens. Im Fall von hMCP1 N1pE(1-38) erfolgte dies über das C-terminale Lysin des Peptides. Die Deaktivierung der restlichen reaktiven Gruppen auf der Chip-Oberfläche erfolgte durch Zugabe von 1 M Ethanolamin-HCL, pH 8,5 für 7 Min.

#### 2.5.1.2 Bindungsstudien der anti-MCP1 N1pE-Antikörper an verschiedene Peptide

Für die Bindungsstudien kamen CM5-Chips zum Einsatz, die entweder mit ca. 100 RU humanem hMCP1 N1pE(1-38), beziehungsweise mit weiteren humanen Peptiden konjugiert wurden. Die Messung erfolgte mit HBS-EP Puffer (Fa. Biacore) als Laufpuffer mit einer Flussrate von 30 µl/Min. Die monoklonalen Antikörper wurden zur Analyse in Laufpuffer verdünnt.

Zur Ermittlung der Basislinie lief für ca. 70 s Laufpuffer durch Referenz- und Messflusszelle. Anschließend erfolgte die Injektion von 150 µl Antikörperlösung für 300 s. Während dieser Assoziationsphase bindet der Antikörper an das Antigen der Messflusszelle. Als Referenz wurde eine unmodifizierte Flusszelle verwendet, die nicht

spezifisch mit den anti-MCP1 N1pE-Antikörpern interagieren sollte. Das Signal der unmodifizierten Referenzzelle wurde vom Signal der Messflusszelle subtrahiert. Dadurch wird eine Beeinflussung des Messsignals durch unspezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche minimiert. Nach Abschluss der Injektion erfolgte die erneute Zugabe des Laufpuffers zu den Flusszellen. In dieser Phase erfolgt die Dissoziation des Antikörpers vom Antigen. Schließlich wurde der Biacore CM5-Chip durch die kurze Injektion von 0,1 M HCl regeneriert, was die Entfernung der verbliebenen Antikörper bewirkte. Die Auswertung der Bindungsdaten erfolgte mit Hilfe des Programms BIAevaluation (Fa. Biacore, Freiburg). Verfolgt man grafisch die Änderung der RU während der einzelnen Injektionsphasen, so erhält man ein typisches Sensorgramm. Abbildung 2.4 zeigt beispielhaft die Charakteristik der Bindung des anti-MCP1 N1pE-Antikörpers 2C9 an hMCP1 N1pE(1-38).



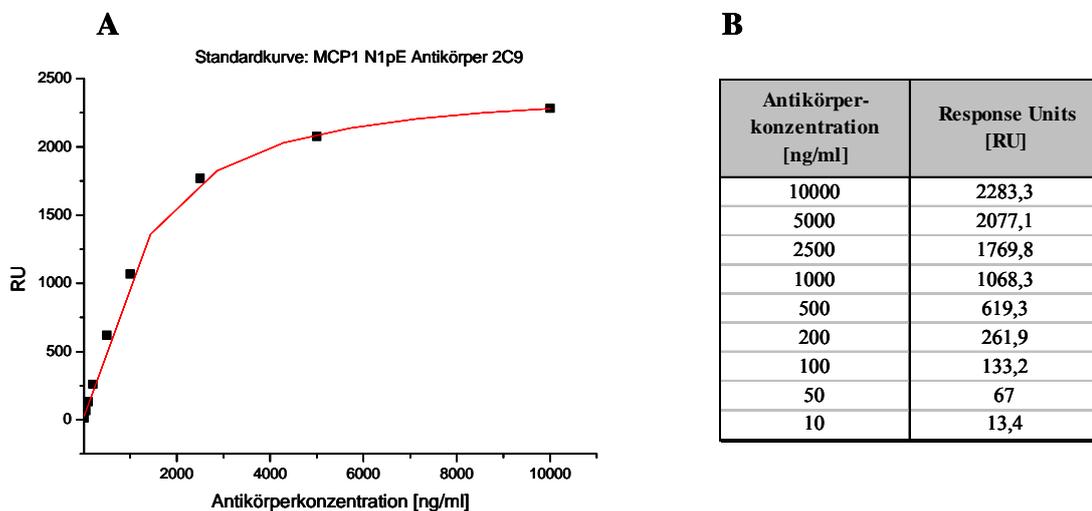
**Abbildung 2.4:** Sensorgramm der Bindung des anti-MCP1 N1pE-Antikörpers 2C9 an das Antigen hMCP1 N1pE(1-38) und Darstellung der einzelnen Messphasen. Die Messung erfolgte am Gerät Biacore 3000 (Fa. GE Healthcare). Aufgetragen sind die gemessenen *ResponseUnits* [RU] in Abhängigkeit von der Auftragszeit [s].

Die RU der unter Zugabe des Laufpuffers erhaltenen Basallinie wurden  $RU = 0$  gesetzt. Während der Injektion des Antikörpers erfolgt die Assoziation an das Antigen auf dem Sensorchip. Gegen Ende der Assoziationsphase flacht die Kurve ab, da sich ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation zwischen dem Antikörper und dem Antigen auf der Chip-Oberfläche einstellt. Nach Beendigung der Antikörper-Injektion

dissoziiert der Antikörper wieder vom Sensorchip und die Kurve fällt ab (Dissoziation). Durch die Regeneration mit 0,1 M HCl werden schließlich die restlichen verbliebenen Antikörper vom Sensorchip entfernt.

### 2.5.1.3 Quantitative Ermittlung des Antikörpergehalts in verschiedenen Proben

Zur quantitativen Bestimmung des Antikörpergehalts im Zellkulturüberstand wurde zunächst eine Standardkurve mit bekannten Konzentrationen homogenen Antikörpers aufgenommen. In Abbildung 2.5 ist exemplarisch für den Antikörper 2C9 die Standardkurve mit den dazugehörigen Messdaten dargestellt, die sich nach Auftragung der eingesetzten Antikörpermenge gegen die ermittelten RU ergibt.



**Abbildung 2.5:** **A** - Sensorgramm der konzentrationsabhängigen Bindung des anti-MCP1 N1pE-Antikörpers 2C9 an das Antigen hMCP1 N1pE(1-38). Die Messung erfolgte am Gerät Biacore 3000 (Fa. GE Healthcare). Aufgetragen sind die gemessenen *ResponseUnits* [RU] gegen die Antikörper-Konzentration. **B** – Messdaten der konzentrationsabhängigen Bindung des anti-MCP1 N1pE-Antikörpers 2C9 an das Antigen hMCP1 N1pE(1-38).

Voraussetzung für die exakte Quantifizierung der Antikörper-Konzentration in den Zellkulturüberständen ist allerdings, dass die vom Gerät ermittelten RU im linearen Bereich dieser Standardkurve liegen, was ab ca. 500 ng/ml nicht mehr der Fall ist.

### 2.5.2 PepSpot-Analyse

Die PepSpot-Analyse wurde durchgeführt, um Informationen über Kreuzreaktivitäten und weitere Anwendungsmöglichkeiten der Antikörper, wie z.B. den Einsatz im mMCP1 N1pE oder rMCP1 N1pE ELISA zu erhalten. Die PepSpot Membran wurde von JPT Peptide

Technologies GmbH (Berlin) hergestellt. Hierfür wurden die zu untersuchenden Peptide auf der Membran in einer Konzentration von 1 µg/Spot immobilisiert. Die nachfolgenden Schritte zum Blocken unspezifischer Bindungen sowie der Entwicklung der Antikörperreaktion entsprechen dem Prozedere des Western Blots (siehe 2.4.2).

### 2.5.3 Epitopmapping

Zur Identifikation der MCP1-Sequenzen, die von den Detektionsantikörpern *mouse anti hMCP1*, *Rat anti mouse MCP1* und *Rabbit anti rat MCP1* erkannt werden, wurden von Dr. Nicole Wehofsky (Abteilung Naturstoffbiochemie, Prof. Dr. Frank Bordusa) membrangebundene Peptidbibliotheken zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der Peptidbibliotheken erfolgte vollautomatisch durch die sogenannte Spot-Synthese unter Verwendung des „SPOT Peptidsynthesizers APS222“. Dazu wurden jeweils 10 Aminosäuren lange Peptide in räumlich voneinander getrennten Spots direkt auf einer Hydroxy-Cellulose-Membran synthetisiert, welche mit zwei beta-Alanin-Resten (&#61538;-Ala)<sub>2</sub> als Spacer modifiziert wurde. Die Peptidsequenzen wurden dabei so ausgewählt, dass sie die vollständige Aminosäuresequenz des jeweiligen Antigens (h-, m- bzw. rMCP1) in je 10 Aminosäuren langen Peptiden repräsentieren, wobei sich die benachbarten Peptide einer Reihe jeweils um 9 Aminosäuren überlappen (Frank und Overwin, 1996).

Für das Epitopmapping der drei untersuchten Antikörper konnte das Protokoll für lineare Epitope angewendet werden. Dazu wurde die Membran zunächst für 5 Min mit Methanol gewaschen. Daraufhin erfolgte für 3 x 10 Min ein weiterer Waschschriff mit TBS und die anschließende Inkubation für 2 h in Blocking Puffer (5 % Milchpulver in TBS-Tween). Die Antikörperreaktion fand über Nacht bei 4 °C durch Zugabe von 1 µg/ml des jeweiligen Antikörpers, gelöst in Blocking Puffer, statt. Nach einem Waschschriff für 3 x 10 Min mit TBS wurden die sekundären Antikörper bzw. das Streptavidin-Peroxidase-Polymer 1:2000 in Blocking Puffer verdünnt und für 2 h mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde anschließend 3 x 10 Min mit TBS gewaschen. Die Signalentwicklung erfolgte unter Verwendung des *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrates* (Fa. PIERCE) nach Protokoll des Herstellers.

Um auszuschließen, dass die sekundären Antikörper (anti-*mouse*- bzw. anti-*rat* HRP-konjugiert) und das Streptavidin-Peroxidase-Polymer mit Sequenzen der jeweiligen Peptidbibliothek interagieren, wurden diese in einem Kontrollexperiment, ohne vorherige Inkubation mit dem primären Antikörper, zur Membran gegeben. Das anschließende

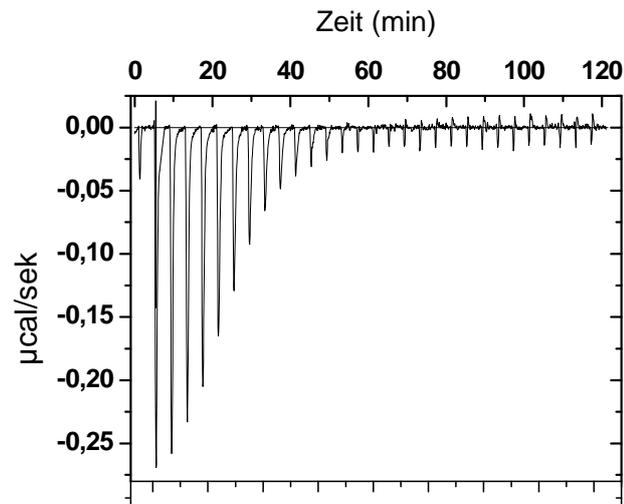
Waschen der Membran und die Entwicklung durch Zugabe des Chemilumineszenz Substrates erfolgten wie oben beschrieben. Weder die verwendeten sekundären Antikörper noch das Streptavidin-Peroxidase-Polymer zeigten eine Reaktivität mit der jeweiligen Peptidmembran.

#### **2.5.4 Bestimmung thermodynamischer Parameter mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC)**

##### **2.5.4.1 Beschreibung des Gerätes und des Messprinzips**

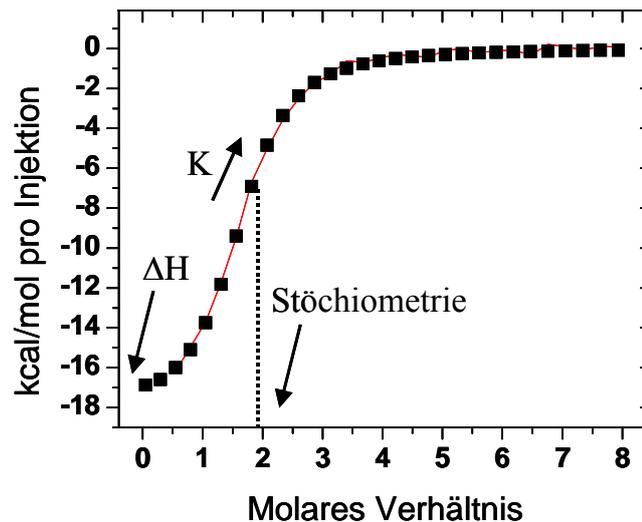
Die Isothermale Titrationskalorimetrie (engl.: *isothermal titration calorimetry*, ITC) wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, die Bindungswärme biochemischer Reaktionen bei konstanter Temperatur zu ermitteln. Dazu wurde das Kompensationskalorimeter VP-ITC MicroCalorimeter der Firma MicroCal (Northampton, USA) genutzt.

Das Gerät besitzt zwei thermisch isolierte Zellen. In der Messzelle findet die zu untersuchende Reaktion statt, die Referenzzelle wird mit dem identischen Puffer gefüllt, in dem sich die Proben befinden. Bei der Messung biochemischer Reaktionswärmen wird ein Reaktionspartner in der Messzelle in Lösung vorgelegt und der andere Reaktionspartner zutitriert. Jede Zugabe des Reaktionspartners führt zu einer Temperaturänderung. Als Messsignal dient der Heizstrom, der der Messzelle zugeführt werden muss, um diese Temperaturdifferenz wieder auszugleichen. Mit jeder Titration nähert sich die Reaktion der Sättigung und die Konzentration freier Bindungspartner und die damit entwickelte Bindungswärme pro Zugabe verringern sich (Abbildung 2.6).



**Abbildung 2.6:** Darstellung einer isothermalen Titrationskurve am Beispiel der Bindung des Antikörpers 4B8 an den Liganden hMCP1 N1pE(1-38). Die Fläche zwischen jedem Peak und der Basislinie entspricht der Bindungswärme, die nach Injektion von 10µl Ligandenlösung zur Antikörperlösung freigesetzt wird.

Die gesamte Wärmeaufnahme- bzw. -abgabe nach jeder Injektion erhält man durch Integration der Fläche zwischen Peak und Basislinie. Abbildung 2.7 zeigt die Auswertung einer ITC-Messung am Beispiel des Antikörpers 4B8. Aufgetragen sind die Integrale der Messsignale gegen das molare Verhältnis. Mit Hilfe des Programmes „Origin 7.0“ wurden durch Approximierung der Wärmeentwicklung pro mol Injektant an die gemessenen Wärmen der einzelnen Injektionen die Parameter  $K_A$  (Assoziationskonstante),  $N$  (Stöchiometrie) und  $\Delta H$  (Bindungsenthalpie) für die Bindung von MCP1 N1pE(1-38) an den Antikörper ermittelt.



**Abbildung 2.7:** Auswertung einer ITC-Messung am Beispiel der Titration des Antigens hMCP1 N1pE(1-38) zum Antikörper 4B8. Der Schnittpunkt mit der Ordinate repräsentiert die Bindungsenthalpie  $\Delta H$ , aus dem Kurvenverlauf lassen sich die Assoziationskonstante  $K_A$  sowie die Stöchiometrie ermitteln.

Nach der Gibbs-Funktion setzt sich die Freie Enthalpie  $\Delta G$  folgendermassen zusammen:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (\text{Gleichung 2})$$

Bei den Größen  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  und  $\Delta S$  handelt es sich um Standardgrößen unter Gleichgewichtsbedingungen, also  $\Delta G^0$ ,  $\Delta H^0$  und  $\Delta S^0$ . Zur besseren Übersicht werden diese Indizes im folgenden nicht berücksichtigt.

Weiterhin steht die freie Bindungsenthalpie über folgende Gleichung mit den Gleichgewichtskonstanten  $K_A$  (Assoziationskonstante) und  $K_D$  (Dissoziationskonstante) in Beziehung:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K = R \cdot T \cdot \ln K_D \quad (\text{Gleichung 3})$$

Aus den Gleichungen 2 und 3 lassen sich die Freie Enthalpie  $\Delta G$  und die Entropie  $\Delta S$  ermitteln.

#### **2.5.4.2 Bestimmung thermodynamischer Parameter der Bindung an MCP1 N1pE(1-38)**

Zur Messung der thermodynamischen Parameter der Antikörperbindung an das Antigen hMCP1 N1pE(1-38) wurden zunächst sowohl die Antikörper als auch das Antigen über Nacht bei 4 °C gegen ITC-Puffer (150 mM NaCl, 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 7,4) dialysiert. Vor Beginn des Titrationsexperimentes wurden die Antikörper- und Antigen-Konzentrationen mittels UV-Spektrum bestimmt (siehe 2.4.3). Für die Ermittlung der thermodynamischen Parameter des Antikörpers 2C9 wurde dieser in einer Konzentration von 4,38 µM in die Messzelle vorgelegt und 147 µM hMCP1 N1pE(1-38) Lösung dazu titriert. Im Falle des Antikörpers 4B8 wurde eine 64,3 µM hMCP1 N1pE(1-38) Lösung zur 1,86 µM Antikörperlösung gegeben. Die Referenzzelle wurde mit ITC-Puffer befüllt. Die Messung der entstehenden Reaktionswärme erfolgte bei 20 °C durch Zugabe von je 10 µl der hMCP1 N1pE(1-38) Lösungen über 29 Injektionen zur Antikörperlösung. Weiterhin wurde die Reaktionswärme ermittelt, die durch die alleinige Verdünnung der hMCP1 N1pE(1-38) Lösung durch Titration in ITC-Puffer entsteht. Die während der Titration von hMCP1 N1pE(1-38) zum Antikörper ermittelte Wärmeentwicklung wurde um diesen Wert korrigiert. Die Auswertung der gewonnenen Daten und Ermittlung der Stöchiometrie (N), der Assoziationskonstante (K<sub>A</sub>), der Enthalpie (ΔH), sowie der Entropy (ΔS) erfolgte mit der Origin Software von MicroCal.

### **2.6 Methoden zur Durchführung und Etablierung des Sandwich-ELISA**

#### **2.6.1 Zyklisierung des MCP1-Standardproteins**

Die quantitative Detektion von MCP1 N1pE in biologischen Proben macht die Verwendung eines Standardproteins notwendig, welches vollständig zyklisiert vorliegt. Die verwendeten Standardproteine weisen allerdings lediglich zu 1 - 10 % einen Pyroglutamatrest auf. Aus diesem Grund wurden die Standardproteine hMCP1, mMCP1 und rMCP1 vor dem Einsatz im ELISA mit rekombinanter QC für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Enzyme hQC und mQC wurden in der Probiobdrug AG rekombinant produziert und für diesen Zweck zur Verfügung gestellt. Da die ersten 16 Aminosäuren des Maus und Ratten MCP1 identisch sind, kann mQC sowohl zur Zyklisierung von mMCP1, als auch rMCP1 verwendet werden. In Vorversuchen wurde ermittelt, dass MCP1 in niedrigen

Konzentrationen dazu neigt, unspezifisch an die Reaktionsgefäßwand zu adhären. Aus diesem Grund wurde zusätzlich 1,1 % (w/v) BSA in den Ansatz gegeben. Tabelle 2.11 zeigt eine Übersicht der jeweiligen Versuchsansätze zur Zyklisierung von rekombinanten MCP1. Der vollständige Umsatz von MCP1 zu MCP1 N1pE und der damit einhergehende Massenverlust von 17 Da konnte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

**Tabelle 2.11:** Versuchsansätze zur vollständigen Zyklisierung von 250 ng rekombinanten MCP1. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37 °C. Der vollständige Umsatz zu MCP1 N1pE wurde mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen.

Volumen	Komponente	
20,75 µl	PBS	PBS
2,5 µl	hMCP1 [100 µg/ml]	mMCP1, rMCP1 [100 µg/ml]
1,25 µl	22 %iges BSA	22 %iges BSA
0,5 µl	hQC [600 µg/ml]	mQC [600 µg/ml]

### 2.6.2 Etablierung und generelles Protokoll der hMCP1 N1pE, mMCP1 N1pE und rMCP1 N1pE ELISAs

Zur Etablierung der MCP1 N1pE ELISAs wurden verschiedene kommerziell erhältliche polyklonale Antikörper auf deren Eignung als Fangantikörper getestet. Dies diente zunächst der Analyse, ob die anschließende Detektion von MCP1 N1pE durch die Antikörper 4B8 und 2C9 möglich ist. Dazu wurden die polyklonalen Fangantikörper in PBS auf Konzentrationen von 500 ng/ml, 250 ng/ml und 125 ng/ml verdünnt und je 100 µl der Lösungen in eine 96-Well Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorp™) gegeben. Die Immobilisierung der Antikörper an die Oberfläche der Mikrotiterplatte erfolgte durch Inkubation über Nacht bei RT. Am nächsten Tag wurden 200 µl Protein-freier ELISA-Blocker (Fa. Thermo Scientific, PIERCE) pro Well zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Darauf folgte die Entfernung ungebundener Antikörper durch 3 maliges Waschen mit je 300 µl TBS-T. Zur Detektion von MCP1 N1pE wurde vollständig zyklisiertes Standardprotein (siehe 2.6.1) in ELISA-Blocker + 0,05 % Tween-20 (ELISA-Blocker (+T)) auf Konzentrationen zwischen 10 ng/ml – 100 pg/ml verdünnt. Je 100 µl Proteinlösung wurden pro Well zum immobilisierten Fangantikörper gegeben. Nach 2 stündiger Inkubation erfolgte ein erneuter Waschschriff, wobei 3 mal je 300 µl TBS-T zu den Wells gegeben wurde. Zur Detektion des immobilisierten zyklisierten MCP1 wurden zunächst 2,5 µg der Detektionsantikörper 2C9 und 4B8 mit 2,5 µg anti-*mouse* IgG-HRP

(XSA von KPL) für 15 Min bei RT inkubiert. Anschließend wurde ein 1000faches Volumen an ELISA-Blocker (+T) zugegeben. Daraufhin folgte die Zugabe von je 100 µl der Detektionsantikörper-Enzymkonjugat-Lösung pro Well und eine erneute 2 stündige Inkubation bei RT. Es wurde erneut 3 mal mit je 300µl TBS-T pro Well gewaschen. Die Entwicklung der Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl des Peroxidase Substrates SureBlue (Fa. KPL). Dieses Substrat enthält den Farbstoff Tetramethylbenzidin (TMB), welcher nach Umsatz durch die Peroxidase eine blaue Färbung aufweist. Die Mikrotiterplatte wurde 30 Min bei RT im Dunkeln inkubiert und die Peroxidase-reaktion anschließend durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung (1,2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beendet. Durch den niedrigen pH-Wert der Stopp-Lösung kommt es zum Farbumschlag von blau nach gelb, wonach die Lösung ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweist. Zusätzlich zur Absorptionsmessung bei 450 nm wurde eine Referenzmessung bei einer Wellenlänge durchgeführt, bei der der Farbstoff keine Absorption zeigt (540 nm). Die Extinktion der Referenzmessung wurde dann von dem Wert der Messwellenlänge subtrahiert, um leichte Fehler, wie z.B. Verschmutzung der Mikrotiterplatte zu reduzieren. Die Variation der Testergebnisse wird so deutlich verkleinert. Die Absorptionen bei 450/540 nm wurden am TECAN Sunrise Plattenreader bestimmt.

Die h-, m- und rMCP1 (N1pE) ELISAs wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll etabliert. Nach Optimierung verschiedener Parameter wie Konzentration des Fangantikörpers, des Detektionsantikörpers und des HRP-Konjugates, Inkubationszeiten und -Temperaturen, sowie Verwendung unterschiedlicher Blocking- und Probenverdünnungspuffer konnten die folgenden ELISA-Protokolle erstellt werden:

**Tabelle 2.12:** Protokoll für den hMCP1 und hMCP1 N1pE ELISA. Für beide ELISAs werden identische Arbeitsschritte durchgeführt, mit Ausnahme der verwendeten Detektionsantikörper-Enzymkonjugat-Lösungen.

Schritt	Reagenzien und Puffer		Prozedur
<i>Coaten des Fangantikörpers</i>	<i>Goat anti hMCP1 AF</i> (R&D) verdünnt in PBS, pH 7,4		250 ng/ml Fangantikörper, 100 µl/Well, Inkubation über Nacht bei 4 °C
<i>Blocken</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer (PIERCE)	PBS, 0,05 % Tween 20, 10 % FBS für Serum Proben	200 µl/Well, Inkubation 2 h bei RT
<i>Waschen</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer +0,05 % Tween 20 (PIERCE)		3 x mit je 300 µl/Well
<i>Verdünnung und Auftragen der Proben / des Standardproteins</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer +0,05 % Tween 20 (PIERCE)	PBS, 0,05 % Tween 20, 10 % FBS für Serum Proben	Konzentrationsbereich der Standardkurve: 1000 pg/ml-16 pg/ml, 100 µl/Well, Inkubation 2 h bei RT
<i>Waschen</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer +0,05 % Tween 20 (PIERCE)		3 x mit je 300 µl/Well
<i>Verdünnung und Auftragen der Detektionsantikörper-Enzymkonjugat-Lösung</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer +0,05 % Tween 20 (PIERCE)	PBS, 0,05 % Tween 20, 10 % FBS für Serum Proben	500 ng/ml Detektionsantikörper, anti-mouse IgG-HRP 1:1000, 100 µl/Well Inkubation 2 h bei RT
	2C9 für hMCP1 N1pE, <i>mouse anti hMCP1</i> (Peprotech) für total hMCP1, anti-mouse IgG-HRP (KPL)		
<i>Waschen</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer +0,05 % Tween 20 (PIERCE)		3 mal mit je 300 µl/Well
<i>Zugabe des Chromogens</i>	SureBlue Reserve TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL)		100 µl/Well Inkubation 30 Min im Dunkeln
<i>Abstoppen der Farbreaktion</i>	1,2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		50 µl/Well
Messung der OD bei 450/540 nm am TECAN Sunrise			

**Tabelle 2.13:** Protokoll für den mMCP1 und mMCP1 N1pE ELISA. Für beide ELISAs werden identische Arbeitsschritte durchgeführt, mit Ausnahme der verwendeten Detektionsantikörper-Enzymkonjugat-Lösungen.

Schritt	Reagenzien und Puffer		Prozedur
<i>Coaten des Fangantikörpers</i>	<i>Rabbit anti mJE</i> (Peprotech) verdünnt in PBS, pH 7,4		500 ng/ml Fangantikörper, 100 µl/Well, Inkubation 3-4 Tage bei 4 °C
<i>Blocken</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer (PIERCE)	PBS, 0,05 % Tween 20, 10 % FBS für Serum Proben	200 µl/Well, Inkubation 2 h bei RT
<i>Waschen</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer +0,05 % Tween 20 (PIERCE)		3 x mit je 300 µl/Well
<i>Verdünnung und Auftragen der Proben / des Standardproteins</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer + 0,05 % Tween 20	PBS, 0,05 % Tween 20, 10 % FBS für Serum Proben	Konzentrationsbereich der Standardkurve: 1250 pg/ml-19,5 pg/ml, 100 µl/Well, 2 h bei RT
<i>Waschen</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer +0,05 % Tween 20 (PIERCE)		3 x mit je 300 µl/Well
<i>Verdünnung und Auftragen der Detektionsantikörper-Enzymkonjugat-Lösung</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer +0,05 % Tween 20 (PIERCE)	PBS, 0,05 % Tween 20, 10 % FBS für Serum Proben	500 ng/ml 2C9, 250 ng/ml <i>rat anti mouse MCP1</i> , <i>anti-mouse</i> IgG-HRP 1:1000, <i>anti-rat</i> IgG-HRP 1:2000, 100 µl/Well Inkubation 2 h bei RT
	2C9 für mMCP1 N1pE, <i>rat anti mouse MCP1</i> (R&D Systems) für total mMCP1, <i>anti-mouse</i> IgG-HRP (KPL), <i>anti-rat</i> IgG-HRP (Sigma)		
<i>Waschen</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer +0,05 % Tween 20 (PIERCE)		3 x mit je 300 µl/Well
<i>Zugabe des Chromogens</i>	SureBlue Reserve TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL)		100 µl/Well Inkubation 30 Min im Dunkeln
<i>Abstoppen der Farbreaktion</i>	1,2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		50 µl/Well
Messung der OD bei 450/540 nm am TECAN Sunrise			

**Tabelle 2.14:** Protokoll für den rMCP1 und rMCP1 N1pE ELISA. Für beide ELISAs werden identische Arbeitsschritte durchgeführt, mit Ausnahme der verwendeten Detektionsantikörper-Enzymkonjugat-Lösungen.

Schritt	Reagenzien und Puffer	Prozedur
<i>Coaten des Fangantikörpers</i>	<i>Rabbit anti rat MCP1</i> (LIFESPAN BIOSCIENCES [LS-C54182/13136]) verdünnt in PBS, pH 7,4	250 ng/ml für rMCP1 N1pE, 150 ng/ml für total rMCP1, 100 µl/Well Inkubation über Nacht bei 4 °C
<i>Blocken</i>	PBS, 0,05 % Tween 20, 10 % FBS	200 µl/Well, Inkubation 2 h bei RT
<i>Waschen</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer +0,05 % Tween 20 (PIERCE)	3 x mit je 300 µl/Well
<i>Verdünnung und Auftragen der Proben / des Standardproteins</i>	PBS, 0,05 % Tween 20, 10 % FBS	Konzentrationsbereich der Standardkurve: 5000 pg/ml-78,2 pg/ml, 200 µl/Well, Inkubation 2 h bei RT
<i>Waschen</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer +0,05 % Tween 20 (PIERCE)	3 x mit je 300 µl/Well
<i>Verdünnung und Auftragen der Detektionsantikörper-Enzymkonjugat-Lösung</i>	PBS, 0,05 % Tween 20, 10 % FBS	500 ng/ml Detektionsantikörper, anti- <i>mouse</i> IgG-HRP 1:1000, Streptavidin-Peroxidase- Polymer 1 µg/ml, 100 µl/Well Inkubation 1 h bei 4 °C
	2C9 für rMCP1 N1pE, <i>rabbit anti rat MCP1</i> , biotinyliert (Peprotech) für total rMCP1, anti- <i>mouse</i> IgG-HRP (KPL), Streptavidin-Peroxidase-Polymer (Sigma)	
<i>Waschen</i>	Protein freier (TBS) Blocking Puffer +0,05 % Tween 20 (PIERCE)	3 x mit je 300 µl/Well
<i>Zugabe des Chromogens</i>	SureBlue Reserve TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL)	100 µl/Well Inkubation 30 Min im Dunkeln
<i>Abstoppen der Farbreaktion</i>	1,2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 µl/Well
Messung der OD bei 450/540 nm am TECAN Sunrise		

### 2.6.3 Erstellung von Standardkurven zur quantitativen Analyse der MCP1 und MCP1 N1pE-Level mit Hilfe des ELISAs

Die zyklisierten rekombinanten Standardproteine hMCP1 N1pE, rMCP1 N1pE und mMCP1 N1pE wurden zur Erstellung der Standardkurven in einer seriellen Verdünnungsreihe jeweils 1:2 in Probenpuffer verdünnt. Von jedem Protein wurden sieben Konzentrationen verwendet, die den in den Tabellen 2.12, 2.13 und 2.14 angegebenen Messbereich umfassen. Durch Auftragen des Probenpuffers ohne Standardprotein wurde der Nullwert ermittelt. Die Erstellung der Standardkurve aus den gemessenen Datenpunkten erfolgte mit dem Programm „Origin7.0“ unter Verwendung folgender Gleichung:

$$y = \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A2 \quad (\text{Gleichung 5})$$

Stellt man diese Formel nach x um, so ergibt sich die MCP1- bzw. MCP1 N1pE-Konzentration in den Proben (x) nach:

$$x = x_0 \cdot \sqrt[p]{\frac{A1 - y}{y - A2}} \quad (\text{Gleichung 6})$$

y	=	Absorption 450/540nm
x	=	MCP1 (N1pE)-Konzentration
A1	=	Absorption bei x = 0
A2	=	obere Asymptote der Y-Achse bei hohen X-Werten
x <sub>0</sub>	=	Wendepunkt, der X-Wert am Mittelpunkt zwischen A1 und A2
p	=	Grad der Sigmoidität

### 2.6.4 Validierung der hMCP1 (N1pE), mMCP1 (N1pE) und rMCP1 (N1pE) ELISAs

Zur Validierung der etablierten ELISAs, wurden diese analog zu den Protokollen in Tabelle 2.12, 2.13 und 2.14 durchgeführt.

#### 2.6.4.1 Validierung der Linearität verschiedener Probenverdünnungen

Um die Linearität der total MCP1 und MCP1 N1pE ELISAs zu untersuchen, wurden Proben mit Verdünnungspuffer seriell auf ausgewählte MCP1-Konzentrationen so verdünnt, dass diese den jeweiligen Messbereich des zu validierenden ELISAs umfassten. Anschließend wurden die MCP1-Konzentrationen der unterschiedlich verdünnten Proben bestimmt und nach Einbeziehung des Verdünnungsfaktors (errechnete Konzentration) mit der zu erwartenden MCP1-Konzentration verglichen. Das Verhältnis Errechnete/Erwartete MCP1-Konzentration der verschiedenen Probenverdünnungen gibt Auskunft über die Linearität des ELISAs. Für die zu erwartende Konzentration wurde die Konzentration der am geringsten verdünnten Probe als Richtwert festgelegt.

#### 2.6.4.2 Validierung der Intraassay- und Interassay-Präzision

Zur Untersuchung der Intraassay-Präzision wurden 2 Proben (Zellkulturüberstand von LPS-stimulierten RAW264.7-Zellen) in 3 verschiedenen Verdünnungen je 6 mal auf einen ELISA aufgetragen und die resultierenden Absorptionen bestimmt (siehe Protokoll Tabelle 2.13). Der prozentuale Variationskoeffizient der ermittelten Absorptionen, welcher ein Maß für die Intraassay- Präzision ist, ergibt sich aus folgender Formel:

$$CV(\%) = \left( \frac{STD}{MW} \right) \cdot 100 \quad (\text{Gleichung 7})$$

MW = Mittelwert der Absorptionen/Konzentrationen

STD = Standardabweichung des Mittelwertes

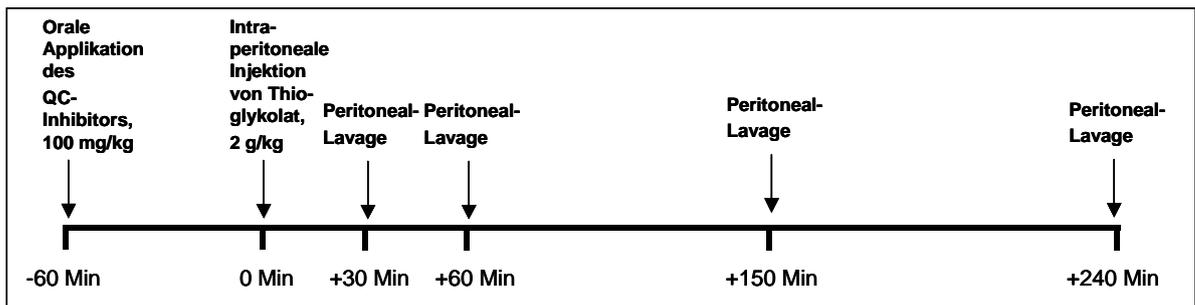
Zur Ermittlung der Interassay-Präzision wurde dieses Experiment von 3 verschiedenen Personen durchgeführt und die jeweiligen mMCP1 N1pE-Konzentrationen anhand der mitgeführten Standardkurve ermittelt. Der prozentuale Variationskoeffizient der errechneten mMCP1 N1pE-Konzentrationen, welcher sich aus der Messung durch 3 verschiedene Personen ergibt, beschreibt die Interassay-Präzision.

## **2.7 Tierexperimentelle Methoden**

### **2.7.1 Thioglykolat induzierte Peritonitis in der Maus**

#### **2.7.1.1 Inhibierung der mMCP1 N1pE Bildung durch Applikation eines QC-Inhibitors**

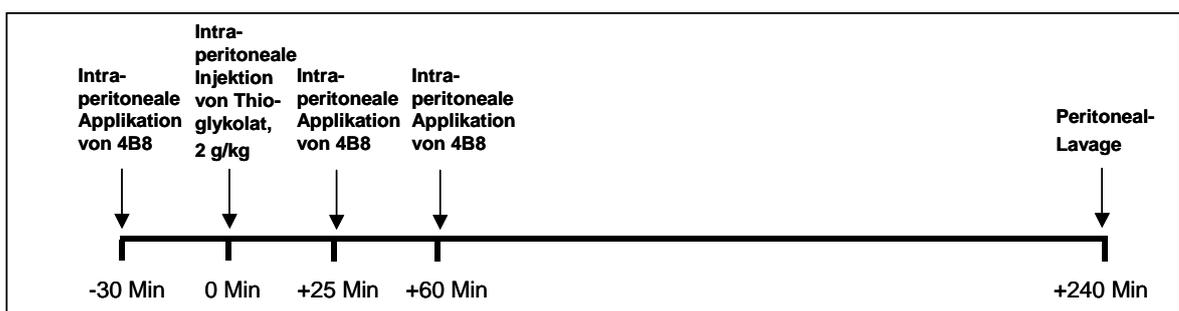
Die Experimente wurden innerhalb der Probiodrug AG von Daniel Friedrich, Sandra Torkler und Anja Fothe durchgeführt und erfolgten im Rahmen eines genehmigten Tierversuches (Aktenzeichen: 203.h-42502-2-856probio). Zur Induktion der Peritonitis wurden weibliche C57BL/6J-Mäuse verwendet (Fa. Charles River, Sulzfeld). Am Tag vor dem Experiment wurde das Gewicht jedes Tieres ermittelt. Der QC-Inhibitor QCI wurde in 0,5 % (w/v) Hydroxyethylcellulose (Fa. Fluka) in physiologischer Kochsalzlösung (Fa. Braun) zu einer Endkonzentration von 7,5 mg/ml gelöst und 60 Min vor Thioglykolat-Injektion oral appliziert. Die Tiere erhielten eine Inhibitor-Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht, d.h. es wurden 13,33 ml/kg Körpergewicht der Inhibitorlösung appliziert. Den Tieren der Kontrollgruppen, die keinen QC-Inhibitor erhielten, wurden äquivalente körperrgewichtabhängige Volumina 0,5 % (w/v) Hydroxyethylcellulose in physiologischer Kochsalzlösung verabreicht. Thioglykolat wurde zu einer Endkonzentration von 80 mg/ml in PBS (Fa. PAA) gelöst. Die Induktion der Peritonitis erfolgte durch intraperitoneale Applikation von 2 g/kg Körpergewicht, d.h. es wurden 25 ml/kg Körpergewicht Thioglykolatlösung appliziert. Im Abstand von 0, 30, 60, 150 und 240 Min nach der Induktion wurde aus den mit Isofluran anästhesierten Mäusen die PLF durch Spülen des Peritoneums mit 8 ml PBS-Puffer gewonnen. Die PLF wurden sofort hinsichtlich der in das Peritoneum eingewanderten Monozyten analysiert (siehe 2.4.6). Die restlichen Proben wurden in Zellpellet und Überstand separiert und für weitere Analysen bei -20 °C gelagert. Abbildung 2.8 zeigt die zeitliche Abfolge der Injektion des QC-Inhibitors, des Thioglykolats und der Entnahme der PLF.



**Abbildung 2.8:** Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsverlaufes zur Untersuchung der QC/isoQC-Inhibierung durch QCI im Peritonitis-Maus-Modell.

### 2.7.1.2 Neutralisierung von mMCP1 N1pE durch Applikation des anti-MCP1 N1pE-Antikörpers 4B8

Diese Tierversuche verliefen, wenn nicht anders angegeben, nach dem Protokoll siehe 2.7.1. Der anti-MCP1 N1pE-Antikörper wurde in PBS-Puffer auf eine Konzentration von 2 mg/ml bzw. 1 mg/ml verdünnt und anschließend sterilfiltriert. Die Injektion der Antikörperlösungen erfolgte -30 Min, +25 Min bzw. +60 Min vor bzw. nach Thioglykolat-Applikation. Dazu wurde den Tieren eine Menge von 5 ml/kg Körpergewicht verabreicht. Den Tieren der Kontrollgruppe, die keinen Antikörper bzw. kein Thioglykolat erhielten, wurden jeweils äquivalente Volumen PBS appliziert (5 ml/kg bzw. 25 ml/kg). Vier Stunden nach Thioglykolat-Applikation wurde den Mäusen in Isofluran-Anästhesie das Peritoneum lavagiert. Abbildung 2.9 zeigt die schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Injektion des Antikörpers, des Thioglykolats und der Entnahme der PLF.



**Abbildung 2.9:** Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsverlaufes zur Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung des anti-MCP1 N1pE-Antikörpers 4B8 im Peritonitis-Maus-Modell.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression, Reinigung und Charakterisierung der verwendeten Proteine

##### 3.1.1 Herstellung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper

Die monoklonalen anti-MCP1 N1pE-Antikörper wurden von der Firma UNICUS OHG in Karlsburg erzeugt. Dazu wurden weibliche BALB/c-Mäuse für 30 Tage (Kurzzeitimmunisierung) bzw. 120 Tage (Langzeitimmunisierung) mit dem Antigen MCP1 N1pE(1-9) immunisiert. Dem Antigen wurde zusätzlich ein C-terminales Cystein angefügt (pE-P-D-A-I-N-A-P-V-C), um eine gerichtete Kopplung an das Trägerprotein BSA über die freien SH-Gruppen des Cysteins zu ermöglichen. Zur Gewinnung der Hybridoma-Primärkulturen wurden die Milzzellen der immunisierten Mäuse entnommen und durch Fusion mit der Myelomzelllinie SP2/0 immortalisiert (siehe 2.3.4). Die Analyse der aus den Zellkulturüberständen erhaltenen monoklonalen Antikörper erfolgte im Rahmen dieser Promotionsarbeit mittels SPR (siehe 2.5.1). Dabei wurden die anti-MCP1 N1pE-Antikörperklone ausgewählt, die eine starke Bindung an hMCP1 N1pE(1-38), aber nicht an hMCP1(3-38) zeigten. Im Zuge dieser Untersuchungen konnten 2 Antikörper produzierende Hybridomazellklone identifiziert werden, deren anti-MCP1 N1pE-Antikörper für die geplanten Untersuchungen am geeignetsten erschienen (Tabelle 3.1). Diese wurden von der Firma UNICUS OHG in Form von Kryokulturen zur Probiobdrug AG gesendet und für die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Experimente kultiviert. In den folgenden Kapiteln dieser Arbeit soll auf deren Charakterisierung, Expression, Reinigung und Anwendung eingegangen werden.

**Tabelle 3. 1:** Auflistung zweier monoklonaler anti-hMCP1 N1pE-Antikörper und deren Isotyp\*.

\* Die Isotypbestimmung erfolgte mittels *IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit* (Fa. Roche).

Antikörperklon	Isotyp*
4B8	IgG1κ
2C9	IgG2bκ

### 3.1.2 Charakterisierung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper

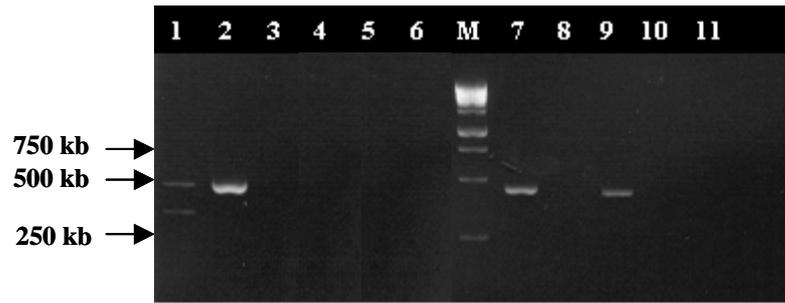
#### 3.1.2.1 Genotypisierung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper

Zur vollständigen Charakterisierung der monoklonalen anti-MCP1 N1pE-Antikörper wurden die Sequenzen der variablen Bereiche der schweren und leichten Antikörperketten ermittelt. Das Wissen um die vollständigen Antikörpersequenzen erlaubt die Ermittlung des exakten Molekulargewichtes und der Extinktionskoeffizienten der Antikörper. Zudem dient die Genotypisierung der Vorbereitung einer Klonierung und rekombinanten Expression.

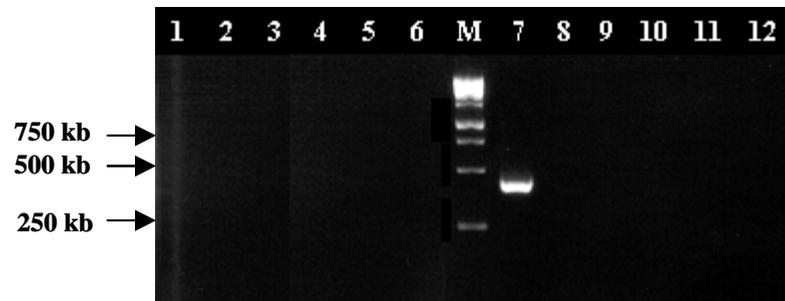
##### RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Klonierung in pJET1.2/blunt

Die Hybridomazelllinien, welche die anti-MCP1 N1pE-Antikörper 4B8 und 2C9 produzieren, wurden kultiviert (siehe 2.3.5), um genügend Zellmaterial zur RNA-Isolierung zu gewinnen. Nach Isolierung der RNA wurde diese als Template zur cDNA-Synthese eingesetzt, wobei unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern lediglich mRNA-Moleküle als Template zur cDNA-Synthese dienten (siehe 2.1.4). Somit umfasste die synthetisierte cDNA die exprimierten Gene der Hybridomazellen, unter anderem auch die leichte und schwere Kette der Antikörper 4B8 und 2C9.

Zur Klonierung in den Vektor pJET1.2/blunt wurden die variablen Bereiche der kodierenden Sequenzen der leichten und schweren Antikörperketten mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde die cDNA der Hybridomazellen als Matrize verwendet. Als Primer dienten DNA-Sequenzen, die zum einen spezifisch für die Signalsequenz und zum anderen den konstanten Teil der leichten und schweren Antikörperketten sind (siehe 2.1.5). Da die Signalsequenzen der variablen Antikörper-Regionen nicht vollständig konserviert sind, wurden degenerierte Primer verwendet. Nach Amplifikation der variablen Antikörperkettenfragmente durch die verschiedenen Primerkombinationen fand zur Kontrolle der Produktbildung eine Agarosegelelektrophorese statt (siehe 2.1.6). Hiermit wurden die Primerpaare identifiziert, die erfolgreich zur Amplifikation eingesetzt werden konnten. In Abbildung 3. 1 ist das Agarosegel nach Auftragen der Amplifikate der variablen Bereiche der leichten Kette des Antikörpers 2C9 dargestellt. Abbildung 3. 2 zeigt die Amplifikate der schweren Kette von 2C9 unter Verwendung der verschiedenen Primervariationen.



**Abbildung 3. 1:** Elektropherogramm zur Kontrolle der Amplifikate des variablen Bereiches der leichten Antikörperkette von 2C9. Auftrennung: 30 Min bei 120 V im 2 % igen Agarosegel. Variabler Bereich der leichten Antikörperkette, amplifiziert mit den Primern 1- MKV1/MKC, 2 - MKV2/MKC, 3- MKV3/MKC, 4- MKV4/MKC, 5- MKV5/MKC, 6- MKV6/MKC, M-1 kb Standard, 7- MKV7/MKC, 8- MKV8/MKC, 9- MKV9/MKC, 10- MKV10/MKC, 11- MKV11/MKC



**Abbildung 3. 2:** Elektropherogramm zur Kontrolle der Amplifikate des variablen Bereiches der schweren Antikörperkette von 2C9. Auftrennung: 30 Min bei 120 V im 2 % igen Agarosegel. Variabler Bereich der schweren Antikörperkette, amplifiziert mit den Primern 1- MHV1/MHCG2b, 2 - MHV2/MHCG2b, 3- MHV3/MHCG2b, 4- MHV4/MHCG2b, 5- MHV5/MHCG2b, 6- MHV6/MHCG2b, M-1 kb Standard, 7- MHV7/MHCG2b, 8- MHV8/MHCG2b, 9- MHV9/MHCG2b, 10- MHV10/MHCG2b, 11- MHV11/MHCG2b

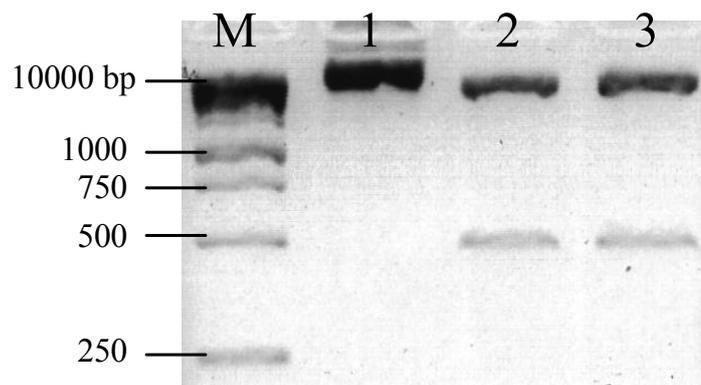
Die Amplifikate des variablen Bereiches der leichten und der schweren Kette haben eine erwartete Größe von ca. 430 - 460 Basenpaaren. Die in Abbildung 3. 1 und Abbildung 3. 2 sichtbaren PCR-Produkte liegen in dem richtigen Größenbereich.

Nachdem die geeigneten Primerpaare zur Amplifizierung der variablen Antikörperkettenfragmente ermittelt wurden, erfolgte eine erneute PCR-Reaktion mit diesen Primerpaaren (siehe 2.1.5), um genügend große Mengen des PCR-Produktes für die Ligationsreaktion herzustellen. Tabelle 3.2 zeigt eine Übersicht über die Primerpaare, die zur Amplifizierung der variablen Antikörperbereiche verwendet wurden.

**Tabelle 3.2:** Zusammenstellung der verwendeten Primerpaare für die Amplifikation der variablen Bereiche der leichten und schweren Antikörperketten von 2C9 und 4B8.

Antikörperklon	Primer zur Amplifizierung der schweren Kette	Primer zur Amplifizierung der leichten Kette
2C9	MHCG2b + MHV7	MKC + MKV2
		MKC + MKV7
		MKC + MKV9
4B8	MHCG1 + MHV7	MKC + MKV1
		MKC + MKV2

Nach Ligation der DNA-Fragmente in den Vektor pJET1.2/blunt (siehe 2.1.7) fand die Transformation von *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 $\alpha$  mit dem rekombinanten Vektor statt (siehe 2.1.8). Die entstandenen Kolonien wurden anschließend über Nacht vermehrt, um genügend Zellen zur Plasmidisolierung zu erhalten (siehe 2.1.9). Zunächst wurde ein Kontrollverdau der isolierten Plasmide mit dem Restriktionsenzym *Bgl* II durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die gewünschten Kettenfragmente in den Vektoren befanden. Da der Vektor zwei *Bgl* II-Restriktionsschnittstellen, jeweils kurz hinter dem 5'Ende und hinter dem 3'Ende des eingefügten Inserts besitzt (siehe Abbildung in 2.1.), wird durch den Restriktionsverdau das Insert entfernt. In Abbildung 3. 3 ist der Kontrollverdau der pJET1.2-Vektoren A und B mit der inserierten DNA des variablen Teils der schweren Kette von 2C9 dargestellt.



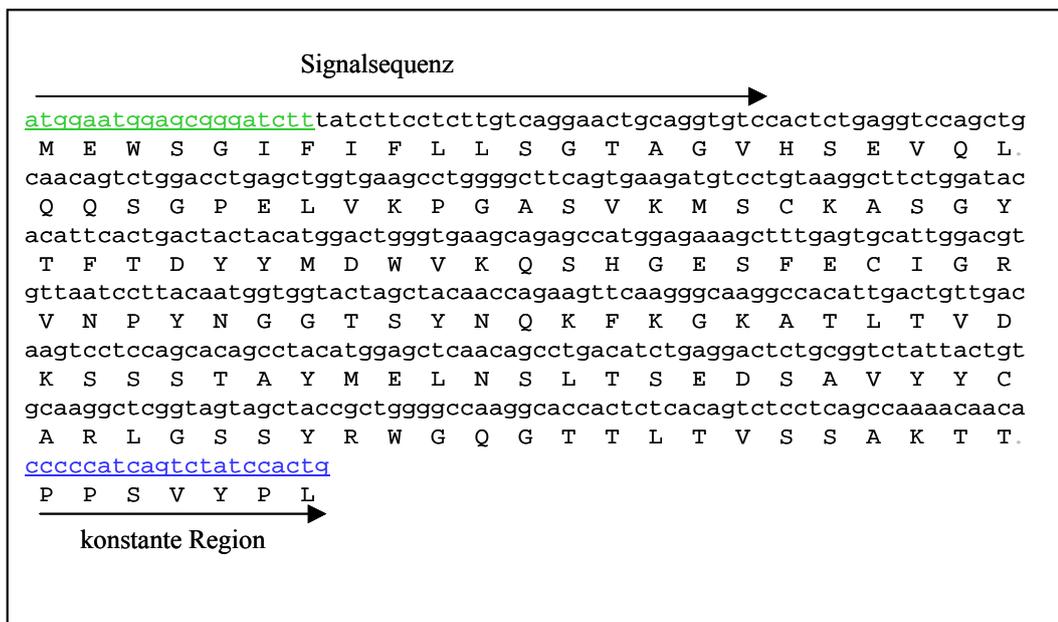
**Abbildung 3. 3:** Elektropherogramm des Kontrollverbaus der beiden rekombinanten pJET1.2-Vektoren A und B mit dem Enzym *Bgl* II. Die ca. 500 bp großen Banden sind die in die Vektoren klonierten Antikörperfragmente des variablen Bereichs der schweren Kette. Auftrennung: 30 Min bei 110 V im 2 % igen Agarosegel. M: 1 kb DNA-Standard, 1: un behandelter Vektor A mit dem inserierten variablen Teil der schweren Kette, 2: *Bgl* II - behandelter Vektor A, 3: *Bgl* II - behandelter Vektor B.

Nachdem die erfolgreiche Insertion der Antikörperkettenfragmente in pJET1.2 bestätigt

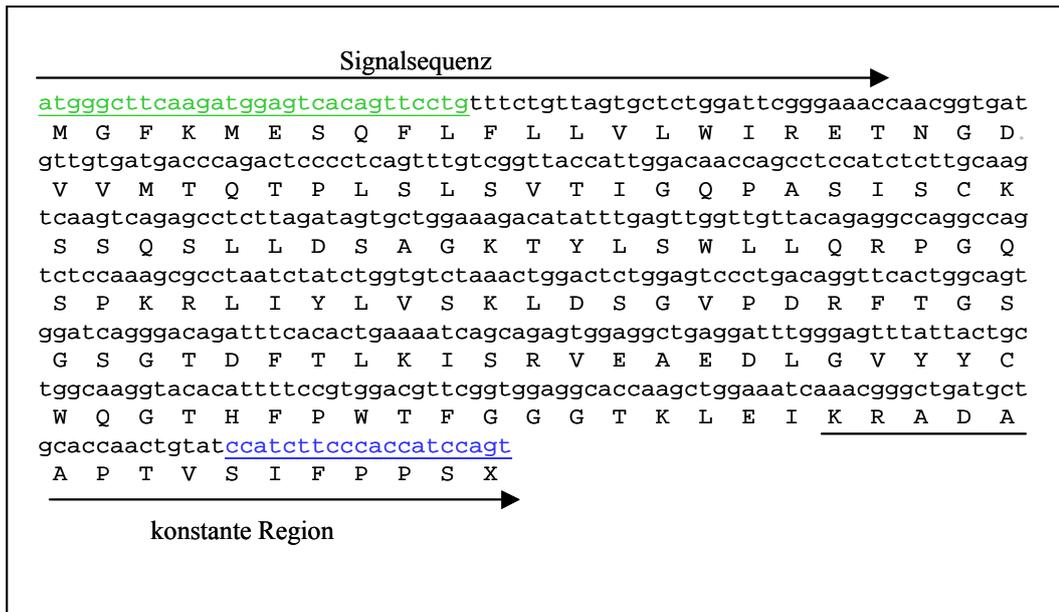
wurde, konnten die Vektoren mit den entsprechenden Primern (pJET5' seq und pJET3' seq) von der Firma GATC sequenziert werden. Die Primer wurden so gewählt, dass sie innerhalb der MCS von pJET1.2, in der Nähe des 5'- sowie des 3'-Bereiches des inserierten DNA-Fragmentes binden.

#### Ermittlung der Sequenzen der variablen Antikörperkettenfragmente

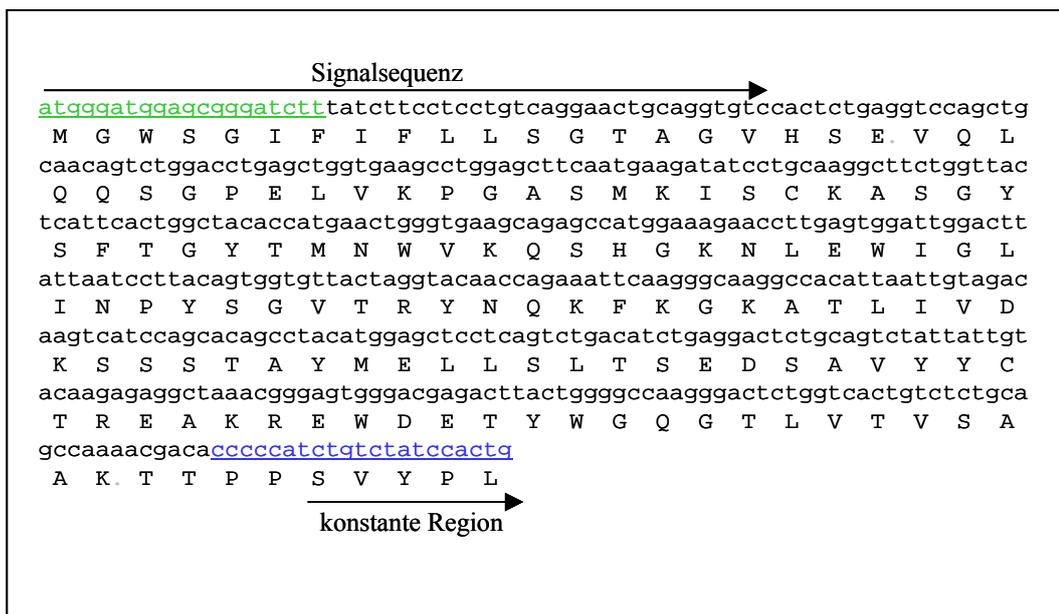
Da die amplifizierte Sequenz noch Teile der Signalsequenz sowie der konstanten Region des Antikörpers enthält, musste der exakte Bereich der kodierenden DNA für die variable Region noch ermittelt werden. Anhand konservierter Bereiche, die den Übergang zur Signalsequenz und zum konstanten Bereich des Antikörpers kennzeichnen, konnten die erhaltenen Sequenzen eingeordnet werden. Die dazwischen liegende Sequenz ist die kodierende DNA für den variablen Bereich der Antikörperketten (Abbildung 3.4 – 3.7).



**Abbildung 3.4:** DNA- und Aminosäuresequenz des variablen Bereiches der schweren Kette des Antikörpers 2C9. Die Signalsequenz, der Übergang zur konstanten Region sowie die Primersequenzen (MHV7 grün, MHCG2b blau) sind gekennzeichnet.



**Abbildung 3.5:** DNA- und Aminosäuresequenz des variablen Bereiches der leichten Kette des Antikörpers 2C9. Die Signalsequenz, der Übergang zur konstanten Region sowie die Primersequenzen (MKV7 grün, MKC blau) sind gekennzeichnet.



**Abbildung 3.6:** DNA- und Aminosäuresequenz des variablen Bereiches der schweren Kette des Antikörpers 4B8. Die Signalsequenz, der Übergang zur konstanten Region sowie die Primersequenzen (MHV7 grün, MHCG1 blau) sind gekennzeichnet.



**Abbildung 3.7:** DNA- und Aminosäuresequenz des variablen Bereiches der leichten Kette des Antikörpers 4B8. Die Signalsequenz, der Übergang zur konstanten Region sowie die Primersequenzen (MKV1 grün, MKC blau) sind gekennzeichnet.

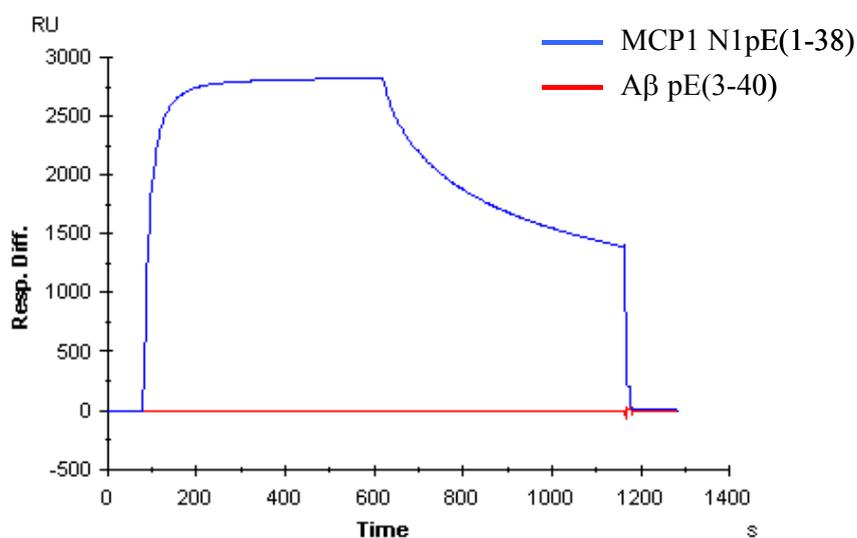
Die Aminosäuresequenz der konstanten Region der leichten Antikörperkette des Isotyps  $\kappa$  wurde aus der Proteindatenbank ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) entnommen. Ebenso konnten die Sequenzen der konstanten Regionen der schweren Antikörperketten IgG1 und IgG2b mit Hilfe der Proteindatenbank ermittelt werden. Nachdem die vollständige Aminosäuresequenz der leichten und schweren Antikörperketten bekannt waren, konnte daraus deren exaktes Molekulargewicht und molarer Extinktionskoeffizient bestimmt werden (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>). Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht der ausgewählten Proteinparameter der Antikörper 2C9 und 4B8.

**Tabelle 3.3:** Ausgewählte Proteinparameter der anti-MCP1 N1pE-Antikörper 2C9 und 4B8, welche aus der Aminosäuresequenz der leichten und schweren Kette ermittelt wurden.

Antikörperklon	Molekulargewicht [g/mol]	Molarer Extinktionskoeffizient [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
2C9	155397	247710
4B8	154863	244480

### 3.1.2.2 Untersuchung von Kreuzreaktivitäten der anti-MCP1 N1pE-Antikörper mittels Plasmonresonanz

Die anti-MCP1 N1pE-Antikörper sollten in der Entwicklung eines hMCP1 N1pE ELISAs Verwendung finden, mit dessen Hilfe z.B. hMCP1 N1pE in humanen Zellkultur-, Serum- oder CSF-Proben quantifiziert werden kann. Um eine hohe Spezifität des Assays zu gewährleisten war es wichtig, so früh wie möglich Kreuzreaktivitäten der anti-MCP1 N1pE-Antikörper zu weiteren humanen Peptiden auszuschließen, die einen Pyroglutamatrest am N-Terminus aufweisen. Dazu wurden von der Abteilung Peptidchemie (Probiobdrug AG) verschiedene Peptide synthetisiert, die einen pE-Rest am N-Terminus besitzen. Diese Peptide wurden dann wie in 2.5.1.1 beschrieben an einen CM5-Chip gekoppelt, um deren Bindung an die anti-MCP1 N1pE-Antikörper im Biacore zu überprüfen. Abbildung 3.8 zeigt exemplarisch die Reaktivität des Antikörpers 2C9 mit seinem Antigen MCP1 N1pE(1-38) und dem Peptid A $\beta$  pE(3-40). Alle weiteren untersuchten Peptide (siehe Tabelle 3.4) zeigten, in gleicher Weise wie A $\beta$  pE(3-40), keine Bindung an den Antikörper.



**Abbildung 3.8:** Ausgewählte Sensorgramme der Selektivitätsanalyse des Antikörpers 2C9 an natürlich vorkommende humane Peptide, die einen Pyroglutamatrest am N-Terminus aufweisen. Dargestellt ist die Bindung an MCP1 N1pE(1-38) und A $\beta$  pE(3-40).

In Tabelle 3.4 sind zusammenfassend die Reaktivitäten der Antikörper 2C9 und 4B8 mit den untersuchten humanen Peptiden gezeigt, die einen pE-Rest am N-Terminus des reifen Proteins aufweisen.

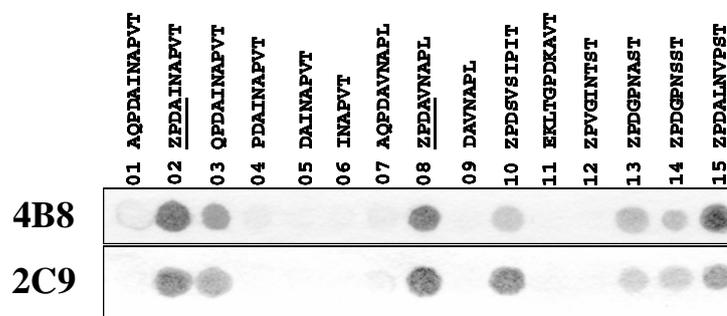
**Tabelle 3.4:** Analysedaten der Reaktivitätsuntersuchung der Antikörper 2C9 und 4B8 mit natürlich vorkommenden humanen Peptiden, die einen Pyroglutamatrest am N-Terminus des reifen Proteins aufweisen. Die Kreuzreaktivitäten sind in % zur Reaktivität mit hMCP1 N1pE(1-38) angegeben.

<b>Protein</b>	<b>Sequenz der vier N-terminalen Aminosäuren</b>	<b>% Kreuzreaktivität im Vergleich zu hMCP1 N1pE(1-38)</b>
A $\beta$ pE(3-42)	pE-F-R-H-...	<1
Big Gastrin	pE-L-G-P-...	<1
Gonadoliberin	pE-H-W-S-...	<1
Neurotensin	pE-L-Y-E-...	<1
Orexin A	pE-P-L-P-...	<1
Fibronektin	pE-A-Q-Q-...	<1
Collagen alpha-1 (I)	pE-L-S-Y-...	<1
Prothyroliberin	pE-P-E-A-...	<1

### 3.1.2.3 Untersuchung von Kreuzreaktivitäten der anti-MCP1 N1pE-Antikörper mit PepSpot Analysen

In einer DotBlot-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Antikörper 2C9 und 4B8 konzentrationsabhängig hMCP1 N1pE(1-38) detektieren (Daten nicht gezeigt). Weiterführend dazu wurden mit einer PepSpot Analyse Kreuzreaktivitäten der anti-MCP1 N1pE-Antikörper untersucht. Dieses Experiment sollte Aufschluss über weitere Anwendungsmöglichkeiten der Antikörper geben, wie der Detektion von Maus- und Ratten-MCP1 N1pE. Zudem werden Informationen über falsch positive Signale erhalten, die beim Einsatz der Antikörper im ELISA entstehen könnten. Dazu wurde eine Nitrozellulosemembran mit den N-terminalen Sequenzen der natürlich vorkommenden humanen MCP-Proteine beladen, die zum Teil durch Insertion beziehungsweise Deletion von 1-4 Aminosäuren modifiziert vorlagen. Des Weiteren wurde die Reaktivität der Antikörper mit den N-terminalen Sequenzen der murinen CC-Chemokine mMCP1, mMCP2 und mMCP3 sowie von Ratten MCP1 untersucht. Abbildung 3.9 zeigt, dass beide Antikörper sowohl humanes MCP1 N1pE(1-10), als auch murines MCP1 N1pE(1-10) detektieren (Spur 02 und 08). Da die ersten 16 Aminosäuren des murinen und Ratten MCP1 identisch sind, ist zu erwarten, dass beide Antikörper für die Erkennung von sowohl mMCP1 N1pE, als auch rMCP1 N1pE eingesetzt werden können. In den Spuren 4-6, 9 sowie 11-12 ist zu erkennen, dass die Antikörper MCP1 nicht mehr binden, sobald die

zyklisierte Aminosäure am N-Terminus fehlt. Das bedeutet, dass auch im geplanten ELISA keine Reaktionen mit N-terminal degradierten Proteinen zu erwarten sind. Kreuzreaktive Peptide sind hMCP2, hMCP4, mMCP3 sowie rMCP3. Die Reaktivität der Antikörper mit dem nicht zyklisierten Peptid hMCP1(1-10) (Spur 3) ist auf eine spontane Zyklisierung des Glutamins während des Prozedere der PepSpot Analyse zurückzuführen. In einer Western Blot Analyse wurde die Detektion gleicher Mengen hMCP1 N1Q und hMCP1 N1pE durch den Antikörper 4B8 miteinander verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass das nicht zyklisierte Peptid im Laufe der Western Blot Prozedur zyklisiert und daraufhin ebenso stark vom anti-MCP1 N1pE-Antikörper erkannt wird wie hMCP1 N1pE (Daten nicht gezeigt).



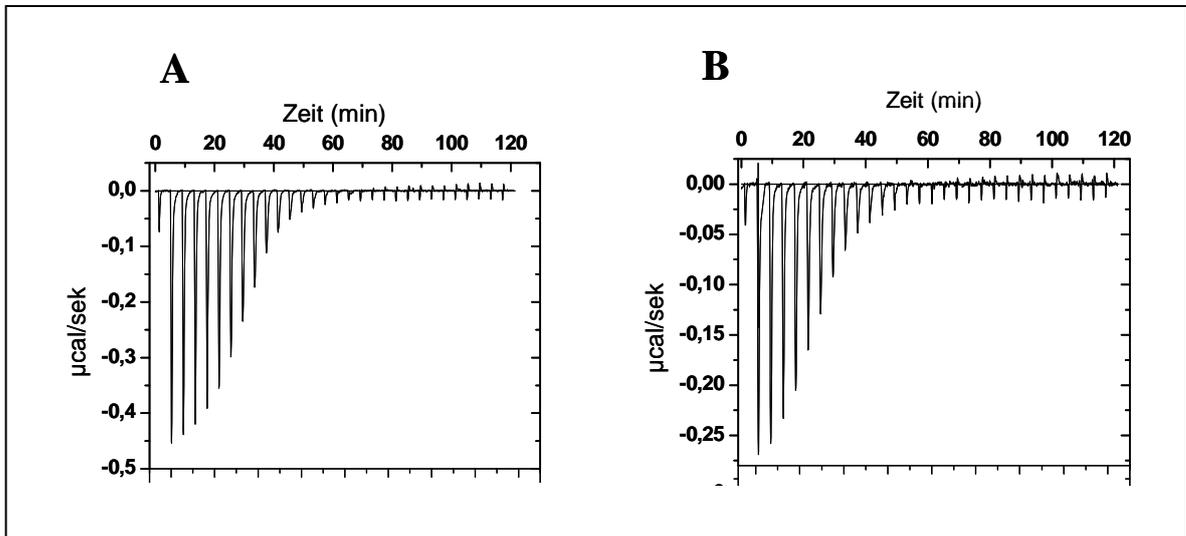
**Abbildung 3.9:** Darstellung einer PepSpot Analyse zur Bindung der monoklonalen anti-MCP1 N1pE-Antikörper 4B8 und 2C9 an zum Teil modifizierte N-terminale Sequenzen der humanen CC-Chemokine MCP1, MCP2, MCP3 und MCP4 sowie der murinen CC-Chemokine mMCP1, mMCP2, mMCP3 und rMCP3. Der zyklisierte Glutaminrest wird mit Z bezeichnet.

01 – hMCP1(Ala-1-10), 02 – hMCP1 N1pE(1-10), 03 – hMCP1(1-10), 04 – hMCP1(2-10), 05 – hMCP1(3-10), 06 – hMCP1(4-10), 07 – mMCP1(Ala-1-10), 08 - mMCP1 N1pE(1-10), 09 - mMCP1(3-10), 10 – hMCP2(1-10), 11 – mMCP2(1-11), 12 – hMCP3(1-9), 13 – mMCP3 N1pE(1-9), 14 – rMCP3(1-9), 15 – hMCP4(1-10).

### 3.1.2.4 Ermittlung thermodynamischer Parameter der anti-MCP1 N1pE-Antikörper mit Hilfe der Isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC)

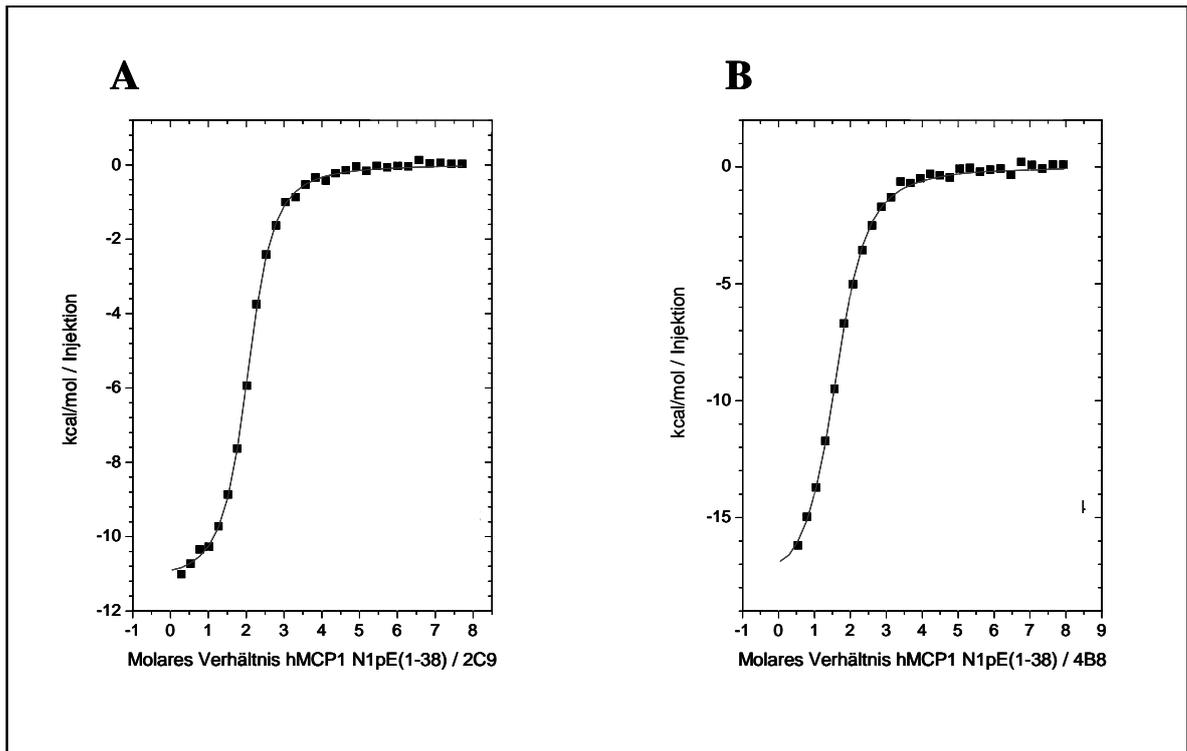
Um die Antikörperbindung an hMCP1 N1pE(1-38) thermodynamisch charakterisieren zu können, wurde die Methode der isothermalen Titrationskalorimetrie angewendet (siehe 2.5.4). Mit dieser Methode kann nicht nur die Bindungs- bzw. Dissoziationskonstante  $K_A$  bzw.  $K_D$  bestimmt werden, sondern auch die Bindungsenthalpie ( $\Delta H$ ) und Stöchiometrie ( $N$ ). Das Antigen hMCP1 N1pE(1-38) wurde dazu wie unter 2.5.4.2 beschrieben in einem Kompensationskalorimeter zu dem jeweiligen Antikörper titriert. Abbildung 3.10 zeigt die resultierenden Titrationskurven bei Titration des Antigens zu **A** – 2C9 bzw. **B** – 4B8. Jeder Peak steht für eine Titration. Nachdem alle Antikörperbindungsstellen vom Antigen

besetzt sind, zeigen die letzten Peaks nur die Wärmetönung, die durch die Verdünnung des hMCP1 N1pE(1-38) in Puffer entsteht.



**Abbildung 3.10:** Darstellung von Titrationskurven der Zugabe von hMCP1 N1pE(1-38) zur Antikörperlösung bei einer Temperatur von 20 °C. **A** – Konzentration von 2C9 in der Messzelle: 4,38  $\mu\text{M}$ ; mit der ersten Injektion wurden 2  $\mu\text{l}$ , mit jeder weiteren 10  $\mu\text{l}$  einer 147  $\mu\text{M}$  hMCP1 N1pE(1-38)-Lösung zugegeben. **B** – Konzentration von 4B8 in der Messzelle: 1,86  $\mu\text{M}$ ; mit der ersten Injektion wurden 2  $\mu\text{l}$ , mit jeder weiteren 10  $\mu\text{l}$  einer 64,3  $\mu\text{M}$  hMCP1 N1pE(1-38)-Lösung zugegeben.

Die Konstanten  $N$ ,  $\Delta H$  und  $K_A$  für die Bildung der Antigen-Antikörperkomplexe wurden mit Hilfe des Programms Origin 7.0 durch Approximierung des Wärmesignals an die gemessenen Wärmen der jeweiligen Injektion bestimmt (Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11:** Auswertung der ITC-Messung der Bindung von hMCP1 N1pE(1-38) an die Antikörper A – 2C9 bzw. B – 4B8. Temperatur 20 °C.

Tabelle 3.5 zeigt eine Übersicht der ermittelten Parameter Stöchiometrie (N), Assoziationskonstante ( $K_A$ ), Dissoziationskonstante ( $K_D$ ), Enthalpie ( $\Delta H$ ), Entropie ( $\Delta S$ ) sowie Gibbs-Energie ( $\Delta G$ ) für die Bindung von hMCP1 N1pE(1-38) an die Antikörper 2C9 und 4B8. In Tabelle 3.5 ist ersichtlich, dass beide Antikörper nahezu gleiche  $K_D$ -Werte aufweisen ( $K_{D\ 4B8} = 234 \pm 14,8$  nM,  $K_{D\ 2C9} = 260 \pm 12,3$  nM). Aus beiden Antigen-Antikörper-Bindungen resultiert ein Entropieverlust ( $\Delta S_{4B8} = -31,8$  cal/mol $\cdot K^{-1}$ ,  $\Delta S_{2C9} = -8,2$  cal/mol $\cdot K^{-1}$ ), welcher allerdings durch den enthalpischen Beitrag der Reaktionen kompensiert wird ( $\Delta H_{4B8} = -18,2 \pm 0,26$  kcal/mol,  $\Delta H_{2C9} = -11,2 \pm 0,07$  kcal/mol). Demnach besitzt der Antikörper 4B8 auch einen niedrigeren  $\Delta G$ -Wert für die Bindung an hMCP1 N1pE(1-38) ( $\Delta G_{4B8} = -8,9$  kcal/mol,  $\Delta G_{2C9} = -8,8$  kcal/mol). Die Stöchiometrie der Antigenbindung des Antikörpers 2C9 beträgt 1,98, der Antikörper 4B8 dagegen bindet lediglich 1,6 Antigenmoleküle pro Antikörpermolekül.

**Tabelle 3.5:** Zusammenstellung der Parameter zur Bindung der Antikörper 2C9 und 4B8 an das Antigen hMCP1 N1pE(1-38). Die Parameter wurden mit Hilfe eines Kompensationskalorimeters bei einer Temperatur von 20 °C bestimmt.

	<b>2C9</b>	<b>4B8</b>
<b>Stöchiometrie (N)</b>	1,98 ± 0,009	1,60 ± 0,02
<b>Assoziationskonstante (K<sub>A</sub>) in 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup></b>	3,81 ± 0,18	4,27 ± 0,27
<b>Dissoziationskonstante (K<sub>D</sub>) in nM</b>	260 ± 12,3	234 ± 14,8
<b>Bindungsenthalpie (ΔH) in kcal/mol</b>	-11,2 ± 0,07	-18,2 ± 0,26
<b>Bindungsentropie (ΔS) in cal/mol*K<sup>-1</sup></b>	-8,20	-31,8
<b>Gibbs Energie (ΔG) in kcal/mol</b>	-8,8	-8,9

### 3.1.3 Expression und Reinigung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper

#### 3.1.3.1 Optimierung der Antikörperproduktion in Hybridomazellen

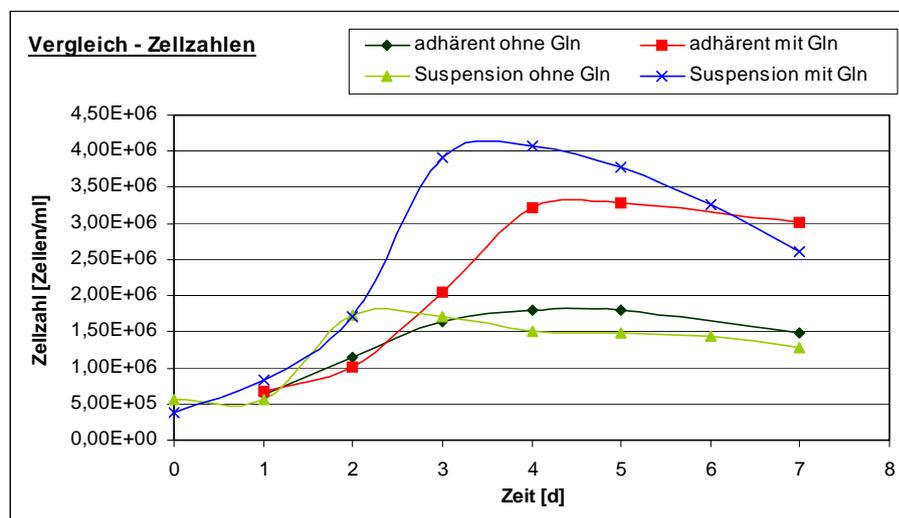
Wie bereits in Kapitel 3.1.1 und 2.3.4 beschrieben, wurden nach Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit dem Antigen hMCP1 N1pE(1-9) mehrere Hybridomazelllinien von der Firma UNICUS OHG hergestellt. Das Screening geeigneter Antikörperklone erfolgte dann innerhalb der Probiodrug AG mittels Plasmonresonanz-Analyse (Daten nicht gezeigt). Die Hybridomazelllinien, die aufgrund der Biacore-Analysen für die Anwendung im MCP1 N1pE ELISA geeignet schienen, wurden dann in Form von Kryokonserven zur Probiodrug AG gesendet. Da die Herstellung neuer Antikörper auch stets mit der Generierung neuer Hybridomazelllinien einher geht, können diese in Wachstum und Antikörperproduktion unterschiedlich sein. Aus diesem Grund wurden zunächst die Kultivierungsbedingungen der Hybridomazellen hinsichtlich des Zellwachstums und der Antikörperproduktion analysiert und optimiert. Im Folgenden wird exemplarisch die Optimierung der Produktion des anti-hMCP1-Antikörpers 2C9 beschrieben.

Da verschiedene Hersteller für die Kultivierung von Hybridomazellen unterschiedliche Medien anbieten, wurden zunächst Wachstumskurven mit verschiedenen Zellkulturmedien (D-MEM, D-MEM/F12, RPMI von Invitrogen, Hybridomed von Biochrom)

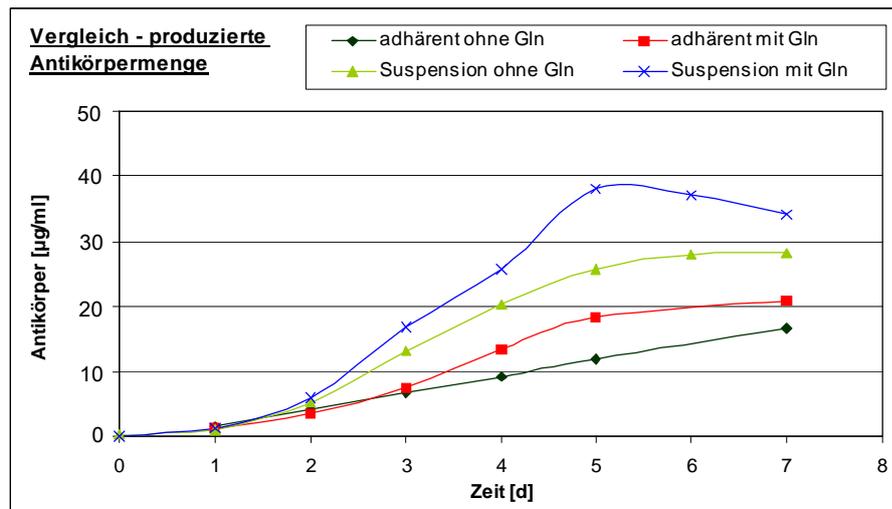
aufgenommen. Die Zellkultivierung erfolgte dabei ruhend in 24-Well-Platten (siehe 2.3.6). Es stellte sich heraus, dass die höchsten Zellzahlen unter Verwendung von D-MEM erreicht wurden (Daten nicht gezeigt).

Um zu prüfen ob eine Steigerung des Zellwachstums sowie der Antikörperproduktion durch eine Kultivierung im Schüttelkolben erreicht werden kann, wurden Wachstumskurven unter Verwendung von D-MEM in ruhender sowie in Schüttelkultur aufgenommen (siehe 2.3.6). Die Kultivierung der ruhenden Kultur erfolgte in einer 24-Well-Platte, wobei pro Tag ein Well geerntet wurde. Zur Überprüfung des Wachstums der Schüttelkultur wurden täglich Proben aus dem Schüttelkolben entnommen.

Weiterhin wurde der Einfluss der Supplemente 4 mM L-Glutamin, 1 mM Vitamine und 1 mM essentielle Aminosäuren untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde beobachtet, dass durch Zugabe von 4 mM L-Glutamin zu D-MEM die Wachstumsgeschwindigkeit der Hybridomazellen sowie die Produktbildungsrate deutlich erhöht werden konnte (Abbildung 3.12 und 3.13). Die Zellzahlen, die am Biacore ermittelten *Response Units* sowie daraus errechnete Antikörpermengen sind im Anhang II (Tabelle B1 – B4) aufgelistet.



**Abbildung 3.12:** Vergleichende Darstellung der Zellzahlen bei der Kultivierung von Hybridomazellen in ruhender und in Suspensionskultur. Die Zellen wurden weiterhin jeweils mit und ohne Zugabe von 4 mM L-Glutamin kultiviert.



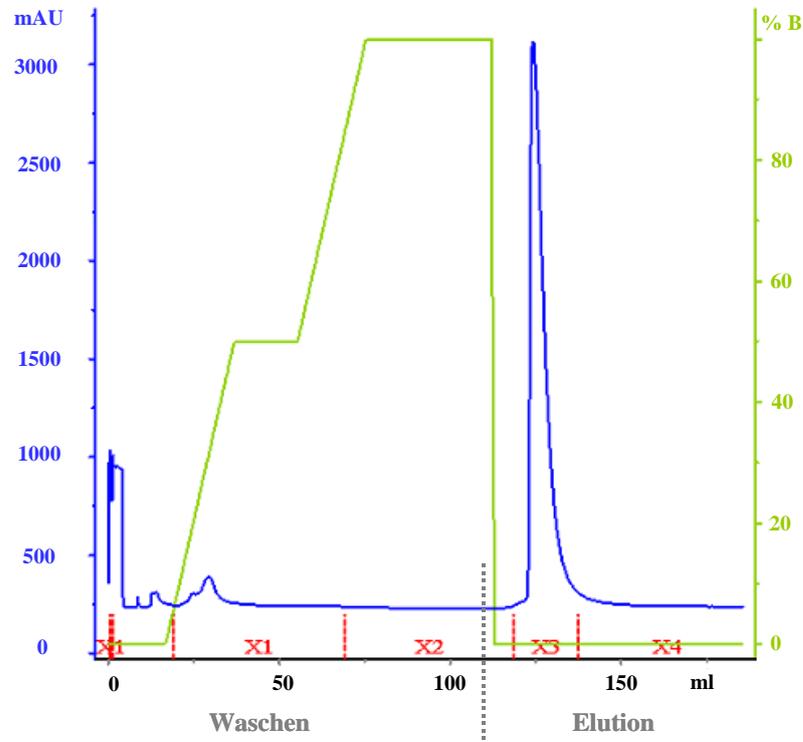
**Abbildung 3.13:** Vergleichende Darstellung der produzierten Antikörpermenge bei der Kultivierung von Hybridomazellen in ruhender und in Suspensionskultur. Die Zellen wurden weiterhin jeweils mit und ohne Zugabe von 4 mM L-Glutamin kultiviert.

In den Abbildungen 3.12 und 3.13 ist ersichtlich, dass die Hybridomazellen in Suspensionskultur unter Zugabe von 4 mM L-Glutamin sowohl die höchste Zelldichte erreichen als auch die größte Menge an Antikörper produzieren. Bis zu Tag 4 in ruhender Kultur und bis zu Tag drei in Suspensionskultur wachsen die Zellen exponentiell an, auch die Antikörpermenge steigt kontinuierlich. Nach der exponentiellen Phase folgen eine kurze stationäre Phase und der Übergang in die Absterbephase. Auffällig ist, dass auch in der Absterbephase weiterhin Antikörper gebildet wird. Lediglich in Suspensionskultur mit Glutamin sinkt die Antikörper-Konzentration im Medium ab Tag fünf wieder leicht ab.

### 3.1.3.2 Antikörperaufreinigung aus den Zellkulturüberständen

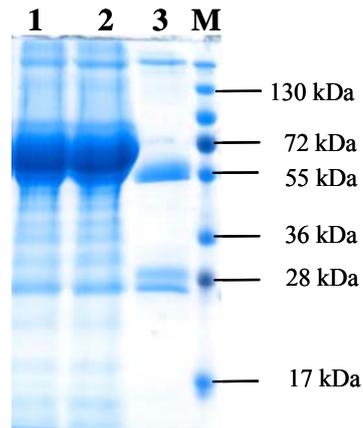
Die anti-MCP1 N1pE-Antikörper sollten bis zur Homogenität aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden, um diese im ELISA und in weiteren Experimenten wie z.B. dem Migrationsassay oder in Tierversuchen einsetzen zu können. Im Folgenden wird beispielhaft die Reinigung des Antikörpers 4B8 über eine Protein G-Säule gezeigt. Wie in 2.4.4.4 beschrieben, wurden die Zellkulturüberstände zunächst mit 2 x Bindungspuffer gemischt und auf die mit Bindungspuffer äquilibrierte Protein G-Säule aufgetragen. Anschließend wurden unspezifisch gebundene Komponenten mit Waschpuffer A von der Säule gewaschen. Durch Zugabe steigender Mengen von Waschpuffer B, wurden über einen NaCl-Gradienten weitere Fremdproteine entfernt (Fraktion X1-X2). Es folgte die

Elution des gebundenen Antikörpers von der Säule mit einer Glycin-HCl-Lösung pH 2,7 (Fraktion X3-X4) und die sofortige Neutralisierung der Lösung. Während der gesamten Prozedur wurde ein Chromatogramm aufgezeichnet, welches in Abbildung 3.14 dargestellt ist.



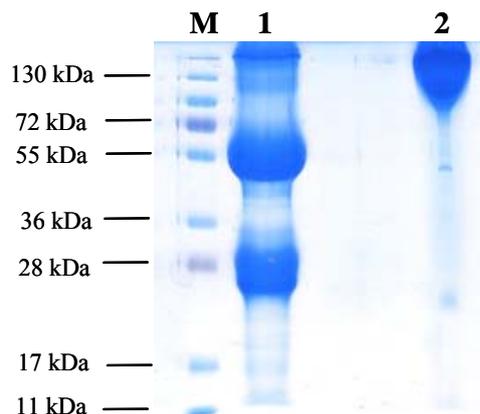
**Abbildung 3.14:** Chromatogramm der Aufreinigung des Antikörpers 4B8 aus 600 ml Hybridoma-Zellkulturüberstand. Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Protein G-Säulenmaterial am Äkta™ Purifier. Dargestellt ist die Absorption des Eluates bei 280 nm (blau), der Gehalt an Waschpuffer B in % (grün) und die gesammelten Fraktionen (rot). Waschen: 0 % Waschpuffer B entsprechen 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0; 100 % Waschpuffer B entsprechen 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 M NaCl, pH 7,0. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7.

Nach der Affinitätschromatographie wurde eine SDS-PAGE (siehe 2.4.1) durchgeführt, um zu bestimmen, in welchen Fraktionen gereinigter Antikörper enthalten ist. Dabei wurden auch Proben von dem ungereinigten Zellkulturüberstand und Proben der Waschfraktionen auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Anschließend erfolgte die Färbung der im Gel befindlichen Proteine mit Coomassie Blau (siehe Abbildung 3.15).



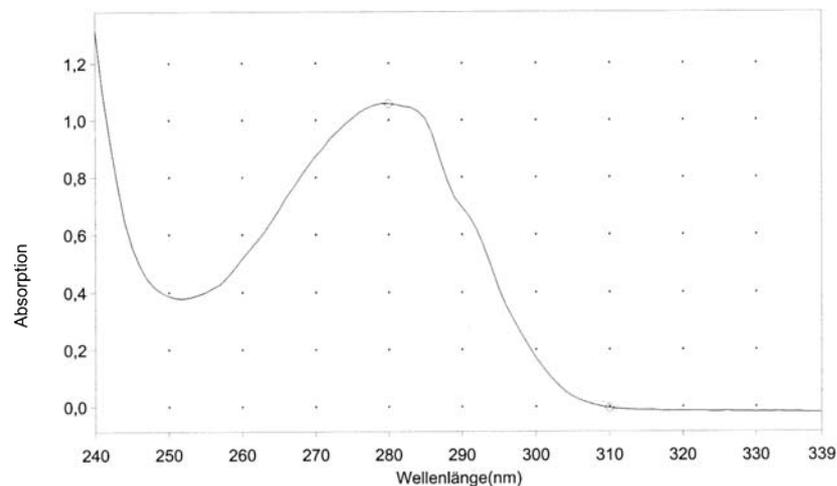
**Abbildung 3.15:** SDS-Gelelektropherogramm (12 % SDS-Gel) der Fraktionen nach der Aufreinigung des Antikörpers 4B8.  
 1 - Zellkulturüberstand vor Auftragen auf die Protein G-Säule, 2 – Durchlauf vom Auftragen auf die Protein G-Säule, 3 - Fraktion X3, M – Proteinstandard.  
 In Spur 1 und 2 wurden je 20  $\mu$ l, in Spur 3 und 4 je 5  $\mu$ l Probe aufgetragen.

Nach Betrachtung des SDS-Gels (Abbildung 3.15) zeigte sich, dass der Antikörper nahezu bis zur Homogenität aufgereinigt werden konnte (Spur 3). Aufgrund der reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE sind die leichte und die schwere Antikörperkette einzeln im Gel zu erkennen (55 kDa und 25 kDa große Banden). Um zu prüfen, ob die einzelnen Antikörperketten des gereinigten Antikörpers über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, wurde eine weitere SDS-Gelelektrophorese der Fraktion X3 unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt (siehe 2.4.1). Abbildung 3.16 zeigt das SDS-Gel des gereinigten Antikörpers unter reduzierenden sowie nicht reduzierenden Bedingungen.



**Abbildung 3.16:** SDS-Gelelektropherogramm (12 % SDS-Gel) von je 5  $\mu$ l des gereinigten Antikörpers 4B8 (Fraktion X3). Die Probe in Spur 1 wurde mit reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und durch 10minütige Inkubation bei 100 °C denaturiert. Die Probe in Spur 2 wurde mit nicht reduzierendem Probenpuffer behandelt und nicht gekocht. Die im Gel befindlichen Proteine wurden mit Coomassie Blau gefärbt.

Anschließend wurde die Fraktion X3 dialysiert, von 30 ml auf ein Volumen von 2 ml eingengt und die Antikörper-Konzentration mit dem UV-Spektrometer bestimmt (siehe 2.4.3). Das resultierende UV-Spektrum ist in Abbildung 3.17 dargestellt.



**Abbildung 3.17:** UV-Spektrum der Fraktion X3 nach Reinigung des Antikörpers 4B8 aus dem Hybridoma-Zellkulturüberstand über Protein G-Säulenmaterial. Die Probe wurde zur Aufnahme des UV-Spektrums 1:8 verdünnt.

Mit Hilfe des in 3.1.2.1 bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten des Antikörpers 4B8 ( $244480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), konnte für die eingengte Antikörperlösung eine Konzentration von 5,38 mg/ml ermittelt werden. Aus 600 ml Hybridomazellkulturüberstand wurden insgesamt 10,8 mg Antikörper aufgereinigt. Zur Aufbewahrung wurde der Antikörper sterilfiltriert, aliquotiert und bei  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.1.4 Expression und Reinigung von SUMO-MCP1

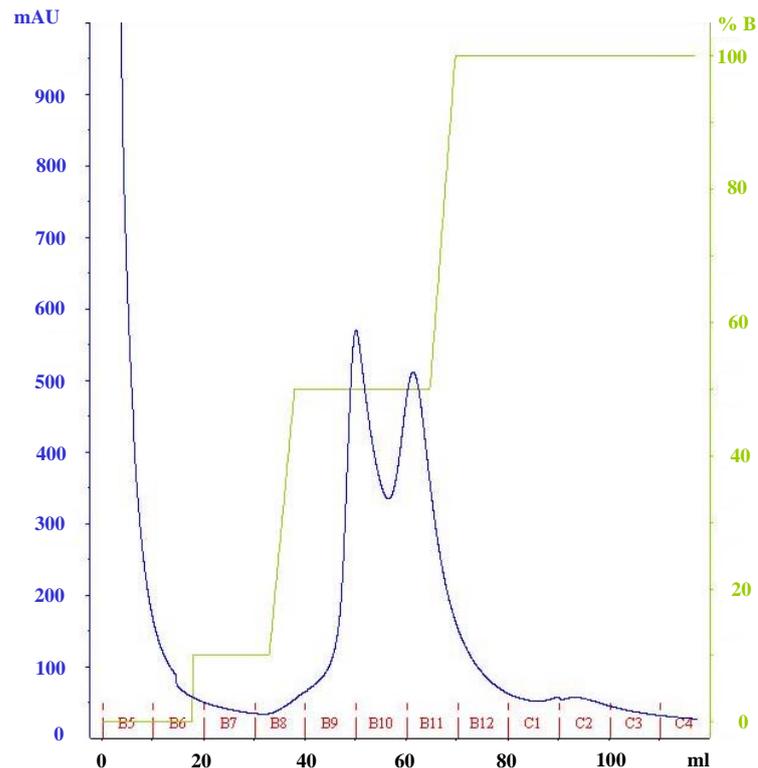
Die Proteine hMCP1, mMCP1 und rMCP1 werden für die in 3.2 beschriebenen ELISAs als Standardproteine benötigt. Weiterhin sollen größere Mengen der Zytokine in Experimenten wie dem THP-1-Migrationssassay (siehe 3.3.2) oder zur Ko-Kristallisation von MCP1 N1pE mit den anti-MCP1 N1pE-Antikörpern Verwendung finden. Aus diesem Grund war es ein Ziel dieser Arbeit, die Proteine rekombinant in *P. pastoris* zu exprimieren. Die Vorläuferproteine des Maus- und Ratten MCP1 bestehen aus 148 Aminosäuren, das des humanen MCP1 aus 99 Aminosäuren. Nach Abspaltung des 23 Aminosäuren langen Signalpeptides werden die reifen, 125 bzw. 76 Aminosäuren langen Proteine frei. Die reifen MCP1 Proteine der 3 Spezies weisen Glutamin als N-terminale Aminosäure auf, welche zu Pyroglutamat zyklisieren kann. Aus der Expression von

hMCP1 in *P. pastoris* ist bekannt, dass ein Großteil der rekombinanten Proteine N-terminal so prozessiert wird, dass hMCP1(3-76) entsteht (Beall *et al.*, 1997, Ruggiero *et al.*, 2003). Das verbleibende Zielprotein wird vermutlich durch die zelleigene QC der Hefen zyklisiert und liegt daraufhin als MCP1 N1pE vor. Um sowohl die N-terminale Prozessierung als auch die Zyklisierung zu verhindern, werden die Zytokine als Fusionsproteine in Form von SUMO-hMCP1, SUMO-mMCP1 und SUMO-rMCP1 exprimiert. Dabei wurde das SUMO-Protein N-terminal an die Zytokine fusioniert. Durch Abspaltung des SUMO-Proteins mit Hilfe der rekombinanten SENP2<sup>363-589</sup>-Protease, kann das N-terminale Glutamin unter definierten Bedingungen *in vitro* freigesetzt werden. Dabei können die Reaktionsbedingungen so gewählt werden, dass die spontane Zyklisierung nicht begünstigt wird. Durch Expression von h-, m- und rMCP1 als SUMO-Fusionsproteine ist die Möglichkeit gegeben, wahlweise MCP1 N1Q zu erhalten oder durch nachträgliche Inkubation mit rekombinanter QC MCP1 N1pE zu generieren (siehe 2.6.1).

#### 3.1.4.1 Expression von SUMO-MCP1

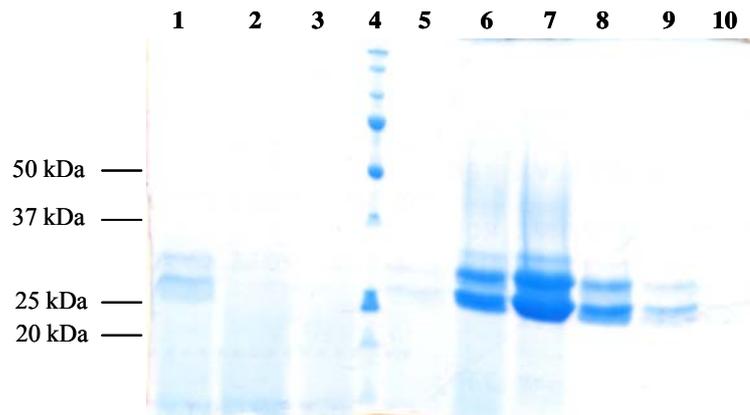
Die *P. pastoris*-Klone mit den entsprechenden Genen zur Expression von SUMO-hMCP1, SUMO-mMCP1 und SUMO-rMCP1 wurden zu Beginn der Arbeit von Juliane Krüger zur Verfügung gestellt. Da die Expressionen von SUMO-hMCP1, SUMO-mMCP1 und SUMO-rMCP1 annähernd gleich verliefen, soll hier die Expression von SUMO-hMCP1 beispielhaft dargestellt werden.

Die Proteinexpression erfolgte wie in 2.2.3 beschrieben in *P. pastoris* im Schüttelkolben. Nach erfolgreicher Expression der rekombinanten Proteine wurden 500 ml des Kulturüberstandes für die Applikation auf das NiNTA-Säulenmaterial vorbereitet (siehe 2.4.4.2). Die Elution des gebundenen Zielproteins erfolgte durch Zugabe von bis zu 500 mM Imidazol (100 % Puffer B) in einem Stufengradienten. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 10 ml gesammelt. Abbildung 3.18 zeigt ein Chromatogramm der Reinigung von SUMO-hMCP1 mittels NiNTA-Säulenmaterial.



**Abbildung 3.18:** Chromatogramm der Elution von SUMO-hMCP1 von NiNTA-Säulenmaterial. Dargestellt ist die Absorption des Eluates bei 280 nm (blau), der Gehalt an Puffer B in % (grün) und die gesammelten Fraktionen (rot). Puffer A: 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7,6. Puffer B: 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,6.

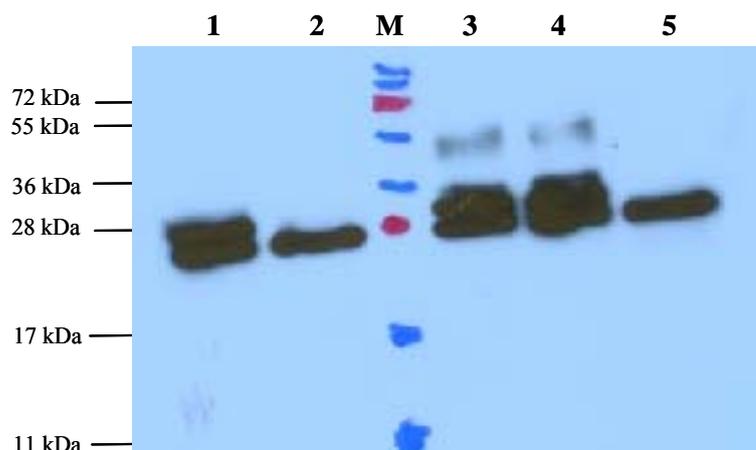
Die Elutionsfraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE auf das Vorhandensein von SUMO-hMCP1, sowie weiterer Fremdproteine untersucht (Abbildung 3.19). Bei Betrachtung des SDS-Gels in Abbildung 3.19 sind im Kulturüberstand 2 dominante Proteinbanden in einer Konzentration von ca. 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erkennbar (Spur 1). Das nicht glykosylierte SUMO-hMCP1 besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 20051,6 Da. Aus Abbildung 3.19 wird deutlich, dass das Zielprotein in den Fraktionen B9-B12 vorliegt (Spur 6-9). Hier sind 2-3 Proteinbanden sichtbar, für welche anhand des Proteinstandards ein Molekulargewicht von 25 – 35 kDa ermittelt wurde.



**Abbildung 3.19:** SDS-Gelelektropherogramm (12 % SDS-Gel) ausgewählter Proteinfractionen der Elution von SUMO-hMCP1 von NiNTA-Säulenmaterial. 21  $\mu$ l Proteinlösung wurden mit 7  $\mu$ l 4 x SDS-Probenpuffer versetzt. Die im Gel befindlichen Proteine wurden mit Coomassie Blau gefärbt.

1 – Kulturüberstand vor Applikation auf das NiNTA-Säulenmaterial, 2 – Durchlauf vom Auftragen auf das NiNTA-Säulenmaterial, 3 – Fraktion B7, 4 – Proteinstandard (BioRad), 5 – Fraktion B8, 6 – Fraktion B9, 7 – Fraktion B10, 8 – Fraktion B11, 9 – Fraktion B12, 10 – Fraktion C1.

Um zu bestätigen, dass es sich hierbei um heterogen glykosyliertes SUMO-hMCP1 handelt, wurde das Zielprotein mit verschiedenen Deglykosylierungsenzymen inkubiert und anschließend im Western Blot detektiert. Aus Abbildung 3.20 ist ersichtlich, dass es sich bei dem gereinigten Zielprotein um N-glykosyliertes SUMO-hMCP1 handelt. Durch die Western Blot Analyse unter Verwendung eines anti-hMCP1-Antikörpers konnte zudem bewiesen werden, dass bei allen im Coomassiegel sichtbaren Proteinbanden (Spur 6-9) SUMO-hMCP1 vorliegt (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20:** Darstellung einer Western Blot Analyse von SUMO-hMCP1 nach Inkubation mit verschiedenen Deglykosylierungsenzymen. 1 – unbehandeltes Protein, 2 – Inkubation mit N-Glykanase, M - Proteinstandard, 3 – Inkubation mit O-Glykanase, 4 – Inkubation mit Sialidase, 5 – Inkubation mit N-Glykanase, O-Glykanase und Sialidase.

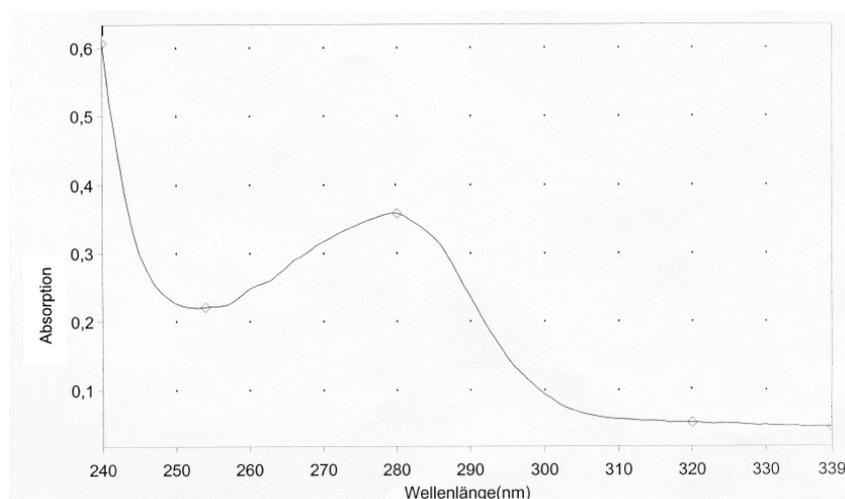
In Vorbereitung des folgenden Arbeitsschrittes, der Spaltung von SUMO-hMCP1 durch

die SENP2<sup>363-589</sup>-Protease und die anschließende Isolierung des reifen hMCP1, war eine vollständige Entfernung des Imidazols aus den Proben notwendig. Dies geschah mit Hilfe einer Entsalzungssäule (HiPrep 26/10 Desalting, GE Healthcare) am Äkta<sup>TM</sup>Purifier (siehe 2.4.4.3). Das Zielprotein wurde dabei in den Aufbewahrungspuffer für SUMO-hMCP1 (20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6,0) überführt. Die Fraktionen B11 und B12 wurden dazu vereinigt. Nach Entsalzung der einzelnen Fraktionen wurde deren Proteinkonzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt (siehe 2.4.3) und die Proben anschließend bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Tabelle 3.6 zeigt zusammenfassend für die einzelnen Fraktionen die ermittelten Absorptionen bei 280 nm, die daraus errechnete Proteinkonzentration sowie die Gesamtproteinmenge.

**Tabelle 3.6:** Charakterisierung der Proteinausbeuten nach der Reinigung von SUMO-hMCP1 über NiNTA-Säulenmaterial. Die Fraktionen B11 und B12 wurden nach der NiNTA-Affinitätschromatographie vereinigt. Dargestellt sind die Volumina der Fraktionen vor Entsalzung, nach Entsalzung, die ermittelten Absorptionen bei 280 nm, die daraus errechneten Proteinkonzentrationen sowie die Gesamtproteinmenge in jeder Fraktion. Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280\text{nm}}$  von SUMO-hMCP1 beträgt  $9970\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Fraktion nach NiNTA	Volumen vor Entsalzung	Volumen nach Entsalzung	$A_{280}$	Konzentration	Menge
B9	5 ml	10 ml	0,155	0,31 mg/ml	3,1 mg
B10	5 ml	10 ml	0,31	0,61 mg/ml	6,1 mg
B11 + B12	10 ml	20 ml	0,071	0,14 mg/ml	2,8 mg

In Abbildung 3.21 ist exemplarisch das UV-Spektrum der Fraktion B10 dargestellt.



**Abbildung 3.21:** UV-Spektrum der Fraktion B10 nach Reinigung von SUMO-hMCP1 über NiNTA-Säulenmaterial und anschließender Entsalzung. Das UV-Spektrum wurde über einen Wellenlängenbereich von 240 nm - 340 nm aufgenommen.

Aus 500 ml Kulturüberstand, mit ca. 100 mg SUMO-hMCP1, konnten insgesamt 12 mg des Zielproteins bis zur Homogenität aufgereinigt werden.

Tabelle 3.7 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der Ausbeuten an SUMO-hMCP1, SUMO-mMCP1 und SUMO-rMCP1 nach deren Reinigung mittels NiNTA-Säulenmaterial aus jeweils 500 ml *P. pastoris* Kulturüberstand.

**Tabelle 3.7:** Proteinausbeuten nach der Reinigung von SUMO-hMCP1, SUMO-mMCP1 und SUMO-rMCP1 aus je 500 ml *P. pastoris* Kulturüberstand über NiNTA-Säulenmaterial.

Protein	Ausbeute in mg
SUMO-hMCP1	12,0
SUMO-mMCP1	7,2
SUMO-rMCP1	6,6

### 3.1.5 Expression und Reinigung von SENP2<sup>363-589</sup>

In Kapitel 3.1.4 wurde die Expression der Fusionsproteine SUMO-hMCP1, SUMO-mMCP1 und SUMO-rMCP1 beschrieben. *Sentrin specific proteases* (SENPs) sind in der Lage, das SUMO-Protein proteolytisch vom Zielprotein zu entfernen (Dekonjugation) (Mikolajczyk *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde das katalytisch aktive Fragment der humanen SENP2, SENP2<sup>363-589</sup>, in *E. coli* exprimiert und isoliert, um die reifen MCP1-Proteine aus den Fusionsproteinen SUMO-MCP1 freisetzen zu können. Die Reinigung von SENP2<sup>363-589</sup> über NiNTA-Säulenmaterial, die anschließende Entsalzung sowie deren Aktivitätsbestimmung erfolgte anhand von publizierten Protokollen (Mikolajczyk *et al.*, 2007) und sind im Methodenteil beschrieben (siehe 2.4.4.2 und 2.4.4.3). Aus dem Zellpellet von 6 Litern BL21-Expressionskultur konnten 5,92 mg SENP2<sup>363-589</sup>-Protease mit einer spezifischen Aktivität von 24,9 U/μg gereinigt werden.

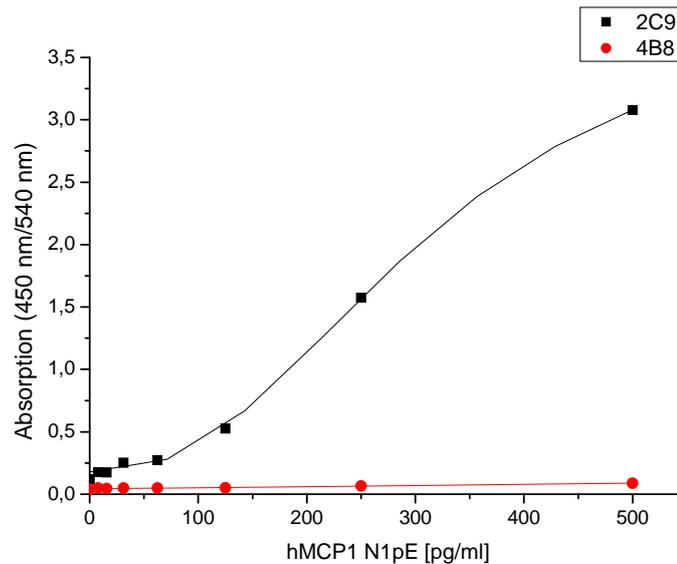
### 3.2 Entwicklung von ELISAs zum quantitativen Nachweis von total MCP1 und MCP1 N1pE

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung des N-terminalen Pyroglutamats von MCP1 war es notwendig einen Assay zu entwickeln, der den quantitativen Nachweis von total MCP1 und MCP1 N1pE in biologischen Systemen ermöglicht. Ziel war dabei, Assays zu generieren, mit denen die Ermittlung des Verhältnisses von MCP1 N1pE / total MCP1 gelingt. Die Menge an total MCP1 umfasst sowohl MCP1 N1pE, als auch MCP1 N1Q

sowie N- oder C-terminal verkürzte Formen des Proteins. Inhibitoren der QCs sind ein nützliches Hilfsmittel um den Einfluss der N-terminalen Zyklisierung von MCP1 in biologischen Systemen zu untersuchen. Um den Einsatz von QC/isoQC-Inhibitoren in klinischen Studien vorzubereiten, müssen diese in klassischen Inflammationsmodellen, z.B. in Maus und Ratte getestet werden. Zur Analyse der Wirksamkeit von QC/isoQC-Inhibitoren in Tiermodellen war es notwendig, neben total hMCP1 und hMCP1 N1pE ELISAs, Assays zur quantitativen Detektion von mMCP1, mMCP1 N1pE sowie rMCP1 und rMCP1 N1pE zu entwickeln. Dazu sollten Sandwich-ELISAs etabliert werden, bei denen zunächst ein immobilisierter Fangantikörper die Antigene total MCP1 und MCP1 N1pE bindet. Durch Zugabe verschiedener Detektionsantikörper kann dann sowohl die Menge an total MCP1 als auch der Anteil von MCP1 N1pE an der Gesamtmenge quantifiziert werden.

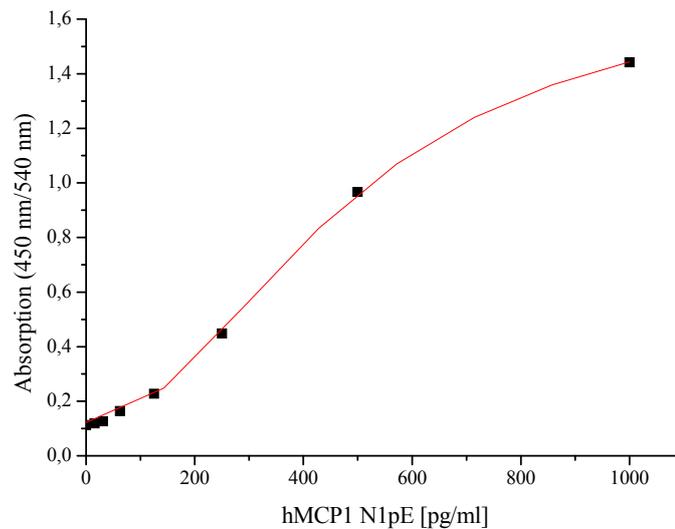
### **3.2.1 Entwicklung von ELISAs zum quantitativen Nachweis von total hMCP1 und hMCP1 N1pE**

Im Laufe der Etablierung des Sandwich-ELISAs zum Nachweis von hMCP1 und hMCP1 N1pE wurden verschiedene kommerziell erhältliche anti-*human*-MCP1-Antikörper hinsichtlich ihrer Verwendung als Fangantikörper getestet (Daten nicht dargestellt). Zunächst wurde wie in 2.6.2 beschrieben untersucht, welcher Antikörper die anschließende Detektion von hMCP1 N1pE durch die anti-MCP1 N1pE-Antikörper ermöglicht. Die besten Resultate erzielte dabei der polyklonale Antikörper *Goat anti hMCP1 AF* (Fa. R&D Systems, Minneapolis). hMCP1 N1pE konnte mit den anti-MCP1 N1pE-Antikörpern 4B8 und 2C9 konzentrationsabhängig nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich, dass der 2C9 Antikörper für den Einsatz im ELISA deutlich besser geeignet ist als 4B8 (Abbildung 3.22).



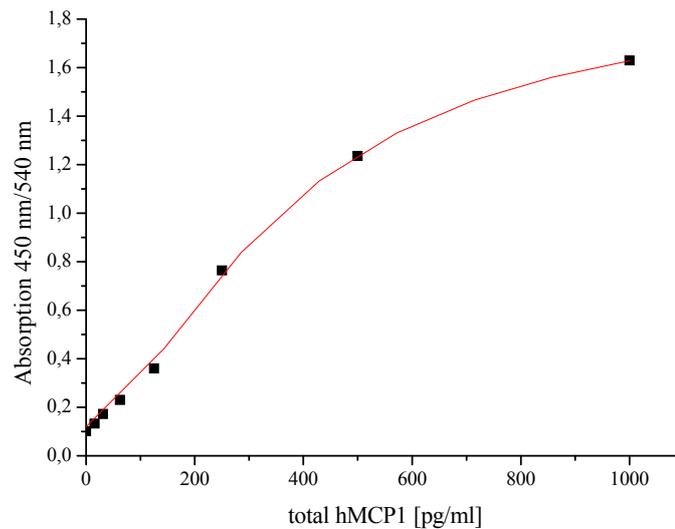
**Abbildung 3.22:** Vergleichende Darstellung der Detektion von hMCP1 N1pE im Sandwich-ELISA durch die Detektionsantikörper 4B8 (rot) und 2C9 (schwarz). Als Fangantikörper wurde der polyklonale *Goat anti hMCP1 AF* von R&D Systems verwendet. Die Standardkurven wurden aus den gemessenen Datenpunkten über einen 4-Parameter-Logistik-Fit erstellt:  $y = (A2 + (A1-A2)/(1+(x/x_0)^p)$ .

Unter Verwendung des Fangantikörpers *Goat anti hMCP1 AF* in Kombination mit dem anti-MCP1 N1pE-Antikörper 2C9 wurden weitere Parameter des ELISA-Protokolls analysiert und optimiert. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen des Fangantikörpers, des Detektionsantikörpers und des HRP-Konjugates miteinander verglichen. Weiterhin erfolgte die Analyse des ELISA-Protokolls hinsichtlich Inkubationszeiten und -Temperaturen, sowie der Verwendung unterschiedlicher Blocking- und Probenverdünnungspuffer (Daten nicht gezeigt). Nach Optimierung der genannten Parameter konnte ein Detektionslimit für total hMCP1 und hMCP1 N1pE von 16 pg/ml erreicht werden. Abbildung 3.23 zeigt eine hMCP1 N1pE Standardkurve (Protokoll siehe Tabelle 2.12) mit den ermittelten Werten der 4 Parameter  $A1$ ,  $A2$ ,  $x_0$  und  $p$  (siehe 2.6.3).



**Abbildung 3.23:** Standardkurve zur Ermittlung der hMCP1 N1pE-Konzentration aus der Absorption bei 450 nm/540 nm. Die Standardkurve wurde aus den gemessenen Datenpunkten über einen 4-Parameter-Logistik-Fit erstellt:  $y = (A2 + (A1 - A2)/(1 + (x/x_0)^p))$ , wobei  $A1 = 0,122$ ;  $A2 = 1,747$ ;  $x_0 = 484,133$ ;  $p = 2,028$  (siehe 2.6.3). Der Sandwich-ELISA wurde unter Verwendung des *Goat anti hMCP1 AF* als Fangantikörper und 2C9 als Detektionsantikörper durchgeführt (siehe Tabelle 2.12).

Da der MCP1-Gehalt in biologischen Proben natürlichen Schwankungen unterliegt, ist es zur Ermittlung des prozentualen Anteils von hMCP1 N1pE notwendig, diesen mit der Menge an total MCP1 zu vergleichen. Aus diesem Grund sollte ein analoger Sandwich-ELISA zur quantitativen Detektion von total hMCP1, unter Verwendung des identischen Fangantikörpers, entwickelt werden. Dazu wurden verschiedene kommerziell erhältliche monoklonale anti-MCP1-Antikörper wie unter 2.6.2 beschrieben auf deren Eignung als Detektionsantikörper getestet. Im Zuge dieser Untersuchungen zeigte der Antikörper *mouse anti hMCP1* (Fa. Peprotech) die besten Resultate. Analog zur Entwicklung des hMCP1 N1pE ELISAs wurden auch die Parameter des total hMCP1 ELISA-Protokolls (siehe 2.6.2) analysiert. Nach Optimierung der Konzentrationen des Fangantikörpers, des Detektionsantikörpers, des HRP-Konjugates, der Inkubationszeiten und -Temperaturen sowie der Blocking- und Probenverdünnungspuffer konnte ebenfalls ein Detektionslimit von 16 pg/ml erreicht werden (siehe Abbildung 3.24). Das Protokoll zur Durchführung des total hMCP1 ELISAs ist in Tabelle 2.12 ersichtlich.

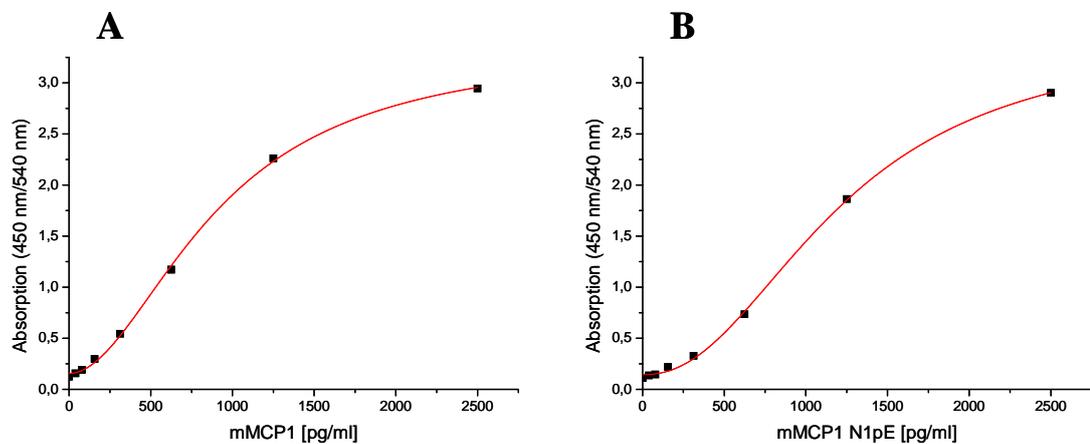


**Abbildung 3.24:** Standardkurve zur Ermittlung der totalen hMCP1-Konzentration aus der Absorption bei 450 nm/540 nm. Die Standardkurve wurde aus den gemessenen Datenpunkten über einen 4-Parameter-Logistik-Fit erstellt:  $y = (A2 + (A1 - A2) / (1 + (x/x_0)^p))$ , wobei  $A1 = 0,12$ ;  $A2 = 1,933$ ;  $x_0 = 370,499$ ;  $p = 1,612$  (siehe 2.6.3). Der Sandwich-ELISA wurde unter Verwendung des *Goat anti hMCP1 AF* als Fangantikörper und *mouse anti hMCP1* (Peprotech) als Detektionsantikörper durchgeführt (siehe Tabelle 2.12).

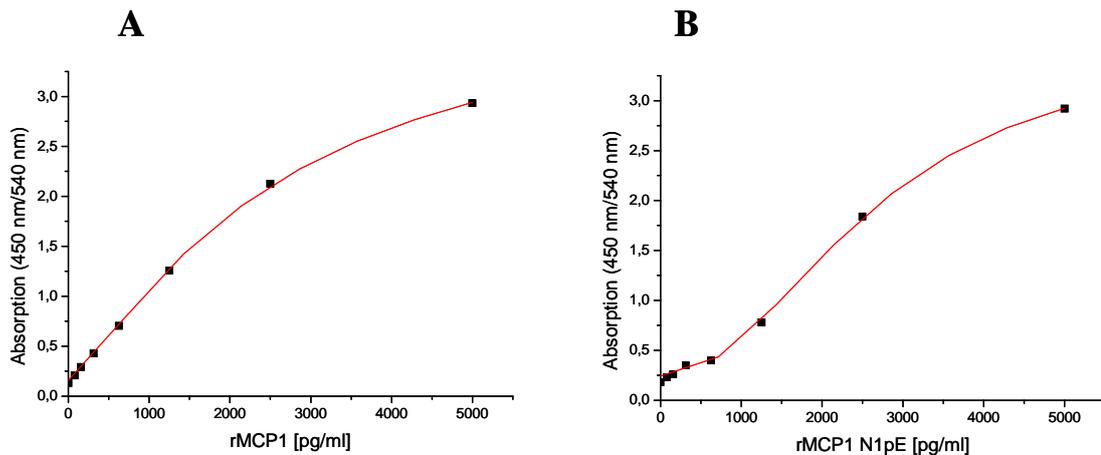
### 3.2.2 Entwicklung von ELISAs zum quantitativen Nachweis von MCP1 und MCP1 N1pE aus Ratte und Maus

Analog zu 3.2.1 wurden zunächst verschiedene kommerziell erhältliche anti-*mouse*-MCP1- sowie anti-*rat*-MCP1-Antikörper hinsichtlich ihrer Verwendung als Fangantikörper getestet. Dabei konnten die besten Resultate mit den polyklonalen Antisera *Rabbit anti mJE* (Fa. Peprotech, Hamburg) sowie *Rabbit anti rat MCP1* (Fa. Lifespan Biosciences, Seattle, USA) erzielt werden. Auch für die Detektion von mMCP1 N1pE und rMCP1 N1pE zeigte sich, dass der Antikörper 2C9 für den Einsatz im ELISA deutlich besser geeignet ist als der Antikörper 4B8 (Daten nicht dargestellt). Weiterhin wurden verschiedene kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper hinsichtlich ihrer Verwendung als Detektionsantikörper für total mMCP1 bzw. total rMCP1 getestet. Zur Etablierung dieser ELISAs wurden die Antikörper *Rat anti mouse MCP1* (Fa. R&D Systems, Minneapolis) und *Rabbit anti rat MCP1* (Fa. Peprotech, Hamburg) ausgewählt. Analog zur Optimierung der humanen ELISAs, wurden Parameter wie Konzentration des Fangantikörpers, des Detektionsantikörpers und des HRP-Konjugates, Inkubationszeiten und -Temperaturen, sowie Verwendung unterschiedlicher Blocking- und Probenverdünnungspuffer analysiert. Die optimierten ELISA-Protokolle sind in den

Tabellen 2.13 und 2.14 dargestellt. Abbildung 3.25 und Abbildung 3.26 zeigen exemplarisch je zwei Standardkurven zur quantitativen Detektion von m- und rMCP1 sowie m- und rMCP1 N1pE.



**Abbildung 3.25:** Standardkurven zur Ermittlung der Konzentration von **A** - mMCP1 und **B** - mMCP1 N1pE aus der Absorption bei 450 nm/540 nm. Die Standardkurven wurden aus den gemessenen Datenpunkten über einen 4-Parameter-Logistik-Fit erstellt:  $y = (A2 + (A1-A2)/(1+(x/x_0)^p))$ . **A:**  $A1 = 0,16$ ;  $A2 = 3,36$ ;  $x_0 = 909,34$ ;  $p = 1,91$ . **B:**  $A1 = 0,14$ ;  $A2 = 3,47$ ;  $x_0 = 1219,74$ ;  $p = 2,207$  (siehe 2.6.3). Der Sandwich-ELISA wurde unter Verwendung des *Rabbit anti mJE* als Fangantikörper und **A** - *Rat anti mouse MCP1*, sowie **B** - *2C9* als Detektionsantikörper durchgeführt (siehe Tabelle 2.13).



**Abbildung 3.26:** Standardkurven zur Ermittlung der Konzentration von A - rMCP1 und B - rMCP1 N1pE aus der Absorption bei 450 nm/540 nm. Die Standardkurven wurden aus den gemessenen Datenpunkten über einen 4-Parameter-Logistik-Fit erstellt:  $y = (A2 + (A1-A2)/(1+(x/x_0)^p))$ . **A:**  $A1 = 0,16$ ;  $A2 = 4,16$ ;  $x_0 = 2618,09$ ;  $p = 1,27$ . **B:**  $A1 = 0,24$ ;  $A2 = 3,60$ ;  $x_0 = 2630,71$ ;  $p = 2,15$  (siehe 2.6.3). Der Sandwich-ELISA wurde unter Verwendung des *Rabbit anti rat MCP1* (Lifespan Biosciences) als Fangantikörper und **A** - *Rabbit anti rat MCP1* (Peprotech), sowie **B** - 2C9 als Detektionsantikörper durchgeführt (siehe Tabelle 2.14).

### 3.2.3 Epitopmapping der Detektionsantikörper des total h-, m- und rMCP1 ELISAs

In den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2 wurde die Entwicklung von MCP1 N1pE ELISAs beschrieben, die dem Nachweis des prozentualen Anteils von MCP1 N1pE in Mensch, Maus und Ratte dienen sollen. Dabei ist es wichtig Kenntnis über die Aminosäuresequenzen zu haben, die von den Detektionsantikörpern der total MCP1 ELISAs erkannt werden. So lassen sich Rückschlüsse darauf ziehen, inwiefern die hier detektierten Proteine Rezeptorbindungssequenzen besitzen oder N- bzw. C-terminal degradiert vorliegen können. Weiterhin ist die Kenntnis um das Epitop hilfreich für die Entwicklung eigener monoklonaler Detektionsantikörper zur Anwendung im total MCP1 ELISA.

Zur Ermittlung des Epitops der Detektionsantikörper wurden Nitrocellulose-Membranen verwendet, auf denen die Aminosäuresequenzen von hMCP1, mMCP1 bzw. rMCP1 in überlappenden Sequenzen von je 10 Aminosäuren gespottet waren (siehe 2.5.3). Diese Membranen wurden von Dr. Nicole Wehofsky (MLU Halle) zur Verfügung gestellt. Das Epitopmapping wurde dann unter Verwendung der Detektionsantikörper *mouse anti human MCP1*, *Rat anti mouse MCP1* und *Rabbit anti rat MCP1* wie in 2.5.3 beschrieben

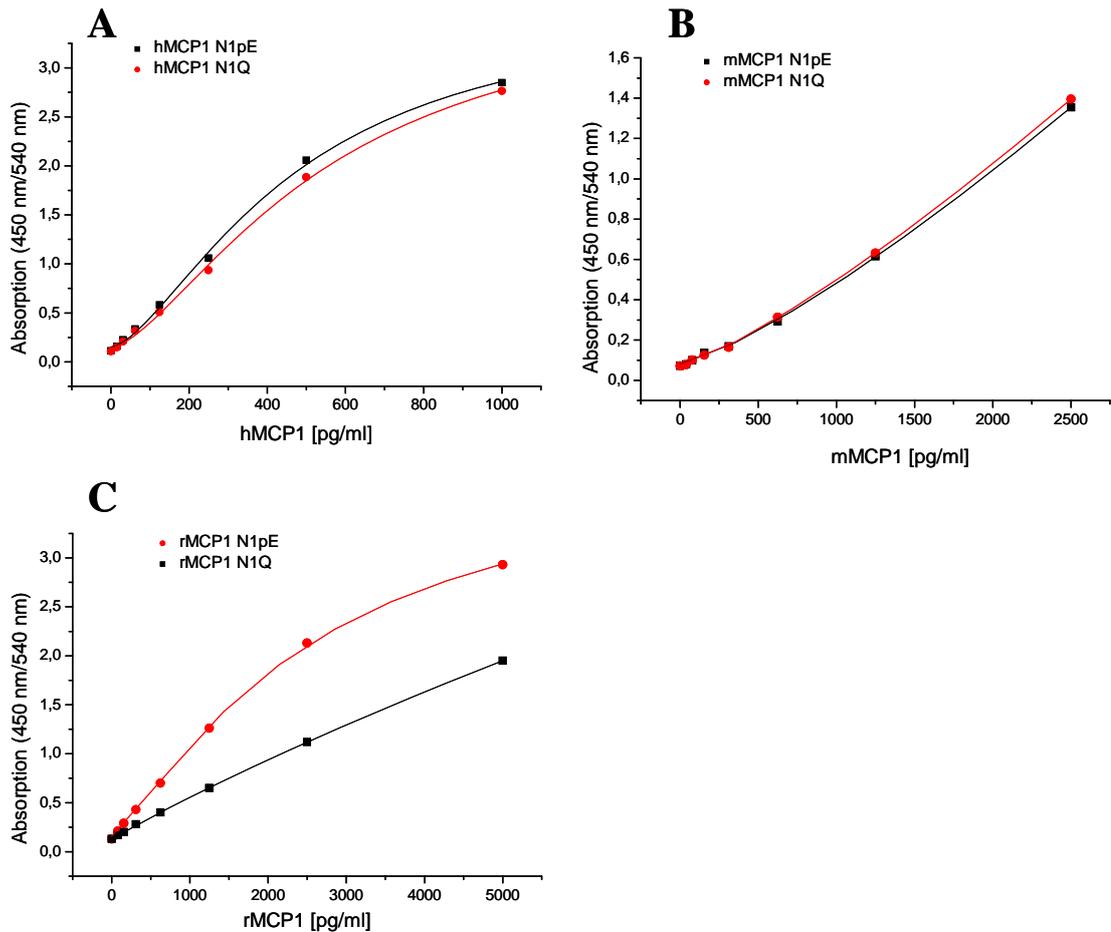


Antikörper *Rabbit anti rat MCP1* mit mMCP1 kreuzreagiert, der Antikörper *Rat anti mouse MCP1* dagegen ist spezifisch für mMCP1 (Daten nicht gezeigt).

Zudem macht dieses Experiment deutlich, dass alle 3 Antikörper diskontinuierliche Epitope erkennen, d.h. es werden jeweils 2 Sequenzen detektiert, die in der MCP1-Primärstruktur nicht nebeneinander liegen. Vor allem die Tatsache, dass die Detektionsantikörper des m- und rMCP1 ELISAs neben der Region um die Aminosäuren 19-22 auch an den zyklisierten N-Terminus binden, macht weitere Untersuchungen notwendig (siehe 3.2.4).

### **3.2.4 Untersuchung des Einflusses des N-terminalen Pyroglutamats auf den total h-, m- und rMCP1 ELISA**

Das Epitopmapping der für den total MCP1 ELISA verwendeten Detektionsantikörper zeigte, dass die Antikörper *Rat anti mouse MCP1* und *Rabbit anti rat MCP1* mit dem N-terminalen Pyroglutamat einer 10 Aminosäuren langen Sequenz ihres Antigens reagieren. Aus diesem Grund musste geprüft werden, ob die Zyklisierung des N-terminalen Glutamins einen Einfluss auf die Affinität des Detektionsantikörpers im ELISA hat. Der total MCP1 ELISA soll in Kombination mit dem MCP1 N1pE ELISA zur Diskriminierung von MCP1 N1Q und MCP1 N1pE dienen. Sollte die Affinität des Detektionsantikörpers für total MCP1 mit sinkender Menge an MCP1 N1pE abnehmen, so kann das Verhältnis MCP1 N1pE / total MCP1 nicht als Maß für den Zyklisierungsstatus von MCP1 dienen. Zur Untersuchung, ob die Detektionsantikörper der total MCP1 ELISAs zwischen MCP1 N1Q und MCP1 N1pE diskriminieren, wurden Standardkurven mit MCP1 N1Q und MCP1 N1pE analysiert und die ermittelten Konzentrationen miteinander verglichen (siehe Abbildung 3.29).



**Abbildung 3.29:** Vergleichende Darstellung der Detektion von MCP1 in Abhängigkeit vom Zyklisierungsstatus. **A** - hMCP1 N1Q und hMCP1 N1pE im total hMCP1 ELISA, **B** - mMCP1 N1Q und mMCP1 N1pE im total mMCP1 ELISA und **C** – rMCP1 N1Q und rMCP1 N1pE im total rMCP1 ELISA. Die Standardkurven wurden aus den gemessenen Absorptionen bei 450 nm/540 nm über einen 4-Parameter-Logistik-Fit erstellt.

Aus Abbildung 3.29 ist ersichtlich, dass die total hMCP1 und mMCP1 ELISAs kaum Unterschiede in der Detektion des zyklisierten bzw. nicht zyklisierten Antigens aufweisen. Das heißt, die Detektionsantikörper *mouse anti human MCP1* und *rat anti mouse MCP1* diskriminieren nicht zwischen MCP1 N1Q und MCP1 N1pE (Abbildung 3.29). Der Antikörper *rabbit anti rat MCP1* dagegen zeigt eine deutlich höhere Affinität zum zyklisierten Antigen im Vergleich zu rMCP1 N1Q. Das bedeutet, dass der Antikörper *rabbit anti rat MCP1* nicht geeignet ist, den Zyklisierungsstatus von rMCP1 wiederzugeben.

### **3.2.5 Validierung der ELISAs zur Detektion von MCP1 und MCP1 N1pE aus Maus, Ratte und Mensch**

In den Kapiteln 3.2.1 – 3.2.2 wurde die Entwicklung der total h-, m- und rMCP1 sowie h-, m- und rMCP1 N1pE ELISAs beschrieben. Diese Assays wurden etabliert, um den MCP1 N1pE-Gehalt an der Gesamt-MCP1-Menge in verschiedenen Zellkultur- und Tiermodellen zu untersuchen. Um zu prüfen, ob eine analytische Methode für die quantitative Bestimmung von MCP1 (N1pE) in einer bestimmten Matrix geeignet ist, d.h. glaubwürdige und reproduzierbare Ergebnisse liefert, ist eine Validierung dieser Methoden notwendig. Dazu geben verschiedene Regelwerke zur Bioanalytik, wie z.B. EMEA (ICH Q6B „Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products“, CPMP/ICH/365/96, September 1999) oder FDA (Guidance for Industry „Bioanalytical Method Validation“, Mai 2001) Richtlinien zur Validierung analytischer Methoden vor, die bis hin zur Arzneimittelzulassung ausreichend sind. Zur Erfüllung der Aufgabenstellung dieser Promotionsarbeit ist derzeit keine vollständige Methodenüberprüfung notwendig. Dennoch sollte die Methode insofern ausreichend validiert sein, dass die generierten Daten eine belastbare Grundlage für weitere Entscheidungen liefern.

Im Zuge der Validierung wurden die Assays hinsichtlich der Spezifität, der Linearität verschiedener Probenverdünnungen, der Stabilität des Analyten in der zu analysierenden Matrix sowie der Intraassay- und Interassay-Präzision untersucht. Da ELISAs zur quantitativen Bestimmung von total hMCP1, mMCP1 und rMCP1, ohne Berücksichtigung des Zyklisierungsstatus, kommerziell erhältlich sind (Fa. PIERCE), konnte zusätzlich ein Vergleich mit diesen Assays durchgeführt werden. Diese Möglichkeit bestand für die h-, m-, und rMCP1 N1pE ELISAs nicht.

Aufgrund der Vielzahl von Daten, die im Zuge der Validierung von sechs verschiedenen ELISAs entstehen, soll innerhalb dieses Kapitels auf die Darstellung der Validierung des Maus MCP1 N1pE ELISAs eingegangen werden. Dieser Assay wurde zur Auswertung von Screenings einer Vielzahl an QC/isoQC-Inhibitoren in Zellkultur- und Mausmodellen verwendet und diente somit als Entscheidungsgrundlage zur Auswahl des Favoriten für die Pre-Klinische Entwicklung.

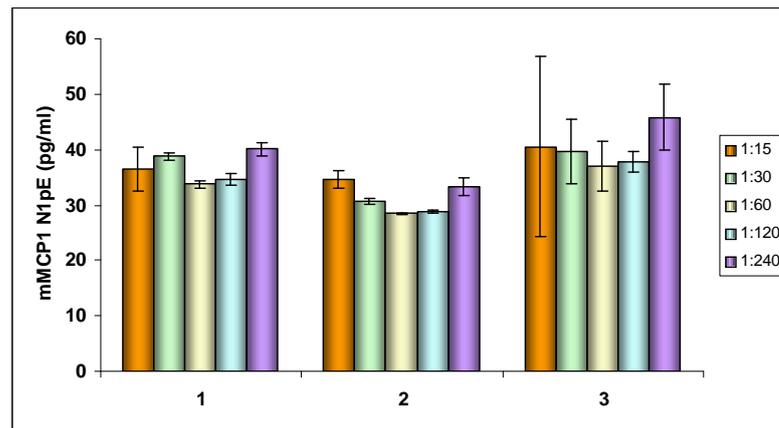
### 3.2.5.1 Validierung der Spezifität des mMCP1 N1pE ELISAs

Die Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, den Analyten in Gegenwart anderer Komponenten zu erkennen und zu quantifizieren. Dieser Punkt sollte schon frühzeitig bei der Assayentwicklung untersucht werden, um falsch positive Messdaten zu vermeiden. Die Spezifität eines ELISAs wird vor allem durch Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper bestimmt. In den Kapiteln 3.1.2.2 und 3.1.2.4 wurden erste Spezifitätsuntersuchungen der anti-MCP1 N1pE-Antikörper durchgeführt. Dabei konnte unter anderem festgestellt werden, dass der Detektionsantikörper des mMCP1 N1pE ELISAs mit mMCP3(1-9) kreuzreagiert (Abbildung 3.9). Die Analyse von rekombinantem *full length* mMCP3(1-74) im mMCP1 N1pE ELISA konnte dagegen zeigen, dass bis zu 5 µg/ml mMCP3(1-74) nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.5.2 Validierung der Linearität verschiedener Probenverdünnungen des mMCP1 N1pE ELISAs

Die Proben, die im mMCP1 N1pE ELISA analysiert werden, enthalten zum Teil sehr unterschiedliche Konzentrationen des Analyten. Um bei der Analyse im ELISA ein Signal zu erhalten, was innerhalb der mitgeführten Standardkurve liegt, müssen diese Proben unterschiedlich verdünnt werden. Durch die Analyse der Linearität verschiedener Probenverdünnungen wird untersucht, ob die Daten unterschiedlich verdünnter Proben miteinander vergleichbar sind.

Zur Untersuchung der Linearität des mMCP1 N1pE ELISAs wurde das Homogenat von drei Gehirn-Hemisphären LPS stimulierter Mäuse so verdünnt, dass die resultierenden Absorptionen den Messbereich des ELISAs umfassen (siehe 2.6.2). Anschließend erfolgte die Ermittlung der Konzentrationen unter Einbeziehung des jeweiligen Verdünnungsfaktors (errechnete Konzentration). Abbildung 3.30 zeigt die errechneten mMCP1 N1pE-Konzentrationen nach unterschiedlicher Verdünnung der einzelnen Proben.



**Abbildung 3.30:** Darstellung der Linearität verschiedener Probenverdünnungen des mMCP1 N1pE ELISAs. Homogenate der rechten Hemisphäre von LPS stimulierten Mäusen (Proben 1-3) wurden nach unterschiedlicher Verdünnung auf den mMCP1 N1pE ELISA aufgetragen und die mMCP1 N1pE-Konzentrationen nach Einbeziehung des Verdünnungsfaktors bestimmt.

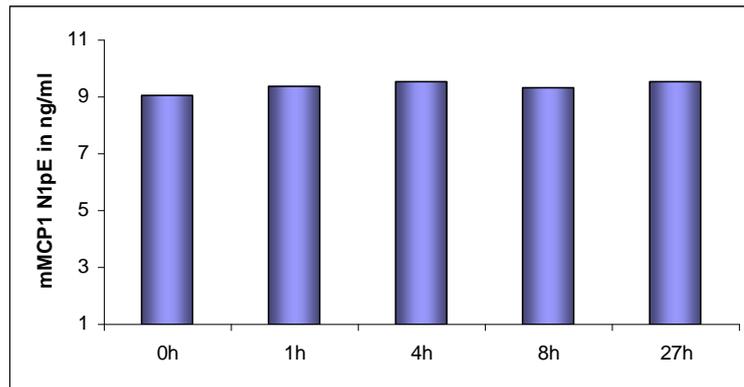
Als Maß für die Linearität eines ELISAs bei verschiedenen Probenverdünnungen dient das Verhältnis Errechner/Erwarteter Konzentration. Dabei wird in diesem Fall als Erwartete Konzentration der mMCP1 N1pE Gehalt der 1:15 verdünnten Probe festgelegt. Tabelle 3.8 zeigt die ermittelten Absorptionen der unterschiedlich verdünnten Proben, die daraus errechneten mMCP1 N1pE-Konzentrationen sowie das Verhältnis Errechner/Erwarteter Konzentration in %. Das Verhältnis Errechner/Erwarteter Konzentration der untersuchten Proben schwankt maximal um 17,9 % (siehe Tabelle 3.8, Probe 2, 1:60 Verdünnung). Dieser Wert liegt allerdings noch in einem akzeptablen Bereich. Betrachtet man die Daten des kommerziellen Maus MCP1 ELISAs von PIERCE, so werden für die Linearität verschiedener Verdünnungen von Maus-Serum bis zu 10 % Abweichung beschrieben (*Instructions for Mouse MCP-1 ELISA Kit*, PIERCE). Weiterhin ist keine Tendenz zu erkennen, dass die errechnete MCP1 N1pE-Konzentration mit steigendem Verdünnungsfaktor konstant zu- oder abnimmt. Somit kann eine Beeinflussung der Datenqualität durch unterschiedliche Probenverdünnung ausgeschlossen werden.

**Tabelle 3. 8:** Darstellung der Messdaten zur Linearitätsuntersuchung des mMCP1 N1pE ELISAs. Homogenate der rechten Hemisphäre von LPS stimulierten Mäusen wurden nach unterschiedlicher Verdünnung auf den mMCP1 N1pE ELISA aufgetragen. Dargestellt sind jeweils in einer Doppelbestimmung die Absorptionen der Proben, der Mittelwert der mit Hilfe des 4-Parameter-Logistik-Fit ( $y = (A2 + (A1 - A2)/(1+(x/x_0)^p)$ ) errechneten Konzentrationen nach Einbeziehung des Verdünnungsfaktors sowie das Verhältnis Errechneter/Erwarteter mMCP1 N1pE-Konzentration in %.

Probe	Verdünnung	Absorption		mMCP1 N1pE [ng/ml]	STD	Errechnete/Erwartete mMCP1 N1pE-Konzentration in %
1	1:15	2,119	2,272	36,48	4,03	100,0
	1:30	1,467	1,497	38,78	0,68	106,3
	1:60	0,624	0,641	33,70	0,55	92,4
	1:120	0,302	0,288	34,72	1,08	95,2
	1:240	0,172	0,178	40,13	1,21	110,0
2	1:15	2,116	2,182	34,66	1,60	100,0
	1:30	1,219	1,187	30,64	0,61	88,4
	1:60	0,521	0,517	28,46	0,13	82,1
	1:120	0,245	0,242	28,90	0,25	83,4
	1:240	0,149	0,156	33,35	1,57	96,2
3	1:15	2,499	1,959	40,49	16,27	100,0
	1:30	1,628	1,377	39,64	5,80	97,9
	1:60	0,775	0,637	37,08	4,48	91,6
	1:120	0,336	0,312	37,82	1,78	93,4
	1:240	0,212	0,180	45,82	6,03	113,2

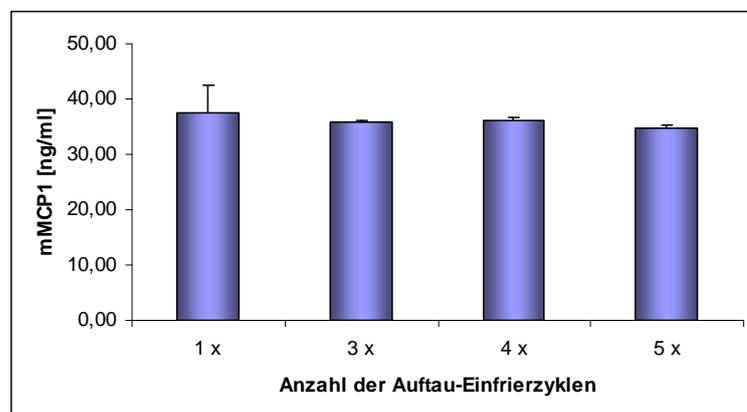
### 3.2.5.3 Validierung der Stabilität von mMCP1 N1pE

Die Untersuchung der Stabilität eines Analyten sollte für die üblichen Prozeduren wie Probenahme, Probenhandhabung, Lang- und Kurzzeitlagerung, Einfrieren, Auftauen oder Standzeiten während der Messung relevante Daten liefern. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Untersuchung der Stabilität von mMCP1 N1pE in Maus-Serum dargestellt werden. Da bei der Entnahme der Proben und vor dem Probenauftrag auf den ELISA oftmals längere Standzeiten bei Raumtemperatur nicht zu vermeiden sind, wurde der Einfluss der Inkubation von Maus-Serum bei Raumtemperatur auf die Detektion von mMCP1 N1pE untersucht. In Abbildung 3.32 ist erkennbar, dass eine längere Standzeit der Proben keinen Einfluss auf den mMCP1 N1pE-Gehalt hat.



**Abbildung 3.32:** Darstellung der Stabilität von nativem mMCP1 N1pE in Maus-Serum bei Raumtemperatur.

Viele Tierversuche werden in Zusammenarbeit mit externen Kooperationspartnern durchgeführt, so dass die gewonnenen Proben in gefrorenem Zustand zum Ort der Analyse gesendet werden. Weiterhin ist es oftmals nicht zu vermeiden, eine Probe mehrfach aufzutauen und wieder einzufrieren, z.B. wenn deren Analyse wiederholt werden muss. Aus diesem Grund wurde der Einfluss mehrmaligen Auftauens und Einfrierens auf die mMCP1-Konzentration in Maus-Serum untersucht. In Abbildung 3.33 ist ersichtlich, dass eine Maus-Serum Probe bis zu 4 x aufgetaut und wieder eingefroren werden kann und sich dadurch nur geringe Auswirkungen auf den mMCP1-Gehalt ergeben.



**Abbildung 3.33:** Darstellung der Auswirkung mehrmaligen Auftauens und Einfrierens auf die Detektion von mMCP1 in Maus-Serum. Für diesen Versuch wurde Serum von LPS stimulierten Mäusen verwendet.

### 3.2.5.4 Validierung der Intraassay- und Interassay-Präzision des mMCP1 N1pE ELISAs

Die Präzision ist der Grad der Übereinstimmung zwischen unabhängigen Testergebnissen, die unter vorgegebenen Bedingungen erzielt werden. Dabei wird zwischen Intraassay-

Präzision und Interassay-Präzision unterschieden.

Zur Untersuchung der Intraassay-Präzision des mMCP1 N1pE ELISAs wurden 2 Proben in drei verschiedenen Verdünnungen je sechs mal auf einen ELISA aufgetragen und die resultierenden Absorptionen bestimmt (siehe Tabelle 2.13). Die drei Verdünnungen wurden angefertigt um zu prüfen, in welchen Bereichen der Standardkurve die Intraassay- und Interassay-Präzision gegeben ist. Nach Berechnung des Variationskoeffizienten aus den Mittelwerten der Absorptionen und deren Standardabweichung (siehe 2.6.4.2), erhält man Aufschluss über die Intraassay-Präzision (siehe Tabelle 3.9).

**Tabelle 3.9.:** Darstellung der Intraassay-Präzision des mMCP1 N1pE ELISAs. Gezeigt sind die Mittelwerte der 6fachen Absorptionsbestimmung (MW) zweier Proben (1+2), deren Standardabweichungen (STD) und die resultierenden Variationskoeffizienten (CV) in %.

Probe	Verdünnung	MW (Absorption)	STD	CV (%)
1	1:500	1,27	0,037	2,90
	1:1000	0,55	0,018	3,28
	1:2000	0,24	0,010	3,98
2	1:500	1,07	0,048	4,49
	1:1000	0,41	0,015	3,81
	1:2000	0,19	0,005	2,82

Der prozentuale Variationskoeffizient der 6fachen Absorptionsbestimmung im mMCP1 N1pE ELISA liegt zwischen 2,90 % und 4,49 %. Vergleicht man diese Daten mit anderen validierten ELISAs, so sind die im mMCP1 N1pE ELISA ermittelten Variationskoeffizienten zum Teil deutlich niedriger (Steiner *et al.*, 2000, Steiner *et al.*, 2003).

Zur Ermittlung der Interassay-Präzision wurde das oben beschriebene Experiment insgesamt drei mal von drei unterschiedlichen Personen durchgeführt. So erhält man durch Berechnung des Variationskoeffizienten aus den Mittelwerten der Konzentrationen und deren Standardabweichung Informationen über die Interassay-Präzision (siehe Tabelle 3.10). Der prozentuale Variationskoeffizient der mMCP1 N1pE-Konzentrationen aus drei verschiedenen Experimenten liegt zwischen 0,10 % und 3,92 %. Eine hohe Präzision ist durch eine geringe Variation der einzelnen Testergebnisse gekennzeichnet. Die ermittelten Variationskoeffizienten sind sehr gering und liegen zum Teil deutlich unter denen, die für

andere validierte ELISAs ermittelt wurden (Steiner *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 2003; Gómez-Morales *et al.*, 2008). Die hier gezeigten Ergebnisse beweisen eine sehr hohe Intraassay- sowie Interassay-Präzision des mMCP1 N1pE ELISAs.

**Tabelle 3.10.:** Darstellung der Interassay-Präzision des mMCP1 N1pE ELISAs. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) der mMCP1 N1pE-Konzentrationen aus drei Experimenten, die von drei unterschiedlichen Personen durchgeführt wurden, deren Standardabweichungen (STD) und den resultierenden Variationskoeffizienten (CV) in %.

Probe	Verdünnung	MW [ng/ml]	STD	CV (%)
1	1:500	373,86	2,37	0,63
	1:1000	398,00	0,39	0,10
	1:2000	383,95	3,54	0,92
2	1:500	347,09	3,63	1,05
	1:1000	325,87	5,90	1,81
	1:2000	312,61	12,26	3,92

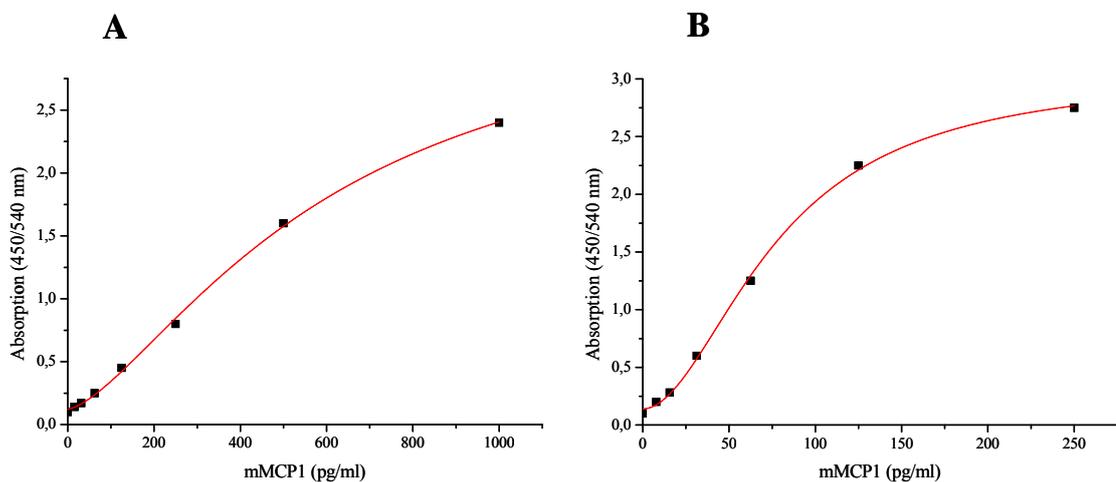
### 3.2.5.5 Vergleich des total mMCP1 ELISAs mit einem kommerziellen mMCP1 ELISA

Aufgrund der Tatsache, dass PIERCE einen ELISA zur quantitativen Detektion von Maus MCP1 anbietet, bestand die Möglichkeit, den im Zuge dieser Arbeit entwickelten total mMCP1 ELISA mit dem kommerziell erhältlichen ELISA zu vergleichen. Da Antikörper gegen MCP1 N1pE bisher nicht zur Verfügung standen, war dies für die Validierung des mMCP1 N1pE ELISAs leider nicht möglich. Die Analyse verschiedener Maus-Proben im eigenen ELISA und im PIERCE ELISA zeigte eine konstante Diskrepanz in den absoluten mMCP1-Konzentrationen zwischen beiden Assays. Dabei lagen die im PIERCE ELISA ermittelten mMCP1-Konzentrationen stets um ca. Faktor 7 unter denen unseres mMCP1 ELISAs (Daten nicht gezeigt). Die relativen Unterschiede zwischen verschiedenen Proben mit unterschiedlichen mMCP1-Konzentrationen waren allerdings zwischen beiden Assays absolut vergleichbar. Um zu prüfen, ob diese Diskrepanz in unterschiedlichen Konzentrationen der Standardproteine begründet ist, wurde das Standardprotein von Peprotech auf den PIERCE ELISA aufgetragen und somit die Konzentrationen beider Proteine miteinander verglichen. Die Daten in Tabelle 3.11 zeigen, dass die Diskrepanz in den mMCP1-Konzentrationen auf unterschiedliche Konzentrationsangaben der Standardproteine der verschiedenen Hersteller zurückzuführen ist.

**Tabelle 3.11:** Zusammenstellung der Daten zur Untersuchung der Diskrepanz zwischen unterschiedlichen Konzentrationsangaben zweier verschiedener mMCP1 N1pE Standardproteine. Das Standardprotein des PBD-ELISAs (Fa. Peprotech) wurde auf den PIERCE ELISA aufgetragen und dessen Konzentration, gemessen am PIERCE Standardprotein, ermittelt.

Konzentration PBD-Standardprotein [pg/ml]	Ermittelte Konzentration im PIERCE ELISA [pg/ml]
2500	340,6
1250	175,1

Trägt man das PIERCE Standardprotein auf beide ELISAs auf wird weiterhin deutlich, dass der in dieser Arbeit entwickelte ELISA sensitiver als der PIERCE ELISA ist (Abbildung 3.34).



**Abbildung 3.34:** Vergleich der Detektion von rekombinantem mMCP1 von PIERCE **A** – im PIERCE ELISA und **B** – im PBD ELISA. Die aufgetragenen Mengen des Standardproteins richten sich nach den Angaben des Herstellers (Fa. PIERCE). Die Standardkurven wurden aus den gemessenen Datenpunkten über einen 4-Parameter-Logistik-Fit erstellt.

Diese Daten zeigen, dass beide ELISAs die relativen Mengen an mMCP1 in den untersuchten Proben gleichermaßen detektieren. Die Diskrepanz in den absoluten mMCP1-Konzentrationen ist in unterschiedlichen Konzentrationsangaben der Standardproteine begründet. Der Messbereich unseres ELISAs liegt zwischen 40-2500 pg/ml. PIERCE gibt zwar für seinen *mouse* MCP1 ELISA einen Messbereich von 16-1000 pg/ml an, dieser erhöht sich allerdings um Faktor 7 - 7,5 bei Verwendung des Peprotech-Standardproteins. Da das in *P. pastoris* exprimierte Standardprotein zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung stand, wurden diese Versuche mit mMCP1 von Peprotech durchgeführt.

### **3.3 Untersuchungen zur physiologischen Funktion von MCP1 N1pE**

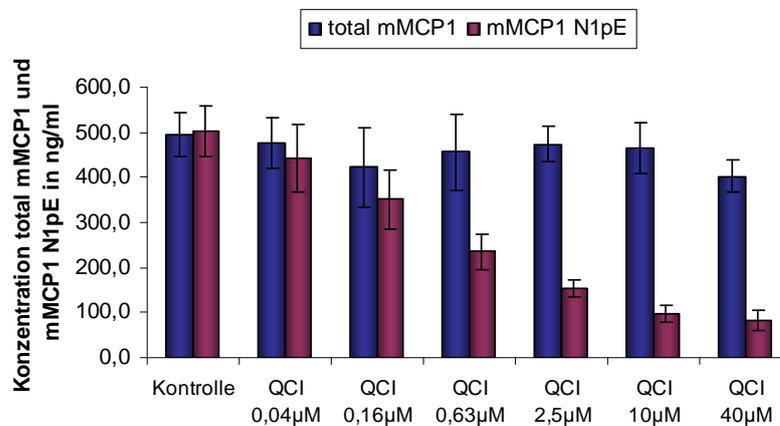
#### **3.3.1 Untersuchung des Einflusses der N-terminalen Zyklisierung von MCP1 in *in vitro* und *in vivo* Tiermodellen**

Wie in Kapitel 1.3 bereits erwähnt wurde, ist die QC im menschlichen und tierischen Organismus an der Bildung von Proteinen beteiligt, die einen N-terminalen pE-Rest aufweisen. Dabei führt die N-terminale Modifizierung von MCP1 vermutlich zu dessen proteolytischer Stabilisierung (Cynis *et al.*, 2010, in Vorbereitung), was Auswirkungen auf die Progression MCP1 relevanter Krankheiten wie Arteriosklerose oder Arthritis haben könnte. Um die Bedeutung des Zyklisierungsstatus von MCP1 ausführlicher zu untersuchen, konnte ein Inhibitor gegen die Glutaminylzyklasen QC und isoQC eingesetzt werden, welcher von der Probiobio AG entwickelt wurde. In diesem Kapitel werden *in vitro* Modelle vorgestellt, in denen der Einfluss des QC/isoQC-Inhibitors auf den prozentualen Gehalt an MCP1 N1pE untersucht wird. Weiterhin wurde der QC-Inhibitor in einem *in vivo* Maus-Modell verwendet, um die Bedeutung des N-terminalen Pyroglutamats auf die biologische Funktion von MCP1 zu analysieren. Zum Nachweis der erfolgreichen QC-Inhibierung in diesen Modellen wurden die in Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 etablierten ELISAs eingesetzt, die eine quantitative Analyse des zyklisierten und nicht zyklisierten MCP1 in Mensch, Maus und Ratte ermöglichen.

##### **3.3.1.1 Untersuchung des Einflusses der QC-Inhibierung auf die MCP1 N1pE-Bildung in Zellkulturmodellen**

Der QC/isoQC-Inhibitor QCI wurde zunächst in einem geeigneten *in vitro* Zellkulturmodell getestet, um dessen Einfluss auf die MCP1 N1pE-Level zu untersuchen. Zur Analyse der Wirksamkeit in allen drei Spezies wurden die Maus-Zelllinie RAW264.7, die Ratten-Zelllinie MADB und die humane Zelllinie A549 verwendet. Die MCP1-Expression wird nach Stimulation mit inflammatorischen Reagenzien deutlich erhöht (Rollins *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1991). Aus diesem Grund erfolgte zunächst eine inflammatorische Stimulation der Zellen, um die Ausschüttung des Zytokins MCP1 zu bewirken. Dazu wurden RAW264.7-Zellen mit 10 ng/ml LPS, MADB-Zellen mit je 10 ng/ml TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  sowie die A549-Zellen mit je 10 ng/ml IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  behandelt (siehe 2.3.8). Gleichzeitig wurde den Zellen der QC/isoQC-Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert, um dessen dosisabhängige Wirkung auf den MCP1 N1pE-Gehalt zu untersuchen. Mit Hilfe der im Zuge dieser Arbeit entwickelten

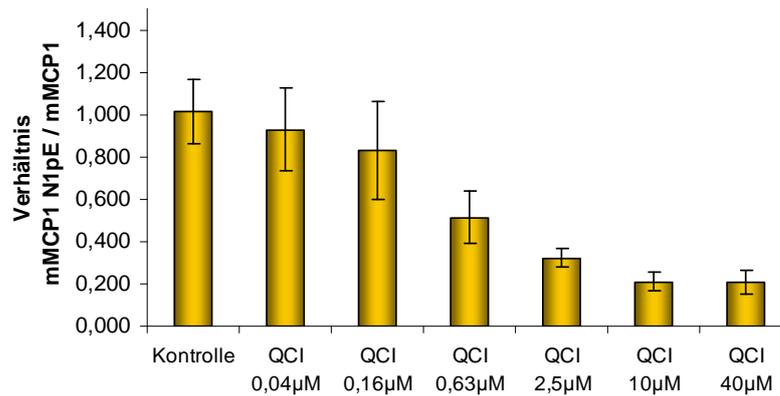
ELISAs (siehe 3.2.1 und 3.2.2) konnten die total MCP1- und MCP1 N1pE-Level in den Proben quantifiziert werden. Abbildung 3.35 zeigt den Effekt der QC-Inhibierung auf die total mMCP1- und mMCP1 N1pE-Level in RAW264.7-Zellen.



**Abbildung 3.35:** Darstellung der Menge an total mMCP1 und mMCP1 N1pE im Zellkulturüberstand von RAW264.7-Zellen, die mit 10 ng/ml LPS stimuliert und mit unterschiedlichen Konzentrationen des QC/isoQC-Inhibitors behandelt wurden. Der total mMCP1 und mMCP1 N1pE Gehalt in den Proben wurde mit Hilfe des mMCP1 und mMCP1 N1pE ELISAs nach dem Protokoll siehe Tabelle 2.13 ermittelt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus einer 4fach-Bestimmung.

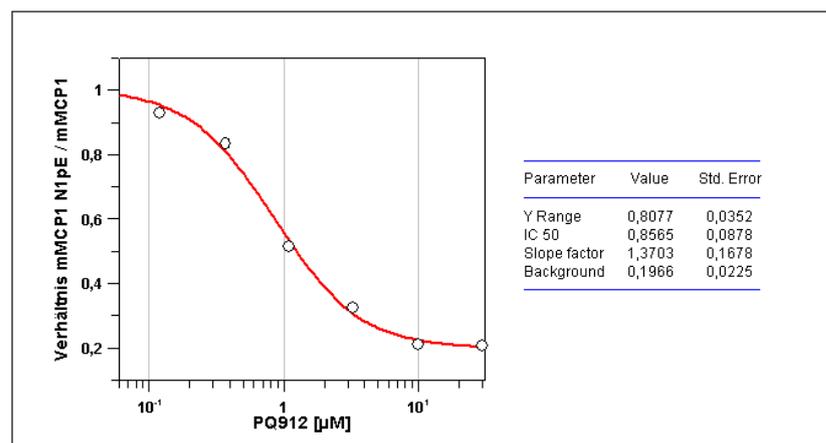
In Abbildung 3.35 ist ersichtlich, dass die Applikation des QC/isoQC-Inhibitors keinen Einfluss auf die Gesamt mMCP1-Menge zeigt, die total mMCP1-Level in den einzelnen Proben variieren um maximal 18,7 % ( $494,9 \pm 48,2$  ng/ml in der Kontrolle;  $402,4 \pm 34,9$  ng/ml nach Applikation von 40  $\mu$ M QCI). Die MCP1 N1pE-Menge dagegen wird durch Zugabe des Inhibitors dosisabhängig reduziert (von  $502,4 \pm 56,3$  ng/ml in der Kontrolle auf  $83,3 \pm 22,7$  ng/ml nach Applikation von 40  $\mu$ M QCI).

Da der Inhibitor keinen Einfluss auf den total mMCP1-Gehalt zeigt, lässt sich dessen Wirkung mit dem Verhältnis von mMCP1 N1pE / total mMCP1 darstellen.



**Abbildung 3.36:** Darstellung des Verhältnisses von mMCP1 N1pE zu total mMCP1 im Zellkulturüberstand von RAW264.7-Zellen, die mit 10 ng/ml LPS stimuliert und mit unterschiedlichen Konzentrationen des QC/isoQC-Inhibitors QCI behandelt wurden. Der total mMCP1 und mMCP1 N1pE Gehalt in den Proben wurde mit Hilfe des mMCP1 und mMCP1 N1pE ELISAs nach dem Protokoll siehe Tabelle 2.13 ermittelt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus einer 4fach-Bestimmung.

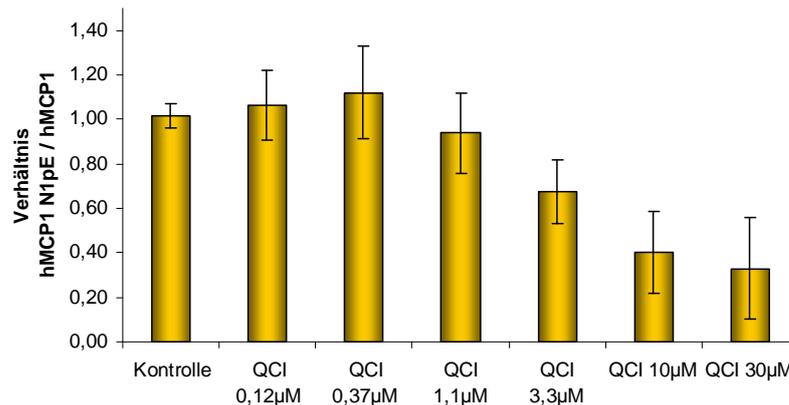
Aus der konzentrationsabhängigen Reduktion des Verhältnisses mMCP1 N1pE / mMCP1 lässt sich der  $IC_{50}$ -Wert für den Inhibitor QCI an den QCs der verwendeten Zelllinie ermitteln. Abbildung 3.37 zeigt die Berechnung des  $IC_{50}$ -Wertes für QCI an der Zelllinie RAW264.7 mit Hilfe des Programmes GraFit 5.



**Abbildung 3.37:** Ermittlung des  $IC_{50}$ -Wertes von QCI an RAW264.7-Zellen aus dem Verhältnis mMCP1 N1pE / mMCP1.

Für die QCI-vermittelte Inhibierung der mMCP1 N1pE Bildung im Zellkulturüberstand von RAW264.7-Zellen konnte ein  $IC_{50}$ -Wert von  $0,86 \pm 0,09 \mu\text{M}$  ermittelt werden.

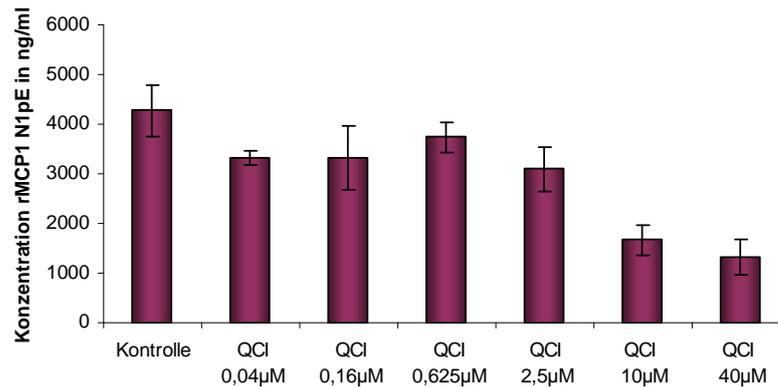
Um zu prüfen, ob der QC/isoQC-Inhibitor hinsichtlich der humanen- und Ratten-QC eine ähnliche Wirksamkeit zeigt, wurden analoge Versuche mit A549-Zellen sowie MADB-Zellen durchgeführt (siehe 2.3.8). Abbildung 3.38 zeigt das resultierende Verhältnis von hMCP1 N1pE / hMCP1 nach Applikation von QCI zu der stimulierten humanen Zelllinie A549.



**Abbildung 3.38:** Darstellung des Verhältnisses von hMCP1 N1pE zu total hMCP1 im Zellkulturüberstand von A549-Zellen, die mit je 10 ng/ml IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  stimuliert und mit unterschiedlichen Konzentrationen des QC/isoQC-Inhibitors QCI behandelt wurden. Der total hMCP1 und hMCP1 N1pE Gehalt in den Proben wurde mit Hilfe des hMCP1 und hMCP1 N1pE ELISAs nach dem Protokoll siehe Tabelle 2.12 ermittelt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus einer 4fach-Bestimmung.

Für die QCI-vermittelte Inhibierung der hMCP1 N1pE Bildung im Zellkulturüberstand von A549-Zellen konnte ein IC<sub>50</sub>-Wert von  $3,14 \pm 0,62 \mu\text{M}$  ermittelt werden.

In Kapitel 3.2.4 wurde gezeigt, dass nach unserem bisherigen Wissen ein Detektionsantikörper für den total rMCP1 ELISA, welcher rMCP1 N1Q und rMCP1 N1pE gleichermaßen detektiert, kommerziell nicht erhältlich ist. Somit ist eine Auswertung des Experimentes in MADB-Zellen durch Darstellung des Verhältnisses rMCP1 N1pE / rMCP1 nicht möglich, denn aufgrund der Reduktion von rMCP1 N1pE sinkt auch die im total rMCP1 ELISA detektierte Menge an Gesamt rMCP1 (siehe Kapitel 3.2.4). Aus diesem Grund sind in Abbildung 3.39 lediglich die rMCP1 N1pE-Level nach Zugabe unterschiedlicher Mengen von QCI dargestellt.



**Abbildung 3.39:** Darstellung der Menge an rMCP1 N1pE im Zellkulturüberstand von MADB-Zellen, die mit je 10 ng/ml TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  stimuliert und mit unterschiedlichen Konzentrationen des QC/isoQC-Inhibitors QCI behandelt wurden. Der rMCP1 N1pE Gehalt in den Proben wurde mit Hilfe des rMCP1 N1pE ELISAs nach dem Protokoll siehe Tabelle 2.14 ermittelt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus einer 4fach-Bestimmung.

Im Gegensatz zu den Daten, die in RAW264.7- und A549-Zellen erhalten wurden, können die Ergebnisse der MADB-Zellen nicht mit Hilfe des Verhältnisses rMCP1 N1pE / rMCP1 ausgewertet werden. Geht man davon aus, dass die Applikation des Inhibitors keinen Einfluss auf die Menge an Gesamt rMCP1 hat, so lässt sich der Inhibierung anhand der Konzentrationen von rMCP1 N1pE berechnen. In MADB-Zellen wurde somit für den Inhibitor ein IC<sub>50</sub>-Wert von  $21,19 \pm 6,51 \mu\text{M}$  ermittelt.

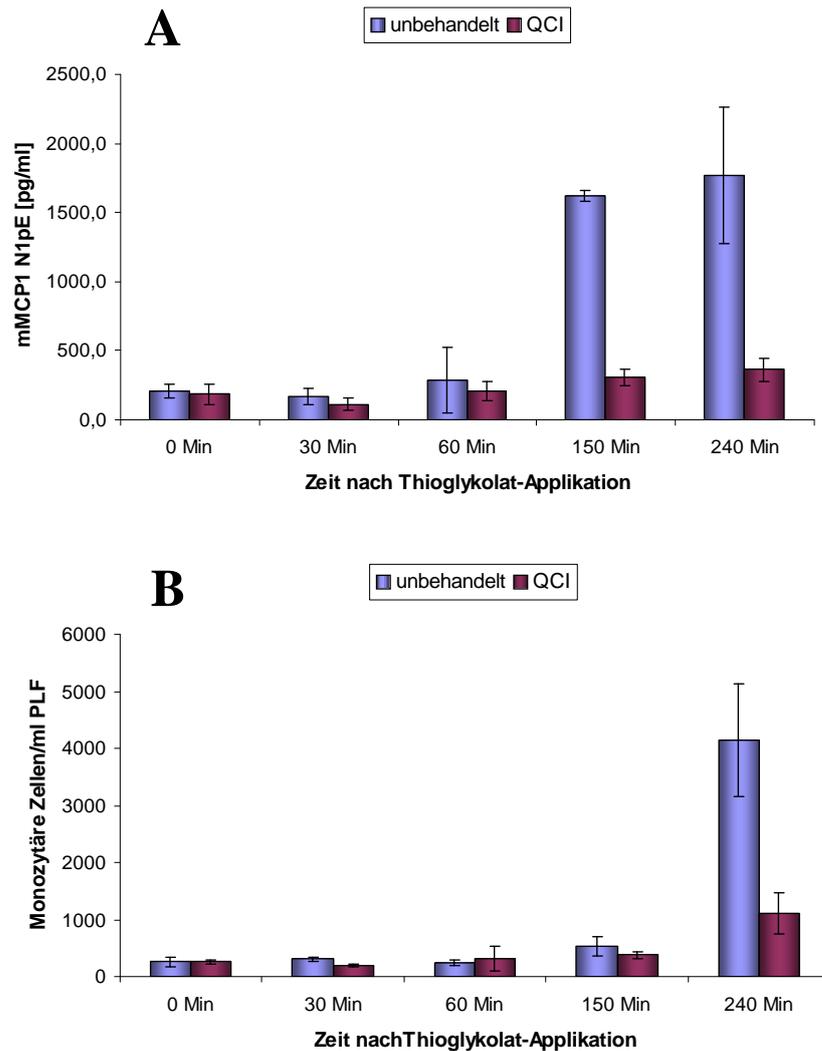
Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Applikation eines QC/isoQC-Inhibitors den Anteil von MCP1 N1pE an der Gesamt-MCP1-Menge konzentrationsabhängig verringern kann. Somit stellen Inhibitoren der QCs ein wichtiges Werkzeug dar, um die biologische Funktion des N-terminalen Pyroglutamats nach Verringerung des MCP1 N1pE Gehalts in ausgewählten Tiermodellen zu untersuchen.

### 3.3.1.2 Untersuchung des Einflusses der QC-Inhibierung im Peritonitis-Maus-Modell

Zur Untersuchung des Einflusses der N-terminalen Zyklisierung von mMCP1 auf die Rekrutierung von Monozyten in einer akuten Entzündungsreaktion, wurde das Modell der Thioglykolat induzierten Peritonitis angewendet. Durch die Applikation von Thioglykolat in das Peritoneum von Mäusen wird eine Entzündung des Bauchfells (Peritonitis) hervorgerufen. Aufgrund des inflammatorischen Stimulus exprimieren die im Peritoneum befindlichen Makrophagen und mesothelialen Zellen vermehrt mMCP1 (Henderson *et al.*, 2003). Unter Anwendung des total mMCP1 und mMCP1 N1pE ELISAs konnte in

Vorversuchen gezeigt werden, dass ca. 95 % des ausgeschütteten MCP1 als MCP1 N1pE vorliegen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der vermehrten MCP1-Expression wandern dann Monozyten aus dem Blutkreislauf entlang des MCP1-Gradienten in das Peritoneal-Gewebe zum Ort höchster MCP1-Konzentration (Zlotnik und Yoshie, 2000).

Zur Untersuchung des Einflusses eines verringerten MCP1 N1pE-Gehaltes aufgrund der QC-Inhibierung im Peritonitis-Maus-Modell wurden weibliche C57BL/6J-Mäuse verwendet, in denen mittels Thioglykolat eine Peritonitis induziert wurde (siehe 2.7.1.1). Sechzig Minuten vor Induktion der Peritonitis erfolgte die orale Applikation von 100 mg/kg Körpergewicht des Inhibitors. Durch die Inhibierung der QC sollte die Bildung von mMCP1 N1pE unterbunden werden, was wiederum die Rezeptoraktivität und die Stabilität des Zytokins herabsetzt. Um den Einfluss des QC/isoQC-Inhibitors auf den mMCP1 N1pE Gehalt und die in das Peritoneum eingewanderten Monozyten zu untersuchen, wurden die Tiere 0, 30, 60, 150 und 240 Min nach Thioglykolatapplikation narkotisiert und deren PLF gewonnen. Daraufhin erfolgte die Analyse der total mMCP1- und mMCP1 N1pE-Level in der PLF im ELISA sowie der eingewanderten Monozyten mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.4.6). Abbildung 3.40 zeigt die ELISA- und FACS-Daten der mit QCI behandelten Tiere, im Vergleich zu den Gruppen, die keinen Inhibitor erhalten haben. In Abbildung 3.40 (A) ist ersichtlich, dass die mMCP1 N1pE-Level in der PLF der unbehandelten Tiere 150 Min nach Thioglykolatapplikation deutlich ansteigen (von  $205 \pm 48$  pg/ml zum Zeitpunkt 0 Min auf  $1620 \pm 38$  pg/ml). Die Applikation von 100 mg/kg QCI inhibiert die Bildung von mMCP1 N1pE zu diesem Zeitpunkt um 78,8 % (von  $184 \pm 70$  pg/ml zum Zeitpunkt 0 Min auf  $308 \pm 58$  pg/ml). Die total mMCP1-Level dagegen waren durch den Inhibitor nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Abbildung 3.40 (B) zeigt, dass 150 Min nach Thioglykolatapplikation die Monozytenmigration in das Peritoneum noch nicht begonnen hat. In den unbehandelten Tieren ist nach 240 Min ein deutlicher Anstieg der im Peritoneum befindlichen Monozyten zu verzeichnen (von  $260 \pm 83$  monozytäre Zellen/ml PLF zum Zeitpunkt 0 Min auf  $4137 \pm 988$  monozytäre Zellen/ml PLF). Durch den QCI-vermittelten verringerten MCP1 N1pE-Gehalt konnte die Einwanderung der Monozyten in das Peritoneum um 73,6 % reduziert werden (von  $263 \pm 38$  monozytären Zellen zum Zeitpunkt 0 Min auf  $1105 \pm 360$  monozytäre Zellen/ml PLF).



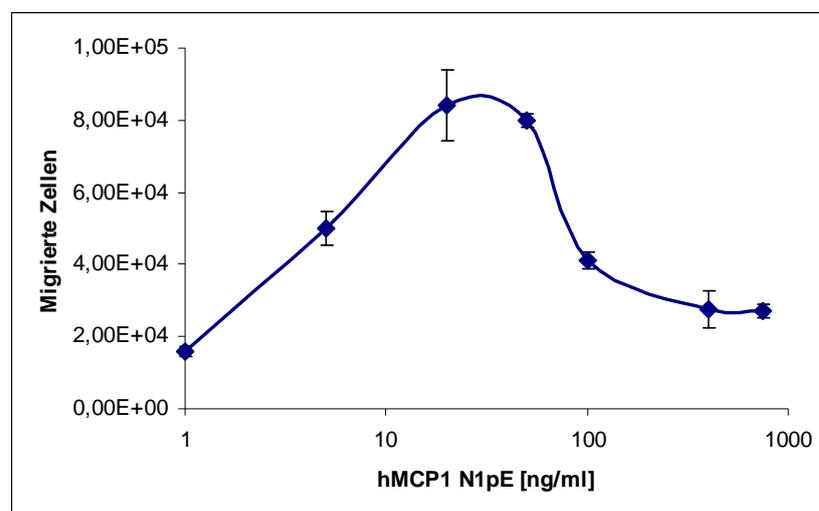
**Abbildung 3.40:** Analyse der PLF von C57BL/6J-Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion einer Peritonitis durch Thioglykolat. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus einer Gruppe von vier Tieren.

**A** – Konzentrationen an mMCP1 N1pE in der PLF von Mäusen, die mit QCI behandelt wurden (rot), im Vergleich zu unbehandelten Tieren (blau). Der mMCP1 N1pE Gehalt in den Proben wurde mit Hilfe des mMCP1 N1pE ELISAs nach dem Protokoll siehe Tabelle 2.13 ermittelt. **B** – Ergebnisse der Monozyten-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie in der PLF von Mäusen, die mit QCI behandelt wurden (rot), im Vergleich zu unbehandelten Tieren (blau).

### 3.3.2 Untersuchung der neutralisierenden Wirkung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper mittels des THP1-Migrationsassays

Die neutralisierende Wirkung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper wurde an hMCP1 N1pE unter Verwendung eines THP-1-Chemotaxis-Assays untersucht. THP-1 (*Human acute monocytic leukemia cell line*) ist eine myelo-monozytäre humane Zelllinie, die durch eine neoplastische Mutation unbegrenztes Zellwachstum erlangte. Diese Suspensionszelllinie exprimiert den CCR2-Rezeptor auf der Zelloberfläche und ist dadurch in der Lage, entlang eines MCP1-Gradienten zum Ort der höchsten Chemokin-Konzentration zu migrieren

(Chakravarty *et al.*, 1998). Wirkt ein anti-MCP1-Antikörper neutralisierend, so wird die CCR2-Rezeptorbindung und somit die chemoattraktive Wirkung des MCP1 unterbunden. Ein Maß für die neutralisierende Wirkung eines Antikörpers ist der ND<sub>50</sub>-Wert (ND = Neutralisierungs Dosis). Dieser ist definiert als die Antikörper-Konzentration die benötigt wird, um eine halb-maximale Inhibierung der Zytokin-Aktivität, gemessen an einer reagierenden Zelllinie, hervorzurufen. Dabei sollte das Zytokin so konzentriert sein, dass eine maximale Migrationsreaktion ausgelöst wird. Aus diesem Grund wurde in einem Vorversuch die MCP1-Konzentration ermittelt, mit der eine maximale THP-1-Migration erreicht wird (Abbildung 3.41).

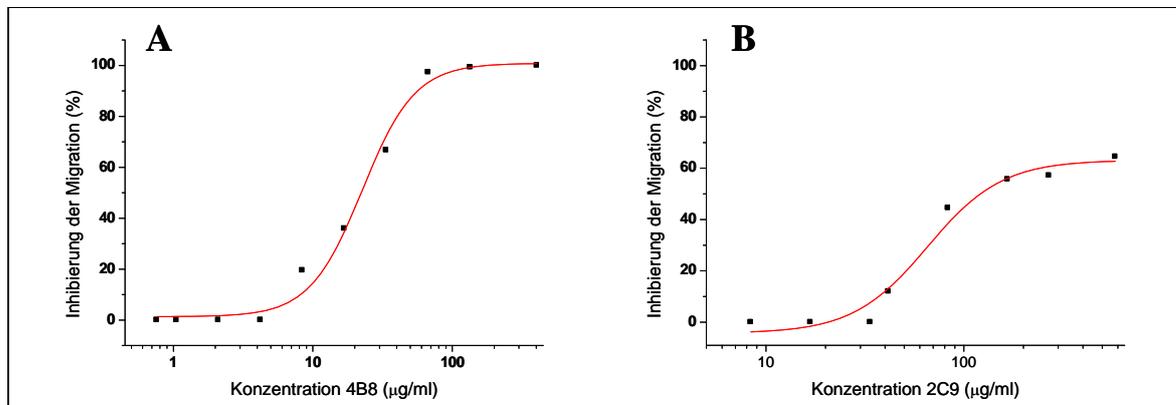


**Abbildung 3.41:** Darstellung der Abhängigkeit der THP-1-Zellmigration von der hMCP1 N1pE-Konzentration.  $1 \times 10^7$  THP-1 Zellen wurden auf die Membraneinsätze gegeben, im Boden der Transwell-Platten befanden sich hMCP1 N1pE-Lösungen variierender Konzentration. Die Inkubation erfolgte 2 h bei 37 °C (siehe 2.3.9). Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus 3 Bestimmungen.

Abbildung 3.41 zeigt, dass die Migrationsreaktion der THP-1-Zellen bei einer hMCP1 N1pE-Konzentration von 20 ng/ml ein Maximum aufweist ( $8,4 \times 10^4 \pm 9,9 \times 10^3$  migrierte Zellen pro ml). Mit steigender Zytokin-Konzentration nimmt die Migration der Zellen allerdings wieder ab ( $2,75 \times 10^4 \pm 5,0 \times 10^3$  migrierte Zellen pro ml bei einer hMCP1 N1pE-Konzentration von 400 ng/ml).

Nachdem die hMCP1 N1pE-Konzentration bekannt war, bei der eine maximale THP-1-Migration erreicht wird, konnte unter diesen Bedingungen der ND<sub>50</sub>-Wert für beide Antikörper ermittelt werden. Dazu erfolgte eine Präinkubation der Antikörper mit hMCP1 N1pE, so dass sich die Immunkomplexe bildeten bevor die Migrationsreaktion

startete (siehe 2.3.9). Abbildung 3.42 zeigt die Neutralisierungskurven zur Ermittlung des ND<sub>50</sub>- Wertes.



**Abbildung 3.42:** Neutralisierungskurven zur Ermittlung des ND<sub>50</sub>-Wertes der anti-MCP1 N1pE-Antikörper **A** – 4B8 und **B** – 2C9 unter Verwendung von 20 ng/ml hMCP1 N1pE im THP-1-Migrationsassay. Die Inhibierung der Zellmigration (%) wurde gegen die Antikörper-Konzentration aufgetragen. Die Erstellung der Neutralisierungskurven erfolgte unter Verwendung des IC<sub>50</sub>-Fits  $y=A1+A2/(1+10^{(\log(x0)-\log(x))})$ , wobei für **A**: A1 = 1,25; A2 = 99,61; x<sub>0</sub> = 22,60 und für **B**: A1 = -4,36; A2 = 67,57; x<sub>0</sub> = 65,57.

Aus Abbildung 3.42 wird deutlich, dass der Antikörper 4B8 die stärkere neutralisierende Wirkung zeigt. Der Antikörper 2C9 konnte selbst bei einer Konzentration von 580 µg/ml keine vollständige Inhibierung der THP-1-Zellmigration erreichen. Für 4B8 wurde ein ND<sub>50</sub> Wert von  $22,6 \pm 1,9$  µg/ml ermittelt, für 2C9 dagegen  $65,6 \pm 9,7$  µg/ml.

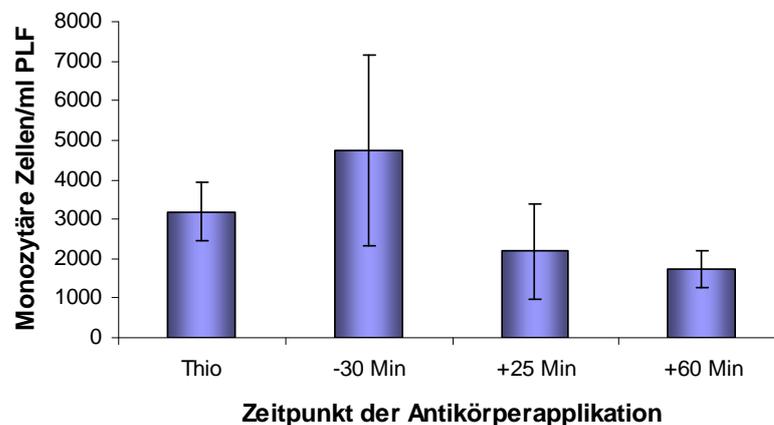
### 3.3.3 Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper im Peritonitis-Maus-Modell

MCP1 ist in einer Vielzahl von Krankheiten wie z.B. Arteriosklerose, Krebs, HIV oder Rheumatoide Arthritis induziert und involviert (Deshmane *et al.*, 2009). Aus diesem Grund ist neben der QC-Inhibierung, und der damit einhergehenden beschleunigten N-terminalen Degradierung des MCP1 (Cynis *et al.*, 2010, in Vorbereitung), der Einsatz neutralisierender anti-MCP1-Antikörper ein weiterer interessanter Ansatz zur Behandlung der genannten Krankheitsbilder.

Zur Untersuchung, ob der anti-MCP1 N1pE-Antikörper 4B8 eine antiinflammatorische Wirkung aufweist, wurde das Peritonitis-Maus-Modell angewendet. In Kapitel 3.3.1.2 konnte mit diesem Modell bereits gezeigt werden, dass die Inhibierung der Zyklisierung von mMCP1 in einer deutlichen Reduktion der Monozytenmigration zum Ort der

Entzündung resultiert. Da die neutralisierende Wirkung des Antikörpers 4B8 *in vitro* in Kapitel 3.3.2 bewiesen wurde, sollte dies nun fortführend im Tiermodell untersucht werden. Dazu wurde in weiblichen C57BL/6J-Mäusen durch Injektion von Thioglykolat eine Entzündung des Peritoneums hervorgerufen (siehe 2.7.1.2). Aufgrund des inflammatorischen Stimulus wird im Peritoneum vermehrt mMCP1 exprimiert (Henderson *et al.*, 2003), welches zu ca. 95 % als MCP1 N1pE vorliegt. Daraufhin wandern Monozyten aus dem Blutkreislauf in das Peritoneal-Gewebe ein (Zlotnik und Yoshie, 2000). Wirkt der anti-MCP1 N1pE-Antikörper neutralisierend auf mMCP1, so wird die Aktivierung des CCR2-Rezeptors auf der Monozytenoberfläche, und somit deren Migration zum Ort höchster MCP1-Konzentration, verhindert.

Zunächst wurde untersucht, zu welchem Applikationszeitpunkt der Antikörper die Monozytenmigration effektiv unterbinden kann. Dazu wurden je 5 mg des Antikörpers / kg Körpergewicht 30 Min vor bzw. 25 und 60 Min nach Thioglykolatapplikation in das Peritoneum der Mäuse injiziert (siehe 2.7.1.2). Vier Stunden nach Thioglykolatapplikation wurde das Peritoneum lavagiert und die Monozyten in der PLF mittels FACS-Analyse gezählt. Abbildung 3.43 zeigt die in das Peritoneum eingewanderten Monozyten, 4 h nach Thioglykolatapplikation.

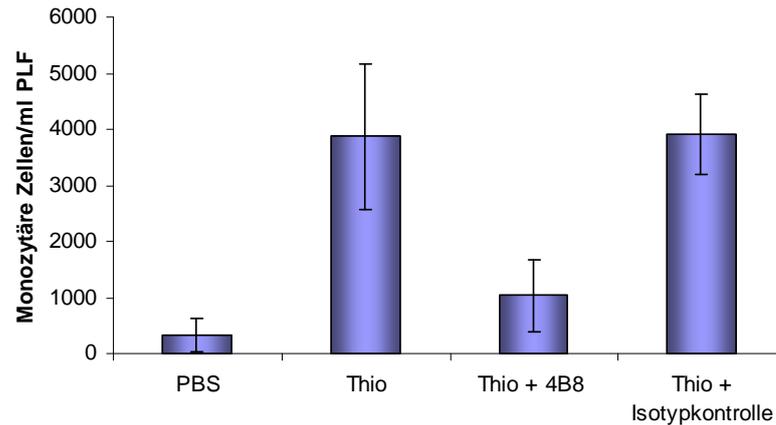


**Abbildung 3.43:** Darstellung der in das Peritoneum eingewanderten Monozyten nach Induktion einer Thioglykolat-bedingten Peritonitis. Der anti-MCP1 N1pE-Antikörper 4B8 wurde 30 Min vor, bzw. 25 Min und 60 Min nach Thioglykolatapplikation in einer Konzentration von 5 mg/kg Körpergewicht in das Peritoneum injiziert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus einer Gruppe von 6 Tieren.

In Abbildung 3.43 ist ersichtlich, dass die Injektion des Antikörpers eine Erhöhung der eingewanderten Monozyten um 48 % bewirkt, wenn dieser 30 Min vor Thioglykolat appliziert wird ( $3195 \pm 728$  monozytäre Zellen/ml PLF ohne Antikörperapplikation, 4731

$\pm 2406$  monozytäre Zellen/ml PLF bei Antikörperapplikation 30 Min vor Thioglykolat). Wird der Antikörper 25 Min nach Thioglykolat gegeben, so ist eine Reduktion der Monozytenzahl um 31,7 % zu verzeichnen (von  $3195 \pm 728$  monozytären Zellen auf  $2181 \pm 1200$  monozytäre Zellen/ml PLF). Findet die Applikation von 5 mg/kg Körpergewicht des Antikörpers 60 Min nach Thioglykolat statt, wird die Monozytenzahl um 45,4 % reduziert (von  $3195 \pm 728$  monozytären Zellen auf  $1745 \pm 460$  monozytäre Zellen/ml PLF).

Um auszuschließen, dass die Reduktion der in das Peritoneum migrierten Monozyten auf einer unspezifischen Reaktion gegen die Applikation von Maus-IgG1-Molekülen zurückzuführen ist, wurde in einem weiteren Experiment eine Isotypkontrolle mitgeführt. Dabei handelte es sich um einen anti-A $\beta$  N3pE(3-x)-Antikörper des Isotyps IgG1, welcher ebenfalls in Maus-Hybridomazellen unter Verwendung von *Ultra low IgG*-FBS exprimiert wurde. Der Antikörper wurde von Martin Kleinschmidt über Protein G-Säulenmaterial isoliert und für dieses Experiment freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Im Vergleich zum Vorversuch wurde den Tieren 60 Min nach Thioglykolat die doppelte Antikörpermenge (10 mg / kg Körpergewicht) appliziert. Abbildung 3.44 zeigt die Monozyten, die 4 h nach Thioglykolatapplikation in der PLF mittels FACS-Analyse gezählt wurden (siehe 2.4.6). Aus Abbildung 3.44 ist ersichtlich, dass die Injektion von Thioglykolat die im Peritoneum befindliche Monozytenzahl verzehnfacht ( $334 \pm 293$  monozytäre Zellen/ml PLF nach Applikation von PBS auf  $3870 \pm 1307$  monozytäre Zellen/ml PLF nach Thioglykolatapplikation). Durch Injektion des Antikörpers 4B8 wurde die Zahl der eingewanderten Monozyten um 73,3 % reduziert ( $3870 \pm 1307$  monozytäre Zellen/ml PLF ohne Antikörperapplikation,  $1032 \pm 648$  monozytäre Zellen/ml PLF nach Injektion von 10 mg/kg 4B8). Im Vergleich zum Vorversuch (Applikation von 5 mg/kg Körpergewicht) konnte durch den Einsatz der doppelten Antikörpermenge (10 mg/kg Körpergewicht) die Zahl der eingewanderten Monozyten um weitere 28 % verringert werden. Die Applikation der Isotypkontrolle dagegen zeigte keine Beeinflussung der Monozytenmigration ( $3870 \pm 1307$  monozytäre Zellen/ml PLF ohne Antikörperapplikation,  $3905 \pm 718$  monozytäre Zellen/ml PLF nach Injektion von anti-A $\beta$  N3pE(3-x)).



**Abbildung 3.44:** Darstellung der in das Peritoneum eingewanderten Monozyten nach Induktion einer Thioglykolat-bedingten Peritonitis. Die Antikörperlösungen wurden 60 Min nach Thioglykolatapplikation in einer Konzentration von 10 mg / kg Körpergewicht in das Peritoneum injiziert. Die PLF wurde 4 h nach Thioglykolatstimulation gewonnen. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus einer Gruppe von 6 Tieren.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MCP1 N1pE die aktive und stabile Spezies innerhalb der total MCP1-Menge darstellt. MCP1 N1pE induziert die Migration der monozytären Zelllinie THP-1 *in vitro* (siehe Abbildung 3.41) sowie die Infiltration von Monozyten in das Peritoneum *in vivo* (siehe Abbildung 3.40). Sowohl die Inhibierung der Bildung von MCP1 N1pE als auch die Blockade der Wechselwirkung des zyklisierten Proteins mit seinem Rezeptor unterdrücken die Einwanderung von Monozyten zum Ort der Entzündung im Peritonitis-Maus-Modell. Somit stellen Inhibitoren der QCs und anti-MCP1 N1pE-Antikörper zwei interessante Ansätze für die Entwicklung therapeutischer Strategien zur Unterbindung von Entzündungsreaktionen, wie z.B. im Kontext von Arteriosklerose oder Rheumatoider Arthritis, dar.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur physiologischen Relevanz der N-terminalen Zyklisierung des Chemokins MCP1 durchgeführt. Dazu wurden die Auswirkungen der Applikation eines QC/isoQC-Inhibitors auf den MCP1 N1pE-Gehalt in geeigneten Zellkulturmodellen analysiert. Weiterhin wurde der QC/isoQC-Inhibitor im Peritonitis-Maus-Modell eingesetzt, um den Einfluss des N-terminalen Pyroglutamats von MCP1 auf dessen Aktivität *in vivo* zu untersuchen.

Sowohl für funktionelle und therapeutische Fragestellungen als auch zur quantitativen Detektion von MCP1 N1pE wurden Antikörper generiert, die spezifisch den zyklisierten N-Terminus von hMCP1, mMCP1 und rMCP1 erkennen. Die Antikörper konnten erfolgreich in Hybridomazellen exprimiert und aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden. Unter Verwendung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper konnten ELISAs etabliert werden, die die Diskriminierung zwischen MCP1 N1pE und total MCP1 aus Mensch, Maus und Ratte erlauben. Dabei umfasst die Menge an MCP1 N1pE N-terminal intaktes, zyklisiertes Protein, die Menge an total hMCP1 dagegen repräsentiert sowohl hMCP1 N1pE, als auch hMCP1 N1Q und N-terminal verkürzte Formen. Die ELISAs wurden dann dazu verwendet, den Einfluss der N-terminalen Zyklisierung von MCP1 in physiologischen Modellen zu untersuchen.

Neben deren Einsatz im ELISA sind die anti-MCP1 N1pE-Antikörper auch für therapeutische Fragestellungen interessant. Aus diesem Grund wurden die Antikörper hinsichtlich ihrer neutralisierenden Wirkung *in vitro* und *in vivo* analysiert. Deren Einsatz im Peritonitis-Maus-Modell liefert wichtige Informationen über die Funktion des zyklisierten N-Terminus bei der Bindung des CCR2-Rezeptors und der damit einhergehenden Rekrutierung von Monozyten.

### 4.1 Expression, Reinigung und Charakterisierung der verwendeten Proteine

#### 4.1.1 Genotypisierung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper

Die leichten und schweren Ketten eines Antikörpers setzen sich jeweils aus einer konstanten und einer variablen Region zusammen. Dabei sind die variablen Bereiche beider Antikörperketten, vor allem aber die CDRs, verantwortlich für die Antigenbindung der Immunglobuline. Aus diesem Grund ist für die Genotypisierung von Antikörpern insbesondere die Sequenzierung der unbekannt, variablen Bereiche der Antikörperketten notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurden die Sequenzen der variablen Bereiche der



Die so generierten Antikörper können bei unveränderter Spezifität im Menschen eingesetzt werden, ohne eine Immunreaktion gegen den Antikörper auszulösen. So besteht für die in dieser Arbeit generierten anti-MCP1 N1pE-Antikörper die Möglichkeit, diese so zu modifizieren, dass sie für eine therapeutische Anwendung im Menschen geeignet wären.

#### **4.1.2 Untersuchung von Kreuzreaktivitäten der anti-MCP1 N1pE-Antikörper**

Die anti-MCP1 N1pE-Antikörper wurden mittels Plasmonresonanz-Analyse hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivität zu humanen Peptiden getestet, die ebenfalls einen Pyroglutamarest am N-Terminus aufweisen (siehe 3.1.2.2). Des Weiteren erfolgte die Untersuchung der Reaktivität mit zum Teil modifizierten N-terminalen Sequenzen der humanen CC-Chemokine hMCP1, hMCP2, hMCP3 und hMCP4 sowie der murinen CC-Chemokine mMCP1, mMCP2, mMCP3 und ratten MCP3 (siehe 3.1.2.3). Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass die anti-MCP1 N1pE-Antikörper selektiv mit den ersten 4 Aminosäuren des MCP1 (pE-P-D-A) reagieren. Diese Aminosäuresequenz ist neben humanen, murinen und Ratten MCP1 auch am N-Terminus von hMCP2 und hMCP4 zu finden. Sowohl hMCP2 als auch hMCP4 sind CC-Chemokine, die im Laufe inflammatorischer Prozesse vermehrt exprimiert werden. Beide Proteine rekrutieren hauptsächlich Monozyten, aber auch T-Lymphozyten, Basophile und Eosinophile zum Ort der Entzündung (Proost *et al.*, 1996; Iwamoto *et al.*, 2008). Mit Hilfe des hMCP1 N1pE ELISAs soll die Rolle des N-terminalen Pyroglutamats von MCP1 bei der Progression inflammatorischer Prozesse untersucht werden. Da im Laufe von Entzündungsreaktionen neben der hMCP1- auch die hMCP2- und hMCP4-Expression verstärkt wird, ist es wichtig auszuschließen, dass der hMCP1 N1pE ELISA mit den beiden Proteinen kreuzreagiert. Für den Fangantikörper des hMCP1 ELISAs ist keine Kreuzreaktivität zu hMCP2 oder hMCP4 beschrieben (Datenblatt des *Goat anti hMCP1 AF*, Katalognummer AF-279-NA). Allerdings haben Crown *et al.* gezeigt, dass hMCP1 *in vitro* Heterodimere mit hMCP2 und hMCP4 ausbilden kann (Crown *et al.*, 2006). Dadurch besteht theoretisch die Möglichkeit, dass der Fangantikörper *Goat anti hMCP1 AF* ein hMCP1-Molekül bindet, welches im heterodimeren Komplex mit hMCP2 oder hMCP4 vorliegt. So könnte der Detektionsantikörper 2C9 aufgrund der Bindung an hMCP2 N1pE oder hMCP4 N1pE ein falsch positives Signal für hMCP1 N1pE generieren. Unter Verwendung eines Detektionsantikörpers für hMCP2 sowie hMCP4 sollte in nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen werden, dass durch den Fangantikörper *Goat anti hMCP1 AF* die Bindung eines hMCP1-hMCP2-Heterodimers bzw. eines hMCP1-hMCP4-Heterodimers erfolgt.

Die Proteine mMCP3 und rMCP3 weisen am N-Terminus die Aminosäuresequenz pE-P-D-G-... auf, wobei die ersten 3 Aminosäuren dem Epitop der anti-MCP1 N1pE-Antikörper entsprechen. In der PepSpot Analyse war eine Reaktivität der Antikörper 2C9 und 4B8 mit mMCP3 und rMCP3 zu beobachten. Das generierte Signal war allerdings im Vergleich zur Reaktion mit mMCP1 deutlich schwächer (siehe Abbildung 3.9). Die mMCP3 und rMCP3 Expression ist ebenfalls im Verlauf von entzündlichen Prozessen erhöht (Wang *et al.*, 2000; Tsou *et al.*, 2007), so dass eine Kreuzreaktivität mit dem m- und rMCP1 N1pE ELISA erhöhte Signale für MCP1 N1pE liefern kann. Ob die Bildung heterodimerer Komplexe ebenfalls bei den CC-Chemokinen aus Maus und Ratte auftritt, wurde bisher nicht untersucht. Die Kreuzreaktivität des mMCP1 N1pE ELISAs mit rekombinantem *full length* mMCP3(1-74) (Fa. Peprotech) wurde im Laufe dieser Arbeit analysiert. Dabei wurde nachgewiesen, dass unter Verwendung des Fangantikörpers *Rabbit anti mJE* bis zu 5 µg/ml mMCP3(1-74) nicht durch den Detektionsantikörper 2C9 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch sollte in weiterführenden Arbeiten auch im rMCP1 N1pE ELISA die Kreuzreaktivität mit rMCP3 unter Verwendung eines geeigneten Detektionsantikörpers ausgeschlossen werden.

Trotz der potentiellen Kreuzreaktivität des Antikörpers 2C9 zu hMCP2, hMCP4 und mMCP3 zeigen die ELISA-Daten, z.B. in Kapitel 3.3.1.1, dass in humanen und murinen Proben 100 % zyklisiertes MCP1 detektiert werden. Das heißt, in einer Probe, die nicht mit QC-Inhibitor behandelt wurde, sind die Mengen an total h- und mMCP1 vergleichbar mit den Mengen an h- und mMCP1 N1pE. Dies ist auch in Übereinstimmung mit Literaturdaten, die zeigen, dass natürlich vorkommendes hMCP1 zu 100 % als hMCP1 N1pE vorliegt (Proost *et al.*, 1998; Schutyser *et al.*, 2002). Eine Beeinflussung der in dieser Arbeit etablierten MCP1 N1pE ELISAs durch Kreuzreaktivitäten zu hMCP2 N1pE, hMCP4 N1pE bzw. mMCP3 N1pE ist deshalb nicht anzunehmen. Zudem werden MCP2, MCP3 und MCP4 zwar oftmals gemeinsam mit MCP1 induziert, sind dabei im Vergleich zu MCP1 allerdings mindestens 10fach geringer konzentriert (Van Damme *et al.*, 1992; Van Damme *et al.*, 1994).

### 4.1.3 Ermittlung thermodynamischer Parameter der anti-MCP1 N1pE-Antikörper mit Hilfe der ITC

Zur thermodynamischen Charakterisierung der Antigen-Antikörperinteraktion wurde die Bindung der Antikörper 2C9 und 4B8 an das Antigen hMCP1 N1pE (1-38) mittels ITC analysiert. Dabei wurden für beide Antikörper nahezu gleiche  $K_D$ -Werte ermittelt ( $K_{D\ 4B8} = 234\ \text{nM}$ ,  $K_{D\ 2C9} = 260\ \text{nM}$ ). Die hier ermittelten Dissoziationskonstanten sind, im Vergleich zu bisher in der Literatur beschriebenen anti-MCP1-Antikörpern, relativ hoch. Der monoklonale anti-MCP1-Antikörper 11K2 wurde zur Behandlung von Atherosklerose in ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen eingesetzt und verhinderte erfolgreich die Degeneration von Arterien (Lutgens *et al.*, 2005). Für diesen Antikörper wurden Dissoziationskonstanten für hMCP1 von 14 pM und für mMCP1 von 0,3 nM ermittelt (Lutgens *et al.*, 2005). Für den Antikörper ABN912, welcher in einer klinischen Phase I Studie an Arthritis Patienten eingesetzt wurde, konnte für die Bindung an hMCP1 mittels Plasmonresonanz-Analyse ein  $K_D$ -Wert von 43 pM berechnet werden (Haringman *et al.*, 2006). Bei der Ermittlung der Dissoziationskonstante am Biacore wurde der Antikörper jedoch als Analyt verwendet, was bei entsprechender Ligandendichte auf der Chip-Oberfläche zu starken Aviditätsffekten führt. Die daraus ermittelten Dissoziationskonstanten sind deutlich kleiner als die tatsächlichen Werte. Aus diesem Grund sind die mit dem Biacore ermittelten Daten mit den mittels ITC berechneten Parametern schwer vergleichbar. Messtechnisch bedingt können bei der ITC keine Aviditätseffekte auftreten und die daraus ermittelten Dissoziationskonstanten sind real.

Aus beiden Antigen-Antikörper-Bindungen resultiert ein Entropieverlust ( $\Delta S_{4B8} = -31,8\ \text{cal/mol}\cdot\text{K}^{-1}$ ,  $\Delta S_{2C9} = -8,2\ \text{cal/mol}\cdot\text{K}^{-1}$ ), welcher allerdings durch den enthalpischen Beitrag der Reaktionen kompensiert wird. Dabei weist der Antikörper 4B8 eine niedrigere Reaktionsenthalpie im Vergleich zu 2C9 auf ( $\Delta H_{4B8} = -18,2\ \text{kcal/mol}$ ,  $\Delta H_{2C9} = -11,2\ \text{kcal/mol}$ ). Vor allem spezifische Reaktionen, bei denen hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, sind enthalpisch getrieben. Bei solch spezifischen Wechselwirkungen verlieren die Bindungspartner vor allem an konformativen Freiheitsgraden, was wiederum den Entropieverlust bedingt (Ohtaka *et al.*, 2002).

Die Stöchiometrie der Antigenbindung des Antikörpers 2C9 beträgt 1,98, das heißt ein Antikörpermolekül ist in der Lage, mit nahezu zwei Molekülen hMCP1 N1pE(1-38) zu interagieren. Der Antikörper 4B8 dagegen bindet lediglich 1,6 Antigenmoleküle pro Antikörpermolekül, was auf einen geringeren Anteil an aktivem Antikörpern zurückzuführen ist. Im Zuge der Reinigung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper werden diese

mit einem sauren Puffer (pH 2,7) eluiert. Dieser Prozess könnte die partielle Denaturierung einiger Antikörpermoleküle bewirken, welche dadurch in ihrer Antigenbindung eingeschränkt sind. Die Antikörper-Konzentration wurde anhand der Absorption bei 280 nm bestimmt. Mit dieser Methode kann nicht zwischen partiell denaturiertem und vollständig intaktem Antikörper unterschieden werden.

#### **4.1.4 Optimierung der Antikörperproduktion in Hybridomazellen**

Die Hybridomazellen, welche die anti-MCP1 N1pE-Antikörper exprimieren, wurden von der Firma UNICUS OHG in Karlsburg erzeugt und in Form von Kryokonserven zur Verfügung gestellt. Da verschiedene Hybridomazelllinien hinsichtlich Wachstum und Antikörperproduktion unterschiedlich sein können, wurden zunächst die Kultivierungsbedingungen der 2C9-produzierenden Zelllinie analysiert und optimiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Hybridomazellen in Suspensionskultur unter Zugabe von 4 mM L-Glutamin sowohl die höchste Zelldichte erreichen als auch die größte Menge an Antikörper produzieren. Jeweils am 3. bzw. 4. Kultivierungstag beginnt die stationäre Phase und darauf folgt die Absterbephase der Zellen (siehe Abbildung 3.12). Betrachtet man die Antikörpermenge im Zellkulturüberstand während der Absterbephase, so fällt auf, dass diese weiterhin ansteigt (siehe Abbildung 3.13). Die Tatsache, dass auch in der Absterbephase weiterhin Antikörper gebildet wird, ist charakteristisch für Hybridomazellen (Biblia und Robinson, 1995).

Die höheren Zellzahlen und Antikörper-Ausbeuten in Suspensionskultur lassen sich durch einen verbesserten Sauerstoffeintrag, hervorgerufen durch die ständige Bewegung des Schüttelkolbens, begründen. Mit einem höheren Sauerstoffeintrag steigt die Stoffwechselleistung und damit auch die Produktbildungsrate.

Zellen können neben Pyruvat und Glukose auch Glutamin als Energiequelle nutzen (Lindl und Gstraunthaler, 2008). Dabei erhöhen hohe Glutamin-Konzentrationen die Glutamin-Aufnahmerate. Anschließend kann Glutamin über die Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und den Zitratzyklus für die Energiegewinnung genutzt werden (Omasa *et al.*, 1992). Miller *et al.*, konnten zeigen, dass die ATP-Produktionsrate unter Zugabe von Glutamin steigt, wodurch die Hybridomazellen dementsprechend besser proliferieren können (Miller *et al.*, 1989). Aus der Erhöhung der Gesamtzellzahl resultiert eine vermehrte Antikörperproduktion. Auch Omasa *et al.* konnten zeigen, dass die Zugabe von bis zu 10 mM L-Glutamin sowohl die Antikörperproduktion als auch die spezifische Wachstumsrate der Zellen steigert (Omasa *et al.*, 1992).

Um Aussagen über die Verwendung des zugegebenen L-Glutamins als Kohlenstoffquelle treffen zu können, wurde zusätzlich die Glukose-Konzentration im Medium bestimmt (siehe Anhang II). Vergleicht man den Glukoseverbrauch der Zellkulturen unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen wird deutlich, dass sich dieser in den Kulturen mit und ohne L-Glutamin nicht unterscheidet. Auch Omasa *et al.*, konnten zeigen, dass die Glukosaaufnahmerate nicht von der vorhandenen Glutamin-Konzentration abhängt (Omasa *et al.*, 1992). Beide Stoffe stellen für die Zelle Energiequellen dar, es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Zellen im vorliegenden Versuch bevorzugt L-Glutamin als Kohlenstoffquelle genutzt haben. Dies zeigt sich daran, dass unter Zugabe von L-Glutamin höhere Zellzahlen erzielt werden, obwohl die Glukoseverbrauchsrate gleich der ohne L-Glutamin-Beigabe ist. Miller *et al.* beobachteten ebenfalls, dass die maximale Zellzahl zu dem Zeitpunkt erreicht wurde, an dem Glutamin vollständig verbraucht war (Miller *et al.*, 1988). Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass Glutamin den limitierenden Faktor für die Kultivierung darstellte.

Bei der Kultivierung von Hybridomazellen werden grundsätzlich zwei Ziele verfolgt, aus denen sich unterschiedliche Prozessführungsstrategien ableiten. Die Hybridomazellen haben nach 5 Tagen in Schüttelkultur unter Zugabe von 4 mM L-Glutamin die höchste Antikörpermenge gebildet. Allerdings befinden sich die Zellen zu diesem Zeitpunkt schon in der Absterbephase. Für eine fortlaufende Kultivierung muss der Mediumwechsel nach 2-3 Tagen in der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt werden. Hinsichtlich einer hohen Antikörperausbeute und Produktivität sollte eine 5-tägige Fermentation durchgeführt werden, da im batch-Prozess nur einmal Medium zugesetzt werden muss.

Durch die Inkubation der Hybridomazellen in Schüttelkultur sowie die Zugabe von L-Glutamin zum Zellkulturmedium konnte die Antikörperausbeute insgesamt um Faktor 3 gesteigert werden. Somit konnten nach 5 tägiger Inkubation in Schüttelkultur unter Zugabe von 4 mM L-Glutamin ca. 14 mg des homogenen Antikörpers 2C9 aus 500 ml Zellkulturüberstand isoliert werden (Daten nicht gezeigt).

#### **4.1.5 Expression von SUMO-MCP1**

Zur rekombinanten Herstellung des humanen MCP1 wurden in den letzten 18 Jahren verschiedene Expressionssysteme verwendet. Allerdings zeigte bisher jede der getesteten Methoden Nachteile. So liegt das in *E. coli* exprimierte MCP1 in *Inclusion bodies* vor (Beall *et al.*, 1992) und ist nach der Rückfaltung zwar aktiv, aber im Vergleich zu den glykosylierten Proteinen aus *P. pastoris* oder Tierzellen instabiler (Ruggiero *et al.*, 2003).

Aus der Expression in Zellkultursystemen wie COS-Zellen (Zhang *et al.*, 1994) und Insektenzellen (Ueda *et al.*, 1994, Ishii *et al.*, 1995) ergeben sich lediglich geringe Mengen des Zielproteins. Zudem erweist sich in diesen Expressionssystemen eine Produktion im größeren Maßstab als schwierig. Mit dem *P. pastoris* Expressionssystem konnten bisher die höchsten Mengen nativen Zielproteins erhalten werden (Beall *et al.*, 1998, Ruggiero *et al.*, 2003). Beall *et al.* erzielten im Expressionsüberstand eine rekombinante Proteinkonzentration von ca. 100 µg/ml. Dieser Wert ist absolut vergleichbar mit der im Laufe dieser Arbeit durchgeführten Expression von SUMO-hMCP1 in *P. pastoris* (ca. 200 µg/ml). Allerdings fanden Beall *et al.* bei der Expression von hMCP1 eine heterogene Zusammensetzung des Zielproteins vor (Beall *et al.*, 1998). Die N-terminale Sequenzierung ergab, dass es sich bei ca. 50 % der exprimierten Proteine um N-terminal verkürztes MCP1(3-76) handelt. Das restliche Protein liegt als MCP1 N1pE vor, aufgrund des pE-Restes war dessen N-terminale Sequenzierung nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit ist es durch Expression von SUMO-MCP1 N1pE in *P. pastoris* gelungen, sowohl die N-terminale Prozessierung als auch die unkontrollierte Bildung von MCP1 N1pE zu verhindern. Die Expressionsrate bleibt dabei im Vergleich zu Literaturdaten unbeeinflusst. Glykosylierungen können an verschiedene Aminosäuren angefügt werden, an Asparagin (N-Glykosylierungen) und an Serin oder Threonin (O-Glykosylierungen) (Cregg *et al.*, 2000). Aus Abbildung 3.20 ist ersichtlich, dass das in *P. pastoris* exprimierte SUMO-hMCP1 N-glykosyliert vorliegt. Obwohl die Aminosäuresequenz von hMCP1 eine Konsensus-Sequenz für N-Glykosylierungen aufweist (Rollins *et al.*, 1989), wurde bisher kein natürlich vorkommendes N-glykosyliertes hMCP1 gefunden (Jiang *et al.*, 1990; Opendakker *et al.*, 1995). Physiologisches hMCP1 wurde bisher als sialysiertes und O-glykosyliertes Protein beschrieben (Opendakker *et al.*, 1995, Jiang *et al.*, 1990). Allerdings resultierte schon die rekombinante Expression von hMCP3 in *P. pastoris* in N-glykosyliertem Protein (Masure *et al.*, 1995). Auch Beall *et al.* erhielten N-glykosyliertes hMCP1 nach dessen Expression in *P. pastoris* (Beall *et al.*, 1998). Es muss also hervorgehoben werden, dass das in dieser Arbeit exprimierte rekombinante hMCP1 nicht seine physiologisch vorkommende Glykosylierung aufweist. Ungeachtet dessen ist es für den Einsatz als Standardprotein für den hMCP1 und hMCP1 N1pE ELISA geeignet. Der Vergleich mit dem in *E. coli* exprimierten hMCP1 (Fa. Peprotech) zeigt keinen Unterschied zwischen der Detektion des nicht glykosylierten Proteins aus *E. coli* und dem N-glykosylierten Protein aus *P. pastoris*. Auch im THP-1 Migrationsassay zeigen beide Proteine die gleiche chemotaktische Aktivität (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2 Entwicklung von ELISAs zum quantitativen Nachweis von MCP1 und MCP1 N1pE aus Mensch, Maus und Ratte**

Zur Untersuchung der Bedeutung des N-terminalen Pyroglutamats von MCP1 wurden ELISAs entwickelt, die den quantitativen Nachweis von total MCP1 und MCP1 N1pE in biologischen Proben ermöglichen. Dabei werden die Antigene total MCP1 und MCP1 N1pE zunächst von einem immobilisierten polyklonalen Fangantikörper gebunden. Durch Zugabe zweier verschiedener monoklonaler Detektionsantikörper kann dann sowohl die Menge an total MCP1, als auch der Anteil von MCP1 N1pE an der Gesamt-MCP1-Menge quantifiziert werden. So konnten Assays etabliert werden, mit denen die Ermittlung des Verhältnisses von MCP1 N1pE / total MCP1 in humanen-, murinen- und Ratten-Proben gelingt.

Die in dieser Arbeit etablierten ELISAs weisen Detektionslimits von 16 pg/ml für total hMCP1 und hMCP1 N1pE, 40 pg/ml für total mMCP1 und mMCP1 N1pE und 80 pg/ml für total rMCP1 und rMCP1 N1pE auf. ELISAs zur quantitativen Detektion von hMCP1, mMCP1 und rMCP1 sind kommerziell erhältlich (Fa. PIERCE), wobei der Nachweis der Proteine unabhängig von deren Zyklisierungsstatus erfolgt. Für diese ELISAs werden Detektionslimits von 10 pg/ml (hMCP1), 4 pg/ml (mMCP1) und 5 pg/ml (rMCP1) angegeben. In Kapitel 3.2.5.5 konnte allerdings gezeigt werden, dass dies in einer Diskrepanz in den Konzentrationsangaben der verwendeten Standardproteine begründet liegt. Korrigiert man diese Konzentrationsangaben, so sind die ELISAs von PIERCE und die in dieser Arbeit etablierten Assays in ihrer Sensitivität vergleichbar.

Weiterhin wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit erstmals Assays entwickelt, mit denen hMCP1 N1pE, mMCP1 N1pE und rMCP1 N1pE quantitativ detektiert werden können. Ein Vergleich mit kommerziell erhältlichen ELISAs war hier nicht möglich.

Die Fangantikörper *Goat anti hMCP1 AF*, *Rabbit anti mJE* und *Rabbit anti rat MCP1* sind polyklonale Antikörper. Polyklonale Antikörper sind ein Gemisch aus verschiedenen Antikörpern, die von verschiedenen B-Zellen produziert wurden und gegen unterschiedliche Epitope desselben Antigens gerichtet sind. Durch eine Studie mit verschiedenen zyklisierten A $\beta$ -Peptiden konnte gezeigt werden, dass der zyklisierte N-Terminus eine besonders immunogene Wirkung hat und somit auch das N-terminale Pyroglutamat des MCP1 eine verstärkte Immunantwort auslösen kann (Britschgi *et al.*, 2009). So ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich in einem heterogenen Antikörpergemisch gegen MCP1 ein Antikörper befindet, welcher spezifisch N1pE detektiert, relativ groß. Es muss also die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die polyklonalen

Fangantikörper zum Teil spezifisch den N-terminalen Pyroglutamarest binden und somit die anschließende Detektion durch den anti-MCP1 N1pE-Antikörper 2C9 beeinträchtigen. Allerdings zeigen die im Laufe dieser Arbeit generierten Daten, z.B. aus den Zellkulturmodellen (siehe 3.3.1.1), dass in Proben, die nicht mit QC-Inhibitor behandelt wurden, ein Verhältnis von total MCP1 / MCP1 N1pE von 1 ermittelt wird. Dies ist in Übereinstimmung mit Literaturdaten, in denen in physiologischen Proben in der Regel 100 % zyklisiertes MCP1 gefunden werden (Proost *et al.*, 1996; Proost *et al.*, 1998; Schutyser *et al.*, 2002). Sollte eine Maskierung des zyklisierten N-Terminus aufgrund der Bindung durch den Fangantikörper stattfinden, so müsste dies in einer verringerten Detektierbarkeit von MCP1 N1pE resultieren. Der Detektionsantikörper für total MCP1 dagegen bindet in einer Loop-Region in der Nähe des N-Terminus (siehe 3.2.3) und sollte dadurch nicht beeinträchtigt sein.

Aufgrund der Tatsache, dass die in dieser Arbeit etablierten ELISAs in biologischen Proben ein Verhältnis von total MCP1 / MCP1 N1pE von nahezu 1 angeben, ist die Detektierbarkeit von MCP1 N1pE mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht eingeschränkt.

#### **4.2.1 Epitopmapping der Detektionsantikörper des total h-, m- und rMCP1 ELISAs**

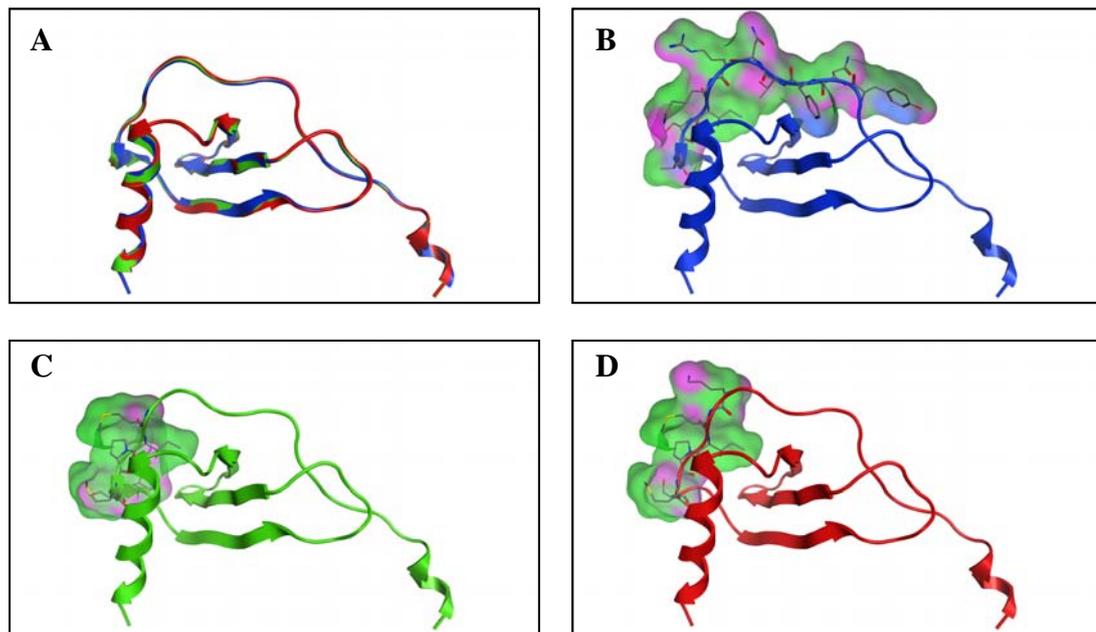
Zur Ermittlung der Aminosäuresequenzen, die von den Detektionsantikörpern des total h-, m- und rMCP1 ELISAs erkannt werden, wurde ein Epitopmapping durchgeführt (siehe 3.2.3). Dabei konnte gezeigt werden, dass alle 3 Antikörper diskontinuierliche Epitope erkennen, d.h. es werden jeweils 2 Sequenzen detektiert, die in der MCP1-Primärstruktur nicht nebeneinander liegen. Diese Eigenschaft findet man häufig bei Antikörpern, die native Proteine erkennen und somit für die Anwendung im ELISA geeignet sind. Erst durch die Ausbildung der Tertiärstruktur gelangen Aminosäuren, die in der Primärstruktur weit voneinander entfernt liegen, in unmittelbare räumliche Nähe zueinander.

Die Daten in Kapitel 3.2.3 zeigen, dass die Detektionsantikörper des total mMCP1 und rMCP1 ELISAs an den zyklisierten N-Terminus ihres Antigens binden. Sollte daraus resultieren, dass mMCP1 N1pE und rMCP1 N1pE in den total MCP1 ELISAs bevorzugt erkannt werden, so wären die Antikörper *Rat anti mouse MCP1* und *Rabbit anti rat MCP1* für eine Anwendung als Detektionsantikörper im total MCP1 ELISA unbrauchbar. Diese Tatsache machte weitere Untersuchungen der total mMCP1 und rMCP1 ELISAs notwendig, welche in Kapitel 4.2.3 diskutiert werden. Weiterhin wurde durch das Epitopmapping deutlich, dass alle drei Detektionsantikörper Epitope erkennen, welche im *Alignment* der Aminosäuresequenzen von h-, m- und rMCP1 an ähnlicher Position

innerhalb der Primärstruktur liegen. Jedes Epitop beinhaltet unter anderem die Aminosäuren 19-22 (siehe Abbildung 3.28). Dies gibt Hinweise darauf, dass es sich hierbei um eine exponierte Sequenz in der Tertiärstruktur der drei Proteine handelt. Betrachtet man die Röntgenkristallstruktur von hMCP1 (pdb Code: 1DOK) so wird deutlich, dass sich die vom Detektionsantikörper gebundenen Aminosäuren 13-22 nahe dem N-Terminus auf einem Loop befinden (siehe Abbildung 4.3). Da bisher keine Kristallstrukturen sowohl von mMCP1 als auch von rMCP1 existieren, wurde mit dem Programm MOE<sup>®</sup> (Version 2009.10) jeweils ein Homologie-Modell unter Zuhilfenahme der Kristallstruktur von hMCP1 als Template erstellt. Die Betrachtung dieser Homologie-Modelle zeigt, dass sich die Epitope der Detektionsantikörper *Rat anti mouse MCP1* und *Rabbit anti rat MCP1* ebenfalls sehr wahrscheinlich auf einem entsprechenden Loop der Proteinoberfläche befinden (siehe Abbildung 4.3).

Dieses Experiment lieferte entscheidende Informationen für die geplante Entwicklung eigener Detektionsantikörper für den total h-, m- und rMCP1 ELISA. Es konnten exponierte Strukturen identifiziert werden, die sich in der Nähe des N-Terminus befinden und als Erkennungssequenz für den Detektionsantikörper gut geeignet sind. Die Tatsache, dass die 3 Detektionsantikörper der verschiedenen ELISAs ein Epitop in der gleichen Loop-Region erkennen, bietet einen deutlichen Vorteil hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Assays untereinander.

Weiterhin sollte in diesem Zusammenhang hervorgehoben werden, dass die Detektionsantikörper zwar nahe dem N-Terminus binden, aber trotz allem Formen von MCP1 detektieren, die aufgrund der Spaltung durch Aminopeptidasen oder DP4 N-terminal degradiert vorliegen.



**Abbildung 4. 3:** **A** – Darstellung der überlagerten Kristallstrukturen von hMCP1 (Lubkowski *et al.*, 1997, pdb: 1DOK, blau) mit Homologiemodellen von mMCP1 (grün) und rMCP1 (rot). Gut sichtbar in der verwendeten Ansicht ist die hohe Ähnlichkeit innerhalb der Sekundärstrukturen. Aufgrund der Verwendung von hMCP1 als Templatestruktur für die Erstellung der Modelle sind methodenbedingt nur die entsprechenden C-terminal verkürzten Teile (jeweils AS 1-76) von mMCP1 und rMCP1 sinnvoll modellierbar und hier abgebildet.

**B-D:** Darstellung der jeweiligen Strukturmodelle von hMCP1 (**B**, blau), mMCP1 (**C**, grün) und rMCP1 (**D**, rot). Zusätzlich zur Darstellung der Sekundärstruktur sind jeweils die Aminosäuren mit ihren Seitenketten und den dazugehörigen molekularen Oberflächen abgebildet, die das jeweilige Epitop des Detektionsantikörpers *mouse anti human MCP1* (**B**), *rat anti mouse MCP1* (**C**) und *rabbit anti rat MCP1* (**D**) darstellen. Dabei haben die Oberflächenfarben folgende Bedeutung: rosa – Bereiche, die für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen geeignet sind; grün – hydrophobe Bereiche; blau – moderat polare Regionen.

#### 4.2.2 Untersuchung des Einflusses des N-terminalen Pyroglutamats auf den total h-, m- und rMCP1 ELISA

Der total MCP1 ELISA soll unter anderem in Kombination mit dem MCP1 N1pE ELISA zur Diskriminierung von MCP1 N1Q und MCP1 N1pE dienen. Im Zuge des Epitopmappings wurde allerdings gezeigt, dass die Detektionsantikörper *rat anti mouse MCP1* und *rabbit anti rat MCP1* an den N-terminalen Pyroglumatrest ihres denaturierten Antigens binden (Kapitel 3.2.3). Deshalb wurde in einem weiteren Experiment untersucht, ob die Zyklisierung der nativen Proteine hMCP1, mMCP1 und rMCP1 einen Einfluss auf deren Bindung durch den Detektionsantikörper des total MCP1 ELISAs hat. Dabei stellte sich heraus, dass die Detektionsantikörper *mouse anti human MCP1* und *rat anti mouse MCP1* nicht zwischen MCP1 N1Q und MCP1 N1pE diskriminieren, der Antikörper *rabbit*

*anti rat MCP1* dagegen weist eine deutlich höhere Reaktivität mit dem zyklisierten Antigen auf (siehe Abbildung 3.29). In Kapitel 3.2.3 konnte bereits gezeigt werden, dass *mouse anti human MCP1* nicht mit den ersten 12 Aminosäuren des hMCP1 N1pE interagiert (siehe Abbildung 3.28). Aus diesem Grund wurde auch nicht erwartet, dass der total hMCP1 ELISA Unterschiede in der Detektion von hMCP1 N1Q und hMCP1 N1pE aufweist. Der Antikörper *rat anti mouse MCP1* erkennt zwar die 10 Aminosäuren lange N-terminale Sequenz von mMCP1 N1pE, unterscheidet aber in der 3-dimensionalen Struktur des nativen Proteins nicht zwischen mMCP1 N1Q und mMCP1 N1pE.

Der Detektionsantikörper *Rabbit anti rat MCP1* ist, im Gegensatz zu den monoklonalen Antikörpern *Rat anti mouse MCP1* und *mouse anti human MCP1*, ein polyklonaler Antikörper. In Kapitel 4.2.1 wurde bereits erwähnt, dass der zyklisierte N-Terminus eine besonders immunogene Wirkung haben kann. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich in einem heterogenen Antikörpergemisch gegen rMCP1 Antikörper befinden, die spezifisch N1pE detektieren, relativ groß.

Dieses Experiment macht deutlich, dass die total h- und mMCP1 ELISAs zur Bestimmung des total MCP1-Gehaltes einer Probe geeignet sind, da diese vom Zyklisierungsgrad des N-Terminus nicht beeinflusst werden. Dies ermöglicht in Kombination mit dem MCP1 N1pE ELISA den prozentualen Anteil von MCP1 N1pE an der Gesamt-MCP1-Menge in biologischen Proben zu ermitteln. Der total rMCP1 ELISA dagegen ist für diese Anwendung nicht geeignet. Die Abnahme von rMCP1 N1pE in, z.B. mit QC-Inhibitor behandelten Proben, würde sowohl im rMCP1 N1pE ELISA als auch im total rMCP1 ELISA in einer Verringerung des Signals resultieren.

#### **4.2.3 Validierung der ELISAs zur Detektion von MCP1 und MCP1 N1pE aus Maus, Ratte und Mensch**

Im Zuge der Validierung der in 3.2.1 und 3.2.2 etablierten Assays wurden diese hinsichtlich der Spezifität, der Linearität verschiedener Probenverdünnungen, der Stabilität des Analyten in der zu analysierenden Matrix sowie der Intraassay- und Interassay-Präzision untersucht. Mögliche Kreuzreaktivitäten der etablierten ELISAs wurden bereits in Kapitel 4.1.2. diskutiert. In Kapitel 3.2.5.2 konnte gezeigt werden, dass im mMCP1 N1pE ELISA verschiedene Verdünnungen einer Probe über einen sehr weiten Bereich nahezu die gleiche Konzentration unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors lieferten. Unterschiedlich verdünnte Proben können demnach auch bei stark unterschiedlichen Absorptionen miteinander verglichen werden. Stabilitätsuntersuchungen von mMCP1

zeigten, dass der quantitative Nachweis von mMCP1 N1pE weder durch längere Inkubationszeiten bei Raumtemperatur, noch durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren beeinflusst ist. Weiterhin weist der im Laufe dieser Arbeit etablierte ELISA eine sehr gute Intraassay- und Interassay-Präzision auf, mit prozentualen Variationskoeffizienten die einen Wert von maximal 4,49 % nicht überschreiten. Die Firma PIERCE gibt für seine kommerziellen hMCP1, mMCP1 und rMCP1 ELISAs Variationskoeffizienten für die Intraassays- und Interassay-Präzision von <10 % an. Vergleicht man das Detektionslimit von dem in dieser Arbeit etablierten total mMCP1 ELISA mit einem kommerziell erhältlichen ELISA von PIERCE, so wird deutlich, dass der PIERCE ELISA weniger sensitiv ist.

Verschiedene Regelwerke zur Bioanalytik, wie z.B. EMEA (ICH Q6B „Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products“, CPMP/ICH/365/96, September 1999) oder FDA (Guidance for Industry „Bioanalytical Method Validation“, Mai 2001) geben Richtlinien zur Validierung analytischer Methoden vor, die bis hin zur Arzneimittelzulassung ausreichend sind. Dabei werden keine Grenzwerte für die Linearität, Stabilität des Analyten sowie Intraassay- und Interassay-Präzision vorgeschrieben, sondern lediglich Empfehlungen ausgesprochen. Für Linearitätsuntersuchungen und Intraassay- sowie Interassay-Präzision werden Abweichungen von 5-20 % als Richtwerte angegeben, es können auch bis hin zu 50 % akzeptabel sein (Entscheidung der europäischen Kommission vom 12. August 2002). Eine validierte Methode soll Daten generieren, die dem Analytiker ein begründetes Vertrauen geben, dass die Methode für den definierten Zweck geeignet ist. Soll eine quantitative Analyse unter *Good Manufacturing Practice* (GMP)-Maßstäben validiert werden, so werden die Akzeptanzbereiche selbst festgelegt und müssen von den zuständigen Behörden akzeptiert werden.

Zur Erfüllung der Aufgabenstellung dieser Promotionsarbeit ist derzeit keine vollständige Methodenüberprüfung notwendig. Dennoch wurde die Methode mit den hier gezeigten Untersuchungen insofern ausreichend validiert, dass die generierten Daten zuverlässig und reproduzierbar sind.

### 4.3 Untersuchungen zur physiologischen Funktion von MCP1 N1pE

#### 4.3.1 Beeinflussung der MCP1 N1pE-Bildung durch QC-Inhibitoren in Zellkulturmodellen

Natürlich vorkommendes MCP1 liegt nahezu vollständig zyklisiert als MCP1 N1pE vor (Proost *et al.*, 1998; Schutyser *et al.*, 2002). Vermutlich wird diese Zyklisierung von den Enzymen QC (Pohl *et al.*, 1991; Schilling *et al.*, 2008) und isoQC (Cynis *et al.*, 2008) katalysiert. Allerdings kann die Zyklisierung des N-terminalen Glutamins unter bestimmten physikochemischen Bedingungen auch spontan erfolgen (Blombäck, 1967; Khandke *et al.*, 1989). Um zu prüfen, welchen Einfluss die Enzyme QC und isoQC auf die Bildung von MCP1 N1pE haben, wurde der QC/isoQC-Inhibitor QCI in einem *in vitro* Zellkulturmodell der Maus-Zelllinie RAW264.7, der Ratten-Zelllinie MADB und der humanen Zelllinie A549 appliziert. Die Auswertung durch Quantifizierung der total MCP1- und MCP1 N1pE-Mengen in den Zellkulturüberständen zeigte dabei, dass die MCP1 N1pE-Level mit steigender Inhibitor-Konzentration abnehmen. Die total MCP1-Level der humanen und murinen Zelllinie bleiben dagegen unbeeinflusst. Da der Detektionsantikörper des total rMCP1 ELISAs eine Präferenz für rMCP1 N1pE zeigt (siehe Kapitel 3.2.4), lässt sich eine Beeinflussung der total rMCP1-Menge mit dem in dieser Arbeit etablierten ELISA nicht feststellen. Da allerdings bestätigt werden konnte, dass die total MCP1-Level in dem humanen und murinen Modell nicht beeinträchtigt sind, kann davon ausgegangen werden, dass auch keine Beeinflussung der total rMCP1-Level erfolgt. So kann die Berechnung des  $IC_{50}$ -Wertes allein aus den Daten für MCP1 N1pE erfolgen.

Anhand der QCI-konzentrationsabhängigen Reduktion des Verhältnisses MCP1 N1pE / total MCP1 bzw. der rMCP1 N1pE-Level, konnten  $IC_{50}$ -Werte für die jeweiligen Zelllinien berechnet werden. Obwohl die  $K_i$ -Werte von QCI, welche an den rekombinanten Enzymen QC und isoQC ermittelt wurden, kaum voneinander abweichen (persönliche Mitteilung von Dr. Torsten Hoffmann, Probiobio AG), zeigen sich in den  $IC_{50}$ -Werten aus den Zellkulturexperimenten große Unterschiede. Ein  $IC_{50}$ -Wert, welcher aus einem *in vitro* Zellkulturexperiment ermittelt wurde, wird von unterschiedlichen Faktoren wie Enzymkonzentration, Substratkonzentration, Proteinbindung des Inhibitors oder der Membranpermeabilität des Inhibitors beeinflusst. So befinden sich im Zellkulturmedium 10 % FBS sowie verschiedene, von den Zellen sezernierte Proteine. Das heißt ein Teil des Inhibitors könnte aufgrund unspezifischer Proteinbindung nicht für die QC und isoQC

zugänglich sein. QC ist ein extrazelluläres Enzym, isoQC dagegen ist im Golgi Apparat lokalisiert (Cynis *et al.*, 2008). Die Inhibierung des Enzyms isoQC ist deshalb abhängig von der Fähigkeit des Inhibitors, die Zellmembran zu passieren. Zudem zeigen die drei verwendeten Zelllinien unterschiedliche Expressionslevel der Enzyme QC und isoQC (persönliche Mitteilung von Dr. Astrid Kehlen, Probiodrug AG). So waren in RAW264.7-Zellen keine detektierbaren Mengen an QC-mRNA nachweisbar. Der Inhibitor zeigt wiederum die beste Wirksamkeit an dieser Zelllinie. MCP1, welches aufgrund des inflammatorischen Stimulus synthetisiert wird, gelangt über den sekretorischen Weg in den Golgi-Apparat und wird dort von der isoQC zyklisiert (Cynis *et al.*, 2008). Bei Inhibierung der isoQC sekretiert die Zelle vermehrt MCP1 N1Q, welches während der Inkubationszeit von 24 h im Zellkulturüberstand akkumuliert wird. Im extrazellulären Raum von MADB- und A549-Zellen ist genügend QC vorhanden. So kann das extrazelluläre Enzym trotz Anwesenheit des kompetitiven Inhibitors im Laufe der Inkubationszeit von 24 h sekretiertes MCP1 N1Q nachträglich zyklisieren. Dies könnte die Tatsache erklären, dass die  $IC_{50}$ -Werte in diesen Zellen im Vergleich zur Zelllinie RAW264.7 sehr hoch sind.

Im Gegensatz zum  $K_i$ -Wert ist der  $IC_{50}$ -Wert eines Inhibitors abhängig von der Substrat- und Enzymkonzentration. Neben unterschiedlichen QC- und isoQC-Leveln sezernieren die untersuchten Zelllinien nach Stimulation verschiedene MCP1-Mengen in den Zellkulturüberstand (siehe Abbildung 3.35-3.39). Die  $IC_{50}$ -Werte von QCI an den verwendeten Zelllinien werden demnach von einer Vielzahl zusammenwirkender Parameter beeinflusst.

Die in 3.3.1.1 dargestellten Daten bestätigen, dass die Enzyme QC und isoQC *in vitro* maßgeblich an der Bildung von MCP1 N1pE beteiligt sind. In allen untersuchten Zelllinien nehmen die MCP1 N1pE Konzentrationen mit steigender Inhibitor-Konzentration ab. Allerdings wurde in keinem Fall eine 100 %ige Inhibierung der N-terminalen Pyroglutamat-Bildung erreicht, die MCP1 N1pE-Level konnten auf maximal 20 % gesenkt werden (Abbildung 3.35). Vermutlich erfolgt während der Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C eine spontane Zyklisierung geringer MCP1-Mengen. In Vorbereitung auf eine Anwendung im Tiermodell zeigen diese *in vitro* Daten, dass Inhibitoren der Enzyme QC/isoQC ein wichtiges Instrument sind, um die Funktion des N-terminalen Pyroglutamats von MCP1 zu untersuchen.

#### 4.3.2 Untersuchung des Einflusses der QC/isoQC-Inhibierung im Peritonitis-Maus-Modell

In Kapitel 3.3.1.1 wurde in verschiedenen Zellkulturexperimenten gezeigt, dass ein QC/isoQC-Inhibitor *in vitro* in der Lage ist, die MCP1 N1pE-Level konzentrationsabhängig zu senken. Durch Applikation von QCI im Peritonitis-Maus-Modell sollte nun geprüft werden, ob die Inhibierung der Zyklisierung von mMCP1 einen Einfluss auf die Rekrutierung von Monozyten in das Peritoneum ausübt.

Unter Anwendung des Peritonitis-Maus-Modells konnte in der Literatur bereits bewiesen werden, dass mMCP1 essentiell für die Anlockung von Monozyten ist. Henderson *et al.* haben gezeigt, dass 4 h nach Thioglykolatstimulation die in das Peritoneum migrierten Monozyten in MCP1 *knock out* Mäusen auf 16 % des Wildtyplevels reduziert waren (Henderson *et al.*, 2003). Weiterhin konnte durch Applikation des CCR2 Antagonisten INCB3344 die Monozyteneinwanderung in das Peritoneum im Thioglykolatmodell dosisabhängig reduziert werden (Brodmerkel *et al.*, 2005). Auch in CCR2 *knock out* Mäusen ist die Rekrutierung von Monozyten in das Peritoneum nach Thioglykolatinjektion massiv beeinträchtigt (Boring *et al.*, 1997; Tsou *et al.*, 2007).

Die in dieser Arbeit generierten Daten zeigen, dass nicht nur die vermehrte MCP1-Expression, sondern vielmehr die Bildung von MCP1 N1pE essentiell für die Rekrutierung von Monozyten ist. Betrachtet man das Verhältnis von mMCP1 N1pE / total mMCP1 in der PLF von Tieren, denen kein QC-Inhibitor appliziert wurde, so liegen 100 % des mMCP1 zyklisiert vor (Daten nicht gezeigt). Bereits in der Literatur wurde beschrieben, dass natürlich vorkommendes MCP1 vollständig zyklisiert ist. So haben Proost *et al.* physiologisches hMCP1 aus humanen Monozyten isoliert. Dabei lag sämtliches N-terminal intaktes Protein als hMCP1 N1pE vor und ließ sich nicht mit der Methode des Edman-Abbaus sequenzieren (Proost *et al.*, 1998). Auch hMCP1, welches aus der Bauchhöhle von Patientinnen mit Ovarialkarzinom isoliert wurde, ergab kein Signal bei der Sequenzierung durch den Edman-Abbau, was für die vollständige Präsenz von hMCP1 N1pE spricht (Schutyser *et al.*, 2002). Wird die Zyklisierung von MCP1 unterbunden, so resultiert dies in einer verkürzten Halbwertszeit und vermehrter proteolytischer Degradierung am N-Terminus des Proteins, vor allem durch die Protease DP4 (Cynis *et al.*, 2010, in Vorbereitung). Mit dem in Kapitel 3.3.1.2 vorgestellten Experiment konnte bewiesen werden, dass die Zyklisierung des N-terminalen Glutamins essentiell für die chemotaktische Wirkung des Zytokins ist. Aufgrund der Inhibierung der mMCP1 N1pE Bildung ist die Monozyteneinwanderung zum Ort der Entzündung massiv beeinträchtigt.

Die Applikation von 100 mg/kg QCI inhibierte die Bildung von mMCP1 N1pE 150 Min nach Thioglykolatapplikation um 78,8 %. Nach 240 Min war die Menge an der in das Peritoneum eingewanderten Monozyten um 73,6 % reduziert.

Dieses Experiment gibt weiterhin eindrucksvoll die zeitliche Reihenfolge zwischen der Inhibitorwirkung auf mMCP1 N1pE und der resultierenden Wirkung auf die Monozytenmigration wieder. Durch die Applikation von Thioglykolat sind die mMCP1 N1pE-Mengen in den unbehandelten Tieren nach 150 Min 8fach erhöht. Die vermehrte mMCP1 N1pE Expression bewirkt dann nach 240 Min die Rekrutierung von Monozyten in das Peritoneum (Abbildung 3.40, unbehandelt). Diese Dokumentation des zeitlichen Verlaufs der Inflammationsreaktion zeigt noch einmal den direkten Zusammenhang zwischen dem inflammatorischen Stimulus, der mMCP1 N1pE Bildung und der Rekrutierung von Monozyten.

Die Ergebnisse des total mMCP1 ELISAs zeigen, dass die Gesamt-mMCP1-Menge durch die Applikation des Inhibitors unbeeinflusst bleibt. Wie bereits in Kapitel 4.2.2 erwähnt wurde, bindet der Detektionsantikörper des total mMCP1 ELISAs zwar nahe dem N-Terminus von mMCP1, detektiert aber trotz allem Varianten des Proteins, die aufgrund der Spaltung durch DP4 oder andere Aminopeptidasen N-terminal degradiert vorliegen. Fehlen aber die erste oder die ersten zwei Aminosäuren des MCP1, so resultiert dies in einer massiven Reduktion des chemotaktischen Potentials (Gong und Clark-Lewis, 1995). Die in Kapitel 3.3.1.2 vorgestellten Daten deuten darauf hin, dass die Inhibierung der Pyroglutamat-Bildung in einer vermehrten N-terminalen Degradierung und dem damit einhergehenden Verlust der Rezeptorbindung resultiert. Der proteolytische Abbau des gesamten Proteins ist allerdings in dem beobachteten Zeitrahmen nicht zu erkennen, so dass die Mengen an total mMCP1 unverändert bleiben.

MCP3 ist ebenfalls in die Anlockung von Monozyten involviert. Es wurde gezeigt, dass die Monozyteneinwanderung nach Thioglykolatstimulation in MCP3 *knock out* Mäusen beeinträchtigt ist (Tsou *et al.*, 2007). Da MCP3 ebenfalls ein Substrat der QC und isoQC darstellt (Cynis *et al.*, 2010, in Vorbereitung), ist ein additiver Effekt des QC-Inhibitors über die Reduktion der MCP1 N1pE-Level hinaus anzunehmen. Die Zytokine MCP3 und MCP1 werden zwar oft gemeinsam induziert und zeigen gegenüber Monozyten das gleiche chemotaktische Potential (Proost *et al.*, 1996), allerdings ist MCP3 im Vergleich zu MCP1 ca. 10fach geringer konzentriert (Van Damme *et al.*, 1992; Van Damme *et al.*, 1994). Der Einfluss der Inhibierung der mMCP3 N1pE Bildung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

### 4.3.3 Untersuchung der neutralisierenden Wirkung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper im THP1-Migrationsassay

In Vorbereitung der Anwendung von anti-MCP1 N1pE-Antikörpern zur Neutralisierung von mMCP1 N1pE im Peritonitis-Maus-Modell, wurde zunächst deren neutralisierende Wirkung *in vitro* geprüft. Dazu wurde im THP1-Migrationsassay untersucht, ob die Antikörper 4B8 und 2C9 die hMCP1 N1pE induzierte Zellmigration verhindern können. Betrachtet man die Abhängigkeit der THP1-Zellmigration von der hMCP1 N1pE-Konzentration, so ist ein typischer glockenförmiger Verlauf erkennbar. Ist die Zytokin-Konzentration erst einmal hoch genug, um eine maximale Migrationsreaktion hervorzurufen, so nimmt die Migration der Zellen mit steigender MCP1-Konzentration wieder ab. Dieser Effekt wurde für die Bindung von hMCP1 an CCR2 (Gong und Clark-Lewis, 1995; Proost *et al.*, 1998; Chakravarty *et al.*, 1998) und auch für andere Chemokine häufig in der Literatur beschrieben (Ugoccioni *et al.*, 1995). Die Bindung von MCP1 am extrazellulären CCR2-Aminoterminus führt zunächst zur Rezeptor-Homodimerisierung (Rodriguez-Frade *et al.*, 1999). Die Rezeptor-Dimerisierung diente schon für andere Liganden als Erklärung für den glockenförmigen Kurvenverlauf der Rezeptor-Aktivierung (Wells, 1996). Ist der Ligand gering konzentriert, so findet dieser sehr schnell einen freien Rezeptor auf der Zelloberfläche, welcher dimerisieren und daraufhin ein Signal generieren kann. Allerdings sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Rezeptor-Monomere aufeinandertreffen mit zunehmender Liganden-Konzentration (Von Hippel und Berg, 1989). Eine weitere Erklärung für den glockenförmigen Verlauf der MCP1-Konzentrationsabhängigkeit liegt darin begründet, dass hMCP1 N1pE durch Diffusion in die Membraneinsätze zu den Zellen gelangt. Ist hier schon eine genügend hohe lokale Zytokin-Konzentration erreicht, werden die Zellen nicht mehr zur Migration zum Boden der Transwell-Platten angeregt.

In Kapitel 3.1.2.4. wurde gezeigt, dass die Antikörper 4B8 und 2C9 einander ähnliche  $K_D$ -Werte aufweisen. Allerdings zeigt 4B8 in der Biacore-Analyse eine deutlich geringere Dissoziationsgeschwindigkeit im Vergleich zu 2C9 (Daten nicht gezeigt). Diese Daten weisen darauf hin, dass 4B8 eine länger anhaltende Bindung zum Antigen eingeht, was wiederum die stärkere neutralisierende Wirkung erklärt.

Die in diesem Experiment generierten Daten beweisen, dass die Antigen-Antikörperbindung die Aktivierung des hMCP1 N1pE-Rezeptors CCR2 unterbindet. Gong *et al.* konnten zeigen, dass das Fehlen der ersten Aminosäure von hMCP1 in einer massiven Reduktion des chemotaktischen Potentials resultiert (Gong und Clark-Lewis,

1995). Wie in Abschnitt 3.1.2.3 gezeigt wurde, besteht das Epitop der Antikörper 4B8 und 2C9 aus den Aminosäuren 1-4 des hMCP1 N1pE. Vermutlich findet durch die Antikörperbindung eine kompetitive Hemmung der Bindung an den CCR2 Rezeptor statt. Allerdings besitzt hMCP1 mit einem  $K_D$ -Wert von 2,8 nM (Gong und Clark-Lewis, 1995) eine sehr hohe Affinität zu CCR2, was in Konkurrenz zur Antikörperbindung eine deutliche Präferenz für die Interaktion mit CCR2 vermuten lässt.

McQuibban *et al.* konnten im Jahr 2002 zeigen, dass durch Abspaltung der ersten 4 Aminosäuren des hMCP1 N1pE (hMCP1(5-76)) ein CCR2-Antagonist entsteht (McQuibban *et al.*, 2002). In Anbetracht dieser Tatsache besteht außerdem die Möglichkeit, dass nach Bindung des Antikörpers die Interaktion mit CCR2 weiterhin stattfindet, dessen Aktivierung allerdings durch Maskierung der ersten 4 Aminosäuren des hMCP1 N1pE nicht mehr geschehen kann.

#### **4.3.4 Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper im Peritonitis-Maus-Modell**

In Kapitel 3.3.2 wurde bereits gezeigt, dass die anti-MCP1 N1pE-Antikörper *in vitro* eine neutralisierende Wirkung aufweisen, d.h. die MCP1 induzierte THP1-Zellmigration unterbinden. Durch den Einsatz des Antikörpers 4B8 im Peritonitis-Maus-Modell wurde schließlich bewiesen, dass dieser auch *in vivo* neutralisierend wirkt und die mMCP1 N1pE induzierte Migration von Monozyten in das Peritoneum verhindern kann (Abbildung 3.44). Zur Optimierung des Versuchsaufbaus wurden verschiedene Applikationszeitpunkte des Antikörpers miteinander verglichen (siehe Abbildung 3.43). Dabei konnte gezeigt werden, dass der deutlichste Effekt auf die Monozytenmigration zu verzeichnen ist, wenn der Antikörper 60 Min nach Thioglykolatinjektion appliziert wird. Thioglykolat, auch Mercaptoessigsäure, ist ein reduzierendes Agens. Jeder Antikörper besteht aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten, die jeweils durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es ist anzunehmen, dass diese bei Kontakt mit Thioglykolat reduziert werden, was wiederum zur Inaktivierung des Antikörpers führen kann. So lässt sich die Tatsache erklären, dass der Antikörper 4B8 keine Wirkung auf die Monozyteneinwanderung zeigt, wenn dieser 30 Min vor Thioglykolatapplikation injiziert wird ( $3195 \pm 728$  monozytäre Zellen/ml PLF ohne Antikörperapplikation,  $4731 \pm 2406$  monozytäre Zellen/ml PLF bei Antikörperapplikation 30 Min vor Thioglykolat). Die darauffolgende Thioglykolatapplikation verursacht vermutlich die Inaktivierung des im Peritoneum befindlichen Antikörpers. Wird der Antikörper dagegen 25 Min nach

Thioglykolat appliziert, so ist eine deutliche Wirkung auf die Monozytenmigration erkennbar (von  $3195 \pm 728$  monozytären Zellen der Kontrolle auf  $2181 \pm 1200$  monozytäre Zellen/ml PLF). Das beste Resultat wird allerdings erzielt, wenn der Antikörper 60 Min nach Thioglykolat verabreicht wird (von  $3195 \pm 728$  monozytären Zellen ohne Antikörperapplikation auf  $1745 \pm 460$  monozytäre Zellen/ml PLF). Vermutlich verliert Thioglykolat über diesen Zeitraum sein reduzierendes Potential aufgrund der Reduktion verschiedener Proteine des Peritoneums.

Die neutralisierende Wirkung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper *in vivo* macht diese zu einem interessanten Instrument zum Einsatz in Krankheitsbildern, in denen MCP1 eine wesentliche Rolle spielt. Antikörper, die eine neutralisierende Wirkung auf MCP1 ausüben, wurden schon in den letzten Jahren als ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen und Krebs diskutiert. So konnte im Laufe einer Pre-klinischen Studie in einem Prostata-Krebs Modell gezeigt werden, dass murine und humane anti-MCP1-Antikörper in Kombination mit dem Zytostatikum Docetaxel eine Regression von Tumoren bewirken (Loberg *et al.*, 2007). Weiterhin konnte die Applikation eines neutralisierenden Antikörpers für MCP1 (11K2) in einem Maus-Arteriosklerose Modell die Größe der arteriosklerotischen Plaques reduzieren sowie deren Makrophagen- und CD45<sup>+</sup>-Zellkonzentrationen verringern (Lutgens *et al.*, 2005). Allerdings zeigte sich in einer klinischen Phase I Studie an Patienten, die unter rheumatoider Arthritis leiden, dass die Applikation des anti-MCP1-Antikörpers ABN912 keinen bis hin zu einem negativen Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung hat (Haringman *et al.*, 2006). In dieser Studie wurde beobachtet, dass die MCP1-Level im Blut der Patienten 30 Min nach Applikation des Antikörpers bis zu 2000fach anstiegen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der hoch affine Antikörper ( $K_D = 43$  pM) mit niedrig affinen Bindungsstellen in der extrazellulären Matrix (z.B. zu Glykosaminoglykanen) in Konkurrenz tritt und dadurch gebundenes MCP1 aus den vaskulären Kompartimenten mobilisiert (Haringman *et al.*, 2006). Der in dieser Arbeit generierte Antikörper 4B8 weist einen  $K_D$ -Wert von 234 nM auf (siehe Tabelle 3.5) und ist somit um Faktor 5000 weniger affin als der Antikörper ABN912. Das Ergebnis der Studie im Jahr 2006 macht deutlich, dass eine zu hohe Affinität des anti-hMCP1-Antikörpers möglicherweise nachteilige Auswirkungen hat. Vermutlich ist in diesem Fall ein Antikörper mit geringerer Affinität erfolgsversprechender, da zwar aufgrund der inflammatorischen Reaktion sezerniertes, lokal hoch konzentriertes hMCP1 N1pE neutralisiert wird, das an der extrazellulären Matrix immobilisierte hMCP1 allerdings nicht

in großen Mengen in Form von Antigen-Antikörper-Komplexen in den Blut-Kreislauf gelangt.

Der entscheidende Vorteil der anti-hMCP1 N1pE-Antikörper liegt allerdings darin, dass diese lediglich stabiles, rezeptoraktives MCP1 N1pE erkennen. Durch N-terminale Degradierung von MCP1 entstehen Rezeptorantagonisten, für die eine physiologische antiinflammatorische Funktion diskutiert wird (McQuibban *et al.*, 2002, Cynis *et al.*, 2010, in Vorbereitung). Dieses antagonistisch wirkende MCP1 wird von den Antikörpern 4B8 und 2C9 nicht gebunden. So kann bei Applikation der anti-hMCP1 N1pE-Antikörper deren neutralisierende Wirkung durch die Anwesenheit von physiologischen N-terminal tranktierten Rezeptorantagonisten verstärkt werden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1. Zusammenfassung

Als Ergebnis dieser Arbeit war es erstmals möglich in biologischen Proben zwischen MCP1 N1Q und MCP1 N1pE zu differenzieren und damit Einblicke in die physiologische Funktion des N-terminalen Pyroglutamats zu erhalten. Zu diesem Zweck war es notwendig Antikörper zu generieren, die selektiv die zyklisierte Form von hMCP1, mMCP1 und rMCP1 erkennen. Mit Hilfe dieser anti-MCP1 N1pE-Antikörper ist es gelungen ELISAs zu entwickeln, die den quantitativen Nachweis von hMCP1 N1pE, mMCP1 N1pE und rMCP1 N1pE ermöglichen. Um den prozentualen Gehalt von MCP1 N1pE an der Gesamt-MCP1-Menge einer Probe ermitteln zu können, wurden zusätzlich vergleichbare ELISAs zur quantitativen Detektion von total hMCP1, mMCP1 und rMCP1 etabliert. Die in dieser Arbeit entwickelten ELISAs wurden ausreichend validiert und optimiert und weisen ein Detektionslimit von 80 pg/ml für rMCP1 (N1pE) bis hin zu 16 pg/ml für hMCP1 (N1pE) auf.

Weiterhin ist es gelungen, die Expression und Reinigung der anti-MCP1 N1pE-Antikörper in Hybridomazellen, der Proteine SUMO-hMCP1, SUMO-mMCP1 sowie SUMO-rMCP1 in *P. pastoris* und des SENP2<sup>363-589</sup>-Fragmentes in *E. coli* zu etablieren und zu optimieren.

Unter Anwendung eines QC/isoQC-Inhibitors konnte in Zellkulturmodellen gezeigt werden, dass die Enzyme QC und isoQC *in vitro* maßgeblich an der Bildung von MCP1 N1pE in humanen-, murinen- und Ratten-Zellen beteiligt sind. Mit Hilfe dieses Inhibitors wurde zudem gezeigt, dass die Inhibierung der mMCP1 N1pE Bildung *in vivo* eine antiinflammatorische Wirkung im Peritonitis-Maus-Modell hervorruft.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit bewiesen, dass die anti-MCP1 N1pE-Antikörper durch Bindung der ersten vier Aminosäuren des MCP1 N1pE eine neutralisierende Wirkung auf die MCP1 induzierte Aktivierung des CCR2 Rezeptors *in vitro* ausüben. Der Einsatz im Peritonitis-Maus-Modell demonstrierte schließlich, dass der Antikörper 4B8 auch *in vivo* mMCP1 N1pE neutralisiert und die Migration von Monozyten in das Peritoneum verhindert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bildung des N-terminalen Pyroglutamatrestes essentiell für die physiologische Aktivität des MCP1 ist. Wird dieser Prozess entweder durch Inhibitoren der QC/isoQC unterbunden oder der N-Terminus von MCP1 N1pE durch Applikation eines anti-MCP1 N1pE-Antikörpers blockiert, so bewirkt dies eine deutliche Reduktion der chemotaktische Wirkung des Zytokins.

## 5.2 Ausblick

Die in dieser Arbeit entwickelten ELISAs dienen dem Screening von QC/isoQC-Inhibitoren in humanen, murinen und Ratten-Zellkulturmodellen, sowie in verschiedenen *in vivo* oder auch *ex vivo* Tiermodellen. Die Methoden sind insofern ausreichend validiert, dass sie schon heute eine belastbare Grundlage für weitere Entscheidungen, z.B. der Auswahl eines QC/isoQC Inhibitors für dessen klinische Entwicklung liefern. Ziel ist es, den total hMCP1 und hMCP1 N1pE ELISA begleitend zur Prä-Klinischen Entwicklung sowie in Klinischen Phasen eines QC/isoQC-Inhibitors einzusetzen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die generierten anti-MCP1 N1pE-Antikörper die Aktivität von hMCP1 N1pE *in vitro* und von mMCP1 N1pE *in vivo* neutralisieren. Im Peritonitis-Maus-Modell weisen sie dadurch eine antiinflammatorische Wirkung auf und verhindern die Einwanderung von Monozyten zum Ort der Entzündung. Diese Eigenschaft macht die anti-MCP1 N1pE-Antikörper zu einem interessanten Werkzeug zur Behandlung MCP1 relevanter Krankheiten wie Arteriosklerose, Arthritis oder Krebs. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Sequenzierung der Antikörper wurden die Voraussetzungen für deren Klonierung und rekombinante Expression geschaffen. So besteht z.B. die Möglichkeit, durch Mutagenese der CDRs deren Affinität zu MCP1 N1pE zu erhöhen. Zur Vorbereitung einer späteren therapeutischen Anwendung im Menschen können durch Austausch der variablen Regionen des Maus-Antikörpers gegen humane Sequenzen chimäre Antikörper exprimiert werden. Weiterhin könnte zusätzlich eine Humanisierung der Antikörper erfolgen. Dies würde deren Einsatz im Menschen erlauben ohne eine Immunreaktion gegen den Antikörper auszulösen.

Eine Röntgenkristallstruktur der Antikörper im Komplex mit MCP1 N1pE sollte detaillierten Aufschluss über die Antigen-Antikörper-Interaktionen geben. Bisher ist es nicht gelungen, eine Kristallstruktur von mMCP1 und rMCP1 zu erhalten. So wäre beispielsweise eine Ko-Kristallisation der anti-MCP1 N1pE-Antikörper im Komplex mit

mMCP1 N1pE und rMCP1 N1pE ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung der Tertiärstruktur der beiden Proteine.

## 6 Literaturverzeichnis

- Arnold, U.; Schulenburg, C.; Schmidt, D.; Ulbrich-Hofmann, R. (2006): Contribution of structural peculiarities of onconase to its high stability and folding kinetics. *Biochemistry* 45, 3580-3587
- Baggiolini, M.; Dewald, B.; Moser, B. (1994): Interleukin-8 and related chemotactic cytokines - CXC und CC chemokines. *Adv Immunol.* 55, 97-179
- Balkwill, F. (2004): Cancer and the Chemokine Network. *Nature* 4, 540-550
- Barna B.P.; Pettay J.; Barnett G.H.; Zhou P.; Iwasaki K.; Estes M.L. (1994): Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *J Neuroimmunol.* 50, 101-107
- Barnes P.J. (2000): Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 343, 269-80
- Batliwalla, F. M.; Baechler, E. C.; Xiao, X.; Li, W.; Balasubramanian, S.; Khalili, H.; Damle, A.; Ortmann, W. A.M; Perrone, A.; Kantor, A. B.; Gulko, P. S.; Kern, M.; Furie, R.; Behrens, T. W.; Gregersen, P. K. (2005): Peripheral blood gene expression profiling in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 6, 388-397
- Beall, C.J.; Mahajan, S.; Kolattukudy, P.E. (1992): Conversion of Monocyte Chemoattractant Protein-1 into a Neutrophil Attractant by Substitution of Two Amino Acids. *J Biol Chem.* 267, 3455-3459
- Beall C.J.; Mahajan S.; Kuhn D.E.; Kolattukudy P.E. (1996): Site-directed mutagenesis of monocyte chemoattractant protein-1 identifies two regions of the polypeptide essential for biological activity. *Biochem J.* 313, 633-640
- Beall, C.J.; Breckenridge, S.M.; Chakravarty, L.; Kolattukudy, P.E. (1997): Expression of Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 12, 145-150
- Biblia, T. A. and Robinson, D. K. (1995): In Pursuit of the Optimal Fed-Batch Process for Monoclonal Antibody Production. *Biotechnol Prog.* 11, 1-13
- Blombäck, B. (1967): Derivatives of glutamine in peptides. *Methods Enzymol.* 11, 398-411
- Boulianne, G. L.; Hozumi, N.; Shulman, M. J. (1984): Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature (Lond.)* 312, 643-646
- Boring, L.; Gosling, J.; Chensue, S.W.; Kunkel, S.L.; Farese, R.V.; Broxmeyer, H.E.; Charo, I.F. (1997): Impaired Monocyte Migration and Reduced Type 1 (Th1) Cytokine Responses in C-C Chemokine Receptor 2 Knockout Mice. *J Clin Invest.* 100, 2552-2561

- Boring, L.; Gosling, J.; Cleary, M.; Charo, I.F. (1998): Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894-897
- Britschgi, M.; Olin, C.E.; Johns, H.T.; Takeda-Uchimura, Y.; LeMieux, M.C.; Rufibach, K.; Rajadas, J.; Zhang, H.; Tomooka, B.; Robinson, W.H.; Clark, C.M.; Fagan, A.M.; Galasko, D.R.; Holtzman, D.M.; Jutel, M.; Kaye, J.A.; Lemere, C.A.; Leszek, J.; Li, G.; Peskind, E.R.; Quinn, J.F.; Yesavage, J.A.; Ghiso, J.A.; Wyss-Coraya, T. (2009): Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *PNAS* 106, 12145-12150
- Brodmerkel, C.M.; Huber, R.; Covington, M.; Diamond, S.; Hall, L.; Collins, R.; Leffert, L.; Gallagher, K.; Feldman, P.; Collier P.; Stow, M.; Gu, X.; Baribaud, F.; Shin, N.; Thomas, B.; Burn, T.; Hollis, G.; Yeleswaram, S.; Solomon, K.; Friedman, S.; Wang, A.; Xue, C.B.; Newton, R.C., Scherle, P.; Vaddi, K. (2005): Discovery and Pharmacological Characterization of a Novel Rodent-Active CCR2 Antagonist. INCB3344, *J Immunol.* 175, 5370-5378
- Brown Z.; Strieter R.M.; Neild G.H.; Thompson R.C.; Kunkel S.L.; Westwick J. (1992): IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. *Kidney Int.* 42, 95-101
- Callewaere C.; Banisadr G.; Rostene W.; Parsadaniantz S.M. (2007): Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol.* 38, 355-363
- Capelli, A.; Stefano, A.D.; Gnemmi, I.; Balbo, P.; Cerutti, C.G.; Balbi, B.; Lusuardi, M.; Donner, C.F. (1999): Increased MCP-1 and MIP-1b in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitis. *Eur Respir J.* 14, 160-165
- Chakravarty, L.; Rogers, L.; Quach, T.; Breckenridge, S.; Kolattukudy, P.E. (1998): Lysine 58 and Histidine 66 at the C-terminal  $\alpha$ -Helix of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Are Essential for Glycosaminoglycan Binding. *J Biol Chem.* 273, 29641-29647
- Chang, L.; Ernst, T.; Hillaire, C.; Conant, K. (2004): Antiretroviral treatment alters relationship between MCP-1 and neurometabolites in HIV patients. *Antivir Ther.* 9, 431-440
- Charo, I. F. und Taubman, M. B. (2004): Chemokines in the Patogenesis of Vascular Disease. *Circ Res.* 95, 858-866
- Cinque, P.; Vago, L.; Mengozzi, M.; Torri, V.; Ceresa, D.; Vicenzi, E.; Transidico, P.; Vagani, A.; Sozzani, S.; Mantovani, A.; Lazzarin, A.; Poli, G. (1998): Elevated cerebrospinal fluid levels of monocyte chemotactic protein-1 correlate with HIV-1 encephalitis and local viral replication. *AIDS* 12, 1327-1332
- Cipollone, F.; Marini, M.; Fazia, M.; Pini, B.; Iezzi, A.; Reale, M.; Paloscia, L.; Materazzo, G.; D'Annunzio, E.; Conti, P.; Chiarelli, F.; Cuccurullo, F.; Mezzetti, A. (2001): Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21, 327-334

- Clore G.M.; Gronenborn A.M. (1995): Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *FASEB J.* 9, 57–62
- Connolly, J.M. and Rose, D.P. (1998): Angiogenesis in two human prostate cancer cell lines with differing metastatic potential when growing as solid tumors in nude mice. *J Urol.* 160, 932-936
- Conti, I. and Rollins, B.J. (2004): CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol.* 14, 149–154
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J.; Higgins, D. R. (2000): Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 16, 23-52
- Crown, S.E.; Yu, Y.; Sweeney, M.D.; Leary, J.A.; Handel, T.M. (2006): Heterodimerization of CCR2 Chemokines and Regulation by Glycosaminoglycan Binding. *J Biol Chem.* 281, 25438-25446
- Cushing S.D.; Berliner J.A.; Valente A.J.; Territo M.C.; Navab M.; Parhami F.; Gerrity R.; Schwartz C.J.; Fogelman A.M. (1990): Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5134–5138
- Cynis, H.; Rahfeld, J.U.; Stephan, A.; Kehlen, A.; Koch, B.; Wermann, M.; Demuth, H.U.; Schilling, S. (2008): Isolation of an Isoenzyme of Human Glutaminyl Cyclase: Retention in the Golgi Complex Suggests Involvement in the Protein Maturation Machinery. *J Mol Biol.* 379, 966-980
- Cynis, H.; Hoffmann, T.; Manhart, S.; Gans, K.; Kleinschmidt, M.; Rahfeld, J.-U.; Sedlmeier, R.; Müller, A.; Graubner, S.; Heiser, U., Kehlen, A.; Friedrich, D.; Wolf, R.; Quax, P.H.A.; Thomsen, M.; Schilling, S.; Demuth, H.-U. (2010): Enhancing a Chemokine's Fate for Degradation: A Novel Therapy for Cardiovascular Disease. *in Vorbereitung*
- Dahl, S.W.; Slaughter, C.; Lauritzen, C.; Bateman, R.C.; Connerton, I.; Pedersen, J. (2000): *Carica papaya* Glutamine Cyclotransferase Belongs to a Novel Plant Enzyme Subfamily: Cloning and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Protein Expr Purif.* 20, 27-36
- De Groot, C.J.A.; Ruuls, S.R.; Theeuwes, J.W.M.; Dijkstra, C.D.; Van Der Valk, P. (1997): Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56, 10–20
- Deshmane, S. L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B.E. (2009): Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res.* 29, 313-326
- D'hulst, A.I.; Vermaelen, K.Y.; Brusselle, G.G.; Joos, G.F.; Pauwels, R.A. (2005): Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J.* 26, 204–213

- Dingermann, T. (1999): Gentechnik, Biotechnik. 1. Auflage Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, 303-313, 453, 568-570
- Ebisawa M.; Yamada T.; Bickel C.; Klunk D.; Schleimer R.P. (1994): Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. III. Effect of the chemokine RANTES. *J Immunol.* 153, 2153–2160
- EMA (1999): ICH Topic Q 6 B „Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products“. *CPMP/ICH/365/96*
- Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*, L221/8
- Ernst, C.; Zhang, Y. J.; Hancock, P. H.; Rutledge, B. J.; Corless, C. L.; Rollins, B. J. (1994): Biochemical and biologic characterization of Murine Monocyte Chemoattractant Protein-1. *J Immunol.* 152, 3541-3549
- Ezura, Y.; Kajita, M.; Ishida, R.; Yoshida, S.; Yoshida, H.; Suzuki, T.; Hosoi, T.; Inoue, S.; Shiraki, M.; Orimo, H.; Emi, M. (2004): Association of multiple nucleotide variations in the pituitary glutaminyl cyclase gene (QPCT) with low radial BMD in adult women. *J Bone Miner Res.* 19, 1296-1301
- FDA (2001): Guidance for Industry „Bioanalytical Method Validation“
- Fenoglio, C.; Galimberti, D.; Lovati, C.; Guidi, I.; Gatti, A.; Fogliarino, S. (2004): MCP-1 in Alzheimer’s disease patients: A-2518G polymorphism and serum levels. *Neurobiol Aging* 25, 1169–73
- Fischer, W.H. and Spiess J. (1987): Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutaminyl peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 3628-3632
- Frank, R. and Overwin, H. (1996): SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. In: *Meth. Mol. Biol.*, (66): *Epitope mapping protocols*, ed. G.E. Morris, 149-169. Totowa, NJ: Humana Press
- Galimberti, D.; Schoonenboom, N.; Scarpini, E.; Scheltens, P. (2003): On behalf of the Dutch-Italian Alzheimer Research Group. Chemokines in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer’s disease patients. *Ann Neurol.* 53, 547–8
- Galimberti, D.; Fenoglio, C.; Lovati, C.; Venturelli, E.; Guidi, I.; Corr, B.; Scalabrini, D.; Clerici, F.; Mariani, C.; Bresolin, N.; Scarpini, E. (2006 a): Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* 27, 1763–1768
- Galimberti, D.; Schoonenboom, N.; Scheltens, P.; Fenoglio, C.; Bouwman, F.; Venturelli, E.; Guidi, I.; Blankenstein, M.A.; Bresolin, N.; Scarpini, E. (2006 b): Intrathecal Chemokine Synthesis in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *Arch Neurol.* 63, 538-543

- Graves, D.T.; Jiang, Y. (1995): Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med.* 6, 109-118
- Gómez-Morales, M. A. ; Ludovisi, A. ; Amati, M. ; Cherci, S.; Pezzotti, P.; Pozio, E. (2008): Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Human Trichinellosis. *Clin Vaccine Immunol.* 15, 1723-1729
- Gong, J.-H. and Clark-Lewis, I. (1995): Antagonists of Monocyte Chemoattractant Protein 1 Identified by Modification of Functionally Critical NH<sub>2</sub>-terminal Residues. *J Exp Med.* 181, 631-640
- Gong, J.-H.; Ratkay, L.G.; Waterfield, J.D.; Clark-Lewis, I. (1997): An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J Exp Med.* 186, 131-137
- Goren, H.J.; Bauce, L.G.; Vale, W. (1977): Forces and structural limitations of binding of thyrotrophin-releasing factor to the thyrotrophin-releasing receptor: the pyroglutamic acid moiety. *Mol Pharmacol.* 13, 606-614
- Handel, T.M. and Domaille, P.J. (1996): Heteronuclear (1H, 13C, 15N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry* 35, 6569-6584
- Haringman, J.J.; Gerlag, D.M.; Smeets, T.J.M.; Baeten, D.; Van den Bosch, F.; Bresnihan, B.; Breedveld, F.C.; Dinant, H.J.; Legay, F.; Gram, H.; Loetscher, P.; Schouder, R.; Woodworth, T.; Tak, P.P. (2006): A Randomized Controlled Trial With an Anti-CCL2 (Anti-Monocyte Chemotactic Protein 1) Monoclonal Antibody in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 54, 2387-2392
- Heguy, A.; O'Connor, T.P.; Luetlich, K.; Worgall, S.; Ciecuch, A.; Harvey, B.G.; Hackett, N.R.; Crystal, R.G. (2006): Gene expression profiling of human alveolar macrophages of phenotypically normal smokers and nonsmokers reveals a previously unrecognized subset of genes modulated by cigarette smoking. *J Mol Med.* 4, 318-28
- Hein, T. und Hopfenmüller, W. (2000): Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany. *Der Nervenarzt* 4, 288-294
- Henderson, R.B.; Hobbs, J.A.R.; Mathies M.; Hogg, N. (2003): Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood* 102, 328-335
- Huang, D.R.; Wang, J.; Kivisakk, P.; Rollins, B.J.; Ransohoff, R.M. (2001): Absence of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Mice Leads to Decreased Local Macrophage Recruitment and Antigen-specific T Helper Cell Type 1 Immune Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Exp Med.* 193, 713-726
- Ishii, K.; Yamagami, S.; Tanaka, H.; Motoki, M.; Suwa, Y.; Endo, N. (1995): Full active baculovirus-expressed human monocyte chemoattractant protein 1 with intact N-terminus. *Biochem Biophys Res Commun.* 206, 955-961

- Ishizuka, K.; Kimura, T.; Igata-yi, R.; Katsuragi, S.; Takamatsu, J.; Miyakawa, T. (1997): Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin Neurosci.* 1, 135–8
- Iwamoto, T.; Okamoto, H.; Toyama, Y.; Momohara, S. (2008): Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *FEBS J.* 275, 4448-4455
- Izikson, L.; Klein, R.S.; Charo, I.F.; Weiner, H.L.; Luster, A.D. (2000): Resistance to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice Lacking the CC Chemokine Receptor (CCR2). *J Exp Med.* 192, 1075-1080
- Jahresbericht des Fraunhofer-Instituts für Toxikologie und experimentelle Medizin ITEM (2006), 40-41
- Jee, Y.; Yoon, W.K.; Okura, Y.; Tanuma, N.; Matsumoto, Y.J. (2002): Upregulation of monocyte chemotactic protein-1 and CC chemokine receptor 2 in the central nervous system is closely associated with relapse of autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J Neuroimmunol.* 128, 49-57
- Jiang, Y.; Valente, A.J.; Williamson, M.J.; Zhang, L.; Graves, D.T. (1990): Post-translational modification of a monocyte-specific chemoattractant synthesized by glioma, osteosarcoma, and vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 265, 18318-18321
- Karpus, W.J. and Kennedy, K.J. (1997): MIP-1 $\alpha$  and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *J Leukoc Biol.* 62, 681-687
- Keatings V.M.; Barnes P.J. (1997): Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 155, 449–53
- Kelner, G. und Zlotnik, A. (1995): Cytokine profile of early thymocytes and characterization of new class of chemokine. *J Leuk Biol.* 57, 778-781
- Khandke, K. M.; Fairwell, T.; Chait, B. T.; Manjula, B.N. (1989): Influence of ions on cyclization of the amino terminal glutamine residues of tryptic peptides of streptococcal PepM49 protein. Resolution of cyclized peptides by HPLC and characterization by mass spectrometry. *Int J Peptide Protein Res.* 34, 118-123
- Köhler, G. and Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497
- Kurihara, T.; Warr, G.; Loy, J.; Bravo, R. (1997): Defects in Macrophage Recruitment and Host Defense in Mice Lacking the CCR2 Chemokine Receptor. *J Exp Med.* 186, 1757-1762
- Lassmann, H.; Zimprich, F.; Vass, K.; Hickey, W.F. (1990): Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res.* 28, 236-243

- Lau, E. K.; Paavola, C. D.; Johnson, Z.; Gaudry, J. P.; Geretti, E.; Borlat, F.; Kungl, A. J.; Proudfoot, A. E.; Handel, T. M. (2004): Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *J Biol Chem.* 279, 22294-22305
- Liao, Y.-D.; Wang, S.-C.; Leu, Y.-J.; Wang, C.-F.; Chang, S.-T.; Hong, Y.-T.; Pan, Y.-R.; Chen, C. (2003): The structural integrity exerted by N-terminal pyroglutamate is crucial for the cytotoxicity of frog ribonuclease from *Rana pipiens*. *Nucleic Acids Res.* 31, 5247-5255
- Libby, P.; Ridker, P. M.; Maseri, A. (2002): Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135-1143
- Lindl, T. und Gstraunthaler, G. (2008): Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank. 6. Auflage Heidelberg Spektrum Akademischer Verlag, 89-95
- Liu, S.H.; Wong, C.S.; Chang, D.M. (2005): Increased monocyte chemoattractant protein-1 in knee joints of rats with adjuvant-induced arthritis: in vivo microdialysis. *J Rheumatol.* 32, 2205-2211
- Loberg, R.; Day, L.L.; Harwood, J.; Ying, C.; St. John, L.N.; Giles, R.; Neeley, C.K.; Pienta, K.J. (2006): CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. *Neoplasia* 8, 578-586
- Loberg, R. D.; Ying, C.; Craig, M.; Day, L., L.; Sargent, E.; Neeley, C.; Wojno, K.; Snyder, L., A.; Yan, L.; Pienta, K., J. (2007): Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo. *Cancer Res.* 67, 9417-9424
- Loetscher, P.; Seitz, M.; Clark-Lewis, I.; Baggiolini, M.; Moser, B. (1994): Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB J.* 8, 1055-1060
- Lu, Y.; Cai, Z.; Galson, D.L.; Xiao, G.; Liu, Y.; George, D.E.; Melhem, M.F.; Yao, Z.; Zhang, J. (2006): Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) acts as a paracrine and autocrine factor for prostate cancer growth and invasion. *Prostate* 66, 1311-1318
- Lubkowski, J.; Bujacz, G.; Boqué, L.; Domaille, P.J.; Handel, T.M.; Wlodawer, A. (1997): The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions. *Nature* 4, 64-69
- Luster, A.D. (1998): Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation, *N Engl J Med.* 338, 436-45
- Lutgens, E.; Faber, B.; Schapira, K.; Evelo, C.T.A.; Van Haaften, R.; Heeneman, S.; Cleutjens, K.B.J.M.; Bijnens, A.P.; Beckers, L.; Porter, J.G.; Mackay, C.R.; Rennert, P.; Bailly, V.; Jarpe, M.; Dolinski, B.; Kotliansky, V.; De Fougères, T.; Daemen, M.J.A.P. (2005): Gene Profiling in Atherosclerosis Reveals a Key Role for Small Inducible Cytokines. *Circulation* 111, 3443-3452

- Mackay, C. R. (2001): Chemokines: immunology's high impact factors. *Nature Immunol.* 2, 95-101
- Maini, R.; Clair, E.W.S.; Breedveld, F.; Furst, D.; Kalden, J.; Weisman, M.; Smolen, J.; Emery, P.; Harriman, G.; Feldmann, M.; Lipsky, P. (1999): Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomized phase III trial. *Lancet* 354, 1932-9
- Marty, M.; Cognetti, F.; Maraninchi, D.; Snyder, R.; Mauriac, L.; Tubiana-Hulin, M.; Chan, S.; Grimes, D.; Antón, A.; Lluch, A.; Kennedy, J.; O'Byrne, K.; Conte, P.; Green, M.; Ward, C.; Mayne, K.; Extra J.M. (2005): Randomized Phase II Trial of the Efficacy and Safety of Trastuzumab Combined With Docetaxel in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer Administered As First-Line Treatment: The M77001 Study Group. *J Clin Oncol.* 23, 4265-4274
- Masure, S.; Paemen, L.; Proost, P.; Van Damme, J.; Opdenakker, G. (1995): Expression of a human mutant monocyte chemotactic protein 3 in *Pichia pastoris* and characterization as an MCP-3 receptor antagonist. *J Interferon Cytokine Res.* 15, 955-63
- McManus, C.; Berman, J.W.; Brett, F.M.; Staunton, H.; Farrell, M.; Brosnan, C.F. (1998): MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol.* 86, 20-9
- McQuibban, G., A.; Gong, J.-H.; Wong, J., P.; Wallace, J., L.; Clark-Lewis, I.; Overall, C., M. (2002): Matrix metalloproteinases processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100, 1160-1167
- Messer, M. (1963): Enzymatic Cyclization of L-Glutamine and L-Glutaminyl Peptides. *Nature* 197, 1299
- Mikolajczyk, J.; Drag, M.; Békés, M.; Cao, J. T.; Ronai, Z. and Salvesen, G. S. (2007): Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO)-specific Proteases: Profiling the specificities and activities of human SENPs. *J Biol Chem.* 282, 26217-26224
- Miller, W. M.; Blanch, H. W.; Wilke, C. R. (1988): A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous culture: Effect of nutrient concentration, dilution rate and pH. *Biotechnol Bioeng.* 32, 947-965
- Miller, W. M.; Wilke, C. R.; Blanch, H. W. (1989): The transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: II Glutamine pulse and step changes. *Biotechnol Bioeng.* 33, 487-499
- Miller, K.D.; Chap, L.I.; Holmes, F.A.; Cobleigh, M.A.; Marcom, P.K.; Fehrenbacher, L.; Dickler, M.; Overmoyer, B.A.; Reimann, J.D.; Sing, A.P.; Langmuir, V.; Rugo, H.S. (2005): Randomized Phase III Trial of Capecitabine Compared With Bevacizumab Plus Capecitabine in Patients With Previously Treated Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 23, 792-799

- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51, 263-273
- Morty, R.E. ; Bulau, P. ; Pellé, R. ; Wilk ; S. ; Abe, K. (2006) : Pyroglutamyl peptidase type I from trypanosoma brucei : a new virulence factor from african trypanosomes that de-blocks regulatory peptides in the plasma of infected hosts. *Biochem J.* 394, 635-645
- Murphy, P. M. ; Baggiolini, M.; Charo, I.F.; Hébert, C.A.; Horuk, R.; Matsushima, K.; Miller, L.H. ; Oppenheim, J.J. ; Power, C.A. (2000): International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 52, 145–176
- Ni, W.; Kitamoto, S.; Ishibashi, M.; Usui, M.; Inoue, S.; Hiasa, K.; Zhao, Q.; Nishida, K.; Takeshita, A.; Egashira, K. (2004): Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 534-539
- O'Brien, S. and Jones, T. (2003): Humanization of monoclonal antibodies by CDR grafting. *Methods Mol Biol.* 207, 81-100
- Ogata, H.; Takeya, M.; Yoshimura, T.; Takagi, K.; Takahashi, K. (1997): The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the pathogenesis of collagen-induced arthritis in rats. *J Pathol.* 182, 106-114
- Ohtaka, H.; Vela' Zquez-Campoy, A.; Xie, D.; Freire, E. (2002): Overcoming drug resistance in HIV-1 chemotherapy: The binding thermodynamics of Amprenavir and TMC-126 to wild-type and drug-resistant mutants of the HIV-1 protease. *Protein Sci.* 11, 1908-1916
- Omasa, T.; Ishimoto, M.; Higashiyama, K.; Shioya, S.; Suga, K. (1992): The enhancement of specific antibody production rate in glucose- and glutamine controlled fed-batch culture. *Cytotechnology* 8, 75-84
- Opdenakker, G.; Rudd, P.M.; Wormald, M.; Dwek, R.A.; Van Damme, J. (1995): Cells regulate the activities of cytokines by glycosylation. *FASEB J.* 9, 453-457
- Paavola, C.D.; Hemmerich, S.; Grunberger, D.; Polsky, I.; Bloom, A.; Freedman, R.; Mulkins, M.; Bhakta, S.; McCarley, D.; Wiesent, L.; Wong, B.; Jarnagin, K.; Handel, T.M. (1998): Monomeric Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) Binds and Activates the MCP-1 Receptor CCR2B. *J Biol Chem.* 273, 33157-33165
- Pohl, T.; Zimmer, M.; Mugele, K.; Spiess, J. (1991): Primary structure and functional expression of a glutaminyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 22, 10059–10063
- Polverini, P.J.; Cotran, P.S.; Gimbrone, M.A. Jr; Unanue, E.R. (1977): Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269, 804–806
- Proost, P.; Wuyts, A; Van Damme, J. (1996): Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *Journal of Leukocyte Biology* 59, 67-74

- Proost, P.; Struyf, S.; Couvreur, M.; Lenaerts, J.P.; Conings, R.; Menten, P.; Verhaert, P.; Wuyts, A.; Van Damme, J. (1998): Posttranslational Modifications Affect the Activity of the Human Monocyte Chemotactic Proteins MCP-1 and MCP-2: Identification of MCP-2(6–76) as a Natural Chemokine Inhibitor. *J Immunol.* 160, 4034-4041
- Proost, P.; Struyf, S.; Damme, J. V. (2006): Natural post-translational modifications of chemokines. *Biochem Soc Trans.* 34, 997-1001
- Proudfoot, A. E.; Handel, T. M.; Johnson, Z.; Lau, E. K.; LiWang, P.; Clark-Lewis, I.; Borlat, F.; Wells, T. N.; Kosco-Vilbois, M. H. (2003): Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 1885-1890
- Rantapää-Dahlqvist, S.; Boman, K.; Tarkowski, A.; Hallmans, G. (2007): Up regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in anti-citrulline antibody and immunoglobulin M rheumatoid factor positive subjects precedes onset of inflammatory response and development of overt rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 66, 121–123
- Reverter, D. and Lima, C. (2004): A basis for SUMO protease specificity provided by analysis of human Senp2 and a Senp2-SUMO complex. *Structure* 12, 1519-1531
- Reverter, D. and Lima, C. (2006): Structural basis for SENP2 protease interactions with SUMO precursors and conjugated substrates. *Nat Struct Mol Biol.* 13, 1060 – 1068
- Rodriguez-Frade, J.M.; Vila-Coro, A.J.; Martin de Ana, A.; Albar, J.P.; Martinez-A., C.; Mellado, M. (1999): The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3628-3633
- Rollins, B. J.; Stier, P.; Ernst, T.; Wong, G.G. (1989): The human homolog of the *JE* gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol Cell Biol* 9, 4687-4695
- Rollins, B.J.; Yoshimura T.; Leonard E.J.; Pober, J.S. (1990): Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol.* 136, 1229–1233
- Rossi, D. and Zlotnik, A. (2000): The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 18, 217–242
- Ruggiero P.; Flati, S.; Cioccio V.D.; Maurizi, G.; Macchia, G.; Facchin, A.; Anacardio, R.; Maras, A.; Lucarelli, M.; Boraschi, D. (2003): Glycosylation enhances functional stability of the chemotactic cytokine CCL2. *Eur Cytokine Netw.* 14, 91-96
- Saido, T. C.; Iwatsubo, T.; Mann, D. M.; Shimada, H.; Ihara, Y.; Kawashima, S. (1995): Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466
- Saltz, L.B.; Meropol, N.J.; Loehrer, P.J.; Needle, M.N.; Kopit, J.; Mayer, R.J. (2004): Phase II Trial of Cetuximab in Patients With Refractory Colorectal Cancer That Expresses the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Clin Oncol.* 22, 1201-1208

- Schutyser, E.; Struyf, S.; Proost, P.; Opdenakker, G.; Laureys, G.; Verhasselt, B.; Peperstraete, L.; Van de Putte, I.; Saccani, A.; Allavena, P.; Mantovani, A.; Van Damme, J. (2002): Identification of Biologically Active Chemokine Isoforms from Ascitic Fluid and Elevated Levels of CCL18/Pulmonary and Activation-regulated Chemokine in Ovarian Carcinoma. *J Biol Chem.* 277, 24584-24593
- Schiff, M.H.; Burmester, G.R.; Kent, J.D.; Pangan, A.L.; Kupper, H.; Fitzpatrick, S.B.; Donovan, C. (2006): Safety analyses of adalimumab (HUMIRA) in global clinical trials and US postmarketing surveillance of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 65, 889–894
- Schilling, S.; Wasternack, C.; Demuth H.U. (2008): Glutaminyl cyclases from animals and plants: a case of functionally convergent protein evolution. *Biol Chem.* 389, 983-991
- Schroff, R.W.; Foon, K.A.; Beatty, S.M.; Oldham, R.K.; Morgan, A.C. (1985): Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy. *Cancer Research* 45, 879-885
- Shahrara, S.; Proudfoot, A.E.I.; Park, C.C.; Volin, M.V.; Haines, G.K.; Woods, J.M.; Aikens, C.H.; Handel, T.M.; Pope, R.M. (2008): Inhibition of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Ameliorates Rat Adjuvant-Induced Arthritis. *J Immunol.* 180, 3447-3456
- Sigurskjold, B.W. (2000): Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem.* 277, 260–266
- Standiford T.J.; Kunkel S.L.; Phan S.H.; Rollins B.J.; Strieter R.M. (1991): Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem.* 266, 9912–9918
- Steiner, J. M.; Williams, D. A., Moeller (2000): Development and validation of a method for simultaneous separation and quantification of 5 different sugars in canine urine, *Can J Vet Res.* 64, 164-170
- Steiner, J. M.; Teague, S. R.; Williams, D. A. (2003): Development and analytic validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of canine pancreatic lipase immunoreactivity in serum, *Can J Vet Res.* 67, 175-182
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24, 145-149
- Traves, S.L.; Culpitt, S.V.; Russell, R.E.K.; Barnes, P.J.; Donnelly, L.E. (2002) Increased levels of the chemokines GRO $\alpha$  and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax* 57, 590-595
- Tsou, C.-L.; Peters, W.; Si, Y.; Slaymaker, S.; Aslanian, A.M.; Weisberg, S.P.; Mack, M., Charo, I.F. (2007): Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117, 902-909

- Ueda, A.; Kawamoto, S.; Igarashi, T.; Ishigatsubo, Y.; Tani, K.; Okubo, T.; Okuda, K. (1994): Human monocyte chemoattractant protein-1 expressed in a baculovirus system. *Gene* 140, 267-272
- Ueno, T. ; Toi, M. ; Saji, H.; Muta, M. ; Bando, H.; Kuroi, K.; Koike, M.; Inadera, H.; Matsushima, K. (2000): Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 6, 3282-9
- Ugoccioni, M.; D'Apuzzo, M.; Loetscher, M.; Dewald, B.; Baggiolini, M. (1995): Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur J Immunol.* 25, 64-68
- Van Coillie, E.; Proost, P.; Van Aelst, I.; Struyf, S.; Polfliet, M.; De Meester, I.; Harvey, D.J.; Van Damme, J.; Opdenakker, G. (1998): Functional Comparison of Two Human Monocyte Chemotactic Protein-2 Isoforms, Role of the Amino-Terminal Pyroglutamic Acid and Processing by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV. *Biochemistry* 37, 12672-12680
- Van Coillie E.; Van Damme J.; Opdenakker G. (1999): The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10, 61-86
- Van Damme, J.; Proost, P.; Lenaerts, J.-P.; Opdenakker, G. (1992): Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med.* 176, 59-65
- Van Damme, J.; Proost, P.; Put, W.; Arens, S.; Lenaerts, J.-P.; Conings, R.; Opdenakker, G.; Heremans, H.; Billiau, A. (1994): Induction of monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2 in human fibroblasts and leukocytes by cytokines and cytokine inducers. *J Immunol.* 152, 5495-5502
- Van Der Voorn, P.; Tekstra, J.; Beelen, R.H.J.; Tensen, C.P.; Van Der Valk, P.; De Groot, C.J.A. (1999): Expression of MCP-1 by Reactive Astrocytes in Demyelinating Multiple Sclerosis Lesions. *Am J Pathol.* 154, 45-51
- Von Hippel, P.H. und Berg, O.G. (1989): Facilitated target location in biological systems. *J Biol Chem.* 264, 675-678
- Vose, J.M.; Link, B.K.; Grossbard, M.L.; Czuczman, M.; Grillo-Lopez, A.; Gilman, P.; Lowe, A.; Kunkel, L.A.; Fisher, R.I. (2001): Phase II Study of Rituximab in Combination With CHOP Chemotherapy in Patients With Previously Untreated, Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol.* 19, 389-397
- Wang, J.M.; Sica A.; Peri G., Walter S., Padura I.M., Libby P., Ceska M., Lindley I., Colotta F., Mantovani A. (1991): Expression of monocyte chemotactic protein and interleukin-8 by cytokine-activated human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 11, 1166-1174
- Wang, X.; Li, X.; Yue, T.L.; Ohlstein, E.H. (2000): Expression of monocyte chemotactic protein-3 mRNA in rat vascular smooth muscle cells and in carotid artery after balloon angioplasty. *Biochim Biophys Acta.* 1500, 41-48

- Wagner W.; Roderburg C.; Wein F.; Diehlmann A.; Frankhauser M.; Schubert R.; Eckstein V.; Ho A.D. (2007): Molecular and Secretory Profiles of Human Mesenchymal Stromal Cells and their Abilities to Maintain Primitive Hematopoietic Progenitors. *Stem Cells* 25, 2638–2647
- Weiss, L.; Si-Mohamed, A.; Giral, P.; Castiel, P.; Ledur, A.; Blondin, C.; Kazatchkine, M.D.; Haeffner-Cavaillon, N. (1997): Plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 but not those of macrophage inhibitory protein-1 $\alpha$  and RANTES correlate with virus load in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 176, 1621–1624
- Wells, J.A. (1996): Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1-6
- Wetlaufer, DB; Anfinsen, CB; Anson, MC; Bailey, K; Edsam, J (1962): Advances in Protein chemistry. *Acad Press London*, 375-378
- Woodruff, P.G.; Koth, L.L.; Yang, Y.H.; Rodriguez, M.W.; Favoreto, S.; Dolganov, G.M.; Paquet, A.C.; Erle, D.J. (2005): A Distinctive Alveolar Macrophage Activation State Induced by Cigarette Smoking. *J Respir Crit Care Med.* 172, 1383-92
- Yamada, Y.; Ando, F.; Shimokata, H. (2007): Association of gene polymorphisms with blood pressure and the prevalence of hypertension in community-dwelling Japanese individuals. *Int J Mol Med.* 19, 675-683
- Yao, T.C.; Kuo, M.L.; See, L.C.; Ou, L.S.; Lee, W.I.; Chan, C.K.; Huang, J.L. (2006): RANTES and Monocyte Chemoattractant Protein 1 as Sensitive Markers of Disease Activity in Patients With Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 54, 2585-2593
- Yoshimura T.; Robinson E.A.; Tanaka S.; Appella E.; Leonard E.J. (1989 a): Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J Immunol.* 142, 1956–1962
- Yoshimura T.; Yuhki N.; Moore S.K.; Appella E.; Lerman M.I.; Leonard E.J. (1989 b): Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen- stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett.* 244, 487–493
- Zhang, Y.J.; Rutledge, B.J.; Rollins, B.J. (1994): Structure/Activity Analysis of Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) by Mutagenesis. *J Biol Chem.* 269, 15918-15924
- Zlotnik, A. and Yoshie O. (2000): Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127

## Anhang I

**Chemikalien; Materialien; Geräte; Kits; Molekulargewichtsmarker; Enzyme/Zytokine und dafür benötigte Lösungen; Antikörper; Peptide; Software; Puffer und Medien; Oligonukleotide**

### Chemikalien

Produkt	Hersteller
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid	Biacore, Freiburg
6-Aminohexansäure	Biacore, Freiburg
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Heidelberg
Agarose	AGS GmbH, Heidelberg
APS	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Biotin	Roth, Karlsruhe
Blocking Puffer + 0,05% Tween-20, Protein frei	Thermo Scientific PIERCE, Rockford, USA
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Comassie brilliand Blue G-250	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
CaSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
CuSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Dextrose	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Ducheve, Haarlem, Niederlande
dNTP	Promega, Madison, USA
EDTA	ICN, Aurora, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethanolamin-HCl	Biacore, Freiburg
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
HCl	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Heidelberg
HEPES	Merck, Darmstadt
Hydroxyethylcellulose	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl	ICN, Aurora, USA
KOH	Roth, Karlsruhe
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Lipopolysaccharide	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
MES	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe

## Anhang I

MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
MgSO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
N-Hydroxysuccinimid	Merck, Darmstadt
NaAcetat	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
Na <sub>2</sub> Citrat	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NH <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Pepton	Difco, Heidelberg
Roti®-Load 1	BIORAD, Hertfordshire, England
SDS	ICN, Aurora, USA
Serva Blue W	Invitrogen, Groningen, Holland,
Sorbitol	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
Streptavidin-Peroxidase-Polymer	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
SureBlue Peroxidase Substrate	KPL, Washington, DC, USA
Technischer Sauerstoff für Fermentation	Messer-Griesheim, Wittenberg
TEMED	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
Thioglykolat	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
Tris	ICN, Aurora, USA
Tween 20	Roth, Karlsruhe
YNB (Yeast nitrogen base)	Invitrogen, Groningen, Holland
Zeocin	Invitrogen, Groningen, Holland
ZnCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Schnellendorf

---

## Materialien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Nunc Maxisorp™-Platten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BD TruCOUNT Tubes	BD Bioscience, Heidelberg
CM5 Sensorchip	Biacore, Freiburg
Corning® Transwell™ Platten	Corning, New York, USA
Dialyseschlauch (0,0025-0,005 Microns)	Roth, Karlsruhe
HiPrep 26/10 Desalting	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HisSpinTrap-Säulchen	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Ni-NTA Superflow Säulenmaterial (4ml)	Quiagen, Hilden
Nitrocellulosemembran	Roth, Karlsruhe
Protein G-Säule, 5 ml	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Superdex 200 HR 10/30	Pharmacia, Erlangen
VIVASPIN 20 ml CONCENTRATOR – Röhrchen	VIVASCIENCE, Hannover

---

## Anhang I

### Geräte

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Äkta™ Purifier	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Avanti J-20 (Zentrifuge)	Beckmann, Palo Alto, USA
BIACORE 3000	Biacore, Freiburg
JA 25.50 (Rotor mit fixierten Winkel für 50 ml Zentrifugenröhrchen)	Beckmann, Palo Alto, USA
JLA-8100 (Rotor mit fixierten Winkel für 1 l Zentrifugenbecher)	Beckmann, Palo Alto, USA
JS 4-3 (Schwing rotor für 50 ml oder 10 ml Falconröhrchen)	Beckmann, Palo Alto, USA
Biofuge fresco	Heraeus
Biofuge pico	Heraeus
Biostat-C Fermenter	B.Braun Biotech International, Melsungen
BioDoc-It™ Imaging System	UVP, Upland (USA)
CASY@Cell Counter (Model DT)	Innovatis AG, Reutlingen
Coulter Allegra™21	Beckmann, Palo Alto, USA
DNA-Gelelektrophorese GEB1A-UVT Elektrophoresekammer AS	Hybaid AGS, Heidelberg AGS, Heidelberg
FACSCalibur™ Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg
<i>French</i> ® Press	Thermo IEC, Needham. Heights, USA
FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH GmbH, Offenburg
Gene Pulser Xcell™ Electroporation System	BIORAD, Hertfordshire, England
Inkubationsschrank B6 FUNCTION line	Heraeus, Hanau
Kreisschüttler GFL 3005	GFL, Burgwedel
MasterCycler	Eppendorf, Hamburg
Millipore (Model 8003) (Ultrafiltration)	Amicon, Witten
MP 220 pH-Meter	Mettler-Toledo, Gießen
PCR-Cycler	Bio-Rad, Hertfordshire (Großbritannien)
PCR-Sprint	Hybaid, Heidelberg
Perkin Elmer UV/Vis Spektrometer Lambda20	Perkin Elmer, Überlingen
pH-Meter inoLab Serie 720	WTW, Weilheim
POWER PAC 200, 300	BIORAD, Hertfordshire, England
Reinstwasseranlage PURELAB Plus UV	USF SERAL, Ransbach-Baumbach
QUALIFREEZE Cryo-Einfriergerät	Nalgene, Roskilde, Dänemark
Schüttelinkubator KS-15/TH-15 und SM-30/TH-30	Bühler, Tübingen
SFM 25 Spectrofluorometer	Kontron Instruments, Zürich
SmartSpec 3000 Spectrophotometer	BIORAD, Hertfordshire, England
SPECTRAFluor Plus	TECAN
Sterilwerkbank Biowizard	Kojair, Vilppula
The QIAexpressionist (Ni-NTA-Säule)	Qiagen, Hilden
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
TECAN Sunrise Plattenreader	TECAN
U-2000 Spectrophotometer	HITACHI
UV-System	iNTAS, Göttingen
Vortex 2 Genie	Scientific Industries, Bochemia, USA
VP-ITC MicroCalorimeter	MicroCal, Northampton, USA

## Anhang I

### Kits

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
CloneJet™ PCR Cloning Kit,	Fermentas, St. Leon-Rot
EasySelect™ <i>Pichia</i> Expression Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
GlycoPro™ Enzymatic Deglycosylation Kit	Prozyme, Hayward, USA
IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit	Roche, Mannheim (Katalog-Nr. 1493027)
JETquick DNA Clean-up Spin Kit/50	Genomed, Bad Oeynhausen
JETsorb Gel Extraction kit/ 150	Genomed, Bad Oeynhausen
NucleoSpin® RNA II Purification Kit	Macherey Nagel, Düren
PCR Product Purification Spin Kit 50	Genomed, Bad Oeynhausen
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis-Kit	STRATAGENE, LaJolla, USA
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
StrataPrep EF Plasmid (Midiprep Kit)	STRATAGENE, LaJolla, USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrates	Thermo Scientific PIERCE, Rockford (Illinois), USA

### Molekulargewichtsmarker

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Bioladder (1 kb / 200 bp)	Hybaid, Heidelberg
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Precision Plus Protein Standard	BIORAD, Hertfordshire, England

## Anhang I

### **Enzyme / Zytokine und dafür benötigte Lösungen**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<i>0,1 M DTT</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>Bgl II</i>	New England Biolabs, Schwalbach
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
<i>First-Strand Buffer, 5x</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
hQC	Probiodrug AG
Ligationspuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
mQC	Probiodrug AG
NEBuffer 3	New England Biolabs, Schwalbach
Nukleotidmix	Promega, Mannheim
Oligo(dT)-Primer	Promega, Mannheim
<i>Pfu</i> 10x Rxn. Buffer w/MgSo <sub>4</sub> 20mM	Promega, Mannheim
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega, Mannheim
Phusion-Polymerase	NEB, Schwalbach
Phusion HF Puffer, 5x	NEB, Schwalbach
rIFN $\gamma$	Peptotech, Hamburg
rTNF $\alpha$	Peptotech, Hamburg
<i>Sac I</i>	New England Biolabs, Schwalbach
Streptavidin-Peroxidase-Polymer	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Groningen, Niederlande
T4-DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> Polymerase 10x Buffer w/MgCl <sub>2</sub> 750mM	Promega, Mannheim

### **Antikörper**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
anti-Ly-6G-PE	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Anti mouse IgG-HRP	KPL, Washington, DC, USA
Anti rat IgG-HRP	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
<i>FcR Blocking Reagent, mouse</i>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Goat anti hMCP1	R&D Systems, Minneapolis, MN USA
Rabbit anti mJE	Peptotech, Hamburg
Rabbit anti rat MCP1 [LS-C54182/13136]	LIFESPAN BIOSCIENCES, Seattle, USA
Rabbit anti rat MCP1, biotinyliert	Peptotech, Hamburg
Rat anti mouse MCP1	R&D Systems, Minneapolis, MN USA
<i>Rat anti mouse neutrophils:FITC</i>	AbD Serotec, Düsseldorf

## Anhang I

### Peptide

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
A $\beta$ pE(3-42)	probiodrug AG, Halle
Ac-QTGG-AMC	probiodrug AG, Halle
Big Gastrin	probiodrug AG, Halle
Collagen alpha-1 (I)	probiodrug AG, Halle
Fibronektin	probiodrug AG, Halle
Gonadoliberin	probiodrug AG, Halle
hMCP1 N1pE (1-38)	probiodrug AG, Halle
Neurotensin	probiodrug AG, Halle
Orexin A	probiodrug AG, Halle
Prothyroliberin	probiodrug AG, Halle

### Software

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
BIAevaluation	Biacore, Freiburg
GraFit 4.03	Erithacus Software Limited
KinLab 2.80.02	Perkin Elmer, Überlingen
MFCS/win 1.x.	B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Origin 7.0	Northampton, USA
Prism 3.02	GraphPad, USA

### Medien und Zusätze für die Zellkultur

<b>Medium</b>	<b>Hersteller</b>
1 % MEM-NEA	Invitrogen, Karlsruhe
D-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
D-MEM/F12	Invitrogen, Karlsruhe
Essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
FBS	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
HybridoMed DIF 1000	Biochrom, Berlin
Insulin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Vitamine	PAA, Cölbe

### Verwendete kommerziell erhältliche Puffer

<b>Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
Ethanolamin-HCL (1M), pH 8,5	Biacore, Freiburg
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
HBS-EP	Biacore, Freiburg
PBS	PAA, Cölbe
Protein freier ELISA-Blocker	Thermo Scientific PIERCE, Rockford, USA
Protein freier ELISA-Blocker + 0,05%	Thermo Scientific PIERCE, Rockford, USA
Tween-20	
Roti®-Load 1	BIORAD, Hertfordshire, England

## Anhang I

### Häufig verwendete Puffer und Lösungen

#### **Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese:**

Färbelösung (Coomassie-Färbung)	50 % Methanol 10 % Essigsäure 0,025 % Serva blue W
Entfärbelösung (Coomassie-Färbung)	10 % Essigsäure
Probenpuffer (reduzierende SDS-Page)	Roti®-Load 1 von BioRad
Probenpuffer (nicht-reduzierende SDS-Page)	250 mM Tris-HCl, pH 8,0 5 % (w/v) SDS 50 % Glycerol 0,005 % Bromphenolblau

#### **Puffer und Lösungen zur Durchführung eines Western Blots:**

PBS	8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,45 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,4 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,5
PBS-Tween	PBS + 0,5 % Tween 20
AP-Puffer	12,1 g/l Tris, pH 9,5 5,84 g/l NaCl 1,02 g/l MgCl <sub>2</sub>
Anoden-Puffer 1	36,3 g/l Tris, pH 10,4 200 ml/l Methanol
Anoden-Puffer 2	3,03 g/l Tris, pH 10,4 200 ml/l Methanol
Kathoden-Puffer	3,03 g/l Tris, pH 9,4 5,25 g/l 6-Aminohexansäure 200 ml/l Methanol
TBS-Puffer	2,4 g/l Tris, pH 7,5 8,7 g/l NaCl 0,5mg/l KCl
TBS-Tween	TBS + 0,5 % Tween 20

## Anhang I

### **Puffer und Lösungen für Bindungsanalysen am Biacore 3000:**

Aktivierungslösungen	0.4 M 1-ethyl-3-(3-dimethylamino- <i>propyl</i> )-carbodiimid (EDC) 0.1 M N-Hydroxysuccinimid (NHS)
Deaktivierungslösung	1 M Ethanolamin-HCL, pH 8,5 (Biacore)
Laufpuffer	HBS-EP (Biacore)
Regenerierungslösung	0,1 M HCl

### **Puffer und Lösungen für den ELISA:**

ELISA-Blocker	Protein freier ELISA-Blocker (Thermo Scientific, PIERCE)
ELISA-Blocker (+T)	Protein freier ELISA-Blocker + 0,05% Tween-20 (Thermo Scientific, PIERCE)
Stop-Lösung	1,2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### **Puffer und Lösungen für die Affinitätschromatographie:**

#### A) Für Protein G Säulenmaterial

2 x Bindungspuffer	40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0
Bindungspuffer	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0
Waschpuffer A	30 mM MES, pH 5,5
Waschpuffer B	30 mM MES, pH 5,5 700 mM NaCl
Elutionspuffer	0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7
Neutralisierungspuffer	1 M Tris-HCl, pH 9,0

#### B) Für NiNTA-Affinitätschromatographie

Bindungspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,6 300 mM NaCl
----------------	--

## Anhang I

Elutionspuffer  
50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,6  
300 mM NaCl  
500 mM Imidazol

### **Puffer zur Aktivitätsbestimmung des SENP2<sup>363-589</sup>-Fragments:**

50 mM Tris, pH 8,0  
5 mM DTT  
1 M Na<sub>2</sub>Citrat

### **Sonstige häufig verwendete Puffer:**

ITC-Puffer  
25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4  
25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
150 mM NaCl  
2 mM EDTA

Probenpuffer (Agarosegelelektrophorese)  
0,4 % Bromphenolblau  
1 mM EDTA  
50 % Glycerol

TBE-Puffer (Agarosegelelektrophorese)  
90 mM Tris  
90 mM Borsäure  
20 mM EDTA

SDS-Puffer  
0,76 g/l Tris  
3,61 g/l Glycine  
0,25 g/l SDS

### **Medien (in alphabetischer Reihenfolge):**

BMM Medium (mit Methanol) / BMG Medium (mit Glycerol) (*P. pastoris*):  
100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,0  
1,34 % YNB  
4x10<sup>-5</sup> % Biotin  
1 % Glycerol  
oder 0,5 % Methanol

LB Medium / LB Agar (*E. coli*):  
5 g/l Hefeextrakt  
5 g/l NaCl  
10 g/l Pepton  
± 10 g/l Agar

YPD Medium / YPD Agar (*P. pastoris*):  
1 % Hefeextrakt  
2 % Peptone  
2 % Dextrose (Glukose)  
± 2 % Agar  
± 100 µg/ml Zeocin

## Anhang I

YPDS Agar (*P. pastoris*):

1 % Hefeextrakt  
2 % Pepton  
2 % Dextrose (Glukose)  
2 % Agar  
100 µg/ml Zeocin  
1 M Sorbitol

### Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert und in einer Konzentration von 100 pmol/µl geliefert.

Verwendungs- zweck	Oligo- nukleotid	Nukleotidsequenz
	MHCG1	5'-CAGTGGATAGACAGATGGGGG-3'
	MHCG2b	5'-CAGTGGATAGACTGATGGGGG-3'
Amplifikation der schweren Antikörper- kette	MHV1	5'-ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC-3'
	MHV2	5'-ATGGGATGGAGCTRATCATSYTCTT-3'
	MHV3	5'-ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT-3'
	MHV4	5'-ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRIT-3'
	MHV5	5'-ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCCTT-3'
	MHV6	5'-ATGGCTTGTCYTRGSGCTRCTTCTGC-3'
	MHV7	5'-ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT-3'
	MHV8	5'-ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG-3'
	MHV9	5'-ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG-3'
	MHV10	5'-ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCCTG-3'
	MHV11	5'-ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG-3'
	MHV12	5'-ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG-3'
	MKC	5'-ACTGGATGGTGGGAAGATGG-3'
Amplifikation der leichten Antikörper- kette	MKV1	5'-ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG-3'
	MKV2	5'-ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG-3'
	MKV3	5'-ATGAGTGTGCTCACTCAGGCCTGGSGTTG-3'
	MKV4	5'-ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCCTG-3'
	MKV5	5'-ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC-3'
	MKV6	5'-ATGAGGTKCYTYTGYSAGYTYCTGRGG-3'
	MKV7	5'-ATGGGCWTC AAGATGGAGTCACAKWYYCWG-3'
	MKV8	5'-ATGTGGGGAYCTKTTYCMMTTTTTCAATTG-3'
	MKV9	5'-ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG-3'
	MKV10	5'-ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT-3'
	MKV11	5'-ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC-3'
Sequenzierung des Inserts in pJET1.2	pJET5'seq	5'-ACTGCTTTAACTTGTGCCTGAACAC-3'
	pJET3'seq	5'-ACGGTTCCTGATGAGGTGGTTAGC-3'
cDNA- Synthese	Oligo(dT)- Primer	5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3'

## Anhang II – Versuchsdaten

**Tabelle B 1:** Versuchsdaten für die Wachstumskurve in adhärenter Kultur ohne Zugabe von L-Glutamin über 8 Tage. Dargestellt ist die Anzahl lebender Zellen, die Glukosekonzentration im Überstand, die vom Biacore gemessenen *Response Units* zur Ermittlung der produzierten Antikörpermenge sowie die Verdünnung des Antikörpers für die Messung im Biacore.

Tag	lebende Zellen [Zellen/ml]	lebende Zellen [%]	Glukose [mg/l]
1	6,36E+05	80,99	3875
2	1,16E+06	87,96	2305
3	1,65E+06	88,56	2095
4	1,80E+06	84,81	1650
5	1,81E+06	76,16	1590
7	1,49E+06	59,85	1335
8	1,38E+06	52,53	981
Tag	gemessene ResponseUnits [RU]	Antikörper-Verdünnung	Antikörpermenge [µg/ml]
1	429	20	6,85
2	520	50	20,81
3	417	100	33,28
4	572	100	45,85
5	371	200	59,12
7	516	200	82,64
8	550	200	88,09

**Tabelle B 2:** Versuchsdaten für die Wachstumskurve in adhärenter Kultur mit Zugabe von 4mM L-Glutamin über 8 Tage. Dargestellt ist die Anzahl lebender Zellen, die Glukosekonzentration im Überstand, die vom Biacore gemessenen *Response Units* zur Ermittlung der produzierten Antikörpermenge sowie die Verdünnung des Antikörpers für die Messung im Biacore.

Tag	lebende Zellen [Zellen/ml]	lebende Zellen [%]	Glukose [mg/l]
1	6,70E+05	82,53	3955
2	1,00E+06	85,67	2290
3	2,05E+06	90,09	1115
4	3,23E+06	91,05	668,5
5	3,28E+06	89,15	362,5
7	3,02E+06	73,12	12,5
8	2,71E+06	62,54	11,5
Tag	gemessene ResponseUnits [RU]	Antikörper-Verdünnung	Antikörpermenge [µg/ml]
1	404	20	6,45
2	430	50	17,18
3	460	100	36,79
4	418	200	66,64
5	575	200	92,17
7	646	200	103,66
8	460	350	104,79

## Anhang II

**Tabelle B 3:** Versuchsdaten für die Wachstumskurve in Suspensionskultur ohne Zugabe von L-Glutamin über 7 Tage. Dargestellt ist die Anzahl lebender Zellen, die Glukosekonzentration im Überstand, die vom Biacore gemessenen *Response Units* zur Ermittlung der produzierten Antikörpermenge sowie die Verdünnung des Antikörpers für die Messung im Biacore.

<b>Tag</b>	<b>lebende Zellen [Zellen/ml]</b>	<b>lebende Zellen [%]</b>	<b>Glukose [mg/l]</b>
0	5,65E+05	85,75	4010
1	5,56E+05	80,35	2540
2	1,74E+06	82,49	1770
3	1,71E+06	76,74	1820
4	1,51E+06	71,55	1730
5	1,48E+06	65,19	1460
6	1,45E+06	57,31	1290
7	1,28E+06	56,37	1280

<b>Tag</b>	<b>gemessene ResponseUnits [RU]</b>	<b>Antikörper- Verdünnung</b>	<b>Antikörpermenge [µg/ml]</b>
0	118,6	10	0,91
1	139,3	50	5,37
2	325,3	100	25,83
3	167,4	500	65,07
4	256,7	500	101,32
5	324,6	500	128,88
6	350,5	500	139,39
7	354,3	500	140,93

## Anhang II

**Tabelle B 4:** Versuchsdaten für die Wachstumskurve in Suspensionskultur mit Zugabe von 4mM L-Glutamin über 8 Tage. Dargestellt ist die Anzahl lebender Zellen, die Glukosekonzentration im Überstand, die vom Biacore gemessenen *Response Units* zur Ermittlung der produzierten Antikörpermenge sowie die Verdünnung des Antikörpers für die Messung im Biacore.

Tag	lebende Zellen [Zellen/ml]	lebende Zellen [%]	Glukose [mg/l]
0	3,74E+05	81,61	4870
1	8,26E+05	83,42	4010
2	1,71E+06	89,60	2280
3	3,92E+06	93,01	1150
4	4,07E+06	88,49	1250
5	3,79E+06	80,32	1160
6	3,26E+06	69,80	1003
7	2,62E+06	57,85	989
8	1,99E+06	46,54	816

Tag	gemessene ResponseUnits [RU]	Antikörper- Verdünnung	Antikörpermenge [µg/ml]
0	35,8	10,00	0,23
1	379,2	20,00	6,04
2	369,8	100,00	29,44
3	530,5	200,00	84,98
4	324,8	500,00	128,96
5	481,8	500,00	192,69
6	463,4	500,00	185,21
7	431,7	500,00	172,35
8	409,8	500,00	163,46

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Ich danke Herrn Prof. H.-U. Demuth für die Vergabe dieses interessanten Themas, für sein Interesse und seine Diskussionsbereitschaft. Bei Dr. habil. Hauke Lilie bedanke ich mich für die Betreuung dieser Dissertationsarbeit seitens der Universität Halle-Wittenberg, seine konstruktive Kritik und Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin danke ich Dr. J.-U. Rahfeld und Dr. Martin Kleinschmidt für die hervorragende Unterstützung und ihre ständige Diskussionsbereitschaft. Ihre Motivation und die vielen konstruktiven Vorschläge zu auftretenden Problemen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem bedanke ich mich bei ihnen und Dr. habil. Astrid Kehlen für das Lesen und die kritische Bewertung des Manuskripts.

Ich danke Frau Dr. Nicole Wehofsky, Abteilung Naturstoffbiochemie MLU-Halle, für die Bereitstellung der membrangebundenen Peptidbibliotheken zur Durchführung des Epitopmappings.

Bei Daniel Friedrich, Anja Fothe und Sandra Torkler möchte ich mich für die Durchführung der Tierversuche bedanken.

Danken möchte ich auch folgenden Studenten für ihr Interesse am Thema und die Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung von Experimenten: Andrea Voigt, Franziska Fietz und Juliane Krüger.

Ich danke den Mitarbeitern der Probiodrug AG, besonders meinen Kolleginnen Claudia Göttlich, Anja Weber, Nadine Jänckel, Katja Menge und Anka Thümmeler für deren Hilfe bei der Durchführung von Experimenten, die angenehme und immer lustige Arbeitsatmosphäre und dass sie stets ein offenes Ohr für kleine und große Probleme hatten. Zudem gilt mein Dank Dr. Astrid Kehlen, Dr. Sonja Kampfer, Dr. Mirko Buchholz und Robert Sommer für ihre Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Stefan Gnoth und bei meinen Eltern für deren zuverlässige Unterstützung im Alltag bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei meinem Großvater Prof. Dr. H. Löffler, der auch im Alter von 87 Jahren stets geduldig versucht hat, mir die unergründlichen Geheimnisse der Physik nahezubringen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Kathrin Gans  
Geburtsdatum: 02.05.1980  
Geburtsort: Halle (Saale)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## Bildungsweg

09/1986 – 07/1991 Grundschule „Bertolt Brecht“ in Halle (Saale)  
09/1991 – 07/1993 Gymnasium „Kinder- und Jugendsportschule Halle“  
09/1993 – 07/1998 „Christian Thomasius-Gymnasium“ in Halle; Abschluss: Abitur  
09/1999 – 09/2001 Grundstudium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
10/2001 – 10/2004 Hauptstudium Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
01/2004 – 08/2004 Diplomarbeit zum Thema „Untersuchung des Einflusses von Aminosäureresten im aktiven Zentrum der Dipeptidylpeptidase IV auf die Substrathydrolyse“, Institut für Genetik, Prof. Dr. Karin Breunig  
10/2004 Abschluss: Diplom-Biologin (Note: 1,1)  
seit 01/2005 Promotionsstudentin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Thema: „Anwendung von anti-MCP1 N1pE-Antikörpern zur Untersuchung des Einflusses der Pyroglutamat-Bildung in physiologischen Modellen“  
03/2005 – 11/2005 Gastwissenschaftler an der *University of British Columbia*, Vancouver

Halle (Saale), Mai 2010

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen gekennzeichnet habe.

Hiermit erkläre ich weiterhin, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Die Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Halle (Saale), d. 20. Mai 2010

Kathrin Gans