

Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen  
MHC-Klasse-I-Moleküle des Hundes

von Leonie Mariella Lumpp

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen  
MHC-Klasse-I-Moleküle des Hundes

von Leonie Mariella Lumpp

aus Reutlingen

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Angefertigt am: Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie  
der Eberhard Karls Universität Tübingen

Mentor: Prof. Dr. Oliver Planz

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin P. Märtlbauer

**Tag der Promotion: 10.02.2018**

Für meinen Hund Emil

„Man kann auch ohne Hund leben, aber es lohnt sich nicht.“

[Heinz Rühmann, 1902-1994]

**TABELLENVERZEICHNIS**

|  |     |
|--|-----|
| <i>Tabelle 1.1: Häufigkeit von ausgewählten Hauttumoren beim Hund</i>  | 22  |
| <i>Tabelle 1.2: Beispiele prädisponierter Tumorerkrankungen beim Hund</i>  | 25  |
| <i>Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper</i>  | 33  |
| <i>Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien</i>   | 33  |
| <i>Tabelle 2.3: Verwendete Geräte</i>  | 35  |
| <i>Tabelle 2.4: Verwendete Glaswaren</i>   | 36  |
| <i>Tabelle 2.5: Verwendete Kits</i>  | 37  |
| <i>Tabelle 2.6: Verwendete Pipettierhilfen</i>   | 37  |
| <i>Tabelle 2.7: Verwendete Plasmide</i>  | 38  |
| <i>Tabelle 2.8: Verwendete Adjuvantien</i>   | 38  |
| <i>Tabelle 2.9: Verwendete Enzyme</i>  | 38  |
| <i>Tabelle 2.10: Verwendete Software</i>   | 38  |
| <i>Tabelle 2.11: Verwendete Verbrauchswaren</i>  | 39  |
| <i>Tabelle 2.12: Sonstige verwendete Gegenstände</i>   | 41  |
| <i>Tabelle 2.13: Verwendete Zelllinien</i>   | 41  |
| <i>Tabelle 2.14: Rezepturen der verwendeten Medien und Lösungen</i>  | 42  |
| <i>Tabelle 3.1: Kontrolle der Expression von transfizierten Zellen</i>   | 66  |
| <i>Tabelle 3.2: Einstellungen am FACS Canto</i>  | 71  |
| <i>Tabelle 3.3: Bindungsaffinitäten für Immunglobuline der Maus</i>  | 89  |
| <i>Tabelle 4.1: Immunisierungsschema BALB/c Mäuse</i>  | 104 |
| <i>Tabelle 4.2: Eluierte Peptide der MHC-Präzipitation von K562 DLA-88*50101 Zellen unter der Verwendung des Antikörpers 12.C8F6</i> | 122 |
| <i>Tabelle 4.3: Eluierte Peptide der MHC-Präzipitation von MDCK II Zellen unter der Verwendung des Antikörpers 12.C8F6</i>           | 124 |



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|   |     |
|---|-----|
| <i>Abbildung 1: Darstellung einer Entzündungsreaktion im Gewebe.</i>                            | 2   |
| <i>Abbildung 2: Schema eines T-Zell-Rezeptors (TCR).</i>  | 4   |
| <i>Abbildung 3: T-Zell Priming.</i>   | 5   |
| <i>Abbildung 4: Schematische Darstellung des IgG Antikörperaufbaus.</i>                         | 6   |
| <i>Abbildung 5: Schematische Darstellung der Herstellung eines monoklonalen Antikörpers.</i>    | 9   |
| <i>Abbildung 6: Struktur eines MHC-Klasse-I-Moleküls.</i>                                       | 11  |
| <i>Abbildung 7: Antigenprozessierung und Beladung eines MHC-Klasse-I-Moleküls.</i>              | 14  |
| <i>Abbildung 8: Zytotoxische T-Zelle erkennt MHC-Klasse-I-Komplex.</i>                          | 14  |
| <i>Abbildung 9: Struktur eines MHC-Klasse-II-Moleküls.</i>                                      | 16  |
| <i>Abbildung 10: Heimtierhaltung in Deutschland.</i>  | 20  |
| <i>Abbildung 11: Hundehaltung in Deutschland.</i>   | 20  |
| <i>Abbildung 12: Häufige Tumorerkrankungen beim Hund.</i>                                       | 21  |
| <i>Abbildung 13: Übersicht der individualisierten Vakzinierung von Hunden.</i>                  | 30  |
| <i>Abbildung 14: Neubauer improved Zählkammer.</i>  | 52  |
| <i>Abbildung 15: Schema der Reklonierung von Sp2/0 DLA-88*50101 Zellen.</i>                     | 60  |
| <i>Abbildung 16: Lichtstreuungseigenschaften einer Zelle.</i>                                   | 63  |
| <i>Abbildung 17: Dot Plot jeder verwendeten Zelllinie.</i>                                      | 64  |
| <i>Abbildung 18: Histogramm-Darstellung.</i>  | 64  |
| <i>Abbildung 19: QUIFI Kit Beads im Histogramm dargestellt.</i>                                 | 68  |
| <i>Abbildung 20: Schematische Darstellung einer Dichtegradientenzentrifugation.</i>             | 75  |
| <i>Abbildung 21: Schema einer Gelkammer-Apparatur.</i>  | 84  |
| <i>Abbildung 22: Aufbau in einer Blotting-Apparatur.</i>  | 85  |
| <i>Abbildung 23: Detektion im Western Blot.</i>   | 86  |
| <i>Abbildung 24: Schema einer Immunpräzipitation.</i>   | 87  |
| <i>Abbildung 25: Agar-Gelelektrophorese von linearisierter DNA.</i>                             | 97  |
| <i>Abbildung 26: Ergebnisse der Probe Transfektion.</i>   | 98  |
| <i>Abbildung 27: Umsetzen transfizierter Sp2/0 Zellen.</i>                                      | 99  |
| <i>Abbildung 28: Ausgewählte Ergebnisse der Transfektion von Sp2/0 Zellen mit DLA-88*50101.</i> | 101 |
| <i>Abbildung 29: Expression von MHC-Molekülen auf K562 Zellen.</i>                              | 102 |
| <i>Abbildung 30: Verlust der Expression von transfizierten Sp2/0 DLA-88*50101 Zellen.</i>       | 103 |



---

|   |     |
|---|-----|
| <i>Abbildung 31: Nachweis der Immunreaktion im Serum.</i>   | 106 |
| <i>Abbildung 32: Vergleich der Präimmunseren mit den Hyperimmunseren.</i>                         | 108 |
| <i>Abbildung 33: Vergleich von Serumproben in der FACS-Analyse.</i>                               | 109 |
| <i>Abbildung 34: Vergleich der Präimmunseren und Hyperimmunseren der drei Mäuse.</i>              | 109 |
| <i>Abbildung 35: FACS-Analyse der Seren auf MDCK II Zellen.</i>                                   | 110 |
| <i>Abbildung 36: Nachweis von MHC-Fragmenten.</i>   | 111 |
| <i>Abbildung 37: Ergebnisse des Klons aus Fusion 1 in der FACS-Analyse.</i>                       | 112 |
| <i>Abbildung 38: Immunpräzipitation eines Klons von Fusion 1.</i>                                 | 113 |
| <i>Abbildung 39: Ergebnisse der Hybridomaüberstände aus Fusion 2 in der FACS-Analyse.</i>         | 114 |
| <i>Abbildung 40: Immunpräzipitation der Klone aus Fusion 2 mit K562 DLA-88*50101 Zellen.</i>      | 115 |
| <i>Abbildung 41: Immunpräzipitation der Klone aus Fusion 2 mit zwei Zelllinien, im Vergleich.</i> | 116 |
| <i>Abbildung 42: Western Blot Analyse des Antikörpers 12.C8F6.</i>                                | 117 |
| <i>Abbildung 43: Immunpräzipitation des Antikörpers 12.C8F6.</i>                                  | 117 |
| <i>Abbildung 44: Isotypbestimmung des Antikörpers 12.C8F6.</i>                                    | 118 |
| <i>Abbildung 45: Bindekapazität des Antikörpers 12.C8F6.</i>                                      | 119 |
| <i>Abbildung 46: Ergebnisse des Klons aus Fusion 3 in der FACS-Analyse.</i>                       | 119 |
| <i>Abbildung 47: Ergebnisse der Klone aus Fusion 3 in der FACS-Analyse.</i>                       | 120 |
| <i>Abbildung 48: Immunpräzipitation der Klone: 12.C8F6 aus Fusion 2 und 2.A9 aus Fusion 3.</i>    | 121 |
| <i>Abbildung 49: Bindemotiv von DLA-88*50101.</i>   | 123 |
| <i>Abbildung 50: Bindemotiv von K562 DLA-88*50101 Zellen.</i>                                     | 123 |

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

|                       |  |
|-----------------------|--|
| %                     | Prozent  |
| ≥                     | Größer-als oder gleich                           |
| §                     | Paragraph  |
| °C                    | Grad Celsius                                     |
| µg                    | Mikrogramm                                       |
| µl                    | Mikroliter                                       |
| µm                    | Mikrometer                                       |
| A                     | Adenin   |
| APC                   | Antigenpräsentierende Zelle                      |
| BCR                   | B-Zell-Rezeptor                                  |
| C                     | Cytosin  |
| ca.                   | circa  |
| CD                    | <i>Cluster of differentiation</i>                |
| cm <sup>2</sup>       | Quadratcentimeter                                |
| CO <sub>2</sub>       | Kohlenstoffdioxid                                |
| CpG ODN               | <i>CpG oligodeoxynucleotides</i>                 |
| CTL                   | <i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>                    |
| CTLA                  | <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein</i> |
| DC                    | <i>Dendritic cell</i>                            |
| ddH <sub>2</sub> O    | <i>double distilled water</i>                    |
| DLA                   | <i>Dog leukocyte antigen</i>                     |
| DNA                   | Desoxyribonukleinsäure                           |
| ER                    | endoplasmatisches Retikulum                      |
| FACS                  | <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>       |
| FITC                  | Fluoreszein Isothiocyanat                        |
| FSC                   | <i>Forward Scatter</i>                           |
| g                     | Gramm  |
| G                     | Guanin   |
| Gy                    | Gray   |
| HGPRT                 | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase    |
| HLA                   | <i>Human leukocyte antigen</i>                   |
| HPLC-H <sub>2</sub> O | Hoch raffiniertes Wasser                         |
| HVR                   | Hypervariable Region                             |
| <i>i. p.</i>          | <i>Intra peritoneal (in die Bauchhöhle)</i>      |
| <i>i. v.</i>          | <i>Intra venös (in die Vene)</i>                 |
| IFN                   | Interferon                                       |
| Ig                    | Immunglobulin                                    |
| IL                    | Interleukin                                      |
| J.                    | Jahr   |
| kb                    | Kilobasen  |
| kDa                   | Kilodalton                                       |
| L                     | Liter  |
| M                     | molare Masse                                     |

---

|                      |   |
|----------------------|---|
| mA                   | Milliampere   |
| mg                   | Milligramm  |
| MHC                  | <i>Major histocompatibility complex</i>                                 |
| min                  | Minuten   |
| ml                   | Milliliter  |
| mM                   | Millimolar  |
| mV                   | Millivolt   |
| NCBI                 | <i>National Center for Biotechnology Information</i>                    |
| NF- $\kappa$ B       | <i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| NK-Zellen            | Natürliche Killerzellen   |
| nm                   | Nanometer   |
| PAMPs                | <i>Pathogen-associated patterns</i>                                     |
| PBMC                 | <i>Peripheral blood mononuclear cell</i>                                |
| PD                   | <i>programmed cell death protein</i>                                    |
| PRR                  | <i>Pattern recognition receptors</i>                                    |
| rpm                  | <i>revolutions per minute</i>   |
| SDS-PAGE             | <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>        |
| SSC                  | <i>Side Scatter</i>   |
| T                    | Thymin  |
| TAP                  | <i>transporter associated with antigen processing</i>                   |
| T <sub>H</sub> Zelle | T-Helferzelle   |
| TLR                  | <i>Toll-like receptor</i>   |
| TNF                  | Tumornekrosefaktor  |
| UV-Licht             | ultraviolettes Licht  |
| V                    | Volt  |
| WHO                  | Weltgesundheitsorganisation   |
| xg                   | -fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )                       |
| z. B.                | zum Beispiel  |
| $\alpha$             | Alpha   |
| $\beta$              | Beta  |
| $\beta_2$ M          | Beta-2-Mikroglobulin  |

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                    |  |           |
|------------------------------------|--|-----------|
| <b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>   | <b>IX</b>  |           |
| <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b> | <b>XI</b>  |           |
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b> | <b>XIII</b>  |           |
| <b>1</b>                           | <b>EINLEITUNG .....</b>                                    | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b>                         | <b>Das Immunsystem .....</b>                               | <b>1</b>  |
| 1.1.1                              | Das angeborene Immunsystem.....                            | 1         |
| 1.1.2                              | Das adaptive Immunsystem .....                             | 3         |
| 1.1.3                              | Antikörper .....   | 6         |
| 1.1.3.1                            | Immunreaktion und Herstellung monoklonaler Antikörper..... | 8         |
| <b>1.2</b>                         | <b>MHC-Moleküle.....</b>                                   | <b>10</b> |
| 1.2.1                              | MHC-Klasse-I-Moleküle .....                                | 10        |
| 1.2.1.1                            | Antigenprozessierung von MHC-Klasse-I-Molekülen .....      | 13        |
| 1.2.1.2                            | Diversität von DLA-88 Allelen.....                         | 15        |
| 1.2.2                              | MHC-Klasse-II-Moleküle .....                               | 15        |
| <b>1.3</b>                         | <b>Tumorerkrankungen .....</b>                             | <b>17</b> |
| 1.3.1                              | Tumorpathologie und Tumorimmunologie.....                  | 17        |
| 1.3.2                              | Die häufigsten Tumorerkrankungen beim Hund.....            | 20        |
| 1.3.2.1                            | Tumoren der Haut .....                                     | 21        |
| 1.3.2.2                            | Tumoren der Maulhöhle.....                                 | 23        |
| 1.3.2.3                            | Mammatumoren .....   | 23        |
| 1.3.2.4                            | Tumoren der Bauchhöhlenorgane .....                        | 24        |
| 1.3.2.5                            | Tumoren des Atmungstraktes.....                            | 24        |
| 1.3.2.6                            | Tumoren des Magen-Darm-Traktes .....                       | 24        |
| 1.3.2.7                            | Tumoren des blutbildenden Systems.....                     | 24        |
| 1.3.2.8                            | Tumoren des Skelletsystems .....                           | 24        |
| 1.3.3                              | Rassedispositionen für bestimmte Tumorerkrankungen .....   | 24        |
| 1.3.4                              | Therapiemöglichkeiten von Tumorerkrankungen.....           | 27        |
| <b>1.4</b>                         | <b>„The Tübingen Approach“.....</b>                        | <b>29</b> |
| <b>1.5</b>                         | <b>Zielsetzung .....</b>                                   | <b>32</b> |
| <b>2</b>                           | <b>MATERIAL.....</b>                                       | <b>33</b> |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.1      | <b>Antikörper</b> .....                                  | 33        |
| 2.2      | <b>Chemikalien</b> .....                                 | 33        |
| 2.3      | <b>Geräte</b> .....                                      | 35        |
| 2.4      | <b>Glaswaren</b> .....                                   | 36        |
| 2.5      | <b>Kits</b> .....  | 37        |
| 2.6      | <b>Pipettierhilfen</b> .....                             | 37        |
| 2.7      | <b>Vektor</b> .....                                      | 38        |
| 2.8      | <b>Adjuvantien</b> .....                                 | 38        |
| 2.9      | <b>Enzyme</b> .....                                      | 38        |
| 2.10     | <b>Marker</b> .....                                      | 38        |
| 2.11     | <b>Software</b> .....                                    | 38        |
| 2.12     | <b>Verbrauchswaren</b> .....                             | 39        |
| 2.13     | <b>Sonstiges</b> .....                                   | 41        |
| 2.14     | <b>Zelllinien</b> .....                                  | 41        |
| 2.15     | <b>Medien und Lösungen</b> .....                         | 42        |
| <b>3</b> | <b>METHODEN</b> .....                                    | <b>47</b> |
| 3.1      | <b>Zellkultur Methoden</b> .....                         | <b>47</b> |
| 3.1.1    | Kultivierung .....                                       | 47        |
| 3.1.1.1  | Kultivierung von C1R Zellen.....                         | 48        |
| 3.1.1.2  | Kultivierung von K562 Zellen .....                       | 48        |
| 3.1.1.3  | Kultivierung von MDCK II Zellen.....                     | 48        |
| 3.1.1.4  | Kultivierung von Sp2/0 Zellen .....                      | 49        |
| 3.1.1.5  | Kultivierung von transfizierten DLA-88*50101 Zellen..... | 49        |
| 3.1.1.6  | Kultivierung von P3X63Ag8 Zellen .....                   | 50        |
| 3.1.1.7  | Kultivierung von Hybridomzellen .....                    | 50        |
| 3.1.1.8  | Massenproduktion von Antikörper .....                    | 51        |
| 3.1.2    | Bestimmung der Lebendzellzahl.....                       | 52        |
| 3.1.3    | Kryolagerung von Zellen .....                            | 53        |
| 3.1.3.1  | Einfrieren von Zellen .....                              | 53        |
| 3.1.3.2  | Auftauen von Zellen.....                                 | 53        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>3.2</b> | <b>Transfektion von Zellen.....</b>                          | <b>54</b> |
| 3.2.1      | Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren .....         | 54        |
| 3.2.2      | Linearisierung von DNA .....                                 | 55        |
| 3.2.2.1    | Enzymatische Verdauung von DNA .....                         | 55        |
| 3.2.2.2    | Extraktion von DNA .....                                     | 55        |
| 3.2.3      | Nukleofektion von SP2/0 Zellen mit DLA-88*50101 .....        | 57        |
| 3.2.3.1    | Testen verschiedener Programmeinstellungen.....              | 57        |
| 3.2.3.2    | Transfektion von Sp2/0 Zellen mit DLA-88*50101 .....         | 58        |
| 3.2.4      | Reklonierung transfizierter Zellen .....                     | 59        |
| <b>3.3</b> | <b>Analytische Methoden.....</b>                             | <b>61</b> |
| 3.3.1      | Durchflusszytometrie .....                                   | 61        |
| 3.3.1.1    | Kontrolle der Expression von Zellen .....                    | 65        |
| 3.3.1.2    | Quantitative Bestimmung von MHC-Klasse-I-Molekülen .....     | 66        |
| 3.3.1.3    | Durchflusszytometrische Analyse von Mausseren .....          | 68        |
| 3.3.1.4    | Durchflusszytometrische Analyse von Hybridomüberständen..... | 70        |
| 3.3.1.5    | Durchflusszytometrische Analysen am FACS Canto .....         | 71        |
| 3.3.1.6    | Bindekapazität des Antikörpers .....                         | 71        |
| 3.3.2      | Massenspektrometrie.....                                     | 72        |
| <b>3.4</b> | <b>Tierexperimentelle Methoden .....</b>                     | <b>73</b> |
| 3.4.1      | Herstellung monoklonaler Antikörper gegen DLA-88 .....       | 73        |
| 3.4.1.1    | Versuchstiere.....   | 73        |
| 3.4.1.2    | Präparation von Zellen für die Immunisierung .....           | 74        |
| 3.4.2      | Isolierung von PBMC's aus Hundeblood .....                   | 75        |
| 3.4.3      | Immunisierung von BALB/c Mäusen .....                        | 76        |
| 3.4.4      | Isolierung von Peritoneal-Makrophagen.....                   | 77        |
| 3.4.5      | Fusion von murinen Milzzellen mit P3X63Ag8 Zellen.....       | 77        |
| <b>3.5</b> | <b>Biochemische Methoden .....</b>                           | <b>80</b> |
| 3.5.1      | Agarose-Gelelektrophorese von linearisierter DNA.....        | 80        |
| 3.5.2      | Western Blot.....  | 81        |
| 3.5.2.1    | Zelllysate herstellen.....                                   | 82        |
| 3.5.2.2    | Gele vorbereiten .....                                       | 82        |
| 3.5.2.3    | Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....                            | 83        |
| 3.5.2.4    | Western Blotting .....                                       | 84        |
| 3.5.2.5    | Antikörper-Markierung .....                                  | 85        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 3.5.3      | Immunpräzipitation .....   | 86         |
| 3.5.3.1    | Zelllysate herstellen.....   | 87         |
| 3.5.4      | Isotypbestimmung des Antikörpers.....                              | 88         |
| 3.5.5      | Aufreinigung von Antikörper über Säulenchromatographie.....        | 89         |
| 3.5.6      | MHC-Präzipitation .....  | 90         |
| 3.5.6.1    | Herstellung und Vorbereitung des Zellpellet .....                  | 90         |
| 3.5.6.2    | Koppeln von Antikörper an Sepharose .....                          | 92         |
| 3.5.6.3    | Vorbereiten der Säule.....   | 92         |
| 3.5.6.4    | Herauslösen von Peptid-MHC-Komplexen .....                         | 93         |
| 3.5.6.5    | C18-Zip-Tip-Entsalzung von Peptiden .....                          | 94         |
| <b>4</b>   | <b>ERGEBNISSE .....</b>  | <b>97</b>  |
| <b>4.1</b> | <b>Linearisierung von DNA für die Transfektion.....</b>            | <b>97</b>  |
| <b>4.2</b> | <b>Transfektion von Sp2/0 Zellen mit DLA-88*50101.....</b>         | <b>98</b>  |
| 4.2.1      | Auswählen eines geeigneten Programms am Nukleofektor.....          | 98         |
| 4.2.2      | Transfektion von Sp2/0 Zellen .....                                | 99         |
| 4.2.3      | Expression von DLA-88 auf transfizierten Sp2/0 Zellen.....         | 100        |
| 4.2.4      | Bestimmung der Anzahl an MHC-Molekülen auf transfizierten Zellen.. | 103        |
| <b>4.3</b> | <b>Immunisierung von BALB/c Mäusen.....</b>                        | <b>104</b> |
| 4.3.1      | Nachweis der Immunreaktion im Serum von BALB/c Mäusen .....        | 106        |
| <b>4.4</b> | <b>Nachweis von MHC-Fragmenten im Western Blot .....</b>           | <b>111</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Nachweis von DLA spezifischen Antikörpern aus Fusion 1.....</b> | <b>112</b> |
| 4.5.1      | Durchflusszytometrie der Hybridomaüberstände.....                  | 112        |
| 4.5.2      | Immunpräzipitation von Hybridomaüberständen.....                   | 113        |
| <b>4.6</b> | <b>Nachweis von DLA spezifischen Antikörpern aus Fusion 2.....</b> | <b>114</b> |
| 4.6.1      | Durchflusszytometrie der Hybridomaüberstände.....                  | 114        |
| 4.6.2      | Immunpräzipitation von Hybridomaüberständen.....                   | 115        |
| 4.6.3      | Western Blot und Immunpräzipitation von 12.C8F6 .....              | 116        |
| 4.6.4      | Isotypbestimmung von 12.C8F6 .....                                 | 118        |
| 4.6.5      | Konzentrationsbestimmung des Antikörpers 12.C8F6 .....             | 118        |
| 4.6.6      | Bindekapazität des Antikörpers 12.C8F6.....                        | 118        |
| <b>4.7</b> | <b>Nachweis von DLA spezifischen Antikörpern aus Fusion 3.....</b> | <b>119</b> |
| 4.7.1      | Durchflusszytometrie der Hybridomaüberstände.....                  | 119        |

|       |  |            |
|-------|--|------------|
| 4.7.2 | Immunpräzipitation von Hybridomaüberständen.....             | 120        |
| 4.8   | <b>Nachweis von Peptiden aus der MHC-Präzipitation .....</b> | <b>122</b> |
| 5     | <b>DISKUSSION .....</b>                                      | <b>125</b> |
| 5.1   | <b>Immunreaktionen der Mäuse.....</b>                        | <b>128</b> |
| 5.2   | <b>Fusionen .....</b>  | <b>131</b> |
| 5.3   | <b>Biochemische Untersuchungen .....</b>                     | <b>132</b> |
| 5.4   | <b>Antikörper 12.C8F6 .....</b>                              | <b>133</b> |
| 5.5   | <b>MHC-Präzipitation .....</b>                               | <b>134</b> |
|       | <b>AUSBLICK.....</b>   | <b>137</b> |
|       | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                 | <b>139</b> |
|       | <b>SUMMARY .....</b>   | <b>141</b> |
|       | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>                            | <b>143</b> |
|       | <b>ANHANG .....</b>  | <b>157</b> |
|       | <b>DANKSAGUNG.....</b>                                       | <b>161</b> |





# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Immunsystem

Jedes Lebewesen besitzt einen Schutzmechanismus, um sich gegen das Eindringen von Krankheitserregern und Fremdstoffen zu wehren. Das Immunsystem stellt den Schutzmechanismus, das biologische Abwehrsystem, von höheren Lebewesen dar. Es erkennt in den Organismus eingedrungene Antigene und entartete Zellen, wodurch wirksame Abwehrmaßnahmen eingeleitet werden. Dabei ist es wichtig, dass zwischen körpereigenen und potentiell gefährlichen, körperfremden Stoffen unterschieden werden kann. Dies ist essentiell, damit keine Autoimmunerkrankungen ausgebildet werden und eine Regulation der Abwehrmechanismen besteht, um eine ziellose Zellzerstörung zu verhindern (1).

Das Immunsystem der höheren Wirbeltiere besteht aus zwei Teilen, dem angeboren und dem anpassungsfähigen, auch adaptives Immunsystem genannt (2).

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

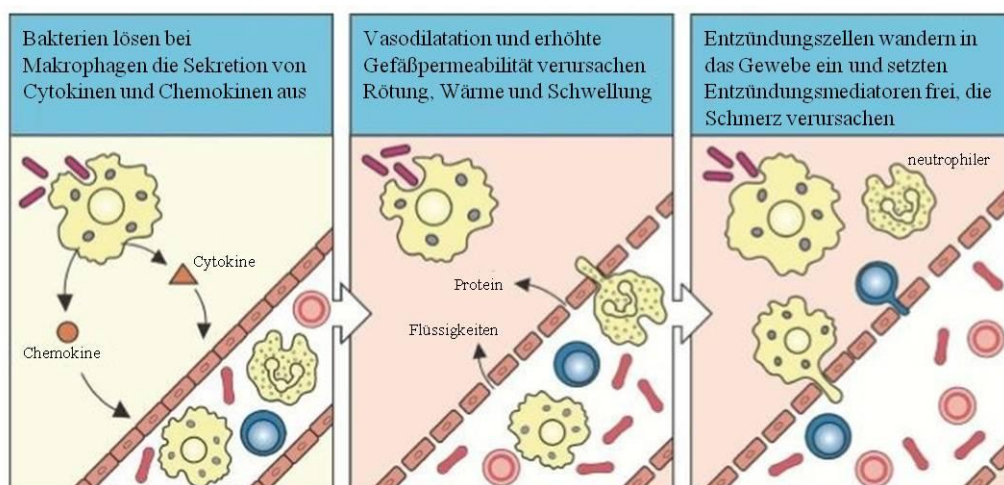
Zu den ersten Bestandteilen der angeborenen Immunität zählen die mechanischen, chemischen und mikrobiologischen Barrieren unseres Körpers. Dies sind beispielsweise die Haut, Bindehaut, das respiratorische Epithel sowie Magen- und Darmschleimhaut. Durch ihre engen Zellkontakte, den „*tight junctions*“ verhindern sie nicht nur das Eindringen von Erregern, sondern können diese auch aktiv bekämpfen (3). Durch den sauren pH-Wert der Magensäure oder den sezernierten Enzymen und Peptiden des Darm- und Flimmerepithels können Mikroorganismen abgetötet werden.

Wird die Barriere von einem Erreger überwunden, kann dieser in das Gewebe eindringen. Dort erkennen Makrophagen den Mikroorganismus über Mustererkennungsrezeptoren („*pattern recognition receptors*“, PRR). Auch neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen besitzen diese Rezeptoren. Auf der Oberfläche von Mikroorganismen befinden sich pathogen spezifische Zielstrukturen, die „*pathogen-associated patterns*“ (PAMPs).

Diese Zielstrukturen können Zellbestandteile wie Lipopolysaccharide oder  $\beta$ -Glukane von Bakterien sein, aber auch DNA oder Hüllproteine von Viren und sezernierte Moleküle von Parasiten. PAMPs sind nur auf Mikroorganismen und nicht auf körpereigenen Zellen zu finden, so dass zwischen körpereigenen und nicht körpereigenen Antigenen unterschieden werden kann.

Nachdem der Erreger über PRR und PAMPs erkannt wurde, wird dieser phagozytiert, wodurch er abgetötet wird. Gleichzeitig setzen die Makrophagen Cytokine und Chemokine frei, wodurch andere Zellen des angeborenen Immunsystems aus dem Blut angelockt werden. Hierzu gehören Granulozyten, Monozyten und Mastzellen. Granulozyten werden in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt, zählen zu den Leukozyten und sind polymorphkernig. Neutrophile Granulozyten können einen Erreger mittels Phagozytose abtöten. Eosinophile Granulozyten und basophile Granulozyten hingegen, setzen Substanzen wie zytotoxische granuläre Proteine frei. Sie haben zusammen mit den Mastzellen ihre Hauptaufgabe im Bereich der allergischen Entzündung (4).

Für die Inflammation (Entzündung) des Gewebes sind die freigesetzten Proteine der Makrophagen verantwortlich. Cytokine sorgen dafür, dass das Gefäßendothel durchlässig wird. Angelockt durch Chemokine, können so die oben genannten Zellen aus dem Blut in das Gewebe eindringen und den Erreger bekämpfen (siehe Abbildung 1). Die Monozyten entwickeln sich dabei zu Makrophagen.



**Abbildung 1: Darstellung einer Entzündungsreaktion im Gewebe.**

Durch Bakterien werden Makrophagen aktiviert und sezernieren Cytokine und Chemokine. Durch Cytokine wird das Gefäßendothel durchlässig, die durch Chemokine angelockten Zellen können passieren und in das Gewebe eindringen. Quelle: (5) modifiziert von L.Lumpp.

Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) zerstören infizierte oder entartete Zellen durch die Aktivierung von Rezeptoren auf der NK-Zelloberfläche. Zusätzlich werden NK-Zellen durch Cytokine (z. B. Interleukin 12 und Typ I-Interferone) aktiviert, welche Produkte von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen sind. Als Reaktion auf diese Aktivierungsreize sezernieren NK-Zellen Cytokine und Chemokine und lysieren Zielzellen (6).

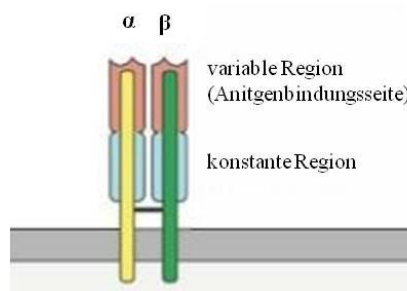
Im Gewebe befinden sich auch unreife dendritische Zellen (DCs). Sie gehen hauptsächlich aus einer myeloiden Vorläuferzelle im Knochenmark hervor. Es gibt allerdings auch Unterklassen, die lymphatische Vorläuferzellen haben. Unreife DCs nehmen Antigene mittels Phagozytose und Makropinozytose auf. Wenn das aufgenommene Material Krankheitserreger enthält, wird dies von den Rezeptoren der Zelle erkannt. Daraufhin erfolgt die Entwicklung zu einer reifen dendritischen Zelle. Diese wandern über afferente Lymphgefäße in die gewebnahen Lymphknoten ein und treffen dort auf naive T-Zellen, welche zur adaptiven Immunantwort gezählt werden (7). Sie nehmen somit eine Schlüsselrolle in der Immunantwort, als Brücke der angeborenen und adaptiven Immunantwort ein. Erreichen die DCs die lymphatischen Organe (z. B. einen Lymphknoten) agieren sie dort als Antigenpräsentierende Zelle (APC). Über die Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II („*major histocompatibility complex*“, MHC), auf ihrer Oberfläche exprimieren sie Bruchstücke des aufgenommenen Fremdmaterials, so genannte Peptide.

### 1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Zum adaptiven Immunsystem gehören die Lymphozyten, sie lassen sich in zwei Haupttypen einteilen, darunter zählen die T-Lymphozyten und die B-Lymphozyten. Beide Zelltypen haben ihren Ursprung aus pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark.

Die Vorläufer der T-Lymphozyten reifen im Thymus heran und gelangen anschließend, wie die B-Zellen, als naive T-Zelle ins Blut (8). Nur 4 % der Lymphozyten sind im Blut verteilt, die meisten sind mit 70 % in lymphatischen Organen zu finden, 10 % im Knochenmark und der Rest in anderen Organen (9). Über MHC-Klasse-I reifen sie zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oder über MHC-Klasse-II zu CD4<sup>+</sup>-T-Zellen heran. Sie exprimieren T-Zell-Rezeptoren (TCRs) einer bestimmten Spezifität auf ihrer Oberfläche (siehe Abbildung 2).

Trifft eine solche T-Zelle auf eine APC, wird die T-Zelle stimuliert und exprimiert einen zum TCR passenden Peptid-MHC-Liganden. Dieser Vorgang wird als „Priming“ bezeichnet (siehe Abbildung 3).



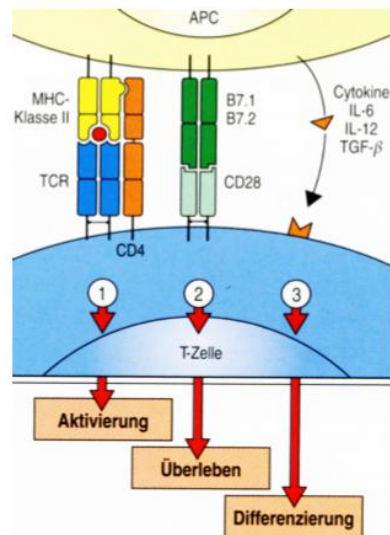
**Abbildung 2: Schema eines T-Zell-Rezeptors (TCR).**

Der T-Zell Rezeptor besteht aus zwei Polypeptidketten ( $\alpha$  und  $\beta$ ). Er wird in eine variable Region, welche die Antigenbindungsseite darstellt und eine konstante Region unterteilt.

Quelle: (5) modifiziert von L.Lumpp.

Um die T-Zelle vollständig aktivieren zu können, müssen drei Voraussetzungen gegeben sein (siehe Abbildung 3). Als erstes muss der TCR der T-Zelle zusammen mit den Co-Rezeptoren CD4 oder CD8 an den MHC-Komplex der APC binden. Dann muss eine Co-Stimulation durch Moleküle wie B7 stattfinden, indem sie an Liganden z. B. CD28 auf der T-Zelle binden. Als letztes erfolgt die Ausschüttung von Cytokinen wie Interleukin-6 oder -12, die von der APC sezerniert werden.

Nur bei Vorhandensein aller drei Signale, wird bei der T-Zelle die Proliferation und Differenzierung ausgelöst. Dadurch werden verschiedene T-Effektor-Tochterzellen gebildet, diese können T-Helfer-, Gedächtnis-, Regulator- oder zytotoxische T-Zellen (CTL) sein. Die zytotoxischen  $CD8^+$ -T-Zellen erkennen MHC-Klasse-I-Moleküle. Sie präsentieren vor allem Peptide von Erregern wie Viren oder extrazelluläre Selbst-Antigene (10) (11). Die betroffenen exprimierenden MHC-Klasse-I Zellen werden anschließend von der CTL abgetötet (siehe Abbildung 8).



### Abbildung 3: T-Zell Priming.

Die Interaktion zwischen der Antigenpräsentierenden Zelle (APC) und der T-Zelle, erfolgt über drei verschiedene Signalwege. Nur bei Vorhandensein aller Wege, kann die T-Zelle sich differenzieren. Als erstes muss der T-Zell-Rezeptor (TCR) an den MHC-Klasse-II-Komplex binden, dies geschieht mit Hilfe des Co-Rezeptors CD4. Anschließend wird durch Moleküle wie B7 eine Co-Stimulation ausgelöst, indem diese an CD28 binden. Als letztes erfolgt die Ausschüttung von Cytokinen durch die APC. Nun wird bei der T-Zelle die Differenzierung ausgelöst. Quelle: (5) modifiziert von L.Lumpp.

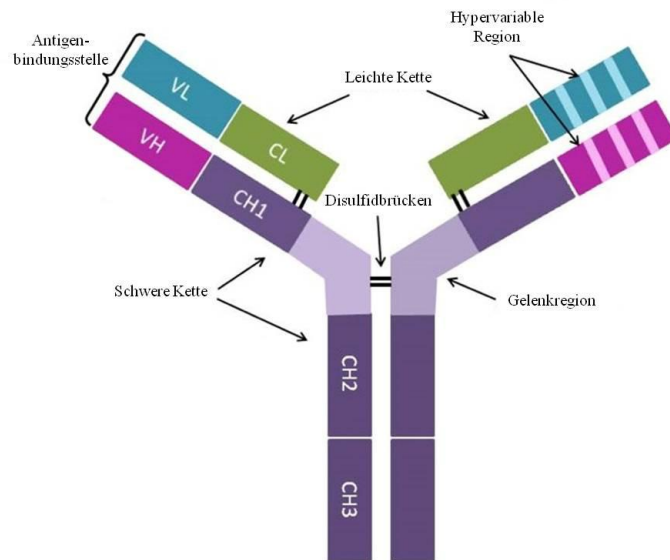
Da diese Art der adaptiven Immunantwort vor allem auf zellulärer Ebene abläuft, wird sie auch zelluläre Immunantwort genannt.

Die naiven  $CD4^+$ -T-Zellen differenzieren sich unter anderem zu  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen. Diese beiden T-Helferzellen unterstützen und aktivieren die B-Zellen, welche sich daraufhin zu Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen entwickeln. Der B-Zell-Rezeptor (BCR) muss dafür das gleiche Antigen erkennen können wie der TCR. Die so entstehenden Plasmazellen sezernieren ihre BCRs als Antikörper ins Blut. B-Zellen dienen somit der humoralen Abwehr, über Aktivierung durch Antigene, Umwandlung zu Plasmazellen und Produktion spezifischer Antikörper. Plasmazellen produzieren Antikörper, die ins Blut abgegeben werden.

Je öfter ein Antigenkontakt stattfindet, desto höher ist der Antikörpertiter im Blut. Gedächtniszellen zirkulieren monatelang oder sind in lymphatischen Geweben ortsständig. Auch hier führt ein erneuter Antigenkontakt zu einer starken Zellproliferation und somit zu einer raschen Immunreaktion (9).

### 1.1.3 Antikörper

Antikörper sind Immunglobuline (Glykoproteine). Sie bestehen aus 4 Ketten, jeweils aus zwei leichten und zwei schweren Ketten (9). Jede Kette besteht aus sogenannten Domänen, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Leichte Ketten besitzen eine Domäne  $C_L$ , schwere Ketten besitzen vier Domänen  $C_H$ . Über die C Typen der schweren Kette, werden die Immunglobuline ihren Klassen zugeteilt. Die einzelnen Immunglobuline unterscheiden sich in Aminosäuresequenzen und Kohlenhydratanteilen. Die häufigste Isoform ist IgG (12). Sie wird in drei konstante Regionen ( $C_{H\ 1-3}$ ) und eine variable Region ( $V_H$ ) unterteilt. Die leichten Ketten bestehen aus nur einer konstanten ( $C_L$ ) und einer variablen Region ( $V_L$ ) (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des IgG Antikörperaufbaus.**

Jeder Antikörper besteht aus 4 Ketten, zwei leichten Ketten ( $C_L$ ) und zwei schweren Ketten ( $C_H$ ). Jede Kette besteht aus sogenannten Domänen, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Anhand der C Typen der schweren Kette, werden die Immunglobuline in ihre Klassen unterteilt. Die schweren Ketten werden in drei konstante Regionen ( $C_{H\ 1-3}$ ) und eine variable Region ( $V_H$ ) unterteilt. Die leichten Ketten bestehen nur aus einer konstanten ( $C_L$ ) und einer variablen Region ( $V_L$ ). Die Antigenbindungsseite wird von der  $V_L$  der leichten Kette und der  $V_H$  der schweren Kette gebildet. Quelle: (13).

In der Röntgenstrukturanalyse ist der Antikörper als Y-förmige Struktur zu erkennen. Die Enden der beiden Arme des Y (Fab-Fragment, *antigen-binding fragment*) bilden die Antigenbindungsstellen. Das Bein (Fc-Fragment, *crystallisable fragment*) bestimmt die Effektorwirkung des Antikörpers. Durch die Bindung an einen Erreger können sie diesen durch Makrophagen oder das Komplementsystem zerstören lassen.

Nach dem Aufbau der schweren Kette werden 5 Klassen unterschieden (9).

### IgG

IgG machen 80 % der Immunglobuline im Plasma aus. Durch das relativ geringe Molekulargewicht (150 kDa) kann es beim Hund, der Katze und dem Menschen auch die Plazentaschranke passieren und bietet somit einen Infektionsschutz für Neugeborene. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Komplementsystems und der Opsonierung (Markierung bestimmter Mikroorganismen durch Antikörper). Das Komplementsystem ist ein Teil des unspezifischen humoralen Immunsystems, welches zur Eliminierung von zellulären Antigenen, z. B. Bakterien, beiträgt. IgG bindet Antigene und erleichtert somit die Phagozytose.

Es gibt vier Subklassen, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> und IgG<sub>4</sub>. Sie unterscheiden sich in ihrem konstanten Bereich, insbesondere in ihren Gelenken und den C<sub>H</sub>2-Domänen (14).

### IgM

IgM sind die größten Antikörpermoleküle im Blut und bestehen aus fünf Untereinheiten, die mit Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Sie machen 7-10 % der Gesamtglobuline aus. Zu ihren Aufgaben gehören die Neutralisation von Fremdkörpern (abgestorbene Zellen und Bakterien), Agglutination und die Komplementaktivierung. Dieser Antikörper wird bei erstmaligem Kontakt mit einem bestimmten Krankheitserreger produziert.

### IgA

IgA kommen im Plasma als Monomere und im Sekret als Dimere vor. Zu den Aufgaben gehören die lokale Abwehr an Schleimhäuten, die Komplementaktivierung und der Infektionsschutz am Gastrointestinaltrakt. Sie werden mit Speichel-, Bronchial-, Magen- und Darmsekreten abgegeben.



### IgE

IgE sind mit dem Fc-Fragment an die Oberflächenrezeptoren von basophilen Granulozyten und Mastzellen gebunden. Sie kommen bei anaphylaktischen und allergischen Reaktionen zum Einsatz und setzen vasoaktive Stoffe wie Histamin frei, was zu einer typischen allergischen Reaktion führt.

### IgD

IgD dienen als Bestandteile der B-Lymphozytenmembran und haben ihre Aufgabe in der Antigenerkennung. Sie kommen nur beim Mensch vor.

#### **1.1.3.1 Immunreaktion und Herstellung monoklonaler Antikörper**

Ein monoklonaler Antikörper ist ein Immunglobulin, welches von einem einzigen B-Zell-Klon produziert wird.

Die Hybridomtechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurde im Jahr 1975 von Georges Köhler und Cesar Milstein etabliert (15). Ihnen wurde dafür 1984 der Nobelpreis verliehen. Sie macht sich die Immunreaktion von Mäusen für eine Antikörpergewinnung zu nutzen.

Die erste Beschreibung von einer Immunreaktion, stammte von Edward Jenner aus dem Jahr 1798. Dieser berichtete über eine „Impfung“ mit Kuhpocken bei einem Jungen, wodurch dieser auch gegen die Menschenpocken immun geworden war. Daher leitet sich auch der Name Vakzination (=Impfung) ab, aus dem lateinischen Wort für Kuh, „*vacca*“. Es gelang dadurch die Pocken weltweit auszurotten (15).

Eine Immunreaktion ist eine Kombination aus humoralen und zellulären Mechanismen. Bei einem ersten Antigenkontakt wird die Primärreaktion eingeleitet. Es kommt zur Bildung von T- und B-Gedächtniszellen. Jeder weitere Kontakt löst eine sehr viel schnellere und stärkere Sekundärreaktion aus, da die Gedächtniszellen sofort mit der Antikörperproduktion beginnen können. Die Antigene werden durch Antikörper neutralisiert. Wird der Organismus bei einer aktiven Immunisierung mit einer geringen Menge eines Antigens (abgetötete, in ihrer Virulenz abgeschwächte oder lebende Antigene) konfrontiert, wird eine Primärreaktion mit Antikörperbildung eingeleitet. Eine wiederholte Exposition des gleichen Fremdstoffes, führt in der Regel zu einer verstärkten Abwehrreaktion des Organismus und zu einer erhöhten Antikörperproduktion (9).

Das Protein, gegen das ein Antikörper produziert werden soll, wird in eine Maus injiziert (siehe Abbildung 5). Es kann ein Adjuvans genutzt werden, um die Immunreaktion zu verstärken, denn dadurch wird eine starke, unspezifische Immunreaktion ausgelöst. Anschließend werden vermehrt B-Zellen aktiviert, die sich in der Milz anreichern. Einige B-Zellen produzieren spezifische Antikörper, gegen das injizierte Antigen. Durch Entnahme der Milz können Milzzellen mit Myelomazellen fusioniert werden. Durch die Fusion entsteht eine unsterbliche Hybridomzelle, welche dauerhaft kultivierbar ist und Antikörper produziert. Die Hybridomzellen können selektiert werden und auf ihre Spezifität gegenüber dem gewählten Antigen getestet werden.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Herstellung eines monoklonalen Antikörpers.**

Der Maus wird mehrmals ein Antigen injiziert, gegen welches ein Antikörper gebildet werden soll. Nach ausreichender Immunisierung, wird die Milz entnommen und deren Zellen mit Hilfe von Polyethylenglykol mit Myelomazellen (P3X63Ag8 Zellen) fusioniert. Die fusionierte Zelle aus B-Lymphozyt und Myelomazelle wird Hybridomzelle genannt. Diese ist unsterblich und somit kultivierbar. Hybridomzellen sezernieren Antikörper. Quelle: (16) modifiziert von L.Lumpp.

Für die Selektion von Hybridomzellen, wird HAT Zellkulturmedium eingesetzt. Das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) ist am Purinstoffwechsel beteiligt. Es ist in der Lage, in Gegenwart von Aminopterin die Substanzen Hypoxanthin und Thymidin umzuwandeln. Diese werden für die Biosynthese der DNA benötigt. Nur die B-Lymphozyten besitzen das Enzym HGPRT, weshalb sie im HAT Zellkulturmedium überleben können. Plasmazellen sind allerdings nicht unbegrenzt überlebensfähig. Myelomazellen eignen sich als Fusionspartner, da diese dauerhaft kultiviert werden können. Ihnen fehlt das Enzym HGPRT und sie können deshalb nicht im HAT Zellkulturmedium überleben. Somit können in diesem Selektionsmedium nur Zellen überleben, die Eigenschaften beider Zelllinien besitzen.

Monoklonale Antikörper finden in der Forschung für viele verschiedene biochemische Methoden Verwendung, wie z. B. Western Blot, Immunpräzipitation und FACS-Analysen (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). Sie können aber auch direkt in der Medizin als therapeutische Antikörper eingesetzt werden (17) (18) (19).

## 1.2 MHC-Moleküle

T-Zellen können mittels TCR spezifische Antigene, die von MHC-Molekülen auf körpereigenen Zellen präsentiert werden, erkennen (11). Die MHC-Restriktion der Antigenerkennung durch T-Zellen, wurde 1973 von Rolf Zinkernagel und Peter Doherty erforscht (15). Die Gene des Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) wurde erstmals bei Transplantationen von Geweben bei Mäusen entdeckt, da sie für die Abstoßungsreaktion des Gewebes verantwortlich sind (20). Die von ihnen codierten Proteine auf den Zelloberflächen sind die caninen Leukozytenantigene. Die genomische Region des caninen MHC wird deshalb als DLA (*dog leukocyte antigen*) bezeichnet.

Fast alle Zellen im Körper von Mensch und Hund können Antigene präsentieren. Hierzu haben diese auf ihrer Oberfläche MHC-Moleküle. Diese sind membranständige, auf der Zelloberfläche vorkommende Glykoproteine. Sie binden unterschiedlich lange Peptide, die über Ankerpositionen mit dem Molekül interagieren. Jedes MHC-Molekül kann nur Peptide mit bestimmten Ankeraminosäuren binden, daher sind die MHC-Moleküle extrem polymorph.

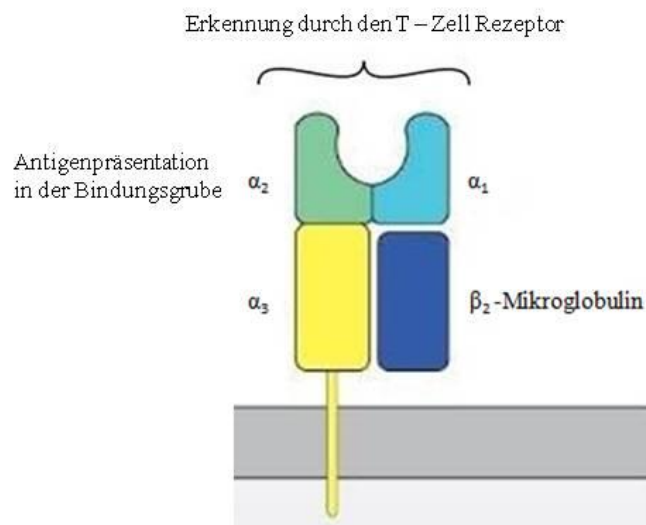
Die MHC-Gene des Menschen sind auf Chromosom 6 lokalisiert (21) und bei Hunden auf Chromosom 12 (22). Sie codieren für drei Klassen von MHC-Molekülen (23), wobei MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II für die Antigenpräsentation zuständig sind. MHC-Klasse-III-Gene codieren für Proteine mit vielen verschiedenen Funktionen. Einige davon sind auch wichtig für die Verteidigung des Körpers (24). Ende der 80er Jahre wurden die caninen MHC-Gene in DLA-Klasse-I und DLA-Klasse-II eingeteilt (25)

### 1.2.1 MHC-Klasse-I-Moleküle

CD8<sup>+</sup>-T-Zellen können anhand der Antigene, welche von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, Tumorzellen und Körperzellen die mit intrazellulären Pathogenen infiziert sind, erkennen. Sie setzen daraufhin Perforin und Granzyme frei und lösen die Apoptose der Zelle aus.

MHC-Klasse-I-Moleküle sind Heterodimere und bestehen aus einer 45 kDa schweren  $\alpha$ -Kette, diese ist mit dem 12 kDa leichten  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2$ M) nicht-kovalent verbunden (26).

Die  $\alpha$ -Kette des MHC-Klasse-I-Komplexes besteht aus drei Domänen, die in den extrazellulären Raum ragen. Das  $\beta_2$ M verleiht dem Komplex Stabilität (siehe Abbildung 6), ist jedoch nicht im MHC-Lokus codiert. Die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne bilden zusammen den peptidbindenden Spalt (siehe Abbildung 6) (24). MHC-Klasse-I-Moleküle binden in diesem Spalt hauptsächlich Peptide, die eine Länge von acht bis zehn Aminosäuren aufweisen. Sie sind über zwei Ankeraminosäuren mit dem DLA verbunden und bilden sogenannte Allel-spezifische Motive (27) (28).



**Abbildung 6: Struktur eines MHC-Klasse-I-Moleküls.**

Ein MHC-Klasse-I-Komplex besteht aus einer  $\alpha$ -Kette und dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2$ M). Die  $\alpha$ -Kette besteht aus drei Domänen, die in den extrazellulären Raum ragen. Das  $\beta_2$ M verleiht dem Komplex Stabilität. Die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ - Domäne bilden zusammen den peptidbindenden Spalt, dieser wird von dem T-Zell Rezeptor erkannt. Quelle: (24) modifiziert von L.Lumpp.

Die MHC-Klasse-I-Gene des Hundes bestehen aus sieben Introns und acht Exons. Das so genannte Startpeptid wird vom ersten Exon codiert. Die  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - und  $\alpha_3$ -Domäne werden hingegen vom zweiten, dritten und vierten Exon codiert. Die Transmembrandomäne wird von den Exons fünf bis sieben und die cytoplasmatischen Bereiche von Exon acht codiert. Die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne sind besonders polymorph und bestehen aus konstanten und drei hypervariablen Regionen (29).

Bisher sind beim Hund sieben Gene bekannt, die für MHC-Klasse-I-Moleküle codieren. Die Gene DLA-88, -12, -64, -12a, 53, und C1pg-26 sind auf Chromosom 12 lokalisiert (22), wohingegen sich das Gen DLA-79 auf Chromosom 18 befindet (30). Da DLA-12a, DLA-53 und C1pg-26 nicht für funktionsfähige MHC-Klasse-I-Moleküle codieren, werden sie auch als Pseudogene bezeichnet (31). Vier MHC-Gene, DLA-12, DLA-64, DLA-79 und DLA-88 codieren für funktionsfähige MHC-Klasse-I-Moleküle.

Die MHC-Klasse-I-Moleküle werden in klassische (MHC-Klasse-Ia-Moleküle) und nicht klassische (MHC-Klasse-Ib) MHC-Moleküle unterteilt. Charakteristisch für MHC-Klasse-Ib-Moleküle sind ein geringer Polymorphismus, eine geringe Expressionsrate sowie strukturelle und funktionelle Besonderheiten (32). Anhand von Untersuchungen zum Polymorphismus der jeweiligen MHC-Klasse-I-Moleküle wurden DLA-12,-64 und-79 als MHC-Klasse-Ib-Gene eingeordnet, da sie einen nur geringen Polymorphismus aufweisen (31) (33). DLA-88 weist einen hohen Polymorphismus auf und wird deshalb als MHC-Klasse-Ia-Gen bezeichnet (33) (34).

Die DLA Nomenklatur wurde 1998 vom Komitee der internationalen Gesellschaft für Tiergenetik (*International Society for Animal Genetics*, ISAG, *DLA Nomenclature Committee*) festgelegt und wurde im Jahre 2000 überarbeitet. Allgemein wurde beschlossen, dass die Allelbezeichnungen aus fünf Ziffern bestehen. Die Ziffern eins bis drei zeigen hierbei den Haupttyp an, der sich über die hypervariablen Regionen in den Exons zwei und drei festlegt. Der Subtyp wird von den Ziffern vier und fünf repräsentiert, der sich durch Varianten in den konstanten Bereichen des zweiten und dritten Exons bestimmen lässt. Alle Allele wurden in aufsteigender Reihenfolge nummeriert, ausgegangen wurde von DLA-88\*00101, welches das erste sequenzierte Allel darstellte (35).

Allele, die an Position 156 eine zusätzliche Aminosäure besitzen, werden beginnend von DLA-88\*50101 gekennzeichnet (36) (37).

### 1.2.1.1 Antigenprozessierung von MHC-Klasse-I-Molekülen

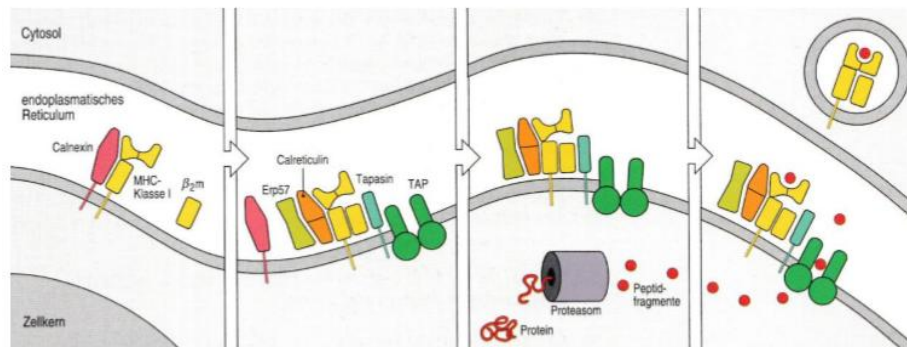
MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren vor allem endogene Peptide aus dem Cytosol und dem Zellkern. Makrophagen und dendritische Zellen können jedoch auch extrazelluläre Peptide auf MHC-Klasse-I-Moleküle binden und somit zytotoxische T-Zellen aktivieren (38).

Dieser Vorgang wird „*Cross-Präsentation*“ genannt. Dadurch sind zytotoxische T-Zellen auch in der Lage, Tumoren und Viren zu erkennen, die keine dendritischen Zellen infizieren (39).

Damit Antigene aus dem Cytosol und dem Zellkern von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden können, müssen diese zunächst in kleinere Peptide zerlegt werden.

Die schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls befindet sich im endoplasmatischen Retikulum (ER). Der peptidbindende Spalt ist nie dem Cytosol ausgesetzt. Peptide die vom Proteasom im Cytosol produziert wurden, müssen für den Zusammenbau deshalb, über den TAP (*transporter associated with antigen processing*) in das ER transportiert werden. Dieser Antigen-Transporter ist ein Heterodimer, das eine Pore durch die Membran des ERs bilden kann (40).

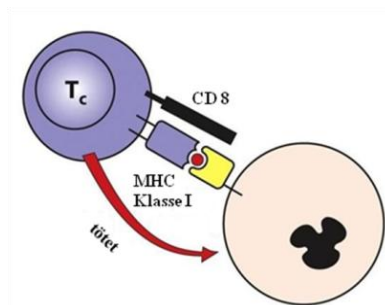
Die synthetisierte MHC-Klasse-I schwere Kette, die in das ER eingeschleust wurde, bindet Calnexin und Calreticulin (41). Dabei sorgt Calnexin für die richtige Faltung der Kette und zusammen mit ERp57 für eine korrekte Oxidation (42). Im darauffolgenden Schritt bindet das  $\beta_2$ -Mikroglobulin, woraufhin Calnexin dissoziiert (43). Anschließend wird die Kette in den Peptidbeladungskomplex integriert. In diesem Komplex interagieren die schwere Kette, Calreticulin, ERp57 und Tapasin, wobei die Chaperone eine Brücke zum TAP bilden (44). So wird die Beladung des MHC-Klasse-I-Moleküls mit einem Peptid aus dem Cytosol möglich (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Antigenprozessierung und Beladung eines MHC-Klasse-I-Moleküls.**

Diese Vorgänge finden im endoplasmatischen Retikulum statt. Die schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls wird über Calnexin und Calreticulin gebunden. Danach kann das β<sub>2</sub>M binden und das Molekül beladen werden. Der fertige Komplex wird anschließend über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Quelle: (45).

Für die Peptidprozessierung werden bestimmte intrazelluläre Proteine, durch das Proteasom, einem multikatalytischen Proteasekomplex, degradiert. Die so entstehenden Peptide werden über den TAP in das ER eingeschleust. Dort binden sie an das partiell gefaltete MHC-Klasse-I-Molekül, das mit dem β<sub>2</sub>-Mikroglobulin gebunden ist. Nun ist der Komplex vollständig, die Chaperone lösen sich und der Komplex wird über ein Vesikel, über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche gebracht. Dort kann eine CD8<sup>+</sup>-T-Zelle, die einen spezifischen TCR besitzt, den Antigen-MHC-Klasse-I-Komplex erkennen und die Zielzelle abtöten (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Zytotoxische T-Zelle erkennt MHC-Klasse-I-Komplex.**

Erkennung eines Peptids durch eine zytotoxische T-Zelle, welches von einem MHC-Klasse-I-Molekül präsentiert wird. Diese kann daraufhin infizierte Zellen, welche ein fremdes Antigen präsentieren, über Induktion der Apoptose abtöten. Quelle: (5) modifiziert von L.Lumpp.

### 1.2.1.2 Diversität von DLA-88 Allelen

Jede MHC-Klasse zeichnet sich durch das Vorkommen verschiedener Allele aus. Dadurch entsteht eine hohe Variabilität hinsichtlich der Präsentation von Antigenen und der daraus resultierenden zellulären Immunität eines jeden Individuums. Bisher konnten 72 DLA-88 Allele identifiziert werden (34) (35) (46) (47) (48) (49) (50).

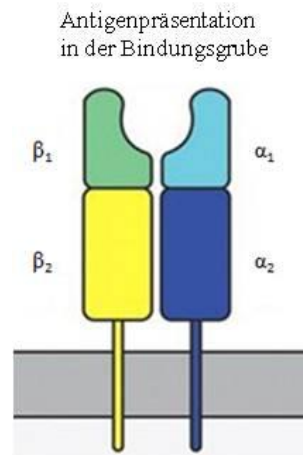
Es wurden bisher 10 Allele bei Golden Retriever (n=47) und Boxer (n=39) identifiziert. Diese Untersuchung sollte Erkenntnisse über die Einschränkung des DLA-88 Polymorphismus innerhalb einer Rasse geben (51). Bei beiden Rassen wurden DLA-88\*00501, DLA-88\*05101, DLA-88\*50101 und DLA-88\*50801 identifiziert. DLA-88\*03401 (50,6 %) trat ausschließlich bei Boxern auf, während DLA-88\*05101 (27,1 %) und DLA-88\*50801 (31,9 %) beim Golden Retriever dominierten. Auf diese Analysen konnten nachfolgende Studien aufbauen. Dabei rückte DLA-88\*50801 in den Fokus, um canine MHC-Klasse-I-Moleküle zu charakterisieren und ein genaueres Verständnis für deren Präsentation von Antigenen zu erhalten (52) (53).

### 1.2.2 MHC-Klasse-II-Moleküle

Diese Moleküle werden von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen Antigene die von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden und differenzieren sich zu weiteren Subpopulationen aus.

Die MHC-Klasse-II-Moleküle bestehen aus zwei Transmembranproteinketten,  $\alpha$  und  $\beta$ . Diese bestehen aus jeweils zwei Proteindomänen (siehe Abbildung 9) (24). Die beiden äußeren Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten bilden zusammen den peptidbindenden Spalt. Dieser Spalt besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices, zwischen denen das Peptid an verschiedenen Ankerpositionen gebunden werden kann. Aminosäuren die 18 bis 20 Aminosäuren aufweisen, haben die höchste MHC-Klasse-II-Affinität (54). Die Länge der gebundenen Peptide ist aber nicht beschränkt. MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren vor allem exogene und membranständige Antigene. Sie können allerdings auch durch Makroautophagie einige bakterielle und virale Antigene, die normalerweise endogenen Ursprungs sind, präsentieren (55).





**Abbildung 9: Struktur eines MHC-Klasse-II-Moleküls.**

Ein MHC-Klasse-II-Molekül besteht aus zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domänen. Diese bestehen aus jeweils zwei Proteindomänen. Die beiden äußeren Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten bilden zusammen den peptidbindenden Spalt. Quelle: (24) modifiziert von L.Lumpp.

Die MHC-Klasse-II-Moleküle werden beim Hund in die Subklassen DLA-DRA, -DRB, -DQA und -DQB unterteilt, viele sind hochpolymorph. Es wurden 62 DRB1, 21 DQA1 und 48 DQB1 Allele identifiziert. Einige Klasse-II-Haplotypen scheinen für bestimmte Rassen charakteristisch zu sein, während die Variationen zwischen den Rassen groß sind (24).

## 1.3 Tumorerkrankungen

### 1.3.1 Tumorpathologie und Tumorimmunologie

Der Begriff Tumor bezeichnet im weiteren Sinne eine Schwellung, Wucherung oder Geschwulst. Im engeren Sinne versteht man unter einem Tumor eine Neubildung von Körpergewebe, die durch Fehlregulation des Zellwachstums entsteht, auch Neoplasie (griechisch: Neubildung) genannt (56).

Der britische Pathologe Rupert Willis definierte 1952 den Begriff Neoplasie: „Eine Neoplasie ist eine abnorme Gewebemasse, deren Wachstum das Wachstum normalen Gewebes übersteigt, unkoordiniert verläuft und persistiert, auch wenn der das Wachstum auslösende Stimulus verschwindet“ (57).

Die Dignität eines Tumors wird in benigne (=gutartig) und maligne (=böartig) eingeteilt. Tumoren entstehen aufgrund von Genmutationen. Gendefekte entstehen ständig und zufällig verteilt im codierenden und nicht codierenden Teil des Genoms. Als Ursache kommen verschiedene exogene und endogene Faktoren in Frage. Diese wirken auf die Initiation und Promotion der Tumorentstehung ein. Dass ein Tumor sich klinisch manifestiert, hängt von dem Mechanismus der Karzinogenität der Faktoren ab, deren Dosis, Einwirkdauer, Kombination mit anderen karzinogenen Faktoren sowie Resistenzmechanismen des Organismus (58). Co-Karzinogen für Papillome ist zum Beispiel das Adlerfarn (*Pteridium aquilium*). Auch UV-Licht ist als Co-Karzinogen beim Plattenepithelkarzinom des Rindes bekannt (58).

Neoplastische Zellen präsentieren auf ihrer Oberfläche veränderte Antigene, die ihre Erkennung durch T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen erlauben. Dies führt zur effektiven Zerstörung einer großen Zahl laufend entstehender Tumorzellen durch das Immunsystem. Dadurch ist auch zu erklären, dass Patienten mit immunsuppressiven Krankheiten eine deutlich erhöhte Tumorrage aufweisen. Da das Immunsystem einen effektiven Selektionsmechanismus für Tumorzellen darstellt, können nur diejenigen Tumorzellen der heterogenen Tumorzellmasse überleben, die sich effektiv der Immunüberwachung entziehen. Zahlreiche Mechanismen erlauben es den Tumorzellen, einer immunologischen Erkennung zu entgehen oder die angreifenden Immunzellen zu zerstören, z. B. durch Induktion von Apoptose der attackierenden Lymphozyten.

Oft fehlen die Co-stimulierenden Faktoren, was ein „*Priming*“ verhindert und somit auch ein abtöten der Tumorzelle. Tumorzellen weisen häufig auch eine reduzierte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf (58).

Ein maligner Tumor entsteht in vier Phasen. Erst transformiert sich die Zelle, wächst und teilt sich. Dann kommt es zu einer lokalen Invasion mit Metastasierung. Als Malignitätskriterien gelten abnorme Kernmorphologie, Mitosen, zentrale Nekrose, invasives, schlecht begrenztes Wachstum und Metastasierung (histologisch sichtbarer Gefäßeinbruch am Primärtumor). Als Metastasierung bezeichnet man die Verschleppung von abgelösten Tumorzellen vom Ursprungstumor, mit anschließendem an- und weiterwachsen in entfernten Körperregionen. Karzinome metastasieren überwiegend lymphogen, während Sarkome vor allem hämatogen metastasieren (59).

Die Metastasierung erfolgt in zwei Phasen. Zuerst kommt es zu einer Invasion der extrazellulären Matrix. Durch Kohäsionsverlust kommt es zur Auflösung der Zellkontakte. Über Rezeptorbindung kommt es zur Adhäsion an der Basalmembran mit anschließendem Durchbruch. Tumorzellen sezernieren proteolytische Enzyme und es kommt zur aktiven Zerstörung der extrazellulären Matrix durch Proteasen. Anschließend erfolgt die Migration (Auswanderung) über Chemotaxis und rezeptorvermittelte Anheftung. Die zweite Phase besteht aus der vaskulären Verbreitung und Absiedelung der Tumorzellen. Da Tumorzellen auf eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen angewiesen sind, muss eine Kapillarisierung erfolgen. Kollagenhaltige Fibroblasten verleihen dem Tumor ein kollagenhaltiges Stützgerüst. Daraufhin wandern Endothelzellen ein und bilden eine Blutversorgung für den Tumor (58).

Damit sich ein Tumor manifestieren kann, müssen die Tumorsuppressorgene inaktiviert werden. Darunter zählen p53 und das Retinoblastom-Protein. Es sind Gene, deren Produkt das physiologische Zellwachstum hemmend reguliert. Sie sind Gegenspieler der Onkogene (=Anti-Onkogene). Diese wiederum sind Gene welche das autonome Wachstum von Tumorzellen fördern. Ist ihre Aktivität gesteigert so können sie zur Tumorentstehung beitragen. Im Gegenzug gibt es die Proto-Onkogene, welche die Proliferation und Differenzierung in einer normalen Zelle regulieren. Physiologisch aktiv sind sie in Phasen des embryonalen, regenerativen oder adaptiven Wachstums und können durch Mutation zu zellulären Onkogenen werden, dafür reicht eine Mutation aus die dominant ist.

Ein Tumor kann auch Virus-assoziiert sein. Es gibt Onkogene DNA- oder RNA-Viren.

#### Onkogene DNA –Viren:

Herpesviren verursachen beim Geflügel die Mareksche Krankheit. Das Virus der Marekschen Krankheit ist das erste Herpesvirus, für das onkogenes Potenzial nachgewiesen werden konnte. Außerdem ist sie die erste tumorassoziierte Erkrankung, die erfolgreich mit einem Lebendvirusimpfstoff bekämpft wird (60).

Bei jungen Hunden tritt durch die Infektion mit dem Caninen oralen Papillomavirus (COPV) die sogenannte Papillomatose auf (58). Sie kann durch direkten Kontakt zwischen Hunden übertragen werden. Oft kommt es innerhalb von drei Monaten zu einem spontanen Rückgang. Aus Warzenmaterial kann ein Impfstoff für die Therapie hergestellt werden (61).

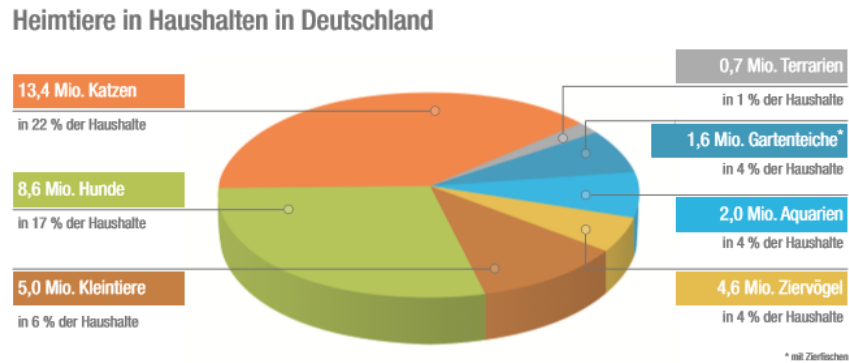
#### Onkogene RNA-Viren:

Defekte Retroviren haben eines ihrer Gene gegen ein Protoonkogen ausgetauscht, es bilden sich Sarkome. Retroviren assoziierte Tumoren sind bekannt als Bovines Leukose Virus (BLV), Ovines Leukose Virus (OVL), Aviäres Leukose Virus (ALV) und Felines Leukose Virus (FeLV) (58).

Als immundefizienten Tumor, kann das Fibrosarkom als der häufigste Tumor adulter Katzen genannt werden. Das feline Sarkomvirus (FeSV) ist eine Mutante des FeLV. Es erkranken überwiegend junge Katzen, prädisponiert sind Vakzinationsstellen (62).

### 1.3.2 Die häufigsten Tumorerkrankungen beim Hund

Es leben 8,6 Mio. Hunde in Deutschland. Der Hund ist somit das zweithäufigste Haustier, das bedeutet, dass in 17 % der Haushalte Hunde leben (63) (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Heimtierhaltung in Deutschland.**

Quelle: (63).

Die Hundehaltung hat sich in den letzten 10 Jahren von 2005 (5,3 Mio.) bis 2015 (7,9 Mio.) um ca. die Hälfte gesteigert. Bis 2016 stieg die Zahl der Hundehaltung in Deutschland auf 8,6 Mio. an (63) (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Hundehaltung in Deutschland.**

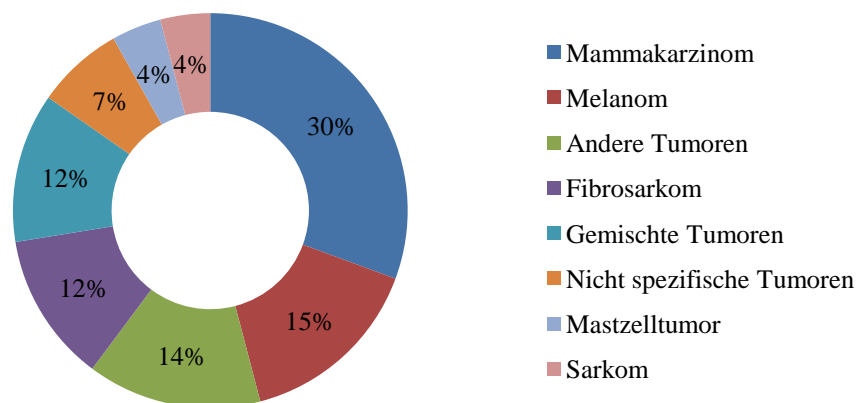
Quelle: (63).

Krebstherapien sind für Hunde immer häufiger von Besitzern gewünscht, weshalb der Hund als Forschungsobjekt für Krebserkrankungen immer weiter in den Vordergrund rückt.

Krebserkrankungen gehören zu einer der häufigsten Todesursachen in unserer Gesellschaft. Im Jahr 2015 starben über 220.000 Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung. Dies machte 25 % der gesamten Todesursachen aus. Es zeigt sich außerdem, dass die Anzahl an Krebserkrankungen innerhalb der letzten Jahre immer weiter ansteigt (64). Auch beim Hund sind gehäuft bestimmte Tumorerkrankungen vorzufinden (siehe Abbildung 12).

Tumorerkrankungen sind stark altersabhängig. Bei Hunden bis zu einem Alter von 3 Jahren liegt die Todesrate durch Tumorerkrankungen bei 20 %, bei einem Alter von über 10 Jahren schon bei 40 %. Bestimmte Tumoren treten besonders häufig in Erscheinung. Häufig ist mit 30 % das Mammakarzinom beim Hund zu finden, dahinter folgt mit 15 % das Melanom (siehe Abbildung 12) (61) (65).

### Häufige Tumorerkrankungen beim Hund



**Abbildung 12: Häufige Tumorerkrankungen beim Hund.**

Quelle: (61).

#### 1.3.2.1 Tumoren der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Körpers und vielen Umwelteinflüssen wie Giftstoffe, UV-Strahlung und Krankheitserreger ausgesetzt, weshalb Tumoren der Haut gehäuft auftreten (siehe Tabelle 1.1). Mit einer Wahrscheinlichkeit von 20-30 % sind Hauttumoren bösartig. Von den Tumoren der Haut ist der Mastzelltumor am häufigsten, er macht 7-21 % aller Hauttumoren aus und ist oft maligne oder potentiell maligne.

Auch das Lipom, ein gutartiger Tumor des Fettgewebes, welches den häufigsten Tumor der Unterhaut darstellt und das kutane Histiocytom sind häufig. Das benigne kutane Histiocytom, ausgehend von der Langerhanszelle der Epidermis, macht 3-15 % aller Hauttumoren aus. Bei Hunden unter 1 J. ist er der häufigste Tumor und macht 90 % der juvenilen Tumoren aus (61). Normalerweise kommt es zu einer spontanen Regression innerhalb von zwei bis drei Monaten, sodass keine Therapie erforderlich ist (66) (67). Als grundsätzliche Mechanismen der Tumorregression zeigte sich eine zu Beginn stattfindende Infiltration mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die von einem Konzentrationsanstieg an T<sub>H</sub>1-Cytokinen (IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ ) begleitet war, die wiederum eine Anlockung von Antitumor-Effektorzellen wie Makrophagen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zur Folge hatte (68). Tumoren der Haaranlagen sind bei juvenilen Hunden unter 1 Jahr der zweithäufigste Tumor, davon ist das Trichoblastom am häufigsten vertreten (61).

Melanome gehen vom Melanozyt aus, der sich im *Stratum basale* der Haut befindet und jede zwanzigste Zelle der Unterhaut ausmacht. Melanome der Haut sind häufig benigne und nur zu 25-50 % maligne, im Bereich der Maulhöhle und an den Zehen sind sie zu 95 % maligne und neigen zur Metastasierung (59) (61) (67).

**Tabelle 1.1: Häufigkeit von ausgewählten Hauttumoren beim Hund**  
Quelle: (61).

| <b>Hauttumoren</b>                     | <b>Häufigkeit</b>               |
|--|---------------------------------|
| Hämangiosarkom                         | 1-2 %, 4 % der Weichteilsarkome |
| Neoplasien der apokrinen Schweißdrüsen | 2 %, davon 40-90 % Karzinome    |
| Keratoakanthom                         | 2-4 %                           |
| Hämangioperizytom                      | 3-4 %, 1/3 der Weichteilsarkome |
| Hämangiom                              | 3,8 %                           |
| Kutanes Histiocytom                    | 3-15 %                          |
| Tumoren der Haaranlagen                | 5 %                             |
| Melanozytäre Tumoren                   | 5-7 %                           |
| Mastzelltumor                          | 7-21 %                          |
| Tumoren der Schweiß-und Talgdrüsen     | 8-10 %                          |
| Weichteilsarkome                       | 10-15 %                         |

### 1.3.2.2 Tumoren der Maulhöhle

Unter den bösartigen Tumoren der Maulschleimhaut kommt am häufigsten das maligne Melanom vor. Nur 2/3 der Tumoren sind dunkel pigmentiert. Amelanotische maligne Melanome sind hochgradig maligne und haben eine schlechte Prognose. Melanome neigen generell zur Metastasierung. Plattenepithelkarzinome stellen den zweithäufigsten bösartigen Tumor der Maulhöhle dar. Sie kommen im Bereich von Gaumen, Zahnfleisch, Zunge und Tonsillen bei älteren Tieren gehäuft vor (61) (59).

### 1.3.2.3 Mammatumoren

Bei der unkastrierten Hündin ist der Mammatumor die häufigste vorgefundene Neoplasie. Die Erkrankung häuft sich ab dem 7. Lebensjahr und zeigt ihren Höhepunkt mit 10-14 Jahren. Dieser Tumor entwickelt sich wahrscheinlich durch hormonelle Imbalancen von exogenem und endogenem Progesteron. Eine Kastration vor der ersten Läufigkeit reduziert das Risiko einer Mammatumorentstehung auf 0,05 % und nach der ersten Läufigkeit auf 8 %. Nach der zweiten Läufigkeit steigt das Risiko auf 26 %. Eine noch spätere Kastration hat keinen hemmenden Einfluss mehr auf die Entstehung dieser Tumoren (59) (61). Hormone, die zur Läufigkeitsunterdrückung verwendet werden, können die Entstehung fördern und zeigen darunter ein über 90 %iges malignes Erscheinungsbild. Milchdrüsentumoren des Hundes sind mit 50-60 % gutartige epitheliale Mammatumoren und bis zu 50 % bösartig. Es kommen überwiegend Karzinome vor, seltener sind Sarkome. Häufiger sind die beiden hinteren Milchdrüsenkomplexe betroffen, als die drei vorderen (59) (61) (67).

Das Mammakarzinom des Hundes weist Ähnlichkeiten zum Brustkrebs des Menschen auf, was tumorassoziierte Entzündung als auch (69), das klinische Bild und die Gemeinsamkeiten auf molekularer Ebene (70) betrifft. Es ist ebenfalls eine starke Ähnlichkeit in der Biologie von Krebs-assoziiertem Stroma des Mammakarzinoms von Hund und Mensch bekannt (71).



#### **1.3.2.4 Tumoren der Bauchhöhlenorgane**

Der Milztumor kommt beim Hund mit 40 % aller abdominalen Tumoren häufig vor. Davon ist das Hämangiosarkom mit 40-60 % aller Milztumoren am häufigsten anzutreffen. Dieser Tumor geht von den Endothelzellen, der Innenauskleidung der Blutgefäße aus, weshalb dieser auch stark zur hämatogenen Metastasierung neigt und Rupturen mit Blutungen in die Bauchhöhle auftreten können. Das Hämangiosarkom macht 7 % aller bösartigen Neoplasien aus. Es ist vor allem bei Hunden im Alter zwischen 9 und 10 Jahren vorzufinden (61) (67).

#### **1.3.2.5 Tumoren des Atmungstraktes**

Karzinome der Nasenhöhle sind beim Hund die häufigsten Tumoren des Atmungstraktes (67).

#### **1.3.2.6 Tumoren des Magen-Darm-Traktes**

Beim Hund machen Magen-Darm-Tumoren, je nach Lokalisation 1–10 % aller Neoplasien aus (72). Tumoren des Dünndarms sind zu 90 % bösartig, auch Tumoren des Magens sind meist maligne, darunter zählen Adenokarzinome, maligne Lymphome und Leiomyosarkome (67).

#### **1.3.2.7 Tumoren des blutbildenden Systems**

Zu den häufigsten Neoplasien des Hundes zählen die Tumoren der Blutzellen und des lymphatischen Gewebes. Der häufigste Tumor des blutbildenden Systems ist das maligne Lymphom, welches von den Lymphozyten ausgeht und eine systemische Krebserkrankung darstellt. Es sind meistens Lymphknoten, Milz und Leber, aber auch Knochenmark und andere Organe betroffen (67).

#### **1.3.2.8 Tumoren des Skelletsystems**

Osteosarkome sind maligne Tumoren des knochenbildenden Bindegewebes, sie machen 85 % bis 90 % aller primären Skelett-Tumoren bei adulten Hunden aus und sind damit die häufigsten Tumoren des Skelettes. Sie zeigen eine hohe Rezidivrate und metastasieren vorwiegend in die Lunge (59). Osteosarkome machen 5-6 % aller bösartigen Tumoren beim Hund aus (61).

### **1.3.3 Rassedispositionen für bestimmte Tumorerkrankungen**

Genetische Defekte und Dispositionen können wesentlichen Einfluss auf die Häufigkeit und die Art von Tumoren in einem Individuum, einer Familie, Zuchtlinie, Rasse oder auch einer ganzen Art nehmen (siehe Tabelle 1.2).

Der autosomal-dominante Erbgang der nodulären Dermatofibrose beim Deutschen Schäferhund, konnte auf einen Vererber mit Spontanmutation, mit einem Defekt im Bhd-Tumorsuppressorgen zurückgeführt werden und durch Zuchthygiene stark eliminiert werden. Der Großteil der genetisch disponiert entstehenden Tumoren unterliegt polygenen Erbgängen, die relevanten Gene sind meist unbekannt (58).

Bestimmte Hunderassen haben ein höheres Risiko an Tumoren zu erkranken als andere (73). So liegt bei Berner Sennenhunden die Tumormortalitätsrate bei 41 % und beim Boxer bei 37 %, beim Cavalier King Charles liegt diese bei nur 5 %. Da einzelne Hunderassen unterschiedliche genetische Pools besitzen, lassen sich Rasseprädispositionen aus den USA nicht immer auf Europa übertragen (61).

**Tabelle 1.2: Beispiele prädisponierter Tumorerkrankungen beim Hund**

Quelle: (59) (61) (74).

| <b>Tumorerkrankung</b>                 | <b>Lokalisation</b>       | <b>Disposition</b>   |
|--|---------------------------|--|
| Basaliome                              | Kopf, Hals                | Hunde zwischen 6-8 J.<br>Cocker Spaniel, Pudel   |
| Basosquamöses Karzinom                 |                           | Hunde zwischen 6-12 J.<br>Scotch Terrier, Englischer Springer, Cocker Spaniel  |
| Benignes kutanes Histiozytom           | Kopf, Ohren, Extremitäten | Junge Hunde unter 4 J.<br>(90 %) Boxer,<br>Dobermann, Pinscher,<br>Bullterrier, Sheltie,<br>Bobtail. Dackel, Cocker Spaniel, Dogge |
| Epuliden                               |                           | Boxer, Bobtails  |
| Fibrosarkome der Maulhöhle             |                           | größere Rassen<br>männliche Hunde  |
| Generalisierte noduläre Dermatofibrose |                           | Deutscher Schäferhund  |
| Gliome                                 |                           | Brachyzephe Rassen<br>unter 5 Jahren<br>Boxer, Bulldoggen,<br>Boston Terrier, Mops   |

|                      |   |   |
|----------------------|---|---|
| Hämangioperizytom    |   | Deutscher Schäferhund,<br>Boxer, Dobermann,<br>Spaniel Rassen, Airedale<br>Terrier, Pudel   |
| Hämangiosarkom       |   | Deutscher Schäferhund,<br>Boxer, Golden Retriever,<br>Berner Sennenhund,<br>adulte Hunde<br>kurzhaarige hellhäutige<br>Rassen (chronische<br>Solarirritation)<br>Greyhound, Whippet,<br>American Pitbull Terrier. |
| Histiozytäres Sarkom |   | Berner Sennenhund,<br>Golden Retriever,<br>Rottweiler   |
| Kutanes Histiozytom  |   | Jüngere Hunde unter 1 J.,<br>Boxer, Dackel, Cocker<br>Spaniel, Dogge, Bobtail   |
| Leiomyom             | Genitalbereich                                  | Boxer   |
| Lipom                | Unterhaut                                       | Ältere Hunde<br>Hündinnen   |
| Malignes Lymphom     |   | Hunde mittleren Alters  |
| Malignes Melanom     |   | Adulte Hunde<br>Dackel, Cocker Spaniel,<br>Pudel<br>Männlich erhöhte Inzidenz   |
| Mastzelltumor        | Extremitäten, Rumpf, Kopf,<br>Anogenitalbereich | Mittelalte Hunde, 9 J.,<br>Boxer, Dackel, Mops,<br>Labrador Retriever,<br>Golden Retriever,<br>Bullterrier, Terrier,<br>Beagle, Schnauzer, Shar<br>Pei, Rhodesian Ridgeback,<br>Weimaraner, Berner<br>Sennenhund  |

|   |   |   |
|---|---|---|
| Osteosarkom                             | großen Rassen 95 % in<br>Extremitäten der lange<br>Röhrenknochen, davon 45-<br>50 % distaler Radius<br>kleine Rassen unter 15kg<br>40 % Femur und Tibia | 6 bis 9 Jahre alte Hunde<br>großwüchsige Rassen<br>Deutscher Schäferhund,<br>Rottweiler, Dogge, Boxer,<br>Bernhardiner, Dobermann,<br>Berner Sennenhund |
| Perinealdrüsentumor                     |   | Rüde  |
| Plattenepithelkarzinom                  | Zehen bei Schnauzer, Pudel  | Wolfsspitz, Schnauzer,<br>Basset, Pudel   |
| Plattenepithelkarzinom der<br>Maulhöhle |   | Ältere Hunde  |
| Prostatatumore                          |   | Ältere Hunde<br>mittelgroße bis große<br>Rassen   |
| Systemische Histiozytose                |   | Berner Sennenhund   |
| Talgdrüsentumor                         | Kopf, Rumpf, Extremitäten   | Cocker Spaniel,<br>Samoyeden, Husky,<br>Pudel, Terrier  |
| Trichoblastom                           |   | Hunde zwischen 4-9 J.<br>Kerry Blue Terrier, Soft<br>Coated Wheaton Terrier,<br>Bichon Frisé  |

### 1.3.4 Therapiemöglichkeiten von Tumorerkrankungen

Aufgrund des gehäuften Auftretens von Tumorerkrankungen beim Hund, wird in diesem Gebiet verstärkt geforscht um neue Therapien zu entwickeln. Die derzeit gebräuchlichsten Therapieansätze sind die chirurgische Entfernung, Bestrahlung und Chemotherapie. Je nach Tumorausprägung werden verschiedene Therapiemöglichkeiten, auch in Kombination angewandt. Die Wahl der Therapie ist vom histologischen Befund und der Lage des Tumors abhängig. Bei einer Chemotherapie werden Substanzen systemisch verabreicht (z. B. Zytostatika wie Doxorubicin). Sie verändern die Vermehrung und die Funktion der Zellen. Diese Substanzen haben aber auch Nebenwirkungen auf Zellen, die ständig der Reproduktion folgen z. B. auf das Knochenmark, welches zuständig ist für die Produktion roter Blutkörperchen, wodurch es zu einem Anämie-Syndrom kommen kann.

Bei der Strahlentherapie werden Krebszellen aufgrund der physikalischen Wirkung von Strahlen auf das Gewebe abgetötet. Dabei werden gesunde Zellen in der Umgebung größtenteils geschützt (75).

Vor vierzig Jahren untersuchten die Veterinär-Onkologen die Möglichkeit, Neoplasien mit einer Antikrebs-Immuntherapie zu behandeln. Leider wurde diese Forschung durch das Fehlen eines detaillierten Verständnisses der Krebsimmunologie behindert. Durch das Verständnis der Krebsimmunologie, das sich in den letzten Jahren entwickelt hat, ist das Interesse an der Antikrebs-Immuntherapie für Hundepatienten wieder in den Vordergrund gerückt (76). Die Immuntherapie von Krebs hat, vor allem in der Humanmedizin, in den vergangenen Jahren erhebliche Fortschritte gemacht, da ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Prinzipien der Tumorbilogie und der Immunologie besteht. Anhand tieferer Einblicke in den Mechanismus der Tumormunologie, kann nun ein therapeutischer Ansatz generiert werden. Grundsätze für eine Immuntherapie bestehen in der Entwicklung und Anwendung von Antikörpern, Cytokinen, Impfstoffen und zellulären Therapien (77). Weitere Fortschritte in der Krebs-Immuntherapie wurden mit der Verwendung von T-Zell-Checkpoint-Inhibitoren, konstruierten T-Zellen, Krebs-Impfstoffen und Anti-B-Zell und -T-Zell-Antikörpern erzielt. Die Inhibition von T-Zell-Kontrollpunkt-Molekülen wie PD-1 und CTLA-4 unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern hat einen bemerkenswerten Erfolg gegenüber fortgeschrittenen Tumoren beim Menschen erzielt. Autologe Krebsvakzine haben krankheitsfreie Intervalle und verbesserte Überlebenszeiten bei Hunden mit Lymphom gezeigt. Darüber hinaus erhielten caninisierte monoklonale Antikörper, die auf CD20 und CD52 zielten, eine Zulassung für die klinische Anwendung bei der Behandlung von B-Zell- und T-Zell-Lymphomen (78).

Ein weiterer vielversprechender Ansatz einer Immuntherapie gegen Krebs, in der Humanmedizin, ist der „Tübingen Approach“ (siehe 1.4). Hierbei wird ein spezifischer Peptidimpfstoff gegen einen Tumor hergestellt, dieser wird dann dem Patienten injiziert. In klinischen Studien beim Menschen zeigten sich damit gute Erfolge (79) (80) (81).

Somit hat sich die Immuntherapie bei Krebs und deren Behandlungsmöglichkeiten in der Veterinärmedizin sowie in der Humanmedizin rasch weiterentwickelt und bietet noch ein weites Feld der Erforschung.

## 1.4 „The Tübingen Approach“

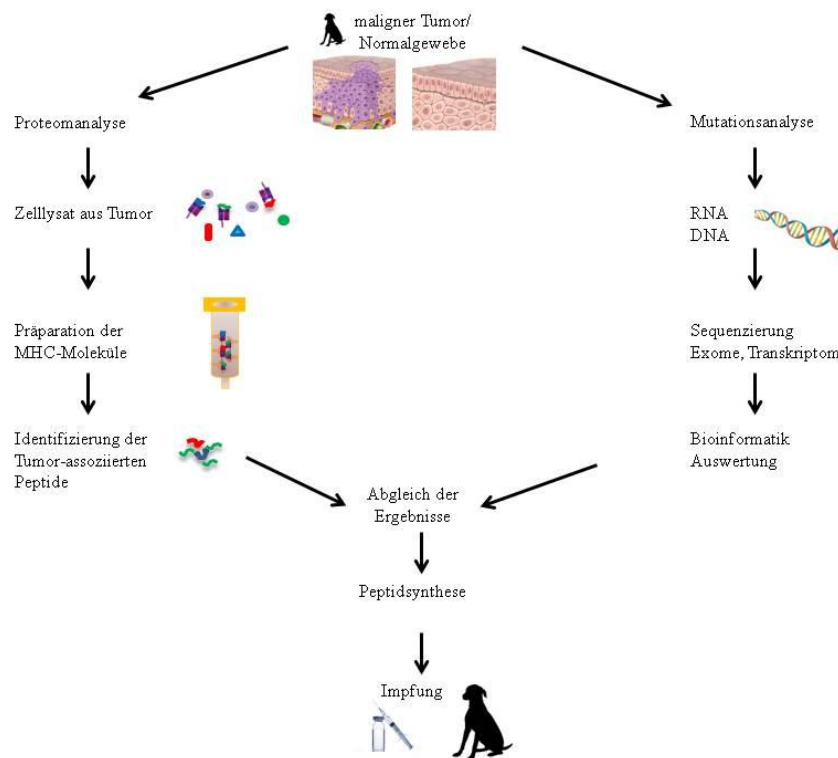
Der „Tübingen Approach“ ist ein Ansatz für eine Immuntherapie von Krebserkrankungen beim Menschen und wurde von Prof. Dr. Rammensee, dem Direktor und Abteilungsleiter der Immunologie des Uniklinikums in Tübingen entwickelt.

Das Ziel ist es dabei, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu aktivieren, damit diese die Tumorzellen zerstören. Im Jahr 1991 wurde ein Antigen im humanen Melanom identifiziert, welches von zytotoxischen T-Zellen erkannt wird (79) (82). Dafür werden tumorspezifische Antigene, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, für einen Peptidimpfstoff eingesetzt.

Der „Tübingen Approach“ beschäftigt sich mit der Identifizierung, der Selektion und Validierung von HLA-Klasse-I-Liganden von Tumorzellen. Ein Tumor besitzt spezifische Antigene, die ihn von normalem Gewebe unterscheiden (83) (84) (85). Außerdem werden tumorassoziierte Antigene exprimiert, die auch auf normalen Geweben exprimiert werden, aber auf Tumorzellen überexprimiert vorkommen (84), weshalb beide potentielle Ziele für eine Krebstherapie darstellen (86). Tumorspezifische Antigene kommen nur auf Tumorzellen und sonst nicht im Körper vor. Sie sind ausschließlich durch Mutationen in den Krebszellen oder von Tumoviren hervorgerufene Strukturen. Zu den tumorassoziierte Antigenen gehören re-exprimierte embryonale Antigene, sowie in der Tumorzelle überexprimierte, also in höherer Molekülzahl als in normalen Zellen vorhandene, ansonsten aber normale, zelluläre Strukturen (87). Lymphozyten sollen auf diese entarteten Zellen sensibilisiert werden (88). Um dies möglich zu machen, müssen die Peptide zuerst identifiziert, selektiert und validiert werden. Danach können tumorspezifische Antigene definiert und für eine personalisierte Vakzinierung gegen Krebs eingesetzt werden (79) (89).

Der „Tübingen Approach“ besteht aus zwei Säulen (siehe Abbildung 13). Zum einen aus der Mutationsanalyse bei der gesundes und tumoröses Gewebe sequenziert wird und zum anderen aus der Proteomanalyse. Die Proteomanalyse steht in unserer Arbeitsgruppe im Fokus, sie soll für den Hund etabliert werden. Hierbei wird aus Normalgewebe und Tumorgewebe ein Lysat hergestellt. Dieses wird anschließend über eine Affinitätssäule, welche mit einem spezifischen Antikörper gegen MHC-Klasse-I-Moleküle präpariert ist, gegeben.

Dadurch können die MHC-Klasse-I-Moleküle in der Säule gebunden werden. Anschließend wird die Säule mit einem Puffer (pH 3,3) gewaschen. Durch den sauren pH-Wert können die Peptide eluiert werden. Es werden nur Peptide herausgelöst, die von DLA präsentiert werden. Die Analyse der Peptide erfolgt mittels HPLC („high performance liquid chromatography“) und Massenspektrometrie (90). Danach können tumorassoziierte Peptide identifiziert werden.



**Abbildung 13: Übersicht der individualisierten Vakzinierung von Hunden.**

Dieses Schema ist nach dem Vorbild des „Tübingen Approach“ aufgebaut. Der Schwerpunkt liegt beim Hund auf der Proteomanalyse. Es werden Zelllysate, von Normalgewebe und Tumorgewebe eines Hundes, über eine Affinitätssäule gegeben. Diese enthält einen spezifischen Antikörper, welcher MHC-Klasse-I-Moleküle binden kann und somit Peptide gewonnen werden können, wodurch anschließend tumorspezifische Peptide identifiziert werden können. Diese können für eine spezifische Impfung beim Hund eingesetzt werden. Die Mutationsanalyse steht beim Hund noch nicht im Fokus. Quellen: (91) (92) (93) (94).

Um Peptide identifizieren zu können, müssen die Ankerpositionen der Aminosäuren, das Bindemotiv, für das jeweilige Allel bekannt sein. Das Bindemotiv von DLA-88\*50101 wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe identifiziert (95), weshalb mit diesem Allel weiter gearbeitet wurde.

Nach Identifizierung des Bindemotivs, Analyse der eluierten Peptide und dem Abgleich mit den Ergebnissen der Mutationsanalyse, kann ein individueller Peptidimpfstoff hergestellt werden. Dieser enthält nur Peptide die ausschließlich auf Tumorzellen zu finden sind.

Der Peptidimpfstoff kann dem Patienten injiziert werden und soll dadurch eine Immunantwort gegen Zellen induzieren, die das ausgewählte Peptid mittels MHC-Klasse-I-Molekül auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, nämlich Tumorzellen. Über CD8<sup>+</sup>-T-Zellen werden diese entarteten Zellen erkannt, woraufhin Tochterzellen aktiviert und die Tumorzellen abgetötet werden.

Dieser Ansatz wurde für die Bekämpfung humaner Tumoren entwickelt, aufgrund der hohen Bedeutsamkeit von Krebstherapien beim Hund soll dieser Ansatz nun auf den Hund übertragen werden (siehe Abbildung 13).

Beim Menschen zeigten sich in den ersten klinischen Studien kaum Nebenwirkungen und ein Anstieg an T-Zellen, welche direkt auf den Impfstoff reagierten (80). Die neusten Erkenntnisse zeigen, dass die Impfung einen sehr guten Erfolg bei einem Patienten mit Cholangiokarzinom erbrachte. Ihm wurde ein Multi-Peptid-Vakzin verabreicht. Das Immunomonitoring zeigte Impfstoff-induzierte T-Zell-Reaktionen auf drei von sieben Peptiden, eine Anti-Tumor-Immunität war nachweisbar. Der Patient bleibt klinisch gesund, ohne radiologisch nachweisbare Tumoren seit März 2013 und die Impfung wird weiter fortgesetzt. Dieser bemerkenswerte klinische Kurs fördert formale klinische Studien zur adjuvanten personalisierten Peptidimpfung in Cholangiokarzinomen des Menschen (96).



## 1.5 Zielsetzung

Das Ziel meiner Doktorarbeit ist es, einen monoklonalen Antikörper gegen MHC-Klasse-I-Moleküle des Hundes herzustellen.

Um eine Immuntherapie nach Ansatz des „Tübingen Approach“ auch beim Hund etablieren zu können, wird ein Antikörper benötigt, der in der Lage ist DLA-88 in einer Säulenimmunpräzipitation zu binden.

Dieser monoklonale Antikörper, soll gegen möglichst viele DLA-88 Allele gerichtet sein, um eine breite Einsatzmöglichkeit zu erreichen.

Bei einer Säulenimmunpräzipitation sollte es durch diesen Antikörper möglich sein, Peptide aus den MHC-Molekülen zu eluieren. Anschließend kann überprüft werden, ob in neoplastischem Gewebe eines Hundes, der das entsprechende Allel trägt, Peptide vorhanden sind, die nur in Tumorgewebe und nicht in normalem Gewebe vorkommen. Durch die Charakterisierung des Bindemotivs von DLA-88\*50101, können für dieses Allel, tumorspezifische Antigene definiert werden (95). Die gewonnenen Erkenntnisse können auf die klinische Anwendung transferiert werden, mit dem Ziel der Etablierung einer Immuntherapie gegen Tumoren beim Hund.

## 2 MATERIAL

Es folgt eine Auflistung der im Laufe dieser Arbeit verwendeten Materialien, Substanzen und Gerätschaften.

### 2.1 Antikörper

**Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper**

| <b>Bezeichnung</b>   | <b>Firma/Hersteller</b>                    |
|--|--|
| 12.C8F6 (1mg/ml und 3,45mg/ml)   | Selbst hergestellt                         |
| BBM.1 monoclonal antibody against human $\beta_2M$ , IgG <sub>2b</sub>   | Universitätsklinikum Tübingen              |
| FITC markierter F (ab') <sub>2</sub> -Fragment goat anti-mouse IgG   | Jackson Immunoresearch                     |
| Goat anti-mouse IgG-HRP (200 $\mu$ l/0,5ml)  | Santa Cruz Biotechnology                   |
| H58A (0,1mg/ml)  | Accurate Chemical & Scientific Corporation |
| H58A monoclonal mouse anti-MHC-class I, IgG concentration 1mg/ml; Species Cross Reactivity: Bovine, caprine, ovine, bison, water buffalo, llama/alpaca, feline, equine, canine, ferret, mink, hamster, human | Linaris                                    |
| pERK IgG <sub>2a</sub> (200 $\mu$ l/ml)  | Santa Cruz Biotechnology                   |
| W6/32 (1mg/ml) monoclonal mouse antibody; Antigenic Determinant: HLA-A, B, C; IgG <sub>2a</sub>  | Universitätsklinikum Tübingen              |

### 2.2 Chemikalien

**Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien**

| <b>Bezeichnung</b>              | <b>Firma/Hersteller</b>            |
|---------------------------------|------------------------------------|
| Acetonitril                     | Avantor Performance Materials B.V. |
| Agarose                         | Lonza                              |
| Albumin Bovine Fraction V (BSA) | Roth                               |
| Ammoniumperoxidsulfat (APS)     | Merck                              |
| Biocol separating Solution      | Biochrom                           |
| Bromphenolblau                  | Sigma                              |

---

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| CHAPS   | BioChemica AppliChem GmbH     |
| Chlorophorm $\geq 99\%$                                 | Roth                          |
| Chlorophorm 99+ %                                       | Sigma                         |
| CNBr-activated Sepharose                                | GE Healthcare Europe GmbH     |
| Complete Protease Inhibitor                             | Roche                         |
| Cut Smart Puffer (10x)                                  | New England Bio Labs GmbH     |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) 100 %                           | Merck KgaA                    |
| Eisessig  | VWR Chemicals                 |
| Ethanol $\geq 99,9\%$                                   | SAV LP GmbH                   |
| Ethanol absolute  | VWR Chemicals                 |
| Ethidiumbromid 1 % (10mg/ml)                            | Roth                          |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)<br>0,511 M pH 8     | Fluka Analytical Bio Ultra    |
| Fetal Calf Serum (FCS)                                  | Gibco                         |
| G418 Sulfate (788,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ )           | Calbiochem                    |
| Glycerol  | Roth                          |
| Glycin  | Roth                          |
| Harnstoff   | Roth                          |
| Hybridoma Fusion and Cloning<br>Supplement (HFCS) (50x) | Roche                         |
| Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine<br>500x (HAT)        | ATCC                          |
| Hypoxanthine-Thymidine 500x (HT)                        | ATCC                          |
| IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's<br>Medium)           | Lonza                         |
| Immobilized Protein A                                   | Pierce                        |
| Isoamylalkohol(3-Methyl-1-Butanol)                      | Fluka Chemika                 |
| L-Glutamin 200 mM                                       | Lonza                         |
| Lysis M-Reagent   | Roche                         |
| Methanol  | VWR Chemicals                 |
| MS-Grade Baker H <sub>2</sub> O                         | J.T. Baker                    |
| Natriumacetat pH 5,2                                    | Roth                          |
| Natriumchlorid (NaCl)                                   | Roth                          |
| Natriumchlorid (NaCl)                                   | VWR Chemicals AnalR Norma Pur |
| Natriumhydroxid (NaOH)                                  | Roth                          |
| Penicillin/Streptomycin 100 mM                          | Sigma                         |
| Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol                       | Roth                          |

---

|                                    |               |
|------------------------------------|---------------|
| Phosphate Buffered Saline (PBS 1x) | Gibco         |
| Polyethylene Glycol 1500 4ml       | Roche         |
| Polyethylene Glycol 4000 (PEG)     | ATCC          |
| Propan-2-ol                        | VWR Chemicals |
| Roti-Load 1 (4x-Konz.)             | Roth          |
| Rotiphorese Gel A                  | Roth          |
| Rotiphorese Gel B                  | Roth          |
| RPMI 1640 (RPMI)                   | Gibco         |
| Salzsäure (HCl)                    | Merck         |
| Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)       | Roth          |
| TEMED                              | Roth          |
| Thimerosal                         | Sigma         |
| Trifluoroaceticacid 100 % (TFA)    | Mercu KGaA    |
| Tris Base                          | Sigma         |
| Trypanblau                         | Merck         |
| Tween 20                           | Merck         |
| Urea                               | Merck         |
| Western Blotting Luminol Reagent   | Immuno Cruz   |

## 2.3 Geräte

**Tabelle 2.3: Verwendete Geräte**

| <b>Bezeichnung</b>                           | <b>Firma/Hersteller</b> |
|--|-------------------------|
| Black and White Monitor SSM-920CE            | Sony                    |
| Brutschrank Heracell 150i                    | Thermo Scientific       |
| Chemolumineszenz-Messgerät<br>SpectraMax 340 | Molecular Devices       |
| Digital pH Meter                             | WTW                     |
| Drucker Color Laserjet 4650dn                | HP                      |
| Durchflusszytometer FACS Calibur             | Becton Dickinson        |
| Durchflusszytometer FACS Canto II            | Becton Dickinson        |
| Eismaschine AF30                             | Scotsman                |
| Electrophoresis Power Supply-EPS 200         | Pharmacia Biotech       |
| Gefrierkombi Öko Super Glass Line            | Liebherr                |
| Gefrierschrank E80                           | Colora Messtechnik      |
| Gene Quant II RNA/DNA Calculator             | Pharmacia Biotech       |
| Heraeus Multifuge 1S-R                       | Thermo Scientific       |
| Fusion Capt Advance SL4 16.09b               | Vilber Lourmat          |

|                                      |                                 |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| Gammacell 1000 Elite                 | Nordion International           |
| Laptop                               | Samsung                         |
| Lichtmikroskop Axiovert 25           | Zeiss                           |
| Lichtmikroskop Wilovert S            | Helmut Hund GmbH                |
| Massenspektrometer LTQ Orbita XL     | Thermo Scientific               |
| Membran-Vakuumpumpe                  | Vaccubrand                      |
| Mikrowelle 800W                      | Bosch                           |
| Mini-Protean system Casting stand    | Bio Rad Laboratories            |
| Mini-Protean Tetra Cell 4-Gel System | Bio Rad Laboratories            |
| NanoDrop 1000 Spektralphotometer     | VWR peqlab                      |
| Nukleofektor CLB-Transfection-Device | Lonza                           |
| Perfect Blue Gelsystem Mini S        | VWR peqlab                      |
| Pumpe MHC (Rotarus MKF4-8)           | Hirschmann Laborgeräte GmbH     |
| Rotierer                             | IKA                             |
| Scanner CanonScan 8800F              | Canon                           |
| Schlauchpumpe easy-load Masterflex   | Millipore                       |
| Schüttler KS125 basic                | IKA                             |
| Sonifier Analog Cell Disrupter 250   | Branson Ultrasonics Corporation |
| Speed Vac/Vacuum Concentrator        | Bachofer                        |
| Sterilbank Tecnoflow                 | Integra Biosciences             |
| Stoppuhr TR118                       | Roth                            |
| Stromgerät PowerPack 3000            | Biorad                          |
| Thermomixer comfort                  | Eppendorf                       |
| Ultra-Low-Gefrierschrank             | Skadi Green Line                |
| Videoprinter Mitsubishi P90          | Mitsubishi                      |
| Vilber Lourmat TFX-20M               | MWG-Biotech                     |
| Vortex Genius 3                      | IKA Labortechnik                |
| Vortex Mixer                         | IKA Labortechnik                |
| Waage GR-300                         | A&D Instruments                 |
| Wasserbad GFL 1083                   | GFL                             |
| Zentrifuge 5415 C                    | Eppendorf                       |
| Zentrifuge Biofuge fresco            | Heraeus Instruments             |

## 2.4 Glaswaren

**Tabelle 2.4: Verwendete Glaswaren**

| <b>Bezeichnung</b>     | <b>Firma/Hersteller</b> |
|------------------------|-------------------------|
| Hamilton Syringe 50 µl | Hamilton                |

|                                      |               |
|--------------------------------------|---------------|
| K3E EDTA Blutröhrchen 3ml            | BD Vacutainer |
| Pasteur-Pipette                      | Brand         |
| Schott Erlenmeyerkolben              | Duran         |
| Schott GL45 Laborglasflaschen 1000ml | Duran         |
| Schott GL45 Laborglasflaschen 2000ml | Duran         |
| Schott GL45 Laborglasflaschen 300ml  | Duran         |
| Schott GL45 Laborglasflaschen 500ml  | Duran         |
| Schott Glaskapillaren                | Duran         |
| Zählkammer Neubauer Improved         | Brand         |

## 2.5 Kits

**Tabelle 2.5: Verwendete Kits**

| Bezeichnung                     | Firma/Hersteller |
|---------------------------------|------------------|
| Nukleofektion Solution Kit:     | Lonza            |
| CLB-Transfection-Puffer         |                  |
| CLB-Transfection Supplement     |                  |
| Pmax GFP                        |                  |
| QIFI-Kit:                       | Dako             |
| Set-Up Beads                    |                  |
| Calibration Beads               |                  |
| FITC Conjugate                  |                  |
| Iso-Gold Rapid Mouse-Monoclonal | BioAssay Works   |
| Isotyping Kit:                  |                  |
| Mouse Iso Gold Cassette 1&2     |                  |
| Sample Diluent Buffer           |                  |

## 2.6 Pipettierhilfen

**Tabelle 2.6: Verwendete Pipettierhilfen**

| Bezeichnung                          | Firma/Hersteller    |
|--------------------------------------|---------------------|
| Multikanalpipette Research Pro       | Eppendorf           |
| Multipipette Plus                    | Eppendorf           |
| Pipetboy ACU                         | Integra Biosciences |
| Pipette Discovery Comfort 0,1-2 µl   | PZ HTL              |
| Pipette Discovery Comfort 200-100 µl | PZ HTL              |
| Pipette Discovery Comfort 20-200 µl  | PZ HTL              |
| Pipette Discovery Comfort 2-20 µl    | PZ HTL              |
| Pipette Pipetman 0,1-2 µl            | Gilson              |

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| Pipette Pipetman 200-1000 µl      | Gilson    |
| Pipette Pipetman 20-200 µl        | Gilson    |
| Pipette Pipetman 2-20 µl          | Gilson    |
| Pipette Research Plus 0,1-2 µl    | Eppendorf |
| Pipette Research Plus 200-1000 µl | Eppendorf |
| Pipette Research Plus 20-200 µl   | Eppendorf |
| Pipette Research Plus 2-20 µl     | Eppendorf |

## 2.7 Vektor

**Tabelle 2.7: Verwendete Plasmide**

| Bezeichnung                      | Firma/Hersteller |
|----------------------------------|------------------|
| pcDNA3.1(+) Vektor, DLA-88*50101 | Gene Art         |

## 2.8 Adjuvantien

**Tabelle 2.8: Verwendete Adjuvantien**

| Bezeichnung  | Firma/Hersteller               |
|--|--------------------------------|
| Type B murine TLR9 agonist (#ODN 1826-1) CpG oligodeoxynucleotides | Alpha Diagnostik International |

## 2.9 Enzyme

**Tabelle 2.9: Verwendete Enzyme**

| Bezeichnung                 | Firma/Hersteller          |
|-----------------------------|---------------------------|
| PvuI-HF 20U/µl              | New England Bio Labs GmbH |
| Trypsin/EDTA Solution (10x) | Biochrom                  |

## 2.10 Marker

| Bezeichnung                               | Firma/Hersteller  |
|---|-------------------|
| PageRuler Plus, Prestained Protein Ladder | Thermo Scientific |
| Smart Ladder                              | Eurogentec        |

## 2.11 Software

**Tabelle 2.10: Verwendete Software**

| Bezeichnung     | Firma/Hersteller |
|-----------------|------------------|
| CellQuestPro    | Becton Dickinson |
| E.A.S.Y. Win 32 | Herolab          |

|                     |                       |
|---------------------|-----------------------|
| FACS DIVA           | Becton Dickinson      |
| Flow Jo V10.0.8     | Miltenyi Biotech      |
| Graph Pad Prism     | Graph Pad Software    |
| NanoDrop 1000 3.7.1 | Peqlab Biotechnologie |
| PowerPoint 2007     | Microsoft             |
| SoftMax Pro         | Molecular Devices     |
| Windows Excel 2007  | Microsoft             |
| Windows Word 2007   | Microsoft             |

## 2.12 Verbrauchswaren

**Tabelle 2.11: Verwendete Verbrauchswaren**

| <b>Bezeichnung</b>   | <b>Firma/Hersteller</b> |
|--|-------------------------|
| Abdeckfolie  | Sargold                 |
| Abdeckplatte High Profile (9MM)  | Greiner Bio-One         |
| Affi-Gel Protein A Säule, Agarose Media<br>50ml                        | Bio Rad                 |
| Amicon Ultra 0,5ml Centrifugal Filters for<br>Protein Ultracel (3 kDa) | Merck Millipore         |
| Cell Strainer 100 µm Nylon   | BD Falcon               |
| Cellstar 6 Well Zellkulturplatte                                       | Greiner Bio-One         |
| Cellstar Tubes 15ml, conical bottom                                    | Greiner Bio-One         |
| Cellstar Tubes 50ml, conical bottom                                    | Greiner Bio-One         |
| Cellstar Zellkulturflasche 175 cm <sup>2</sup>                         | Greiner Bio-One         |
| Cellstar Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup>                          | Greiner Bio-One         |
| Cellstar Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>                          | Greiner Bio-One         |
| Centricon Plus-70 Ultracel Pl-100                                      | Merck                   |
| Cryo Röhrchen (2ml)  | Greiner Bio-One         |
| Dreiwegehahn   | Bio Rad                 |
| Easy strainer 100 µm   | Greiner Bio-One         |
| Einmalspritze 2ml  | HSW Norm-Ject           |
| Entsorgungsbeutel, PP  | Brand                   |
| Eppendorfgefäße Safe-Lock 1,5ml  | Eppendorf               |
| Eppendorfgefäße Safe-Lock 0,5ml  | Eppendorf               |
| Eppendorfgefäße Safe-Lock 2,0ml  | Eppendorf               |
| FACS Röhrchen (0,65ml)   | Brand                   |
| FACS Röhrchen (5ml)  | Falcon                  |
| Falcon PP konische Röhrchen 15 ml                                      | Becton Dickinson        |



---

|  |                          |
|--|--------------------------|
| Falcon PP konische Röhrchen 50 ml          | Becton Dickinson         |
| Filter 5 µl                                | Merck Millipore          |
| Filterpapier                               | Whatman                  |
| Kanüle 26G Sterican                        | B. Braun                 |
| Küvette CL-10                              | Lonza                    |
| Luer-Lok Spritze 20 ml                     | BD Plastipak             |
| MHC-Affinitätssäule Econo columns<br>(8mm) | Bio Rad                  |
| Millex Gp Filter Unit 22 µm                | Merck Millipore          |
| Nitrozellulose-Membranen                   | Sigma                    |
| Nunc Cryo Color Codes                      | Nalge Nunc International |
| Pipette 10 ml                              | Falcon                   |
| Pipette 25 ml                              | Falcon                   |
| Pipette 50 ml                              | Costar                   |
| Pipette 5 ml                               | Falcon                   |
| Pipettenspitzen 10 µl                      | Starlab                  |
| Pipettenspitzen 1000 µl                    | Greiner Bio-One          |
| Pipettenspitzen 200 µl                     | Starlab                  |
| Präzisionswischtücher Kimberly-Clark       | KimtechScience           |
| Protein LoBind Tube 0,5 ml                 | Eppendorf AG             |
| Protein LoBind Tube 1,5 ml                 | Eppendorf AG             |
| Protein LoBind Tube 2 ml                   | Eppendorf AG             |
| Reagenzwanne 100 ml Reagent Reservoir      | Costar                   |
| Serumröhrchen (1,1 ml Z-Gel)               | Sarstedt                 |
| Spritze mit Kanüle (1 ml)                  | Becton Dickinson         |
| Transferpipette 3,5 ml                     | Sarstedt                 |
| Untersuchungshandschuhe Nitrile Azur       | VWR                      |
| Vakuum Filter 0,22 µm                      | Corning                  |
| Zellkulturplatte 12 Well                   | Costar                   |
| Zellkulturplatte 48 Well                   | Costar                   |
| Zellkulturplatte 96 Well U-Bottom          | Greiner Bio-One          |
| Zellkulturplatte Cellstar 24 Well          | Greiner Bio-One          |
| Zellkulturplatte Cellstar F-bottom 96 Well | Greiner Bio-One          |
| Zellkulturplatte Cellstar U-bottom 96 Well | Greiner Bio-One          |
| Zellkulturplatte MultiWell 24 Well         | Greiner Bio-One          |
| Zellkulturplatte MultiWell 6 Well          | Greiner Bio-One          |
| Zellkulturschalen 145/20mm                 | Greiner Bio-One          |

---

|  |                 |
|--|-----------------|
| Zellschaber  | Greiner Bio-One |
| Zip-Tip-Spitzen ( $\mu$ -C <sub>18</sub> , 10 $\mu$ l) | Merck Millipore |

## 2.13 Sonstiges

**Tabelle 2.12: Sonstige verwendete Gegenstände**

| <b>Bezeichnung</b>                       | <b>Firma/Hersteller</b> |
|--|-------------------------|
| Einfrierbehälter Cryo Freezing Container | Nalgene                 |
| Pinzette 6mm breite Spitze               | Bochem                  |
| Pipettensauger                           | Roth                    |

## 2.14 Zelllinien

**Tabelle 2.13: Verwendete Zelllinien**

| <b>Zelllinie</b>   | <b>Beschreibung</b>   |
|--------------------|---|
| C1R                | HLA-A*0201 negative Epstein-Barr-Virus (EPV) transformierte lymphoblastoide Zelllinie (ATCC CRL-2369) |
| C1R DLA-88*50101   | C1R Zellen, die mit DLA-88*50101 transfiziert wurden  |
| K562               | Humane Leukämiezellen (ATCC CCL-243)  |
| K562 DLA-88*50101  | K562 Zellen, die mit DLA-88*50101 transfiziert wurden   |
| MDCK II            | Canine Nierenepithelzellen (DLA-88*03201) (ATCC CRL-2936)   |
| Sp2/0-Ag14         | Maus Myelomazellen: Hybridomazellen aus Mausmilzzellen und P3X63Ag8-Ag8 (ATCC CRL-8287)               |
| Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 Zellen, die mit DLA-88*50101 transfiziert wurden  |
| P3X63Ag8           | Maus Myelomazellen, der BALB/c Maus (ATCC TIB-9)  |

## 2.15 Medien und Lösungen

**Tabelle 2.14: Rezepturen der verwendeten Medien und Lösungen**

|   |   |
|---|---|
| 1 % Agarosegel                            | 0,3 g Agarose<br>30 ml ddH <sub>2</sub> O<br>0,6 ml TAE (50x)<br>1,5 µl Ethidiumbromid (1 %)  |
| APS (33 mg/ml)                            | 0,33 g APS<br>67 ml ddH <sub>2</sub> O  |
| Binding Buffer I (1x) pH 8,5              | 352 g NaCl<br>400 µl Thimerosal-Lösung (50 %)<br>auf 2 L mit MilliQ-Wasser auffüllen  |
| Binding Buffer II (1x) pH 8,5             | 174 g NaCl<br>180 g Urea<br>400 µl Thimerosal-Lösung (50 %)<br>auf 2 L mit MilliQ-Wasser auffüllen                                    |
| Blocking-Lösung für Western Blot          | 20 ml TBS/T<br>1 g BSA  |
| Bromphenolblau für Western Blot           | 5 mg Bromphenolblau<br>1 ml Semi-Dry-Transferpuffer   |
| DMSO Einfriermedium                       | 4 ml Zellkulturmedium<br>0,5 ml DMSO<br>0,5 ml FCS  |
| Elektrophoresepuffer (5x) (2 L)           | 10 g SDS<br>60 g Tris<br>288 g Glycin<br>2000 ml ddH <sub>2</sub> O   |
| Elution Buffer (1x) pH 3, 1 L Stocklösung | 294,1 g Natriumcitrat<br>11,7 g NaCl<br>2000 µl Thimerosal-Lösung (50 %)<br>100 ml Stocklösung auf 2 L mit<br>MilliQ-Wasser auffüllen |
| FACS Puffer                               | 500 ml PBS<br>2,5 g BSA<br>1,6 ml EDTA 0,511 M, pH 8  |
| G418 Stocklösung                          | 14,6 ml IMDM oder RPMI<br>1 g G418-BC Sulfate   |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Harnstoff 8 M                     | 240,24 g Harnstoff (60,06 g/mol)<br>500 ml ddH <sub>2</sub> O  |
| HAT (2x) Zellkulturmedium         | 192,5 ml IMDM<br>50 ml FCS<br>2,5 ml Penicillin/Streptomycin 100x<br>2 ml Phiole HAT<br>5 ml HFCS        |
| HAT Selektionsmedium              | 500 ml IMDM<br>50 ml FCS<br>5 ml Penicillin/Streptomycin. 100x<br>2 ml Phiole HAT                        |
| HT Selektionsmedium               | 500 ml IMDM<br>50 ml FCS<br>5 ml Penicillin/Streptomycin. 100x<br>2 ml Phiole HT                         |
| Hybridoma Zellkulturmedium        | 190 ml IMDM<br>50 ml FCS<br>2,5 ml Penicillin/Streptomycin 100x<br>2,5 ml L-Glutamin 200 mM<br>5 ml HFCS |
| IMDM Zellkulturmedium             | 500 ml IMDM<br>25 ml oder 50 ml FCS<br>5 ml Penicillin/Streptomycin 100x<br>5 ml L-Glutamin 200 mM       |
| IMDM/RPMI + G418 Selektionsmedium | 490 ml Zellkulturmedium<br>10 ml G418 Stocklösung  |
| Ladepuffer für Agarosegel         | 5 ml Glycerol<br>200 µl TAE (50x)<br>0,25 % Bromphenolblau<br>auffüllen auf 10 ml mit ddH <sub>2</sub> O |
| Ladepuffer für Western Blot       | 450 µl RotiLoad (4x)<br>50 µl Semi-Dry-Transferpuffer  |
| Laufpuffer für Agarosegel         | 250 ml TAE (1x)<br>12,5 µl Ethidiumbromid  |
| Lösung A*                         | LC-MS-H <sub>2</sub> O<br>0,1 % TFA (10 %)   |

|   |   |
|---|---|
| Lösung Abe                                | 32 % LC-MS-Acetonitril<br>0,2 % TFA<br>in LC-MS-H <sub>2</sub> O  |
| Lösung A <sub>L</sub>                     | 1 % LC-MS-Acetonitril<br>0,05 % TFA<br>In LC-MS-H <sub>2</sub> O  |
| Lösung B*                                 | 80 % LC-MS-Acetonitril<br>0,1 % TFA<br>in LC-MS-H <sub>2</sub> O  |
| Lysepuffer (1x)                           | ½ Tablette complete Protease-Inhibitor<br>5 ml Lysis-M-Reagent  |
| Obergel/Sammelgel für Western Blot        | 1200 µl Obergellösung<br>500 µl Spacer<br>3 ml Harnstoff 8 M<br>50 µl SDS (10 %)<br>150 µl APS (33 mg/ml)<br>5 µl TEMED |
| Obergellösung                             | 41,63 ml Rotiphorese Gel A<br>9,37 ml Rotiphorese Gel B   |
| Primärantikörperlösung für Western Blot   | 10 µl H58A (1 mg/ml)<br>0,5g BSA<br>10 ml TBS/T   |
| Resolving-Puffer pH 8,9                   | 72,6 g Tris<br>94 ml HCl (1 M)<br>100 ml ddH <sub>2</sub> O   |
| RPMI Zellkulturmedium                     | 500 ml RPMI<br>50 ml FCS<br>5 ml Penicillin/Streptomycin 100x<br>5 ml L-Glutamin 200 mM                                 |
| SDS (10 %)                                | 10 g SDS<br>100 ml ddH <sub>2</sub> O   |
| Sekundärantikörperlösung für Western Blot | 5 µl goat anti-mouse IgG-HRP<br>0,5 g BSA<br>10 ml TBS/T  |

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| Semi-Dry-Transferpuffer pH 9,2 (2 L) | 11,6 g Tris<br>5,8 g Glycin<br>7,4 ml SDS (10 %)<br>400 ml Methanol<br>2000 ml ddH <sub>2</sub> O                                 |
| Spacer-Puffer pH 6,7 (100 ml)        | 7,2 g Tris<br>92,8 g ddH <sub>2</sub> O<br>pH-Wert einstellen mit 1M HCl  |
| TAE                                  | 242 g Tris Base<br>100 ml EDTA 0,5 M pH 8<br>57,1 ml Eisessig<br>auffüllen auf 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O                     |
| TBS (10x) (2 L) pH 7,6               | 24,2 g Tris<br>80 g NaCl<br>2000 ml ddH <sub>2</sub> O<br>pH-Wert einstellen mit 10 M HCl   |
| TBS/T                                | 200 ml TBS<br>2 ml Tween 20<br>1798 ml ddH <sub>2</sub> O   |
| Trypanblau-Lösung                    | 0,2 g Trypanblau<br>100 ml PBS  |
| Trypsin (1x)                         | 1 ml Trypsin (10x)<br>9 ml PBS  |
| Untergel/Trenngel für Western Blot   | 5,2 ml Untergellösung<br>2 ml Resolving-Puffer<br>3 ml Harnstoff 8 M<br>100 µl SDS (10 %)<br>225 µl APS (33 mg/ml)<br>10 µl TEMED |
| Untergellösung                       | 16,5 ml Rotiphorese Gel A<br>2,5 ml Rotiphorese Gel B   |



## **3 METHODEN**

### **3.1 Zellkultur Methoden**

In der Zellkultur wird unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank gearbeitet. Verwendete Materialien sind entweder autoklaviert, steril verpackt oder heißluftsterilisiert.

#### **3.1.1 Kultivierung**

Die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellsuspensionen wurden täglich unter dem Mikroskop auf ihr Wachstum kontrolliert.

Je nach Zelldichte, wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage 1:5 bis 1:20 passagiert, um ein Überwachsen der Zellen zu verhindern und eine optimale Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Nur so bleiben diese vital und können für wissenschaftliche Versuche genutzt werden. Sollte bei Suspensionszellen eine 1:10 Passage durchgeführt werden, so mussten 2,5 ml Zellsuspension, nach mehrfachem resuspendieren, in der Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) belassen oder in eine neue Flasche überführt werden. Die restliche Zellsuspension wurde verworfen und die Zellkulturflasche mit 22,5 ml frischem Zellkulturmedium aufgefüllt. Die maximale Menge, die sich in einer Zellkulturflasche befinden sollte, ergab sich aus der Fläche der verwendeten Zellkulturflasche. In einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche betrug diese 10 ml, in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche 25 ml und in einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche 50 ml. Handelte es sich um adhärente Zellen, wurde in eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche maximal 30 ml frisches Zellkulturmedium hinzugegeben.

Vor der Verwendung musste das Zellkulturmedium und das PBS im Wasserbad auf 37 °C erwärmt werden. Trypsin wurde bei Raumtemperatur erwärmt und die Zellen ebenfalls bei Raumtemperatur umgesetzt, dafür wurden diese mehrmals mit einer Pipette resuspendiert und der Zellkulturflaschenboden mit aufgenommener Zellsuspension abgespült. Wenn alle Zellen in Suspension vorlagen, konnte eine optimale Umsetzung erreichen werden.



Zum Schutz vor Kontaminationen der Zellsuspension, wurden dem Zellkulturmedium Antibiotika zugesetzt, dafür wurden Streptomycin und Penicillin verwendet. Das Wirkungsspektrum von Streptomycin beinhaltet Gram positive und Gram negative Bakterien, während Penicillin nur bei Gram positiven Bakterien eine Wirkung zeigt. Antibiotika sind im Brutschrank bei 37 °C nicht unbegrenzt stabil, sie zerfallen innerhalb von drei bis fünf Tagen. Es war daher nötig, das Medium regelmäßig zu erneuern, um die Wirkung zu gewährleisten. Aufgrund der Gefahr einer Antibiotikaresistenz, sollten nicht weniger als 1 % Antibiotika zugesetzt werden. Zellen mit hoher Teilungsrate haben einen großen Energiebedarf, weshalb dem Zellkulturmedium zusätzlich L-Glutamin hinzugegeben wurde. Diese Aminosäure ist in purem IMDM/RPMI Medium schon enthalten. Auch L-Glutamin ist bei 37 °C nicht lange stabil, weshalb ein Zusatz erforderlich war. Das Medium durfte deshalb auch nicht zu lange im Wasserbad aufgewärmt werden (97).

#### **3.1.1.1 Kultivierung von C1R Zellen**

Bei C1R Zellen handelt es sich um humane HLA-A\*0201 negative Epstein-Barr-Virus (EPV) transformierte B lymphoblastoide Zellen. Diese Zellen exprimieren HLA-B\*3503 und HLA-C\*0401 (98). Sie sind Suspensionszellen und werden mit RPMI Zellkulturmedium kultiviert.

#### **3.1.1.2 Kultivierung von K562 Zellen**

K562 Zellen sind humane myeloische Leukämiezellen (99), sind MHC-Klasse-I-defizient und tragen kein humanes MHC auf ihrer Oberfläche (100). Es handelt sich um Suspensionszellen, welche mit RPMI Zellkulturmedium kultiviert werden. Diese Zellen neigen dazu sich traubenförmig zusammen zu lagern. Durch ein leichtes Klopfen an den Flaschenrand, konnte der Zusammenhalt gelöst werden, um die Zellen vereinzelt in Suspension zu bringen.

#### **3.1.1.3 Kultivierung von MDCK II Zellen**

MDCK II Zellen sind canine Nierenepithelzellen und tragen das Allel DLA-88\*03201. Charakteristisch für Epithelzellen ist, dass sie Zellkontakte untereinander und Verbindungen mit ihrer direkten Umgebung ausbilden, weshalb sie als adhärente Zellen bezeichnet werden. Diese Zellen werden in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Fläche und 25 ml IMDM Zellkulturmedium im Brutschrank kultiviert.

Adhärenente Zellen haften sich an den Zellkulturflaschenboden an und können nur durch Trypsin in Suspension gebracht und anschließend umgesetzt werden. Beim Umsetzen wird erst das Medium abgenommen und verworfen, dann wird der Flaschenboden mit 10 ml PBS abgewaschen und dieses anschließend verworfen. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, erfolgte die Behandlung mit 2,5 ml Trypsin für 10 min im Brutschrank. Trypsin ist eine Endopeptidase, die adhärenente Zellen vom Flaschenboden lösen kann. Nach der Inkubation konnte durch leichtes klopfen an die Flaschenseite die Ablösung verstärkt werden. Die abgelösten Zellen konnten in 10 ml IMDM Zellkulturmedium aufgenommen werden und durch mehrmaliges auf und ab pipettieren resuspendiert werden. So wurde eine Vereinzelung der Zellen erreicht. Je nach Weiterverwendung der Zellen, konnte für Versuche die Lebendzellzahl analysiert werden (siehe 3.1.2) oder sie konnten für die Kultivierung 1:10 oder 1:20 passagiert werden. Das im IMDM Zellkulturmedium enthaltene FCS versorgt die Zellen nicht nur mit wichtigen Wachstumsfaktoren, sondern stoppt auch die Aktivität des Trypsins. Damit die Reaktion des Trypsins gestoppt wird, musste mindestens die dreifache Menge an FCS haltigem Zellkulturmedium hinzugegeben werden.

#### **3.1.1.4 Kultivierung von Sp2/0 Zellen**

Sp2/0 Ag-14-Zellen (Sp2/0) sind Hybridomazellen, sie entstanden durch Fusion von Milzzellen einer BALB/c Maus mit Mausmyelomazellen (P3X63Ag8-Ag8) und werden in IMDM Zellkulturmedium kultiviert. Aufgrund der hohen Wachstumsrate konnte das Zellkulturmedium auf 5 % FCS reduziert werden. Außerdem sind Sp2/0 Zellen semi-adhärenent, das bedeutet, dass die Zellkulturflasche vor dem umsetzen an der Flaschenseite geklopft werden musste, damit sich die Zellen vom Flaschenboden lösten, Trypsin wird nicht benötigt.

#### **3.1.1.5 Kultivierung von transfizierten DLA-88\*50101 Zellen**

Transfizierte Zellen benötigen ein Selektionsmedium. Für die Selektion wurde das Aminoglycosidantibiotikum Geneticin (G418) verwendet. Dieses ist zelltoxisch für eukaryotische Zellen, es bindet an 80S-Ribosomen und hemmt die Translation, in dem es Ablesefehler der t-RNA verursacht (101). Durch Einschleusung eines Neomycin-Geneticin-Resistenzgens kann intrazellulär eine Geneticininaktivierung stattfinden (102).

Die für Resistenzen gegen Geneticin verantwortlichen Gene codieren für Aminoglykosid-Phosphotransferasen (APT). Diese phosphorylieren Geneticin an den Hydroxygruppen und unterdrücken damit die Wirkung der Substanz (103). Um eine Selektion zu erreichen, musste dem verwendeten Zellkulturmedium 1mg/ml G418 zugesetzt werden (102). Das Plasmid der transfizierten Zellen enthielt ein Neomycin-Geneticin-Resistenzgen, dadurch konnten nur Zellen überleben, die erfolgreich mit DLA-88\*50101 transfiziert wurden. Der Zeitraum um stabil transfizierte Zellen vollständig selektieren zu können liegt zwischen 10 und 14 Tagen, danach können resistente Kolonien isoliert werden (101).

C1R DLA-88\*50101 Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche canine MHC-Klasse-I-Moleküle und Humane MHC-Moleküle.

K562 DLA-88\*50101 Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche canine MHC-Klasse-I-Moleküle. Diese Zellen besitzen kein Humanes MHC.

Sp2/0 DLA-88\*50101 Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche canine MHC-Klasse-I-Moleküle und murine MHC-Moleküle.

#### **3.1.1.6 Kultivierung von P3X63Ag8 Zellen**

P3X63Ag8 Zellen sind murine Myelomazellen die ihren Ursprung in BALB/c Mäusen haben. Sie werden in IMDM Zellkulturmedium kultiviert und sind sensitiv für Selektionsmedien. Diese Zellen können nicht in HAT Zellkulturmedium kultiviert werden, da ihnen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) fehlt. Deshalb eignen sie sich als Fusionspartner für die Hybridomaherstellung.

#### **3.1.1.7 Kultivierung von Hybridomzellen**

Hybridomazellen sind Milzzellen einer immunisierten Maus, die mit P3X63Ag8 Zellen fusioniert wurden. Diese Zellen benötigten anfangs ein Selektionsmedium (HAT Zellkulturmedium). In diesem Medium können nur Zellen überleben, die erfolgreich fusioniert wurden. Nach zwei Wochen konnte das Medium gegen HT Zellkulturmedium ausgetauscht werden. Weitere zwei Wochen später, konnte auf IMDM Zellkulturmedium mit zehn prozentigen FCS Anteil gewechselt werden. Damit eine effiziente Aufreinigung stattfinden kann, ist es empfehlenswert den FCS Anteil nach und nach zu verringern, so dass nur noch 2-5 % FCS Anteil besteht.

---

In Verlauf der Kultivierung können Hybridomzellen durch genetische Veränderung ihre Fähigkeit verlieren, Antikörper zu produzieren (104).

#### **3.1.1.8 Massenproduktion von Antikörper**

Damit genug Antikörper für eine MHC-Präzipitation zur Verfügung stand, musste dieser von Hybridomzellen gebildet werden. Für die Kultivierung wurden Rollflaschen mit einem Volumen von 2 Liter verwendet und pro Rollflasche  $1 \times 10^8$  Zellen, in einem Liter zehn prozentigem IMDM Zellkulturmedium, unter ständiger Bewegung in einem Rollgestell inkubiert. Nach 7 bis 10 Tagen konnte der Überstand, mit dem darin enthaltenen Antikörper, geerntet werden.

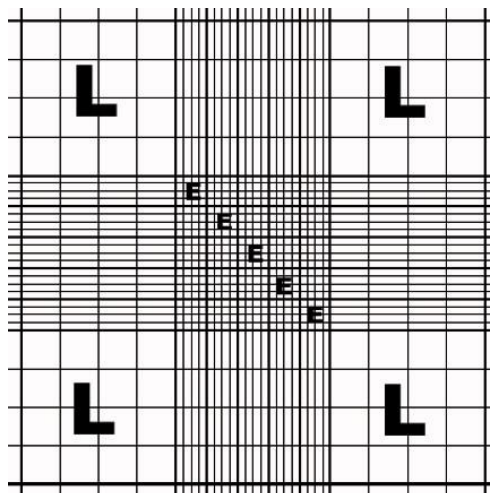
### 3.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl, wurden 25 µl Zellsuspension der kultivierten Zelllinie mit 25 µl Trypanblau-Lösung in einer 96 Well Platte resuspendiert. Trypanblau ist ein Diazofarbstoff, welcher an Protein bindet. Dadurch werden tote Zellen, mit defekter Zellwand, blau eingefärbt. Lebende Zellen, mit intakter Zellwand, nehmen den Farbstoff nicht auf. Das Gemisch wurde in eine Neubauer *improved* Zählkammer pipettiert und die Lebendzellzahl mikroskopisch bestimmt. Im Gesichtsfeld werden nur Zellen gezählt, die keine Blaufärbung aufweisen. Es wurde in den fünf mit E markierten Feldern ausgezählt (siehe Abbildung 14).

Die Zellzahl ergibt sich aus folgender Rechnung:

$$E = X$$

$$X \times 10^5 = \text{Zellen pro ml}$$



**Abbildung 14:** Neubauer *improved* Zählkammer.

Quelle: (105).

Wenn die Zelldichte zu gering ausfiel, wurden alle 25 Felder ausgezählt, die Rechnung veränderte sich dann wie folgt:

$$\text{Zellzahl in 25 Quadraten} = X$$

$$X/5 \times 10^5 = \text{Zellen pro ml}$$

Nach jeder Benutzung wurden die Zählkammer und das Deckglas mit Laborwasser gereinigt und mit einem Präzisionswischtuch abgetrocknet.

### 3.1.3 Kryolagerung von Zellen

Die Zellen konnten für eine kurzzeitige Lagerung, in einem -80 °C Schrank eingefroren werden. War eine längere Lagerung erforderlich, wurden sie nach einer Woche, in einen Stickstofftank bei -196 °C in flüssigem Stickstoff überführt. Der aktuelle Lagerungsort der Proben, war im Verzeichnis der Arbeitsgruppe stets aktuell zu finden und bei neuen Proben zu vermerken.

#### 3.1.3.1 Einfrieren von Zellen

Die Lebendzellzahl sollte für das Einfrieren von Zellen bei mindestens  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml liegen. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die Menge an Zellsuspension aus der gewünschten Gewebekulturflasche entnommen und in ein Falcon-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 7 min, 4 °C) und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein beschriftetes Cryo-Röhrchen (Zelllinie, Datum, Konzentration, institutseigenes Identifikationskennzeichen) pipettiert. Nun wurde das Röhrchen in einen mit Propanol gefüllten Freezing-Container („Mr. Frosty“) gestellt, damit die Zellprobe im -80 °C Schrank mit einer Geschwindigkeit von einem Grad Celsius pro Stunde abgekühlt und eingefroren wurde.

#### 3.1.3.2 Auftauen von Zellen

Zellen wurden aus dem -80 °C Schrank oder dem Stickstofftank geholt und auf Eis transportiert. Nun konnte das Röhrchen mit den enthaltenen Zellen, in der Hand aufgetaut und anschließend sofort unter der Sterilbank in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt werden. Es folgte die langsame Zugabe, Tropfen für Tropfen, von 10 ml des entsprechenden Zellkulturmediums, unter ständigem schütteln. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 7 min, 4 °C), um das möglicherweise noch vorhandene DMSO abzutrennen, denn dieses ist toxisch für die aufgetauten Zellen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche mit einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> überführt. Nach einem Tag Inkubation im Brutschrank, mussten die Zellen unter dem Lichtmikroskop auf ihr Wachstum kontrolliert werden. Gegebenenfalls wurde weiteres Zellkulturmedium hinzugefügt oder die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Fläche umgesetzt.

## 3.2 Transfektion von Zellen

Bei der Transfektion wird genetisches Material in eukaryotische Zellen eingebracht.

Damit nach einer Fusion Hybridomazellen erhalten werden, die den gewünschten DLA Antikörper produzieren, musste eine neue Zelllinie generiert werden, die das gewünschte DLA enthält, um die Mäuse damit zu immunisieren. In dieser Arbeit, wurde die DNA eines mittels Restriktionsenzym linearisierten Plasmids, welches DLA-88\*50101 trägt, durch Nukleofektion in Sp2/0 Zellen transfiziert. Das G418 Gen wurde als Selektionskriterium eingefügt, damit später nur Zellen kultiviert werden konnten, die erfolgreich mit DLA-88\*50101 transfiziert wurden. Mit der Herstellung dieser transfizierten Zellen, sollte bei den Mäusen ausschließlich eine Antikörperproduktion gegen das DLA-88\*50101 erreicht werden, denn die Sp2/0 Zelle ist eine mauseigene Zelle, gegen diese keine Immunreaktion stattfinden sollte. Diese neue Zelllinie konnte für die Immunisierungen der Mäuse verwendet werden.

### 3.2.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren erfolgt mittels „NanoDrop“. Dies ist ein Spektralphotometer, welches die Absorption von Licht durch Nukleinsäuren misst und dadurch eine Konzentration berechnet. Für die Messung wurde der Probenhalter mit Wasser initialisiert und anschließend noch einmal mit Wasser oder Puffer kalibriert. Nun konnte die passende Einstellung für DNA gewählt werden und 1 µl der zu analysierenden Probe auf den Messpunkt des Probenhalters pipettiert werden. Nach herunter klappen des Probenarms wurde der Probenhalter durch die Kapillarkräfte in die Länge gezogen, damit eine dünne Flüssigkeitssäule entsteht. Somit wird die Weglänge zwischen dem oberen und dem unteren Lichtleiter überbrückt. Während der Messung werden nun Lichtblitze durch die Flüssigkeitssäule der Probe geschickt und die Absorption bei 260nm bestimmt (106). Diese ist proportional zu der in der Probe enthaltenen DNA Menge. Zusätzlich wurde die Absorption bei 230nm und 280nm gemessen und durch das Gerät die 260/230 und 260/280-ratios bestimmt. So konnte eine Aussage über Verunreinigungen durch andere Nukleinsäuren (260/230) oder durch phenolische oder organische Rückstände (260/280) getroffen werden. Nach jeder Probe wurde der Probenhalter mit einem Präzisionswischtuch gereinigt.

### 3.2.2 Linearisierung von DNA

Um DNA in Zellen einschleusen zu können, musste das gewünschte Plasmid vorher linearisiert werden.

#### 3.2.2.1 Enzymatische Verdauung von DNA

Zuerst musste die enzymatische Verdauung des Plasmids stattfinden, dafür wurden folgende Substanzen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß, in dieser Reihenfolge pipettiert:

---

|                                 |                              |
|---------------------------------|------------------------------|
| Enzymatische Verdauung von DNA: | 380 µl H <sub>2</sub> O      |
|                                 | 50 µl Cut Smart Puffer (10x) |
|                                 | 60 µl DNA (=50 µg)           |
|                                 | 10 µl PvuI-HF 20U/µl         |

---

Danach wurde die Mischung für drei bis vier Stunden im Thermoblock bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Gelelektrophorese um zu kontrollieren, ob die Linearisierung erfolgreich war (siehe 3.5.1).

Das verwendete Restriktionsenzym PvuI-HF schneidet zwischen folgenden Aminosäuren: CGAT/CG.

#### 3.2.2.2 Extraktion von DNA

Nach dem enzymatischen Verdau, folgte die Extraktion der linearisierten DNA. Für die Extraktion wurde eine Phenolisierung von Proteinen aus Nukleinsäuren durchgeführt. Phenol ist ein sehr guter Wasserstoffbrückenbildner und kann gleichzeitig hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureseitenketten ausbilden. So dissoziiert Phenol Protein-/Nukleinsäuren-komplexe in ihre einzelnen Komponenten. Die Proteine werden denaturiert und reichern sich in der Phenolphase an. Um Proteinverunreinigungen aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen, benutzt man ein Gemisch aus Phenol, Chlorophorm und Isoamylalkohol. Während Chlorophorm Proteine denaturiert und die Phasentrennung erleichtert, verhindert Isoamylalkohol das Schäumen und das Ausbilden einer intensiven Interphase. Ist die Phasengrenze deutlich zu erkennen, kann die oberer Phase mit der Nukleinsäure in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden. Um die letzten Phenolreste aus der Lösung zu entfernen wurde der beschriebene Vorgang mit Chlorophorm wiederholt (101).



Zu dem Verdau-Ansatz folgte die Zugabe von 500 µl Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol. Nach kurzem Vortexen wurde 1 min bei maximaler Geschwindigkeit (13000 rpm) und Raumtemperatur zentrifugiert.

In dieser Zeit wurden drei 1,5 ml Eppendorf Gefäße beschriftet und folgende Substanzen hinein pipettiert:

Eppendorfgefäß 1: 500 µl Chlorophorm + Isoamylalkohol

Eppendorfgefäß 2: 500 µl Chlorophorm + Isoamylalkohol

Eppendorfgefäß 3: 49 µl Natriumacetat 3 M pH 5,2

Nach der Zentrifugation erfolgte das vorsichtige Abnehmen der oberen Phase. Diese wurde in das erste Eppendorfgefäß überführt, gevortext und nochmals wie beschrieben zentrifugiert. Anschließend erfolgte nochmals das Abnehmen der oberen Phasen und überführen in das zweite Eppendorfgefäß, mit darauffolgendem vortexen und abzentrifugieren. Die obere Phase wurde ein letztes Mal abgenommen und in das dritte Eppendorfgefäß überführt. Nun folgte die Zugabe von 1,2 ml Ethanol  $\geq 99,9\%$ , durch leichtes schwenken wurden die Substanzen vermischt. So konnte die DNA durch Ausfällung sichtbar gemacht werden, diese kann in salzhaltigen wässrigen Lösungen durch Zugabe von Alkohol präzipitiert werden. Die Fällung findet bei  $-20\text{ °C}$  für zwei Stunden oder bis über Nacht statt, die Dauer der Fällung richtet sich nach der Konzentration der zu präzipitierenden Nukleinsäurelösung (101). Bei der Ethanol-fällung wird die DNA unter leicht sauren Bedingungen, bei einem pH-Wert von 5,2 in einer weniger polaren alkoholischen Umgebung, aufgrund der Verringerung der Löslichkeit ausgefällt (107).

Das letzte Eppendorfgefäß mit der ausgefällten DNA wurde über Nacht bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren. Am nächsten Morgen erfolgte die Zentrifugation (13000 rpm, 30 min,  $4\text{ °C}$ ) und der Überstand wurde sehr vorsichtig mit einer 200 µl Pipette abgenommen. Eine weitere Zentrifugation folgte für 5 min. Die Probe wurde bei offenem Deckel unter der Sterilbank getrocknet. Nach Zugabe von 50 µl HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  konnte die Probe im NanoDrop gemessen werden. HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  ist hoch raffiniertes,  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  gefiltertes Wasser (108). Die linearisierte DNA wurde, bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

### 3.2.3 Nukleofektion von SP2/0 Zellen mit DLA-88\*50101

Bei der Nukleofektion handelt es sich um eine Elektroporation, eine Transfektionsmethode die den Transfer von Nukleinsäuren in Zellen ermöglicht. Bei einer Elektroporation werden Zellen, in einer DNA haltigen Lösung, einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt, welcher kurzfristig das Membranpotential der Zellen zerstört (109). Dabei entstehen Membranporen, durch die genetisches Material passiv durch Diffusion, als auch elektrophoretisch ins Cytoplasma gelangt (110) (111). Bei der Nukleofektion wird eine Kombination von elektrischen Parametern, die von dem Nukleofektor erzeugt werden und Zelltyp-spezifischen Reagenzien angewandt. Zelltyp-spezifische Reagenzien sorgen dafür, dass die DNA vom Cytoplasma in den Zellkern gelangt (112).

Bei Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hat sich gezeigt, dass sich Sp2/0 Zellen nicht chemisch durch Lipofektamin transfizieren lassen, deshalb wurde für die Transfektion der Zellen die Nukleofektion gewählt.

#### 3.2.3.1 Testen verschiedener Programmeinstellungen

Um ein passendes Programm für die Nukleofektion der Sp2/0 Zelle zu etablieren, musste zuerst ein Testdurchlauf mit drei Probenansätzen und einem Testplasmid durchgeführt werden.

Es mussten mindestens  $1 \times 10^6$  Zellen/ml je Probenansatz ausgezählt und auf 1,3 ml mit IMDM Zellkulturmedium eingestellt werden. Die Sp2/0 Zellen wurden ausgezählt und zeigten eine Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml. Da die gewünschte Zellmenge vorhanden war, wurden für insgesamt drei Probenansätze 3,9 ml Suspension der Sp2/0 Zellen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und anschließend zentrifugiert (4 °C, 1200 rpm, 7 min). Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 15 ml PBS resuspendiert und ein weiteres Mal wie beschrieben zentrifugiert. Nach entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 3,9 ml PBS aufgenommen, resuspendiert und je 1,3 ml der Zellsuspension in drei 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert.

Die vorbereiteten Eppendorfgefäße wurden zentrifugiert (1200 rpm, 10 min) und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, ohne das Zellpellet zu berühren.

Für jeden Transfektions-Ansatz wurden folgende Reagenzien verwendet:

---

|                             |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| Nukleofektion Solution Kit: | 2 µl Testplasmid (0,5 µg/µl) |
|                             | 81 µl CLB-Buffer             |
|                             | 19 µl Supplement             |

---

Von der Mischung wurden 100 µl auf das Zellpellet der ersten Probe pipettiert und dieses somit aufgenommen. Durch leichtes auf und ab pipettieren wurde das Pellet resuspendiert und anschließend in eine Küvette gegeben, nun konnte die Probe in den Nukleofektor gestellt und Programm 3 gestartet werden. Mit den zwei weiteren Proben wurde ebenso verfahren, jedoch wurden einmal Programm 6 und als letztes Programm 9 verwendet. Die Programme unterscheiden sich in der Stärke des Stromstoßes, dieser wurde mit aufsteigender Nummerierung immer stärker.

In eine 6 Well Platte wurden in vier Wells jeweils 3 ml IMDM Zellkulturmedium pipettiert, in 3 Wells davon wurden die transfizierten Zellproben und in ein Well 1,3 ml Sp2/0 Zellen hinzugegeben. Diese Zellen dienten als Kontrolle, anhand dieser konnte die Sterberate der transfizierten Zellen eingeschätzt werden.

Am nächsten Tag erfolgte eine FACS-Analyse, um zu analysieren, welches Programm sich am geeignetsten für eine Transfektion der Sp2/0 Zellen mit DLA-88\*50101 Zellen darstellte (siehe 4.2.1). Die Zellen der 6 Well Platte wurden für die FACS-Analyse jeweils komplett entnommen, zentrifugiert (120 rpm, 7 min, 4 °C,) und anschließend zwei Mal mit FACS-Puffer gewaschen. Hierfür wurde zu jeder Probe 4 ml FACS-Puffer gegeben, die Zellen resuspendiert und wieder zentrifugiert, so wurde zwei Mal verfahren. Für die Messung am FACS Calibur wurde jede Probe in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen pipettiert.

### **3.2.3.2 Transfektion von Sp2/0 Zellen mit DLA-88\*50101**

Für die Transfektion der Sp2/0 Zellen mit DLA-88\*50101 wurde Programm 6 des Nukleofektors verwendet. Die Sp2/0 Zellen wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und wie bei der Probetransfektion mit PBS gewaschen (siehe 3.2.3.1). Anschließend wurden die Zellen in 1,3 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

Das Eppendorfgefäß wurde bei Raumtemperatur zentrifugiert (1200 rpm, 10 min) und der Überstand vorsichtig abpipettiert, anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Nukleofektion-Mischung zu den Zellen.

---

|                         |                                       |
|-------------------------|---------------------------------------|
| Nukleofektion-Mischung: | 4 µl linearisierte DNA (DLA-88*50101) |
|                         | 81 µl CLB-Buffer                      |
|                         | 19 µl Supplement                      |

---

Die Probe wurde in den Nukleofektor gestellt und das Programm 6 gestartet. Nach der Nukleofektion wurde die Probe in das Well einer 6 Well Platte, mit vorgelegten 3 ml IMDM Zellkulturmedium, pipettiert.

### 3.2.4 Reklonierung transfizierter Zellen

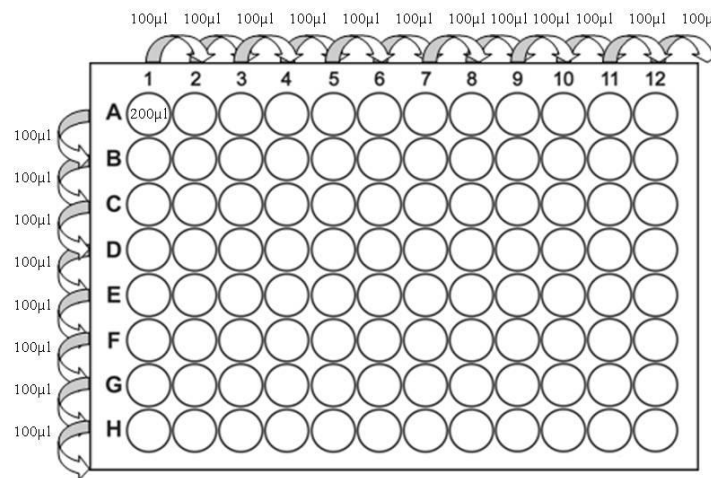
Nachdem die transfizierten Sp2/0 DLA-88\*50101 Zellen in Selektionsmedium kultiviert werden konnten, erfolgte eine Einzelklon-Verdünnung. Diese ist erforderlich um später einen Klon zu generieren, der die beste Expression besitzt. Die Expression beschreibt hierbei, wie viele MHC-Klasse-I-Moleküle des DLA-88\*50101 auf der Zelloberfläche gebildet werden. Mit diesem Klon kann eine monoklonale Zelllinie kultiviert werden, welche anschließend für die Immunisierung der Mäuse zur Verfügung steht.

Die Methode zur Vereinzelung eines Klons ist die Limiting Dilution. Sie basiert auf der Verdünnung einer Zellsuspension in mehreren Verdünnungsstufen, bis nur noch eine oder gar keine Zellen mehr in einer Verdünnungsstufe vorhanden sind. Dadurch kann aus einer einzelnen Zelle und deren entstehenden Tochterzellen, die genetisch identische Klone sind, eine monoklonale Zelllinie entstehen.

Bei der Reklonierung wurde folgendermaßen vorgegangen (siehe Abbildung 15):

In das Well A1 einer 96 Well Platte wurden 200 µl des zu reklonierenden Klons pipettiert und anschließend in alle anderen Wells jeweils 100 µl IMDM Zellkulturmedium mit G418 vorgelegt. Es wurden 100 µl der Zellsuspension aus A1 in das rechte danebenliegende Well A2 pipettiert, resuspendiert und danach wieder 100 µl aufgenommen, um sie in das nächste nebenliegende Well A3 zu überführen. Diese schrittweise Verdünnung der Reihe A wurde bis zum letzten Well der Reihe A12 durchgeführt. Die übrig gebliebenen 100 µl aus A12 wurden verworfen.

Anschließend wurde mit einer Multikanalpipette in die Reihe A, in die Wells A1 bis A12, 100 µl IMDM Zellkulturmedium + G418 pipettiert. Darauf folgte eine weitere Verdünnung mit einer Multikanalpipette. Von der gesamten Reihe A wurden je 100 µl in die darunterliegende Reihe B überführt, resuspendiert und anschließend wieder aufgenommen und sie in die nächste Reihe C zu pipettieren. Dieser Vorgang wurde bis zur Reihe H fortgeführt, wobei die übrigen 100 µl aus Reihe H verworfen wurden. Als letztes wurde auf die komplette 96 Well Platte in jedes Well nochmal 100 µl IMDM Zellkulturmedium + G418 gegeben, so dass jedes Well ein Gesamtvolumen von 200 µl aufwies.



**Abbildung 15: Schema der Reklonierung von Sp2/0 DLA-88\*50101 Zellen.**

In das Well A1 wurde der Klon pipettiert, welcher verdünnt werden sollte. Anschließend wurde dieser schrittweise von Reihe A1 bis A12 von links nach rechts und anschließend von A bis H von oben nach unten verdünnt. Am Ende jeder Reihe wurden 100 µl verworfen.

Quelle: (113) modifiziert von L.Lumpp.

Die 96 Well Platte wurde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach einer Woche konnte die Platte auf das Wachstum der Klone unter dem Lichtmikroskop kontrolliert werden. Sobald das Wachstum eines Klons in einem Well erkannt werden konnte, wurde dieser für die weitere Kultivierung in eine 24 Well Platte überführt und konnte in der FACS-Analyse getestet werden, um die Expression beurteilen zu können. Ein positiver Klon wurde daraufhin in eine 6 Well Platte überführt und weiter kultiviert. Wenn sich der Klon in einer Zellkulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Fläche befand, wurde die Expression im FACS Calibur nochmals kontrolliert. Wenn sich der Klon in der FACS-Analyse wieder positiv darstellte, stand dieser für die Immunisierung der BALB/c Mäuse zur Verfügung und wurde eingefroren, damit jederzeit ein Klon mit optimaler DLA-88\*50101 Expression vorhanden war.

### 3.3 Analytische Methoden

#### 3.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, das die Analyse von Zellen ermöglicht. Diese werden von einer Kapillare eingesaugt und mehrere physikalische Eigenschaften gemessen, während sie in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl fließen. Die gemessenen Eigenschaften umfassen von einer Zelle: die relative Größe, relative Granularität oder innere Komplexität und relative Fluoreszenzintensität. Diese Eigenschaften werden mit einem optisch-elektronischen Kopplungssystem ermittelt. Es zeichnet auf, wie die Zelle oder der Partikel in das Laserlicht eindringt und dadurch eine Fluoreszenz abgibt.

Ein Durchflusszytometer besteht aus drei Hauptsystemen:

- Das Fluidik-System transportiert Partikel in einem Strom zum Laserstrahl.
- Das Optiksytom besteht aus Lasern, um die Partikel im Probenstrom zu beleuchten und optischen Filtern, um die resultierenden Lichtsignale zu den entsprechenden Detektoren zu leiten.
- Das Elektroniksystem wandelt die detektierten Lichtsignale in elektronische Signale um. Dieses kann vom Computer verarbeitet werden. Es gibt auch eine Sortierfunktion, damit ist das Elektroniksystem auch in der Lage, Sortierentscheidungen zu initiieren, um Partikel aufzuladen und abzulenken.

Wenn Partikel den Laser passieren, streuen sie Licht. Sind auf den Zellen fluoreszierende Moleküle vorhanden, wird das gestreute und fluoreszierende Licht gesammelt. Lichtstreuung tritt auf, wenn ein Teilchen einfallendes Licht ablenkt. Das Ausmaß wie dies geschieht, hängt von den physikalischen Eigenschaften eines Teilchens ab, nämlich seiner Größe und internen Komplexität. Beeinflussende Faktoren der Lichtstreuung sind die Membran der Zelle, der Zellkern und jedes körnige Material in der Zelle. Eine fluoreszierende Verbindung absorbiert Lichtenergie über einen Bereich von Wellenlängen, der charakteristisch für diese Verbindung ist.

Durch die Absorption von Licht wird ein Elektron in der fluoreszierenden Verbindung auf ein höheres Energieniveau gehoben. Das angeregte Elektron zerfällt schnell in seinen Grundzustand und gibt die überschüssige Energie als Lichtphoton ab. Dieser Übergang von Energie heißt Fluoreszenz.

Bei der Durchflusszytometrie wird üblicherweise der Argon-Ionen-Laser verwendet, da dieser 488 nm Licht ausstrahlt und somit mehr als ein Fluorochrom angeregt werden kann (114). Eines dieser Fluorochrome ist FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), es ist ein grünfluoreszierendes Molekül. Die Menge des detektierten Fluoreszenzsignals ist proportional zur Anzahl der Fluorochrommoleküle auf dem Partikel. Die FACS-Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) ist eine Form der Durchflusszytometrie. Ein Lichtstrahl wird auf die Zellen geschossen und je nach deren Eigenschaft wieder emittiert. Fluoreszenz markierte Zellen werden je nach Färbung in unterschiedliche Reagenzgefäße sortiert. Je nachdem welches Merkmal man bei einer Zelle untersuchen möchte, muss dieses Merkmal vorher markiert werden.

Bei jeder Durchflusszytometrie wurde folgender Waschschrift durchgeführt: Zentrifugation der FACS-Röhrchen oder Well Platte nach der Inkubationszeit für 5 min bei 4 °C und 1200 rpm. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgekippt und die Probengefäße kurz gevortext, um die Zellen in Suspension zu bringen. Nun wurde FACS-Puffer auf alle Proben pipettiert und anschließend wieder wie beschrieben zentrifugiert. Es folgte erneut das abkippen des Überstandes und resuspendieren der Proben durch vortexen. Danach wurden die Proben entweder weiter verwendet oder es folgten weitere Waschschrte.

Adhärenente Zellen mussten vor der FACS-Analyse durch ein Zellsieb (100 µm) in die FACS-Röhrchen pipettiert werden. Dies ist notwendig, um die Zellkontakte zu lösen, damit die Zellen vereinzelt vorliegen und gemessen werden können.

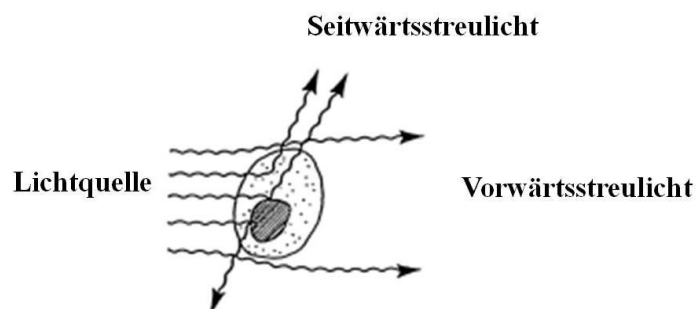
Es war darauf zu achten, dass die Proben jederzeit mit Alufolie abgedunkelt wurden und auf Eis standen, um eine Abschwächung der Fluoreszenz durch Ausbleichung zu verhindern.

Die Proben wurden am FACS Calibur mit dem Programm CellQuestPro gemessen. Es wurden folgende Einstellungen verwendet:

| Detector | Voltage      | AmpGain | Mode |
|----------|--------------|---------|------|
| FSC      | E-1          | 4,99    | Lin  |
| SSC      | 480          | 1       | Lin  |
| FL-1     | 510 oder 520 | 1       | Log  |

FSC („*Forward Scatter*“) ist das Vorwärtsstreulicht, damit wird die Beugung des Lichts bei einem flachen Winkel gemessen, welche von dem Volumen der Zelle abhängt. Es ist proportional zur Zelloberfläche oder –größe.

SSC („*Side Scatter*“) ist das Seitwärtsstreulicht, dieses ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, welche von der Granularität der Zelle abhängig ist (siehe Abbildung 16).

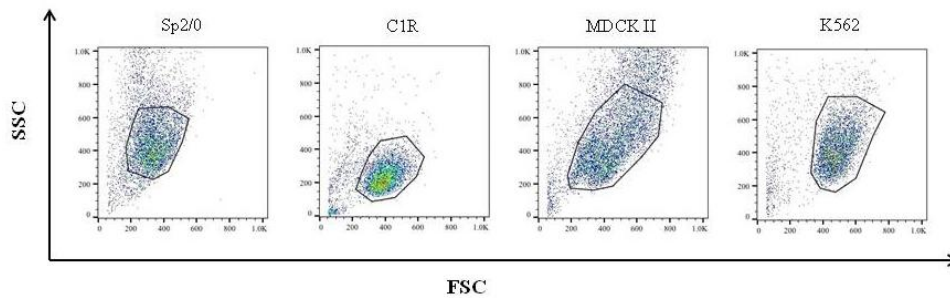


**Abbildung 16: Lichtstreuungseigenschaften einer Zelle.**

Das Licht wird von dem Volumen der Zelle vorwärts gestreut (FSC) und von der Granularität der Zelle im rechten Winkel seitwärts abgelenkt (SSC). Quelle: (114) modifiziert von L.Lumpp.

Aus diesen beiden Parametern ergibt sich die Punktauftragung der Zellen in einem „Dot Plot“ (siehe Abbildung 17). Da sich unterschiedliche Zelltypen in Größe und Granularität unterscheiden, zeigten sich diese in der FACS-Analyse in unterschiedlichen Bereichen. Die zu analysierende Zelllinie wurde mittels Gating eingegrenzt (siehe Abbildung 17). Es fanden daraufhin nur Messungen der Fluoreszenz mittels FL1, an Zellen in diesem markierten Bereich statt. Dadurch konnte der Anteil an Zelltrümmern ausgegrenzt werden, damit diese nicht gemessen wurden. In dem jeweiligen Zellgate wurden zwischen 5000 und 10000 Zellen je Probenmessung gezählt.

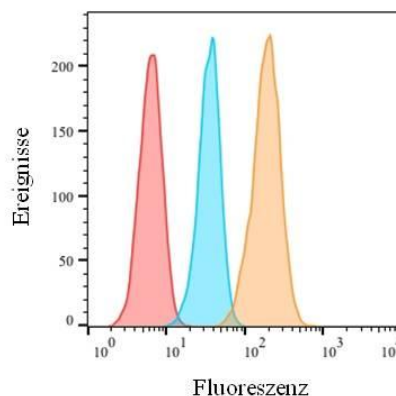




**Abbildung 17: Dot Plot jeder verwendeten Zelllinie.**

Diese Abbildung zeigt das manuell eingestellte Gate jeder Zelllinie die verwendet wurde. Transfizierte Zelllinien zeigen dieselbe Gate-Einstellung wie ihre ursprünglichen Zelllinien. Jede Zelllinie hat ein individuelles Gate im Dot Plot.

Um Antikörper zu markieren, die DLA binden, wurde Anti-Maus-IgG-FITC-Antikörper verwendet. Es können so bestimmte Zellbestandteile durch Fluorochrom gekoppelte Antikörper detektiert werden. Mit FL1 (Fluoreszenzintensität) erfolgte der Nachweis von FITC markierten Oberflächenmolekülen. Deshalb war es wichtig, eine mittels FITC markierte sekundäre Antikörperbehandlung durchzuführen. Diese zeigte jene Bindungsstellen auf, die von dem primären Antikörper zuvor gebunden wurden. Nur wenn der primäre Antikörper zuvor auf ein Oberflächenmolekül der Zelle binden konnte, fluoresziert dieses anschließend bei der Analyse im FACS. Umso höher die Anzahl an primären Bindungen, desto höher ist die detektierte Fluoreszenz. Die Ergebnisse der gemessenen Fluoreszenzsignale wurden anhand ihrer Intensität in einem Histogramm dargestellt (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 18: Beispiel Darstellung eines Histogramms.**

Die rote Kurve zeigt die geringste Fluoreszenz, danach folgt die blaue Kurve und die größte Fluoreszenzintensität zeigt Kurve orange, die rechts im Histogramm zu sehen ist. Je weiter rechts sich eine Kurve im Histogramm darstellt, desto höher ist deren Fluoreszenzintensität. Die Ereignisse stellen die Menge an analysierten Zellen dar, je mehr Zellen analysiert wurden, desto höher stellt sich die Kurve im Histogramm dar.

Mittels Fluoreszenzanalyse ließ sich ermitteln, ob transfizierte Zellen DLA-88\*50101 präsentierten, wie viel Antikörper im Serum der immunisierten Mäuse gegen DLA-88 vorhanden war und ob Hybridomaüberstände eine Antikörperspezifität gegenüber DLA-88 aufwiesen.

### 3.3.1.1 Kontrolle der Expression von Zellen

Um sicher zu sein, dass die Sp2/0 DLA-88\*50101 Zellen genug DLA exprimierten, um eine Immunreaktion hervorzurufen, wurden diese vor jeder Immunisierung getestet. Als Kontrolle wurden Sp2/0 und C1R DLA-88\*50101 Zellen verwendet. Sp2/0 Zellen wurden als Negativkontrolle eingesetzt, da sie kein DLA-88\*50101 besitzen und der Primärantikörper H58A bei diesen Zellen nicht binden kann. C1R DLA-88\*50101 Zellen präsentieren DLA-88\*50101 an ihrer Zelloberfläche, weshalb sie als Positivkontrolle verwendet wurden. Der Primärantikörper H58A bindet hierbei auf Humanem MHC und auf Hunde DLA. Bei jeder Zelllinie, diente FACS-Puffer als negative Vergleichsprobe. Der primär Antikörper H58A wurde verwendet, um auf den transfizierten Zellen das MHC-Klasse-I-Molekül zu binden, welches mit einem sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG-FITC-Antikörper), im FACS Calibur, aufgrund seiner Fluoreszenz sichtbar gemacht werden konnte. So konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Expression von DLA-88\*50101 auf transfizierten Zellen vorhanden war. Die verwendeten Zelllinien wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und je Probe 100  $\mu$ l Zellsuspension in eine 96 Well Platte pipettiert.

#### Primärantikörper-Behandlung:

Zu den Proben wurde 100  $\mu$ l FACS-Puffer oder 100  $\mu$ l der Primärantikörpermischung H58A (0,1mg/ml) in einer Verdünnung von 1:50 in FACS-Puffer pipettiert (siehe Tabelle 3.1). Danach wurde die Platte für 30 min auf Eis bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgte die Zentrifugation der Platte (1200 rpm, 5 min, 4 °C). Bei allen FACS-Analysen wurden die Proben in diesen Einstellungen zentrifugiert, dann wurde zwei Mal mit 200  $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen. Während des letzten Waschschritts wurde eine Lösung in FACS-Puffer mit dem Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG-FITC-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 angesetzt.

Sekundärantikörper-Behandlung:

Nach Zugabe von 100 µl Sekundärantikörperlösung zu jeder Probe, erfolgte eine erneute Inkubation (20 min, 4 °C), danach wurde die Platte zentrifugiert und anschließend einmal gewaschen.

Die Proben wurden in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt, damit sie im FACS Calibur gemessen werden konnten.

**Tabelle 3.1: Kontrolle der Expression von transfizierten Zellen**

| Probe | Zelllinie          | Primärantikörper | Sekundärantikörper |
|-------|--------------------|------------------|--------------------|
| 1     | Sp2/0              | FACS-Puffer      | Anti-Maus-IgG-FITC |
| 2     | Sp2/0              | H58A             | Anti-Maus-IgG-FITC |
| 3     | Sp2/0 DLA-88*50101 | FACS-Puffer      | Anti-Maus-IgG-FITC |
| 4     | Sp2/0 DLA-88*50101 | H58A             | Anti-Maus-IgG-FITC |
| 5     | C1R DLA-88*50101   | FACS-Puffer      | Anti-Maus-IgG-FITC |
| 6     | C1R DLA-88*50101   | H58A             | Anti-Maus-IgG-FITC |

**3.3.1.2 Quantitative Bestimmung von MHC-Klasse-I-Molekülen**

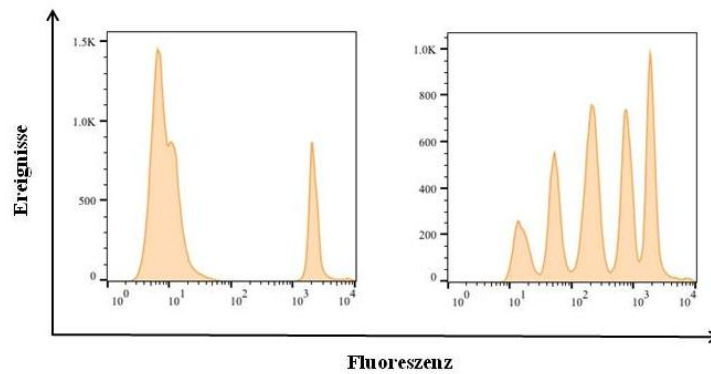
Um zu bestimmen, wie viele MHC-Klasse-I-Moleküle sich auf den Zellen befinden, kann eine quantitative Bestimmung mit einem QIFI Kit durchgeführt werden. Mit dem verwendeten QIFI Kit konnte die Dichte der Antikörperbindung an das Antigen, pro Zelle, mit einer Durchflusszytometrie bestimmt werden. Ein QIFI Kit enthält fünf Populationen von Beads, wobei jede Population mit einer definierten Anzahl von Bindungspositionen ausgestattet ist. Diese Bindungsstellen sind Maus-Antikörper (hochaffine, antihumane CD5 Klone CRIS-1 vom Isotyp IgG<sub>2a</sub>).

Die Bindungsstellen an Antikörper im verwendeten Kit reichten von 2.000 bis 769.000. Das Kit eignet sich gut für den Einsatz in indirekter Immunfluoreszenz, mit jedem unkonjugierten monoklonalen Maus Antikörper des IgG-Isotyps. Zur Bewertung der Antigendichte müssen die Antikörper in Sättigung verwendet werden (115).

Es wurden sechs Ansätze pro Zelllinie mit je  $5 \times 10^5$  Zellen/ml benötigt, die Hälfte davon waren Kontrollproben. Zu drei Proben wurde der Antikörper H58A gegeben. Für die restlichen Proben wurde als Negativkontrolle, ein Isotyp, der pERK Antikörper, verwendet. Der Isotypantikörper ist in der gleichen Spezies generiert worden und weist den gleichen Subtyp auf wie der markierende Antikörper (H58A). Jedoch ist dieser nicht spezifisch und bindet somit nicht an die Zielzelle (116). Nach Einstellen der Zellzahl, wurden die Zellen in FACS-Röhrchen pipettiert, zentrifugiert und anschließend einmal mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde abgekippt und es folgte die primäre Antikörperbehandlung mit H58A (1:50 in FACS-Puffer verdünnt). Die Isotypkontrolle pERK wurde in einer 1:100 Verdünnung verwendet. Pro Zellprobe wurden 100  $\mu$ l Antikörpermischung hinzugeben. Die Beads-Röhrchen wurden ausgiebig gevortext und je 100  $\mu$ l Set-Up Beads und Calibration Beads in je 4 ml FACS-Puffer, in FACS-Röhrchen pipettiert. Nun wurden alle Proben für 30 min auf Eis bei 4 °C inkubiert und anschließend zweimal mit je 4 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von je 100  $\mu$ l der Sekundärantikörperlösung (Anti-Maus-IgG-FITC-Antikörper 1:100 in FACS-Puffer) zu allen Proben, erfolgte eine erneute Inkubation (20 min, auf Eis, abgedunkelt). Durch den mit FITC-markieren Antikörper, wurden die Zellen, Set-Up Beads und Calibration Beads des Kits parallel markiert. Daraufhin folgten zwei weitere Waschschrte mit anschließender Zugabe von 500  $\mu$ l FACS-Puffer zu jeder Probe. Die Messung der Proben fand am FACS Calibur statt.

Der primäre Antikörper, der für die Markierung der Zellen verwendet wurde, musste in Sättigungskonzentration verwendet werden, denn dann entspricht die Anzahl der gebundenen primären Antikörpermoleküle der Anzahl, der auf der Zelloberfläche vorhandenen Antigenbindungsstellen. Der sekundäre Antikörper wurde auch in Sättigungskonzentration verwendet, folglich korreliert die Fluoreszenz mit der Anzahl der gebundenen primären Antikörpermoleküle an den Zellen und den Beads (117).

Die Set-Up Beads wurden als erstes am FACS Calibur analysiert. Diese Probe wurde verwendet, um das Fenster der Analyse zu etablieren. Die Calibration Beads wurden für den Aufbau einer Eichkurve (*Mean Fluorescence Intensity*, MFI) verwendet (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19: QUIFI Kit Beads im Histogramm dargestellt.**

Histogramm der Set-Up Beads (links) und Calibration Beads (rechts). Von jeder Kurve der Calibration Beads wurde ein Median bestimmt, von links nach rechts wurden die Kurven von B bis F gekennzeichnet. Die Anzahl an Antikörpern pro Perle beträgt bei B: 2000, C: 10000, D: 42000, E: 158000, F: 769000. Der ermittelte Median betrug bei B: 1486, C: 5233, D: 20908, E: 74989, F: 182692.

### 3.3.1.3 Durchflusszytometrische Analyse von Mausseren

Um die Spezifität der Antikörperproduktion zu untersuchen, wurde das Serum der immunisierten Mäuse, auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen DLA-88\*50101 getestet. Dadurch konnte analysiert werden, ob die gewünschte Immunreaktion, durch die Immunisierungen der Mäuse erreicht wurde. Nach jeder Blutentnahme wurde das gewonnene Blut verarbeitet und das Serum getestet (siehe Tabelle 4.1).

Die Seren wurden im Laufe dieser Arbeit auf folgenden Zellen getestet:

- C1R DLA-88\*50101
- K562 DLA-88\*50101
- MDCK II

Die Zelllinie auf der die Seren getestet werden sollten, wurde auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt, je 100  $\mu$ l Zellsuspension wurden in einer 96 Well Platte ausplattiert.

### Primärantikörper/Serum-Behandlung:

Der Primärantikörper H58A diente als Positivkontrolle auf transfizierten DLA-88\*50101 Zellen. Er wurde in einer Verdünnung von 1:50 in FACS-Puffer eingesetzt und insgesamt 50 µl zu jeder Zellprobe gegeben, 50 µl FACS-Puffer dienten als Negativkontrolle.

Anschließend wurden Serumverdünnungen angesetzt, je Serumprobe wurde 1 µl Serum mit 49 µl FACS-Puffer gemischt (1:50 Verdünnung) und zu der jeweiligen Zellprobe pipettiert. Als Vergleichsprobe wurde für jedes Hyperimmunserum das jeweilige Präimmunserum der Maus verwendet. Dieses Serum wurde vor der ersten Immunisierung jeder Maus gewonnen. Nachfolgende Seren wurden als Hyperimmunserum bezeichnet. Um zu untersuchen, in welcher Verdünnungsstufe die Seren für die FACS-Analyse eingesetzt werden konnten, wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen getestet. Anfänglich wurde das Serum 1:20 verdünnt eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, dass bessere Ergebnisse mit einer 1:50 Verdünnung erzielt werden konnten, weshalb im weiteren Verlauf mit dieser Verdünnungsstufe gearbeitet wurde.

Nach der Zugabe von FACS-Puffer, Antikörperverdünnung oder Serumverdünnung zu den jeweiligen Proben, wurden diese für 30 min auf Eis bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation und das zweimalige waschen mit 200 µl FACS-Puffer.

### Sekundärantikörper-Behandlung:

Als Sekundärantikörper wurde Anti-Maus-IgG-FITC-Antikörper verwendet. Dieser wurde in einer 1:100 Verdünnung angesetzt und jeweils 50 µl zu allen Proben gegeben, danach wurde für 20 min auf Eis bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte das Zentrifugieren der Platte und anschließendem Waschgang mit 200 µl FACS-Puffer. Die Zellen wurden anschließend in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen, in FACS-Röhrchen pipettiert und am Durchflusszytometer analysiert.

### 3.3.1.4 Durchflusszytometrische Analyse von Hybridomüberständen

Konnte ein Klon mit ausreichendem Wachstum und orange bis gelb verfärbtem Medium erkannt werden, wurde sein Überstand in der FACS-Analyse getestet. Durch das Screening der Hybridomaüberstände wurde untersucht, ob ein Klon spezifische Antikörper gegen DLA-88 produziert. Dafür wurden die Überstände auf K562 DLA-88\*50101 Zellen getestet. Wurde ein Überstand als positiv bewertet, folgten weitere FACS-Analysen auf MDCK II und C1R DLA-88\*50101 Zellen. Gesucht wurde ein Antikörper, der eine positive Reaktion auf DLA-88 transfizierten Zellen und MDCK II Zellen zeigte. Dieser würde somit DLA-88 spezifische Antikörper produzieren.

Für das Screening wurden je Zelllinie  $4 \times 10^6$  Zellen/ml benötigt.

#### Primärantikörper/Hybridomaüberstand-Behandlung:

Auf einer 96 Well Platte wurde für jede Probe 50 µl Zellsuspension pipettiert. Als Negativkontrolle wurde 50 µl HAT Zellkulturmedium verwendet und als Positivkontrolle 50 µl des 1:50 verdünnten Antikörpers H58A (0,1mg/ml).

Anschließend folgte die Zugabe von je 50 µl des zu testenden Hybridomaüberstandes zu den restlichen Proben.

Die Platte wurde für 30 min auf Eis bei 4 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4 °C).

Es folgten zwei Waschschrte mit 200 µl FACS-Puffer.

#### Sekundärantikörper-Behandlung:

Die Sekundärantikörper Behandlung wurde mit Anti-Maus-IgG-FITC-Antikörper (1:100 verdünnt in FACS-Puffer) durchgeführt. Dafür wurde für jede Probe 50 µl Antikörpermischung verwendet und die Platte anschließend für 20 min auf Eis bei 4 °C inkubiert.

Nach Zentrifugation wurden die Proben mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen.

Für die Messung im FACS Calibur wurden die Proben in je 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen pipettiert.

### 3.3.1.5 Durchflusszytometrische Analysen am FACS Canto

Da das Durchflusszytometer FACS Calibur nicht mehr funktionsfähig war, mussten auch Analysen am FACS Canto durchgeführt werden. Die Bearbeitung der Proben vor der FACS-Analyse erfolgten identisch, wie in 3.3.1 beschrieben.

Die Proben wurden mit dem Programm DIVA gemessen. Es wurden folgende Einstellungen verwendet:

**Tabelle 3.2: Einstellungen am FACS Canto**

| Detector | Voltage |
|----------|---------|
| FSC      | 280     |
| SSC      | 400     |
| FITC     | 370     |

Für FITC wurde “Log“ eingestellt, für FSC wurde “H“ (=height) und für alle drei “A“ (=area) verwendet.

### 3.3.1.6 Bindekapazität des Antikörpers

Für die Bestimmung der Bindekapazität wurden je  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml der MDCK II und K562 DLA-88\*50101 Zellen benötigt. Insgesamt wurden 100  $\mu$ l Zellen pro Well in einer 96 Well Platte ausplattiert.

Als Negativkontrolle wurde FACS-Puffer verwendet und als Positivkontrolle H58A (1:50). Alle Verdünnungen erfolgten mit FACS-Puffer. Für die Verdünnungsreihe wurde der aufgereinigte Antikörper 12.C8F6 angesetzt. Folgende Antikörperkonzentrationen wurden eingesetzt: 0,15  $\mu$ g, 0,3  $\mu$ g, 0,6  $\mu$ g, 1,25  $\mu$ g, 2,5  $\mu$ g, 5  $\mu$ g, 10  $\mu$ g und 20  $\mu$ g.

Es folgte die Inkubation für 30 min, abgedunkelt, auf Eis bei 4 °C. Die darauffolgenden Waschschritte und die Sekundäre Antikörperbehandlung erfolgten wie in 3.3.1.3 beschrieben.

Die Zellen wurden anschließend in 200  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und die MDCK II Zellen durch ein Sieb (100  $\mu$ m) in die FACS-Röhrchen filtriert. Die Messungen der Proben erfolgten am FACS Canto.



### 3.3.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie bezeichnet ein Verfahren, das die spezifische Ladung (Verhältnis von Masse zur Ladung) von Molekülen analysiert. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Bevor die Proben mit dem Massenspektrometer analysiert werden konnten, erfolgte eine Auftrennung durch eine Hochflüssigkeitschromatographie (HPLC). Diese ist mit der Ionisationsquelle verbunden. Die ionisierten Moleküle wurden durch die sogenannte Elektrospray-Ionisation (ESI) erzeugt, dabei wird die Probe versprüht, ionisiert und die Tröpfchen anschließend getrocknet. Es bleiben die Ionen der Moleküle zurück. Die Analyse der isolierten Peptide fand in einem Hybridmassenspektrometer LTQ Orbitrap XL von Thermo Scientific statt. Dieses Massenspektrometer koppelt zwei Analysatoren, die LTQ (*linear trap quadrupole*) und einen Orbitrap-Massenanalysator. Die Ionen gelangen über eine Kapillare in das Massenspektrometer und werden in die lineare Ionenfalle injiziert. Dort wird der Ionenstrom fragmentiert und gemessen und die Ionen werden weiter über Zwischenstufen in den Orbitrap-Massenanalysator gelenkt. In diesem befindet sich eine zentrale, spiralförmige Elektrode. Die Ionen, die radial zu dieser Elektrode in den Analysator gelangen, bewegen sich auf Orbits um die zentrale Elektrode herum. Der Grund hierfür ist die elektrostatische Anziehung, da die Ionen nicht zentral injiziert werden schwingen sie entlang der Achse der zentralen Elektrode. Die Frequenz dieser Oszillation wird von einem Detektor registriert, aus der dann das Masse/Ladungs-Verhältnis berechnet werden kann (118). Die Messungen der Proben am Massenspektrometer LTQ Orbitrap XL wurden von Michael Ghosh durchgeführt.

## 3.4 Tierexperimentelle Methoden

### 3.4.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen DLA-88

Monoklonale Antikörper sind spezifisch gegen ein einzelnes Epitop gerichtet. Sie werden von einer Zelllinie produziert, die auf einen einzelnen B-Lymphozyten zurückzuführen ist. Dadurch sind alle Zellen die von diesem Lymphozyten abstammen identisch und somit auch die produzierten monoklonalen Antikörper.

Für die Herstellung monoklonaler Antikörper wurden Milzzellen einer immunisierten Maus, mit Myelomazellen fusioniert. Man erhält eine Zelle die Antikörper sezernieren kann und unsterblich ist, diese fusionierten Zellen nennt man Hybridomzellen.

#### 3.4.1.1 Versuchstiere

Der Tierversuch wurde vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (35/9185.82-2). Für die Herstellung monoklonaler Antikörper wurden acht Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse immunisiert. Diese lebten unter pathogenarmen Bedingungen, in einem Raum mit konstanten Klimabedingungen, bei einem Tag-Nach-Rhythmus von je 12 Stunden, Futter und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

BALB/c Mäuse sind Albino, haben rosa Augen mit weißen Haaren und stammen aus einem Inzucht-Stamm. Seit über 230 Generationen werden sie gezüchtet und stammen aus dem Jahr 1920 aus New York. Sie sind weltweit verbreitet und eine der fünf häufigsten verwendeten Inzucht-Stämme in der biomedizinischen Forschung, vor allem in der Immunologie und Infektionskrankheiten Forschung. Bei diesen Mäusen können die  $T_H2$ -Zellen leichter durch Immunisierung aktiviert werden, was zu einer ausgezeichneten Immunantwort führt (119).

Die Mäuse wurden anhand von Ohrmarkierungen identifiziert. Maus 1 zeigte eine Kerbe im linken Ohr, Maus 2 eine im rechte Ohr und Maus 3 hatte keinerlei Markierungen an den Ohren.

Alle Tierversuche wurden von Prof. Dr. Planz durchgeführt. In regelmäßigen Abständen nahm man den Mäusen Blut ab, um die Antikörperproduktion gegenüber DLA-88 zu untersuchen (siehe Tabelle 4.1). Den Mäusen wurde hierfür *retrobulbär*, unter Isofloran-Narkose, Blut entnommen und dieses in ein Serumröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mindestens 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit das Blut durch gerinnen konnte. Der Überstand (Serum) über der Gelmatrix, der sich nach der Zentrifugation (300 rpm, 5 min, 21 °C) gebildet hatte, wurde in ein beschriftetes 0,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und bei -20 °C aufbewahrt.

#### **3.4.1.2 Präparation von Zellen für die Immunisierung**

Für die Immunisierung wurden jeder Maus  $1 \times 10^7$  Zellen in 200  $\mu$ l PBS injiziert.

Nach dem einstellen der Zelllinie auf die gewünschte Zellzahl wurden diese zentrifugiert (1200 rpm, 7 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet resuspendiert, in 50 ml kühles PBS aufgenommen und abzentrifugiert. Es folgte die Überführung in ein 15 ml Falcon-Röhrchen und das zweimalige Waschen mit 10 ml kühlem PBS. Die Waschschrte sind wichtig, damit das in der Zellsuspension enthaltene G418 des Zellkulturmediums vollständig entfernt wurde, dies könnte sonst zum Tod der Mäuse führen. Nach dem letzten Waschschrte wurde das Zellpellet in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen.

Es folgte die Bestrahlung der Zellen in der Laborgammabestrahlungsanlage bei 5,7 Gy/min für 3,41 min, um die DNA in Bruchstücke zu zerlegen, damit die Zellen sich nicht weiter teilen konnten, nachdem sie der Maus injiziert wurden. Sonst hätten die Zellen zu Tumorwachstum führen können. Nach der Bestrahlung konnte den Proben, wenn erforderlich je 10  $\mu$ l CpG hinzugefügt werden und anschließend den Mäusen injiziert werden.

### 3.4.2 Isolierung von PBMC's aus Hundeblut

Für die Immunisierung von Maus 2, wurden PBMC's (*Peripheral blood mononuclear cells*) aus Hundeblut isoliert. Das Hundeblut stammte aus dem AniCura Kleintiermedizinischen Zentrum Hüttig GmbH in Reutlingen. Es wurden 4 ml Hundeblut aus einem EDTA Blutröhrchen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 8 ml PBS gemischt. In ein 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 12 ml Ficoll pipettiert. Nun wurde langsam und vorsichtig das Blutgemisch über das Ficoll geschichtet und anschließend zentrifugiert (400 xg, 30 min, 20 °C, ohne Bremse). Dies war notwendig, damit beim Abbremsen der Zentrifuge die getrennten Blutbestandteile nicht wieder vermischt werden.

Mithilfe des Ficoll wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, bei der die unterschiedlichen Blutzellen getrennt wurden (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20: Schematische Darstellung einer Dichtegradientenzentrifugation.**

Vor der Zentrifugation lagen die Blutzellen gemischt in der Probe vor. Nach der Zentrifugation, konnten die Zellen in verschiedenen Phasen gefunden werden. Je schwerer ein Blutbestandteil war, desto weiter unten war dieser im Falcon-Röhrchen zu finden. Für weitere Versuche wurde ausschließlich die Phase mit den PBMC's isoliert.

Quelle: (120) modifiziert von L.Lumpp.

Anschließend wurde die PBMC-Phase vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dieses wurde zwei Mal mit RPMI Medium aufgefüllt und für 10 min bei 20 °C, 400 xg mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen mit 5 ml PBS resuspendiert und ausgezählt. Es wurden drei Proben mit je  $5 \times 10^6$  Zellen hergestellt und für Immunisierungszwecke in Einfriermedium bei -80 °C eingefroren.

### 3.4.3 Immunisierung von BALB/c Mäusen

Damit eine Fusion mit antikörperproduzierenden B-Lymphozyten aus der Milz durchgeführt werden konnte, mussten die Mäuse mehrfach, alle zwei Wochen mit dem Antigen immunisiert werden. Es wurde gemäß §10 des Tierschutzgesetzes vorgegangen. Für die Immunisierung wurden verschiedene Zellen verwendet (siehe Tabelle 4.1). Nach Präparation der Zellen wurden jeder Maus 200 µl der Zellsuspension *intra peritoneal* (*i. p.*, in die Bauchhöhle) injiziert. Die letzte Injektion, vier Tage vor der Fusion (finale Boost), erfolgte *intra venös* (*i. v.*, in die Vene). Um die Immunreaktion zu verstärken wurde zeitweise ein Adjuvant injiziert, welches der Zellsuspension kurz vor der Immunisierung hinzugefügt wurde, dafür wurde CpG ODN verwendet.

CpG-Oligodeoxynucleotides (CpG ODN) sind kurze einzelsträngige synthetische DNA-Moleküle, die ein unmethyliertes CG (Cytosin-Guanin) -Dinucleotid in einer spezifischen Basensequenz enthalten (Sequenz: 5'-tccatgacggtcctgacggt-3'). Das p bezieht sich auf Phosphodiester. Diese CpG-Motive werden in eukaryotischer DNA nicht als pathogen-assoziiert betrachtet. Das CpG wird von dem *Toll-like receptor 9* (TLR9) erkannt. Der verwendete ODN 1826 ist ein Typ B murine TLR9 Agonist (121). Die Bindung von TLRs stimuliert eine Dimerisierung der Rezeptoren, wodurch Signalkaskaden gestartet werden. Unter anderem wird die TNF $\alpha$ -Produktion über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B angeregt. proinflammatorische Cytokine und Interferone werden ausgeschüttet. Bei der Verwendung als Impfstoff-Adjuvant verbessern CpG ODNs die Funktion von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen und erhöhen die Entstehung von humoralen und zellulären Impfstoff spezifischen Immunantworten. präklinische Studien zeigten, dass CpG ODNs die Aktivität von Impfstoffen gegen Infektionskrankheiten und Krebs verbessern. (122).

#### **3.4.4 Isolierung von Peritoneal-Makrophagen**

Einen Tag vor der jeweiligen Fusion wurden Peritoneal-Makrophagen aus dem Abdomen einer BALB/c Maus isoliert und in 96 Well Platten ausplattiert. Die Makrophagen sollten Zelltrümmer phagozytieren, die während des Selektionsprozesses bei der Fusion durch nicht fusionierte Zellen entstanden. Bei einer toten Maus wurden über einen Hautschnitt in das Abdomen 10 ml PBS, mittels Kanüle und 10 ml Spritze in die Körperhöhle eingebracht. Der Bauch wurde leicht massiert, das PBS in Nähe der Milz wieder aufgenommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Damit die Makrophagen nicht an der Gefäßwand des Falcon-Röhrchens adhären, wurden 10 ml FCS vorgelegt. Anschließend wurde das Falcon-Röhrchen mit PBS aufgefüllt und die Zellen zentrifugiert (1500 rpm, 10 min, 4 °C).

Je nach Anzahl der Well Platten wurden die Zellen mit HAT Zellkulturmedium resuspendiert und ausplattiert, pro 96 Well Platte wurden 10 ml benötigt. Die Peritoneal-Makrophagen aus einer Maus reichten für vier bis fünf Platten. Mit einer Multikanalpipette wurde in jedes Well 100 µl Makrophagenlösung ausplattiert und anschließend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert, bis am nächsten Tag die Fusion stattfinden sollte. Am Folgetag wurde das Medium auf Verfärbungen kontrolliert, um Kontaminationen auszuschließen.

#### **3.4.5 Fusion von murinen Milzzellen mit P3X63Ag8 Zellen**

Die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomazellen und anschließender Selektion im HAT Zellkulturmedium, dient der Generierung von Hybridomen. Diese sollen Antikörper gegen das MHC-Klasse-I-Molekül des Hundes (DLA) sezernieren.

Um die DLA Spezifität zu erhalten, wurden BALB/c Mäuse mit unterschiedlichen Immunisierungsverfahren immunisiert (siehe Tabelle 4.1).

P3X63Ag8 Zellen wurden kultiviert, um die Myelomazellen für die Fusion bereitzustellen.

#### Aufbereitung von Myelomazellen für die Fusion

Damit sich die Zellen für die Fusion in ihrer proliferativen Phase befinden, wurden diese 24 Stunden vor der Durchführung 1:2 umgesetzt. Die Zelldichte sollte  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml nicht überschreiten, hierfür wurde IMDM Zellkulturmedium verwendet, das nur 5 % FCS enthielt.

Zur Aufbereitung wurden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 7 min, 4 °C) und anschließend drei Mal mit 50 ml PBS gewaschen. Es folgte die Bestimmung der Lebendzellzahl und das Einstellen der Zellen auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml.

#### Aufbereitung von Milzzellen für die Fusion

Nach Tötung der Maus durch Begasung mit Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>), wurde die Milz in 5 ml PBS entnommen. Anschließend wurde die Milz mechanisch mit einem Spritzenstempel durch einen Sieb (100 µm) zerkleinert. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein steriles 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit IMDM aufgefüllt und 10 min stehen gelassen, anschließend wurde zentrifugiert (1200 rpm, 7 min, 4 °C). Es folgte die Resuspension des Zellpellet in 10 ml PBS und das Auszählen der Zellen mit einer Neubauer Zählkammer.

#### Fusion der Zellen

Beide Zelllinien wurden im gleichen Verhältnis in einem 50 ml Falcon-Röhrchen zusammen geführt. Dieses wurde mit PBS aufgefüllt und anschließend zentrifugiert (1200 rpm, 7 min, 4 °C). Es wurden  $7,7 \times 10^7$  Milzzellen in jeder Fusion verwendet.

Für die Fusion wurde PEG 400 aufgeköcht und 2,4 ml IMDM hinzugefügt. Danach wurden 50 %ige PEG-Lösungen als 1 ml Aliquot eingefroren. Während des Anwärmens eines 1 ml Aliquot auf 37 °C wurde das Zellpellet vorsichtig, durch Schnipsen, in der Hand resuspendiert. Anschließend folgte die Zugabe des PEG während 1 min unter ständigem schütteln, wobei das Falcon-Röhrchen schräg gehalten wurde, um das PEG langsam auf den Rand des Zellpellets fließen zu lassen. Danach wurde die Lösung für 90 Sekunden stehen gelassen. Aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit von PEG wurde das vorhandene Wasser gebunden. Dadurch wurde das Wasser zwischen den Membranen verdrängt, somit konnten die Zellmembranen in engen Kontakt miteinander gebracht werden und spontan fusionieren. Hierbei Fusionieren nicht nur Hybridomzellen mit B-Zellen sondern auch die jeweiligen Zelllinien untereinander, weshalb eine nachfolgende Selektion durch Selektionsmedium unbedingt erforderlich ist. Um den Stopp der Fusion herbeizuführen, wurde 10 ml IMDM Medium während 3 min unter ständigem schütteln zugegeben. Es ist wichtig das PEG zu verdünnen, da dieses auf Dauer toxisch wirkt.

Die Lösung wurde 5 min stehen gelassen, anschließend zentrifugiert (900 rpm, 5 min, 4 °C) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Zellpellet wurde schließlich in vorgewärmtem HAT Zellkulturmedium resuspendiert und pro Well 100 µl mit einer Multikanalpipette ausplattiert. Die Spitzen der Pipetten wurden aufgrund der wirkenden Scherkräfte abgeschnitten. Die Platten wurden im Brutschrank inkubiert und durften drei bis vier Tage nicht berührt werden. Es erfolgte eine Selektion von Hybridomazellen mit HAT Zellkulturmedium. P3X63Ag8 Zellen eignen sich als Fusionspartner, da diese dauerhaft kultiviert werden können. Ihnen fehlt das Enzym HGPRT und sie können deshalb nicht im HAT Zellkulturmedium überleben. Somit können nur Hybridomazellen kultiviert werden, die beide Eigenschaften besitzen.

Nach etwa 7 Tagen waren erste Hybridomzellen sichtbar. Das Wachstum der Hybridomzellen musste regelmäßig kontrolliert werden und unter dem Mikroskop geschaut werden, ob sich ein oder mehrere Klone in einem Well befinden. Sobald das Zellkulturmedium orange bis gelb verfärbt war, konnten die Überstände auf ihre Antikörperspezifität in einer FACS-Analyse getestet werden.

#### Unterschiede im Vorgehen bei Fusion Nr.2 und Nr.3

Es wurde dem IMDM Medium 5 % *Hybridoma Fusion and Cloning Supplement* (HFCS) zugesetzt. Dieses ersetzt die „feeder Zellen“, also die Makrophagen. Dem Hybridoma Zellkulturmedium wurde außerdem 20 % FCS anstatt 10 % FCS zugesetzt. Insgesamt wurden vier Fusionsansätze für  $6,6 \times 10^7$  Milzzellen durchgeführt. Die Fusion wurde mit PEG 1500 je 1 ml pro Fusionsansatz durchgeführt. Es wurden  $3 \times 10^4$  Zellen pro Well ausplattiert. Das HAT Zellkulturmedium wurde mit 20 % FCS und 5 % HFCS erst einen Tag nach der Fusion, in 2-facher Konzentration hinzugegeben. Anschließend wurden die 96 Well Platten mit Frischhaltefolie eingewickelt, um einem verdampfen des Zellkulturmediums entgegen zu wirken.



## 3.5 Biochemische Methoden

### 3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese von linearisierter DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Form der Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe, mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Agarose ist ein Polysaccharid, wenn es geschmolzen wird bildet es unverzweigte Helix Ketten aus. Dadurch entsteht ein Netzwerk und nach abkühlen auf Raumtemperatur ein festes Gel mit Poren (123). Diese sind abhängig von der Agarosekonzentration. Ein prozentige Gele weisen eine Porengröße von 150 nm auf und eignen sich gut zur Auftrennung von DNA (124).

Nach der enzymatischen Verdauung der DNA (siehe 3.2.2.1), erfolgte eine Gelelektrophorese, um zu kontrollieren ob die Linearisierung erfolgreich war. Diese erfolgte in einer horizontalen Flachbrett-Elektrophorese-Kammer. Dazu wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt. Agarose wurde mit Wasser im Erlenmeyerkolben in einer Mikrowelle auf eine Temperatur von 34,5 °C bis 37,5 °C gebracht. Anschließend wurde TAE und Ethidiumbromid beigemischt und das flüssige Gel in Kammer gegossen. Der Farbstoff Ethidiumbromid lagert sich an die Nukleinsäure an. Die Probe wurde mit 1 µl DNA, 8 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl Ladebuffer angesetzt. Nach 15 min war das Gel ausgehärtet, der Kamm (0,1 mm, 12 Zähne) wurde entfernt und in eine Tasche des Gels 10 µl Probe pipettiert. In eine weitere Tasche wurde 1,5 µl Marker (Smart Ladder) gegeben. Nach Zugabe des Laufpuffers erfolgte die Gelelektrophorese bei 100 V. Nukleinsäuren sind durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen, so dass sie stets zum positiven Pol wandern. Da jede Base eine Phosphatgruppe enthält, ist das Verhältnis zwischen Größe und Ladung der Moleküle direkt proportional. Je kleiner ein Molekül ist, desto schneller wandert es durch das Gel. Kurze DNA-Fragmente wandern schneller als lange. Als Referenz lässt man einen Marker aus DNA-Molekülen mitlaufen, deren Länge man kennt (123).

Nach 45 min konnte das Gel entnommen werden. Es folgte die Bestrahlung des Gels mit UV-Licht im Transilluminator. Durch das UV-Licht ändert sich das Absorptionsspektrum des Ethidiumbromids, was in einer erhöhten Fluoreszenz resultierte. Dadurch wurden die nativen DNA-Banden sichtbar gemacht. Wenn nur eine Bande zu sehen war, ist die Linearisierung erfolgreich gewesen.

### 3.5.2 Western Blot

Im Western Blot können Proteine, durch Übertragung auf eine Trägermembran nachgewiesen werden. Vorher muss das Proteingemisch aufgetrennt werden. Dafür wurde ein SDS-Page verwendet, bei dem Proteine in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weit auf dem Polyacrylamid-Gel wandern. Polyacrylamid-Gele besitzen kleinere Poren als Agarose-Gele. Diese haben eine Größe zwischen 3nm und 6nm. Aufgrund dieser Eigenschaften kommt die Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei der Auftrennung von kleineren Proteinmolekülen zum Einsatz (124). Nach der Protein Auftrennung wurden diese durch ein weiteres elektrisches Feld, welches senkrecht zum Gel geladen wird, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Proteinbanden sind fest auf der Membran gebunden und können mittels Antikörper nachgewiesen werden. Die freien Bindungsstellen auf der Membran mit Proteinen, die nicht vom Antikörper erkannt werden können, mussten blockiert werden. Dazu wurde die Membran mit BSA behandelt.

Die Primärantikörper binden zunächst an das gesuchte Protein. Nach dem Entfernen unspezifisch bindender Antikörper durch Waschen, wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper behandelt, welcher an den Primärantikörper bindet. Nach dem Auftragen der Antikörper wurde die Membran mehrfach gewaschen, um alle überschüssigen Antikörper zu entfernen. Es wurde ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Der Nachweis des Proteins konnte dadurch mittels Chemolumineszenz erfolgen. Bei der Elektrophorese werden die jeweiligen Moleküle angefärbt, um sie sichtbar zu machen. Um diese sichtbar zu machen, muss eine Anfärbung mit dem Farbstoff Ethidiumbromid stattfinden. Dabei interkalieren Ethidiumbromid Moleküle mit der DNA und lagern sich zwischen den Basenpaaren ab. Hierdurch wird das Absorptionsspektrum von Ethidiumbromid verändert und seine Fluoreszenz bei Anregung mit ultraviolettem Licht verstärkt, sodass die DNA-Fragmente hell leuchten. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden Menge der Nukleinsäuren (125).

### 3.5.2.1 Zellysate herstellen

Bei der Zellyse werden die Zellen mit einem Detergenz aufgeschlossen, um intrazelluläre Proteine freizusetzen. Der dem Lysepuffer zugesetzte Protease-Inhibitor verhindert einen vorzeitigen Abbau der Proteine.

MDCK II, K562 und K562 DLA-88\*50101 Zellen wurden auf  $4 \times 10^6$  /ml eingestellt.  $\frac{1}{4}$  Tablette complete Protease Inhibitor wurde in 2,5 ml Lysis M-Reagent (Roche) gelöst, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach kurz gevortext. Die Zellen wurden zentrifugiert (2500 xg, 10 min), der Überstand verworfen und 200  $\mu$ l Lysis M-Reagent (mit gelöster Tablette) zum Zellpellet gegeben. Es folgte die Inkubation für 10 min unter leichtem schütteln, mit anschließender Zentrifugation (1400 xg, 15 min). Der Überstand wurde in Eppendorfgefäß überführt und weiter verwendet oder eingefroren, das Zellpellet wurde verworfen.

### 3.5.2.2 Gele vorbereiten

Die Kammer wurde nach Anleitung zusammengebaut. Um die Dichte zu prüfen wurde Wasser eingefüllt, welches anschließend abgeschüttet werden konnte. Der Kamm wurde eingesetzt, ca. 1,5cm unter den Zacken des Kammes eine Markierung mit einem Stift gesetzt, da bis dorthin das Trenngel eingegossen werden sollte.

Die Trenngel-Lösung wurde angesetzt, dabei war darauf zu achten, APS und TEMED als letztes hinzugeben. Anschließend konnte das Gel mithilfe einer 5 ml Pipette bis zur Markierung in die Kammer gefüllt werden (ohne Kamm), darüber wurden ca. 1-2 ml Wasser gegossen. Es dauerte 45 min bis das Trenngel komplett auspolymerisiert war. Das Wasser wurde abgegossen und restliche Tropfen vorsichtig mit einem Stück Filterpapier aufgesaugt.

Nun konnte die Sammellösung, bis zur oberen Kante der Glasplatte auf das Trenngel gegossen werden. Der Kamm wurde eingesteckt und das Gel für 25 min auspolymerisiert.

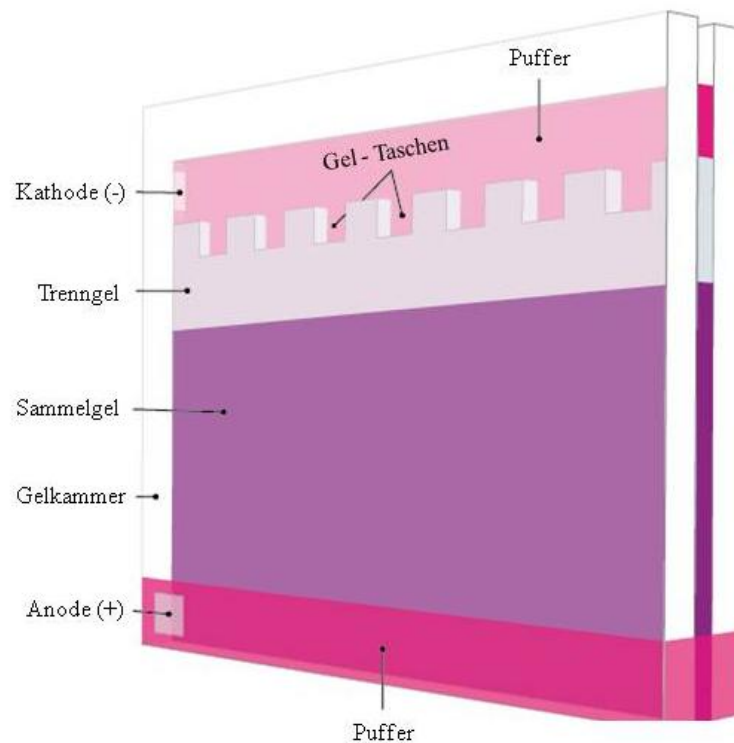
### 3.5.2.3 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) werden negativ geladene Proteine durch Anlegen einer Spannung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine immunologisch detektiert. Polyacrylamidgele bestehen aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Diese unterscheiden sich im Anteil des Polyacrylamids. Sammelgele besitzen eine Konzentration von 5-6 % und Trenngele zwischen 7-20 % Polyacrylamid. Mit der Höhe der Konzentration, kann die Porengröße des Gels beeinflusst werden. Je höher die Konzentration, desto kleiner sind die Poren und desto langsamer laufen die Proteine (126).

Die zuvor gegossenen Polyacrylamid-Gele wurden vertikal in eine mit Laufpuffer gefüllten Kammer eingespannt und die vorbereiteten Proteinproben in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Durch das Anlegen einer Spannung wurden die negativ geladenen Proteine aufgetrennt und wanderten durch die Gelmatrix zur Anode. Im großporigen Sammelgel wurden die Proteine aufgrund eines Stapelungseffektes am Übergang zum Trenngel aufkonzentriert. Im engporigen Trenngel wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt und durch den Vergleich mit einem mitgelaufenen Größenstandard konnte das Molekulargewicht der Proteine ermittelt werden.

Für 2 Gele wurde 30 µl Proben-Lysat mit 10 µl Ladepuffer in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gemischt, gevortext und kurz für 1 min zentrifugiert. Um die Proteine zu denaturieren wurden die Proben im Thermoblock für 5 min bei 99 °C gekocht.

Die vorbereiteten Gele wurden in die Transferkammer eingebaut und der Spalt zwischen der Kammer und den Gelen mit 1x Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Jede Tasche musste mit einer Insulinspitze zwei Mal mit Puffer ausspült werden, um eine Bildung von Schlieren durch den vorhandenen Harnstoff zu verhindern. Es wurden 15-20 µl Probe und 5 µl Marker (PageRuler Plus, Prestained Protein Ladder 250 µl) in die Taschen gefüllt. Danach wurde eine konstante Spannung von 150 mV für 60 min angelegt.



**Abbildung 21: Schema einer Gelkammer-Apparatur.**

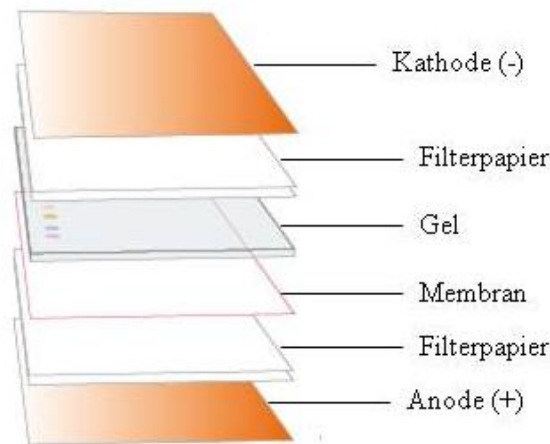
In die Gelkammer-Apparatur wurde Puffer gefüllt und anschließend die Gel-Taschen mit Proben befüllt. Dann wurde die Spannung angelegt und die Proben liefen durch das Trenngel in das Sammelgel. Kurz bevor die Proben den unteren Rand des Sammelgels erreicht hatten, wurde die Spannung aufgehoben. So konnte die Proben ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Quelle: (127) modifiziert von L.Lumpp.

#### 3.5.2.4 Western Blotting

Diese Methode dient dazu, die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine von einem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose Membran zu übertragen, damit sie anschließend mittels Antikörper immunologisch detektiert werden können.

Für den Protein Transfer wurden Nitrozellulose-Membranen in SemiDry-Puffer eingelegt. Auf die Transfer-Kammer wurde nach folgender Reihenfolge gelegt: Filterpapier, Membran, Gel (der Marker muss auf der linken Seite der Membran liegen), Filterpapier (siehe Abbildung 22). Nach Schließen der Blot-Kammer wurde diese auf 40 mA, 25 V für 1 Stunde eingestellt. Danach konnten die Membranen mit einer Pinzette entnommen werden.



**Abbildung 22: Aufbau in einer Blotting-Apparatur.**

Für den Proteintransfer werden die verschiedenen Schichten übereinander gelegt. Die unterste Schicht an der Anode besteht aus zwei Filterpapieren, darüber kommt die Membran. Das Gel wird luftblasenfrei auf die Membran gelegt und anschließend mit zwei weiteren Filterpapieren abgedeckt.

Dadurch konnten die Proteine des Polyacrylamid-Gels auf eine Nitrozellulose Membran übertragen werden.

Quelle: (127) modifiziert von L.Lumpp.

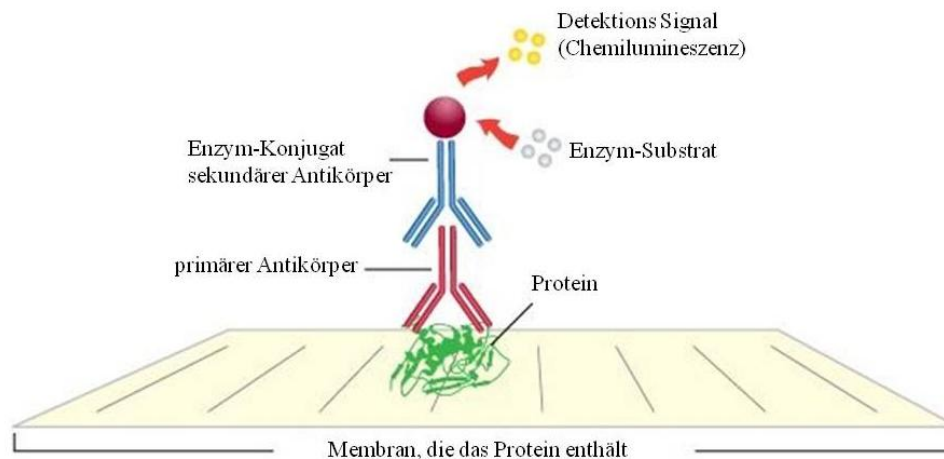
### 3.5.2.5 Antikörper-Markierung

Bei den nachfolgenden Schritten, wurde die Membran auf dem Schüttler mit verschiedenen Lösungen behandelt. Die Membran wurde in einer kleinen Schale mit TBS/T, für 5 min bei Raumtemperatur, auf eine Wippe gestellt und gewaschen. Es folgte das Blockieren mit 20 ml 5 % BSA in TBS/T für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran erneut drei Mal gewaschen. Nun erfolgte die Behandlung mit dem primären Antikörper (H58A), über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler.

Am nächsten Tag wurde der restliche Primärantikörper durch erneutes, dreimaliges waschen mit TBS/T entfernt. Anschließend erfolgte die Behandlung der Membran mit dem Sekundärantikörper (goat anti-mouse IgG-HRP) für 1 Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde drei Mal mit TBS/T und je ein Mal mit TBS und H<sub>2</sub>O gewaschen.

Bevor die Membran im Chemolumineszenz-Messgerät ausgewertet werden konnte, musste sie mit einem Substrat behandelt werden. Die Lösung A und B des Chemolumineszenzreagent wurden im Dunkeln gemischt und 1 ml gleichmäßig auf die Membran pipettiert.

Der benutzte Sekundärantikörper musste HRP-gekoppelt sein. Danach konnte die Membran in das Gerät gelegt werden und nach kurzer Inkubationszeit begann die Meerrettich-Peroxidase das Luminol-Reagent umzusetzen. Dabei wurde blaues Licht emittiert, welches vom System an der Stelle, an der sich der Sekundärantikörper befindet, detektiert werden kann.



**Abbildung 23: Detektion im Western Blot.**

Der primäre Antikörper bindet an das Protein. Anschließend wird der sekundäre Antikörper, der an ein Enzym gekoppelt ist hinzugegeben. Dieser bindet an den Primärantikörper. Durch Substratzugabe kann die Detektion erfolgen. Im Chemolumineszenz-Messgerät können somit die Banden der Proteine auf der Membran sichtbar gemacht werden.

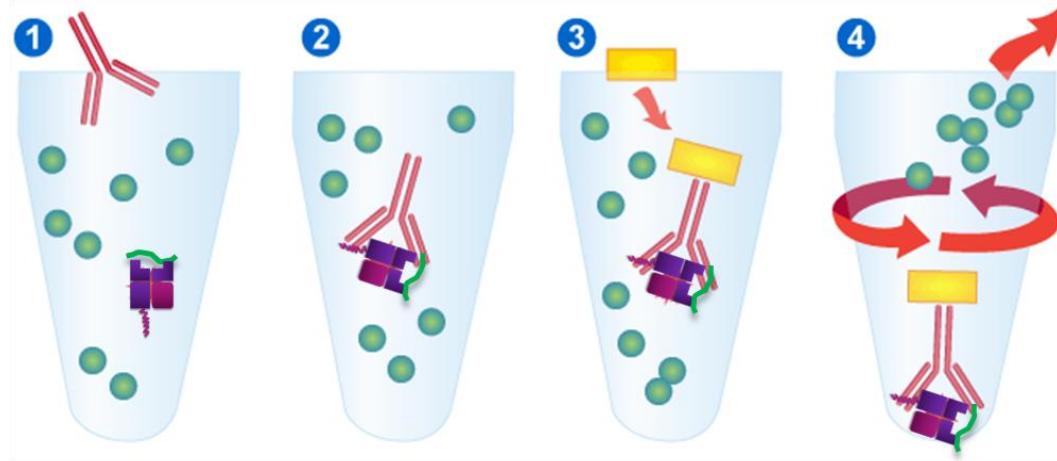
Quelle: (128) modifiziert von L.Lumpp.

### 3.5.3 Immunpräzipitation

Eine Immunpräzipitation ist eine molekularbiologische Methode zum Nachweis von Protein-Wechselwirkungen. Der Nachweis der Protein-Interaktion erfolgt dabei mit Hilfe eines Antikörpers, welcher ein bestimmtes Protein samt Interaktionspartner aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert.

Das Proteingemisch bestand aus MDCK II, K562 und K562 DLA-88\*50101 Zellen. Zu den Zellen wurde H58A Antikörper gegeben, welcher an MHC-Moleküle spezifisch bindet. Über diesen Antikörper wurde das gesuchte Protein mit seinem Interaktionspartner herausgezogen. Dazu wurde Protein A verwendet, welches ein Bestandteil der Zellwand von bestimmten Streptokokken-Stämmen ist. Protein A bindet mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Säugetier-Immunglobuline. Mit diesen Proteinen sind Kügelchen beschichtet (sogenannte Beads, z. B. aus Sepharose), um in einer Immunpräzipitation die Antikörper-Protein-Komplexe an sich zu binden.

Die Isolierung der Komplexe erfolgte durch Zentrifugation und mehreren Waschschritten, um unspezifische Proteine zu entfernen (siehe Abbildung 24). Die Proteine werden von den Beads durch Denaturierung gelöst und anschließend im Western Blot nachgewiesen (129) (siehe 3.5.2.4).



**Abbildung 24: Schema einer Immunpräzipitation.**

1. Zugabe des Antikörpers zum Zelllysate, 2. Bindung an das Zielantigen, 3. Zugabe von Protein A welches an den primären Antikörper bindet, 4. Zentrifugation, Überstand entfernen und waschen. Nun konnte ein Protein mit ihrem Interaktionspartner (Antikörper) aus einem Proteingemisch präzipitiert werden.

Quelle: (130) modifiziert von L.Lumpp

### 3.5.3.1 Zelllysate herstellen

MDCK II, K562, K562 DLA-88\*50101 Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden zweimal mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und bei 400 xg für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml eiskaltem Lysepuffer (1 Tablette complete Protease Inhibitor in 10 ml Lysis M auflösen) resuspendiert. Es folgte ein kurzes vortexen und die Überführung in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß für die Inkubation auf Eis für 30 min. Die Zelllysate wurden zentrifugiert (20 min, 10000 xg, 4 °C), der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, das Pellet wurde verworfen. Anschließend konnten sie weiterverarbeitet werden oder bei -80 °C für längere Zeit eingefroren werden.



Bei Weiterverarbeitung der Proben wurden die Lysate 1:10 mit Lysepuffer verdünnt (10 µl Lysat + 90 µl Lysepuffer) und mit 100 µl Hybridomüberstand oder 100 µl HAT Zellkulturmedium (Negativkontrolle) oder 1 µl H58A (Positivkontrolle) über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 20 µl Protein A, mit anschließender Inkubation für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Schüttler. Danach wurden die Proben 30 Sekunden, 2500 xg bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet drei Mal mit je 500 µl eiskaltem Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurde der Überstand vollständig abgenommen, das Pellet mit 50 µl Ladepuffer (1:10 Verdünnung von Bromphenolblau in 4x Roti) versetzen, kurz gevortext und 10 min bei 99 °C erhitzt. Die Proben wurden ein letztes Mal für 5 min bei 10000 xg zentrifugiert und der Überstand wurde auf ein SDS-PAGE Gel geladen oder in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

#### **3.5.4 Isotypbestimmung des Antikörpers**

Für die Isotypisierung des Antikörpers wurde das "Iso-Gold™ Rapid Mouse-monoklonales Isotyping Kit" verwendet. Dies ist ein seitlicher Flusstest mit ELISA Sensitivität für monoklonale Antikörperklassen und Unterklassenbestimmung. Dieser Test wurde durchgeführt, um im Anschluss das beste Immunglobulin Reinigungsverfahren zu bestimmen (131). Wenn eine richtig verdünnte Probe mit einem spezifischen Isotyp in die Probenvertiefung gegeben wird, bilden sich mit dem eingebetteten Goldkonjugat und den spezifischen Klassen und Unterklassen lösliche Komplexe. Diese laufen der Länge nach die Membran entlang nach oben und werden an der Anti-Isotypen und Klassen-spezifischen Antikörper imprägnierten Membran aufgelöst. Als Positivkontrolle erscheint eine Kontrolllinie auf der Membran in der Region die mit "C" markiert ist. Eine dunkelrote Linie zeigt an, welcher Isotyp oder klassenspezifischer Antikörper in der Probe enthalten ist (131). Für den Assay wurde Hybridomaüberstand des Klons 12.C8F6 verwendet. Der Überstand wurde 1:100 verdünnt, 5 µl Überstand wurde mit 0,5 ml „*Sample Diluent*“ gevortext und anschließend 150 µl des Überstandes, der verdünnten Flüssigkeit, in die Probenvertiefung pipettiert. Nach spätestens 5 min konnte das Ergebnis abgelesen werden.

### 3.5.5 Aufreinigung von Antikörper über Säulenchromatographie

Säugerimmungoglobuline (Ig) können aus Zellkulturmedium, Aszites und Serumproben aufgereinigt werden, dafür werden Beads mit gebundenen Antikörperproteinen verwendet, als festes Trägermaterial dient Sepharose. Dadurch können monoklonale Antikörper mit hohem Reinheitsgrad und hoher Ausbeute gewonnen werden. Die Bindungsspezifität und Bindungsaffinität dieser Proteine variiert je nach Herkunftsorganismus und Antikörperunterklasse (siehe Tabelle 3.3). Die Antikörperproteine Protein A, Protein G und Protein L können Ig binden. Protein A und Protein G binden mit hoher Affinität und Spezifität an die Fc-Region der Immunglobuline. Protein L bindet diese über die Kappa Leichtkette (132).

**Tabelle 3.3: Bindungsaffinitäten für Immunglobuline der Maus**

Quelle: (132).

| <b>Immunglobulin</b>    | <b>Protein A</b> | <b>Protein G</b> | <b>Protein L</b> |
|-------------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>IgG<sub>1</sub></b>  | +                | ++++             | ++++             |
| <b>IgG<sub>2a</sub></b> | ++++             | ++++             | ++++             |
| <b>IgG<sub>2b</sub></b> | +++              | ++++             | ++++             |
| <b>IgG<sub>3</sub></b>  | ++               | +++              | ++++             |

Es besteht eine breite Variation in der Bindungskapazität von Serum-Immunglobulinen von verschiedenen Tierarten. Es werden nur kleine Variationen bei Individuen innerhalb derselben Spezies beobachtet (133).

Damit der Antikörper für weitere Untersuchungen verwendet werden konnte, musste dieser aufgereinigt werden. Dafür wurde eine Protein A Säule eingesetzt. Der Antikörper wurde durch die Inkubation von Hybridomzellen, in einer Rollflasche (siehe 3.1.1.8), gewonnen. Die Flasche sollte ca. 3 Tage, bei 4 °C ruhig stehen gelassen werden, um ein absitzen des Zellschrotts zu ermöglichen. Danach konnte der Überstand mit einer Schlauchpumpe in einen Filter überführt werden. Für die Aufbereitung des filtrierte Überstandes wurden 350 g NaCl und 400 µl Thimerosal (50 %) zu 2 L Antikörper-Überstand gegeben. Der pH-Wert sollte zwischen 8,5 und 9 mit NaOH eingestellt werden.

Über Nacht wurde der Überstand anschließend, über eine Affi-Gel Protein A Säule gegeben. Am nächsten Tag erfolgt das Durchspülen der Säule, mit 50 ml Binding Buffer I, danach folgten 50 ml Binding Buffer II und als letztes wurde 25 ml Binding Buffer I verwendet. Die Elution erfolgte mit 20 ml Elution Buffer, welcher über die Säule laufen gelassen wurde, danach konnte die OD280, des aufgereinigten Antikörpers, gemessen werden.

### **3.5.6 MHC-Präzipitation**

Bei der MHC-Präzipitation wurden die Peptide, welche von den DLA-Molekülen auf K562 DLA-88\*50101 Zellen und den MDCK II Zellen präsentiert werden, mittels Säulenimmünpräzipitation eluiert. In einer Affinitätssäule waren spezifisch bindende Antikörper gekoppelt, die Peptid-MHC-Komplexe binden konnten, während andere Zellbestandteile aus der Säule herausgewaschen wurden. Die Elution der MHC-Liganden erfolgte in mehreren Schritten und durch Ultrafiltration wurden diese von den MHC-Molekülen getrennt. Die Analyse der gewonnenen Peptide erfolgte im Massenspektrometer.

Bei dem verwendeten Antikörper handelte es sich um den aufgereinigten Überstand des Klons 12.C8F6, außerdem wurde eine Kontrollprobe mit dem BBM.1-Antikörper bei K562 DLA-88\*50101 Zellen durchgeführt. Alle Schritte von 3.5.6.2 und 3.5.6.4 wurden in einem 4 °C Kühlraum durchgeführt, um die Proteaseaktivität zu verhindern.

Es wurden insgesamt drei Präzipitationen durchgeführt. Dafür wurden K562 DLA-88\*50101 Zellen ein Mal mit dem Antikörper 12.C8F6 präzipitiert und ein zweiter Kontrollversuch wurde mit dem Antikörper BBM.1 durchgeführt. Außerdem wurden MDCK II Zellen mit dem Antikörper 12.C8F6 präzipitiert.

#### **3.5.6.1 Herstellung und Vorbereitung des Zellpellet**

Für die Herstellung des Zellpellet wurden für jede Präzipitation  $1,1 \times 10^9$  K562 DLA-88\*50101 Zellen verwendet, welche in RPMI Zellkulturmedium ohne G418 kultiviert wurden. Dafür wurden 10 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit je 50 ml Inhalt und  $2,2 \times 10^6$  Zellen/ml benötigt.

Die MDCK II Zellen wurden in Zellkulturschalen kultiviert, um für die spätere Ablösung der adhärennten Zellen kein Trypsin verwenden zu müssen, denn dieses würde die präsentierten MHC-Moleküle zerstören.

Das Medium wurde für die Zellernte abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend mit einem Zellschaber von den Kulturschalen abgelöst und in 2 ml PBS aufgenommen. Für die Präzipitation wurden  $1,5 \times 10^9$  Zellen verwendet.

Alle Schritte mussten auf Eis erfolgen. Die Zellen wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4 °C). Anschließend auf zwei 50ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und jeweils mit 50 ml PBS gewaschen und zentrifugiert. Danach wurde die Zellsuspension in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gemischt und ein letztes Mal mit 10 ml PBS gewaschen, dieses Mal wurde ohne Bremse zentrifugiert, um das Zellpellet nicht zu verwirbeln. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet anschließend bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Für die Zellyse musste das Zellpellet in einem zweifach konzentrierten Lysepuffer gelöst werden. Dieser enthielt 0,4 g CHAPS (1,2 % w/v) und eine Tablette Proteaseinhibitor, die in 33 ml sterilem PBS in einem sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen bis zur vollständigen Auflösung gevortext wurden. Das Zellpellet wurde in den Händen aufgetaut und gevortext, bis das Zellpellet frei beweglich war. Nun erfolgte die Zugabe von zwei Mal 3 ml des vorbereiteten Lysepuffers, im Verhältnis 1:2, zur Löslichkeitserhöhung. Die anschließende Zugabe von PBS zum verbliebenen Lysepuffer verdünnte diesen auf eine einfache Konzentration. Davon wurde zwei Mal 6 ml hinzugefügt, mit anschließender Inkubation für 60 min bei 4 °C. Die folgenden zwei Schritte dienten der Zerstörung, der im Lysepuffer gelösten Zellen, so dass in der Affinitätssäule nur Peptid-MHC-Komplexe gebunden wurden und keine ganzen Zellen.

Für die anschließende Behandlung mit Ultraschall wurde das Lysat vier Mal für 20 Sekunden mit jeweils 20 Sekunden Pause mit Ultraschall behandelt (Einstellungen Sonifier Analog Cell Disrupter 250, Timer: Hold, Duty circle: constant, Output: 5). Danach folgte die Inkubation für 60 min bei 4 °C auf dem Schüttler. Die anschließende Zentrifugation (4000 rpm, 60 min, 4 °C) trennte größere Zellbruchstücke ab. Der Überstand mit den gelösten Peptid-MHC-Komplexen wurde abgenommen und mit Hilfe einer 20 ml Spritze, mit einem 5 µl Filter, steril in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen filtriert. Der gefilterte Überstand enthielt nun alle Arten von kleineren Zellkomponenten und Fragmenten, aber auch Peptid-DLA-Komplexe, die frei von der Zellmembran waren.

### 3.5.6.2 Koppeln von Antikörper an Sepharose

Es wurden 40 mg Sepharose pro 1mg AK (12.C8F6) verwendet. Das 50 ml Falcon-Röhrchen wurde mit 1 mM HCl auf 45 ml aufgefüllt, 5x geschwenkt und 30 min rotiert. Danach wurde für 4 min, bei 21 °C und 300 rpm, ohne Bremse, zentrifugiert. Für die Kopplung wurde der Überstand abgegossen und 20 ml Kopplungspuffer auf die Sepharose geben, danach wurde der AK hinzugeben und der Kopplungspuffer auf 45 ml aufgefüllt. Anschließend wurde 5x geschwenkt und 120 min rotiert. Für das Blockieren der Bindungsstellen ohne AK, wurde nach weiterer Zentrifugation (300 rpm, 5 min, 21 °C, ohne Bremse) und abgießen des Überstandes, 0,2 M Glycin bis auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurde 5 Mal geschwenkt und 60 min rotiert. Nun wurde die Sepharose ein weiteres Mal zentrifugiert (300 rpm, 4 min, 21 °C, ohne Bremse) und der Überstand abgegossen. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen und die Zentrifugation (300 rpm, 4 min, 21 °C, ohne Bremse) der Sepharose mit 45 ml PBS. Zu letzte wurde die Sepharose in 1 ml PBS aufgenommen, somit war der Kopplungsantikörper mit einer Konzentration von 1 mg/ml fertiggestellt. Die mit Antikörpern gekoppelte Sepharose konnte bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt werden.

### 3.5.6.3 Vorbereiten der Säule

Eine Säule (Bio Rad Econo columns, 8mm) und ein Dreiwegehahn wurden zweimal gegenläufig mit Ethanol und ddH<sub>2</sub>O gespült. Die Säule wurde an einer Halterung im Kühlraum (4 °C) angebracht, mit dem Ansaug- und Auslassschlauch verbunden und mit PBS, bei offenem Dreiwegehahn vorgespült. In die leergelaufene Säule erfolgte die Gabe von 1 ml Antikörper-Sepharose-Gemisch, bei geschlossenem Dreiwegehahn. Dabei war es wichtig, dass ein Einschluss von Luftblasen in das Sepharosebett vermieden wurde. Die Equilibrierung der Säule erfolgte durch Zugabe des einfach konzentrierten Lysepuffers auf die Säule, welcher bei 25 rpm über die Säule zirkulierte bis das Zelllysate vorbereitet war.

Der in der vorbereiteten Zelllysateprobe platzierte Aussaugschlauch saugte die Probe in die Säule. Sobald Schlieren in der Säule zu erkennen waren, wurde auch der Auslaufschlauch in der Probe platziert. Das Lysat floss eine Nacht lang über die Affinitätsäule.

#### 3.5.6.4 Herauslösen von Peptid-MHC-Komplexen

Am nächsten Tag erfolgte das Herauslösen der Peptid-MHC-Komplexe aus der Bromcyansäule und die Ultrafiltration des Lysats. Zunächst wurde die Säule 30 min mit PBS, dann eine Stunde mit ddH<sub>2</sub>O gespült. In dieser Zeit erfolgte die Vorbereitung der 0,5 ml Amicon-Filter für die spätere Ultrafiltration. Es wurden Filter mit 3 kDa verwendet, dadurch konnten ausschließlich Peptide die von MHC-Klasse-I-Molekülen stammten, den Filter passieren. Der Amicon-Filter wurde in ein spezielles Amicon-Eppendorfggefäß gesteckt, es erfolgte die Zugabe von 500 µl Baker H<sub>2</sub>O, mit anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 10 min). Dieser Vorgang wurde mit 500 µl 0,1 M NaOH, 500 µl Baker H<sub>2</sub>O und 500 µl 0,2 % TFA wiederholt. Zwischen den Zentrifugationsschritt wurde der Filter herausgenommen, auf einem Küchenpapier ausgeklopft und der Durchlauf verworfen. Die Säule ließ man nach dem Spülvorgang trocken laufen und der Dreiwegehahn wurde geschlossen. Nachdem die Sepharose mit 0,2 prozentiger TFA-Lösung bedeckt und im ersten Durchlauf zusätzlich ein Tropfen 10 % TFA-Lösung zugegeben wurde, konnte die Säule auf den Schüttler gestellt (200 rpm) werden. Durch die Säure lösten sich die nicht-kovalenten Bindungen zwischen der schweren MHC-Kette, dem β<sub>2</sub>-Mikroglobulin, dem Peptid und dem Antikörper. Nach 30 min wurde das Eluat, in dem die MHC-Liganden nun einzeln vorlagen, in ein 1,5 ml-Amicon-Filter-Röhrchen gegeben, dessen Auffanggefäß zuvor ausgewechselt wurde. Die Behandlung mit 0,2 %iger TFA-Lösung erfolgte weitere vier Mal für 15 min. Das Eluat im Amicon Filter wurde für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert, wobei die Abtrennung der Peptide von den restlichen Bestandteilen erfolgte. Der Filter wurde anschließend durch Zugabe von 400 µl Abe (32,5 % Acetonitril und 0,2 % TFA) und Zentrifugation (13000 rpm, 15 min) gespült. Es wurde 400 µl Filtrat gewonnen.

Die Probe wurde anschließend für die Lyophilisierung vorbereitet, um die Peptidproben zu konzentrieren. Diese Methode beruht auf dem physikalischen Phänomen der Sublimation, was einen direkten Übergang vom festen Zustand in den Dampfzustand bedeutet, ohne den flüssigen Zustand zu durchlaufen.

Der Aufbau der Lyophilisierung besteht aus einer Kühlfalle und einer Vakuumpumpe. Von einem neuen 1,5 ml LoBind-Eppendorfgefäß wurde der Deckel abgeschnitten und sechs Mal mit einer rosa Kanüle perforiert. Dieser präparierte Deckel, mit den Perforationslöchern, wurde nun für das offene Proben-Eppendorfgefäß als Verschluss verwendet, um eine Verdunstung während der Lyophilisierung zu gewährleisten und das Röhrchen nachträglich mit dem Originaldeckeln zu verschließen. Das Eppendorfgefäß mit der Probe wurde in das Lyogefäß (600 ml breite Halsfilterflasche) gestellt und ein Handschuh darüber gestülpt, dieser verhindert eine Ansammlung von Kondenswasser in der Probe, welche bei -80 °C eingefroren wurde. Am nächsten Morgen konnte das Wasser abgelassen und die Kältefalle eingeschaltet werden. Vor der Kühlfalle wurde der Ventilator eingeschaltet. Alles wurde eine Stunde laufen gelassen, bis sich die Temperatur zwischen -105 °C und -110 °C befand. Nach einer Stunde konnte die Vakuumpumpe angeschaltet werden, nach Aufbau des Vakuums konnte der Durchlass geöffnet werden. Die Probe wurde auf ein Volumen von etwa 20-40 µl in Form von einem kleinen länglichen Kristall konzentriert. Hier ist es entscheidend, das Filtrat nicht vollständig trocken zu lassen, da eine beträchtliche Menge an Peptiden verloren gehen kann. Anschließend konnte die Probe bei 4 °C, bis zur weiteren Aufbereitung mittels C18-Zip-Tip Entsalzung, gelagert werden.

#### **3.5.6.5 C18-Zip-Tip-Entsalzung von Peptiden**

Die Eluate, die bei der MHC-Präzipitation gewonnen wurden, enthielten Salze und Proteine, welche die Messung im LTQ Orbitrap XL stören würden, deshalb erfolgte die Entsalzung mittels C18-Zip-Tip, unter der Verwendung von 2 µg-Peptidladekapazität-Zip-Tips. Das zugrundeliegende Prinzip ist die Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie. Die Lösungen A\* (0,1 % TFA in MS-Wasser) und B\* (0,1 % TFA in 80 % MS-Acetonitril und MS-Wasser) dienten als Wasch- und Elutionslösungen, die jeweils in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß vorgelegt wurden. Die Einstellung einer 20 µl-Pipette auf 10 µl blieb in allen folgenden Schritten unverändert. Es war wichtig, dass außer bei der Elution keine Luft durch das C18 Material gezogen oder gedrückt werden durfte.

Bei der Entsalzung wurde folgendermaßen vorgegangen:

#### Reinigung der Spitzen

Die Lösung B\* wurde in die Zip-Tip-Spitze aufgezogen und verworfen, dies wurde 10-mal wiederholt.

#### Equilibrierung

Die Lösung A\* wurde aufgezogen und verworfen, dies wurde insgesamt 5-mal wiederholt.

#### Beladung

Die Probe wurde von dem Probengefäß in das Beladungsgefäß pipettiert.

#### Waschen

Die Lösung A\* wurde aufgezogen und verworfen, dies wurde insgesamt 3-mal wiederholt.

#### Elution

Es wurden 20 µl Lösung B\* in 0,5 ml-LoBind-Eppendorfgefäß gegeben und anschließend 10-mal mit Zip-Tip auf- und abpipettiert, beim letzten Mal wurde der zweite Druckpunkt der Pipette ausgenutzt, es wird Luft durch das C-Material gedrückt. Lösung B\* wurde aufgezogen und in ein 0,5 ml-Eppendorfgefäß mit den 20 µl B\* überführt, dabei wurde wieder der zweite Druckpunkt genutzt, anschließend wurde noch zwei Mal Lösung B\* in die Zip-Tip-Spitze aufgezogen und verworfen. Für jede Probe wurden fünf Durchgänge mit den obigen Schritten durchgeführt. Nach der ersten Elution, beginnt man wieder bei dem Schritt "Equilibrierung" und wiederholt den Ablauf noch vier Mal.

#### Vorbereitung der Proben für den Autosampler

Die Probe wurde zentrifugiert (13000 rpm, 5 min), danach 10 µl Lösung A\* hinzugegeben und in Autosamplerröhrchen gegeben. Die Probe wurde in der Speed Vac auf 10 µl eingengt und danach mit Lösung A<sub>L</sub> (1 % Acetonitril, 0,05 % TFA) auf 25 µl aufgefüllt. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstehen. Die so vorbereiteten Proben wurden bei 4 °C gelagert, bei Durchführung der Massenspektrometrie innerhalb der nächsten sieben Tage. Erfolgte diese erst nach mehr als sieben Tagen, wurde die Probe bei -20 °C gelagert.





## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Linearisierung von DNA für die Transfektion

Die Linearisierung der DNA wurde für die Transfektion der Zellen benötigt. Hierfür wurde ein Plasmid verwendet, welches mit DLA-88\*50101 codiert war. Dieses bestand aus dem pcDNA3.1(+) Vektor, als Insert wurde DLA-88\*50101 verwendet. Der Vektor besitzt eine Größe von 5,4 kb (134). Als Selektierungsmerkmal wurde ein Neomycin-Geneticin-Resistenzgen hinzugefügt. Mit Hilfe des Restriktionsenzym PvuI-HF ließ sich das Plasmid linearisieren.

In der Agar-Gelelektrophorese zeigte sich eine Bande, bei 7,5 kb (siehe Abbildung 25). Das Plasmid besteht aus dem Vektor und dem Insert DLA-88\*50101, der Vektor ist mit 5,4 kb bekannt, das Insert muss folglich 2,1 kb besitzen. Die Basenpaare des Plasmids liegen aneinander gereiht, als Strang vor, dadurch zeigt sich, dass die Linearisierung erfolgreich war. Wäre die Linearisierung nicht erfolgreich gewesen und würde das Plasmid noch komplett vorliegen, würden sich mehrere Banden zeigen.



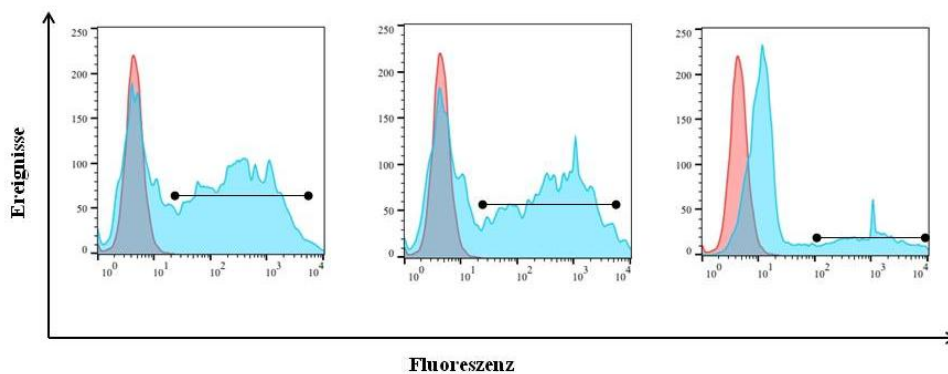
**Abbildung 25: Agar-Gelelektrophorese von linearisierter DNA.**

Links sind die Banden des Markers zu erkennen. Rechts auf dem Agarosegel ist die Bande der Probe zu erkennen, welche sich bei 7,5 kb befindet, damit ist die Linearisierung der DNA bewiesen. Die Basenpaare liegen als Strang vor.

## 4.2 Transfektion von Sp2/0 Zellen mit DLA-88\*50101

### 4.2.1 Auswählen eines geeigneten Programms am Nukleofektor

Die Transfektion der Zellen wurde mit der Nukleofektion durchgeführt. Diese Methode war in der Arbeitsgruppe, für diese Zellen, noch nicht etabliert und es musste ein geeignetes Programm ausgewählt werden. Jeweils  $1 \times 10^6$  Sp2/0 Zellen wurden in drei verschiedenen Programmen am Nukleofektor getestet. Es wurde Programm 3, 6 und 9 durchgeführt, aufsteigend war die Stärke des Stromstoßes zunehmend. Alle Programme zeigten ein positives Ergebnis in der FACS-Analyse. Der Median der Zellen, von Programm 3 lag bei 80,58, es konnten weniger Zellen transfiziert werden, als mit Programm 6. Bei Programm 9 war der Median mit 44,91 am geringsten. Es wurde Programm 6 ausgewählt, hier konnte der beste Median (90,99) erzielt werden (siehe Abbildung 26). So sollte die bestmögliche Transfektion der Zellen gewährleistet werden.

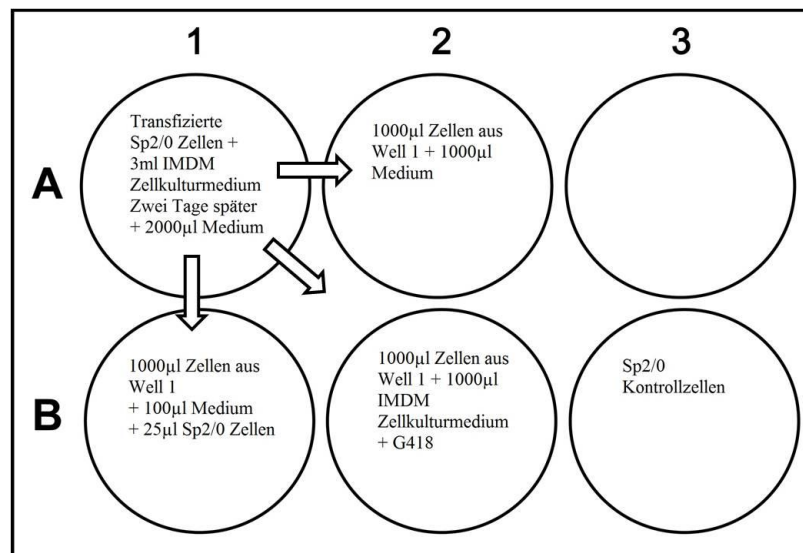


**Abbildung 26: Ergebnisse der Probe Transfektion.**

Von links nach rechts wurde Programm 3, 6 und 9 analysiert. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierten Sp2/0 Zellen (rot) verwendet, welche mit FACS-Puffer inkubiert wurden. Die Kurven der transfizierten Zellen, welche mit H58A (1:50) inkubiert wurden, zeigen eine erhöhte Fluoreszenzintensität. Dadurch stellen sie sich weiter rechts dar, als die Negativkontrolle, welche sich ganz links befindet. Die Linie zeigt den Bereich an, indem der Median ermittelt wurde. Der Median von Programm 3 lag bei 80,58; bei Programm 6 bei 90,99 und bei Programm 9 betrug dieser 44,91.

### 4.2.2 Transfektion von Sp2/0 Zellen

Nach der Transfektion wurden die Zellen in eine 6 Well Platte überführt. Als Wachstumskontrolle diente dieselbe Menge an Sp2/0 Zellen in einem Well der Platte (siehe Abbildung 27). Nach zwei Tagen konnten die transfizierten Zellen aus der 6 Well Platte umgesetzt werden.



**Abbildung 27: Umsetzen transfizierter Sp2/0 Zellen.**

Die Zellen aus A1 wurden nach zwei Tagen in die Wells A2, B1 und B2 umgesetzt. Es wurden unterschiedliche Medien verwendet (IMDM Zellkulturmedium mit und ohne G418). In das Well B1 wurden zusätzlich nicht transfizierte Sp2/0 Zellen hinzugegeben, um eine Wachstumsstimulation der transfizierten Zellen zu erhalten. In dem Well B3 befanden sich nicht transfizierte Sp2/0 Zellen als Wachstumskontrolle. Quelle: (113) modifiziert von L.Lumpp.

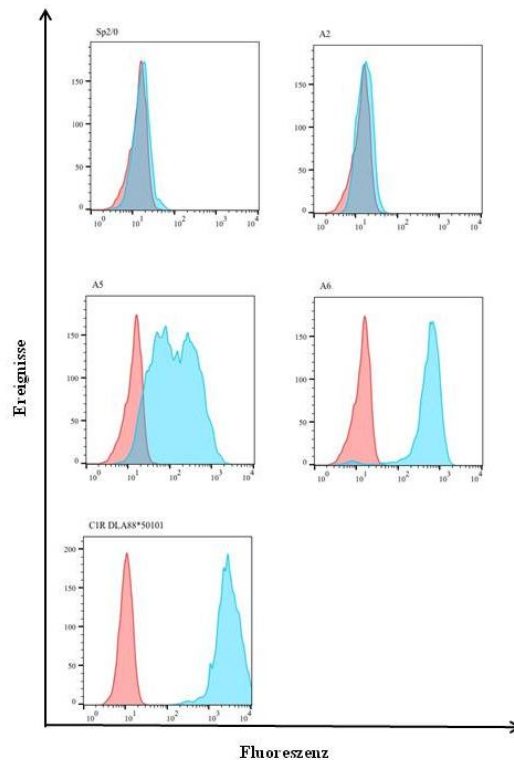
Nach weiteren zwei Tagen konnten die Zellen aus den Wells A1, A2 und B1 in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> und Zugabe von je 2 ml IMDM Zellkulturmedium + G418 umgesetzt werden. Die Zellen des Wells B2 konnten nicht kultiviert werden. Eine Woche nach der Transfektion waren genug Zellen vorhanden, um ihre Expression von DLA-88\*50101 in der FACS-Analyse zu testen.

### 4.2.3 Expression von DLA-88 auf transfizierten Sp2/0 Zellen

Es war wichtig die Expression der transfizierten Zellen zu untersuchen, um sicher zu stellen, dass DLA-88 auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Nur so konnten die transfizierten Zellen, bei der Immunisierung als Antigen von dem Immunsystem der Maus erkannt werden und eine Immunreaktion auslösen.

Die Expression der transfizierten Zellen wurde erstmals nach der Einzelklon-Verdünnung untersucht.

Es wurden insgesamt 10 Klone mit dem Primärantikörper H58A getestet. Als Negativkontrolle für die Klone dienten Sp2/0 Zellen, die mit FACS-Puffer inkubiert wurden. Als Positivkontrolle wurden C1R DLA-88\*50101 Zellen verwendet, da diese bei der Inkubation mit H58A eine positive Reaktion in der FACS-Analyse, durch das Vorhandensein von DLA-88 auf ihrer Zelloberfläche zeigten. Die C1R DLA-88\*50101 Zellen wurde mit FACS-Puffer (Negativkontrolle) und mit H58A (Positivkontrolle) inkubiert (siehe Abbildung 28). Die Klone A1, A2 zeigten keine Expression von DLA-88\*50101 auf ihrer Zelloberfläche. Klon A5 zeigte eine schlechte Expression, weshalb dieser auch verworfen wurde. Die Klone A3, A4, A6, A7, A8, B1 und B2 zeigten eine gute Expression. Daraufhin wurden diese Klone ein weiteres Mal getestet. Hierfür wurden die Klone mit FACS-Puffer (Negativkontrolle) und H58A (Positivkontrolle) inkubiert. Nur die Proben mit dem Primärantikörper H58A zeigten eine positive Reaktion. Somit war die Transfektion erfolgreich. Es standen 7 Klone mit einer Expression von DLA-88\*50101 auf Sp2/0 Zellen zur Verfügung.



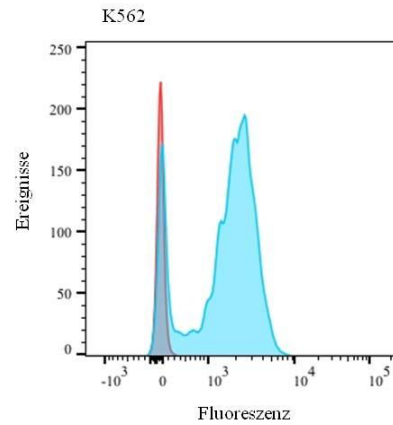
**Abbildung 28: Ausgewählte Ergebnisse der Transfektion von Sp2/0 Zellen mit DLA-88\*50101.**

Als Negativkontrolle dienen in den ersten vier Histogrammen Sp2/0 Zellen und in der letzten Histogramm C1R DLA-88\*50101 Zellen, beide Zelllinien wurden mit FACS-Puffer inkubiert (rot). Die übrigen zu testenden Proben wurden mit H58A inkubiert (blau). Als Positivkontrolle wurden die C1R DLA-88\*50101 Zellen verwendet, welche mit H58A inkubiert wurden (blau), hier zeigt sich eine deutliche Fluoreszenzerhöhung im Vergleich zu der Negativkontrolle (rot), in dem Histogramm der C1R DLA-88\*50101 Zellen. Der Klon A2 zeigt keine Expression von DLA-88\*50101 auf der Oberfläche, es ist keine erhöhte Fluoreszenz nachweisbar. Der Klon A5 zeigt eine mäßige Reaktion im Vergleich zu dem Klon A6, welcher am meisten DLA-88\*50101 Moleküle auf der Oberfläche exprimiert.

Aufgrund der guten Expression, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Klon A6 kultiviert und für die Immunisierung der Mäuse verwendet.

Vor jeder Immunisierung wurden die transfizierten Zellen auf ihre Expression kontrolliert. Nach längerer Kultivierung zeigte sich, dass die Zellen zunehmend an Expression verloren (siehe Abbildung 30) Deshalb wurden diese Zellen mittels QIFI Kit getestet (siehe 4.2.4).

Auch bei K562 Zellen ließ sich ein ähnliches Phänomen erkennen. Nach längerer Kultivierung zeigte sich eine leichte Expression von MHC-Molekülen auf deren Oberfläche, obwohl diese Zellen kein MHC exprimieren sollten (siehe Abbildung 29).

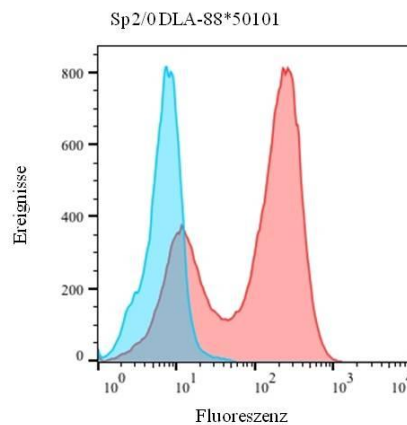


**Abbildung 29: Expression von MHC-Molekülen auf K562 Zellen.**

K562 Zellen zeigten nach längerer Kultivierung eine positive Reaktion nach der Inkubation mit dem Antikörper H58A (blau), im Vergleich zur Negativkontrolle, welche mit FACS-Puffer inkubiert wurde (rot). Die blaue Kurve zeigt zwei Peaks auf, der linke überschneidet sich mit der roten Kurve und somit mit der Negativprobe. Der rechte Peak weist eine erhöhte Fluoreszenz auf, es werden mittels H58A Antikörper humane MHC-Moleküle markiert. Somit werden von den K562 Zellen MHC-Moleküle präsentiert.

#### 4.2.4 Bestimmung der Anzahl an MHC-Molekülen auf transfizierten Zellen

Aufgrund des zunehmenden Expressionsverlustes der Sp2/0 DLA-88\*50101 Zellen, nach längerer Kultivierung, wurden diese mittels QUIFI Kit auf ihre Anzahl an MHC-Molekülen getestet. Dabei zeigte sich, dass ungefähr 30 % der Zellen sehr wenig, bis keine Expression mehr von DLA-Molekülen zeigten (siehe Abbildung 30).



#### Abbildung 30: Verlust der Expression von transfizierten Sp2/0 DLA-88\*50101 Zellen.

Negativkontrolle mit FACS-Puffer (blau), getestete Probe der Sp2/0 DLA-88\*50101 Zellen mit H58A (rot). Zu erkennen ist, dass sich bei der roten Kurve zwei Peaks abzeichnen, dabei stellt der rechte Teil die gewünschte Fluoreszenz dar, während der linke Teil sich mit der blauen Kurve überschneidet und diese Zellen kaum eine Expression von DLA-88\*50101 aufweisen. Die quantitative Durchflusszytometrie wurde insgesamt dreimal durchgeführt (n=3) und davon ein Mittelwert gebildet.

Die Menge der MHC-Klasse-I-Moleküle, die auf der Oberfläche jeder Zelle gefunden wurden betrug bei dem rechten Peak der roten Kurve 287469 Moleküle und bei dem linken Peak (rot) wurden nur 4403 Moleküle analysiert, was ungefähr 30 % der getesteten Zellen entsprach.

Diese Zellen wurden verworfen und neue Sp2/0 DLA-88\*50101 Zellen, des Klons A6, aufgetaut. Nachdem die Expression in einer FACS-Analyse bestätigt wurde, konnten diese Zellen für die weiteren Immunisierungen verwendet werden. Vor jeder Immunisierung wurde ihr Expressionsverhalten analysiert.



### 4.3 Immunisierung von BALB/c Mäusen

Für die Immunisierung wurden drei Mäuse mit unterschiedlichen Zellen immunisiert (siehe Tabelle 4.1). Die Mäuse wurden bei jeder Immunisierung mit  $1 \times 10^7$  Zellen (Sp2/0 DLA-88\*50101 oder C1R DLA-88\*50101) oder  $5 \times 10^6$  Zellen (PBMC's) immunisiert. Bei Maus 1 und Maus 2 wurden das Immunisierungsschema und die verwendeten Zellen für die Immunisierung angepasst. Durch die Verwendung eines Adjuvans (CpG) konnte die Immunreaktion noch verstärkt werden.

**Tabelle 4.1: Immunisierungsschema BALB/c Mäuse**

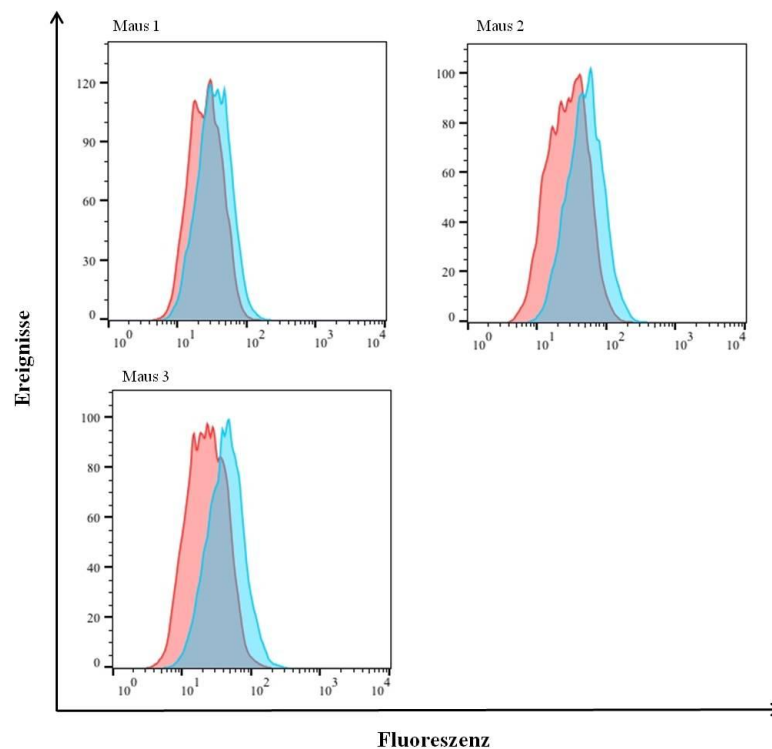
| <b>Vorgehen:</b>                   | <b>1. Maus</b>     | <b>2. Maus</b>     | <b>3. Maus</b>     |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Blutentnahme:<br>(Präimmunserum)   | 28.09.2016         | 28.09.2016         | 28.09.2016         |
| 1. Immunisierung:                  | 28.09.2016         | 28.09.2016         | 28.09.2016         |
| Zelllinie:                         | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 |
| Blutentnahme:                      | 12.10.2016         | 12.10.2016         | 12.10.2016         |
| 1. Boosterung:                     | 12.10.2016         | 12.10.2016         | 12.10.2016         |
| Zelllinie:                         | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 |
| Blutentnahme:<br>(Hyperimmunserum) | 26.10.2016         | 26.10.2016         | 26.10.2016         |
| 2. Boosterung:                     | 26.10.2016         | 26.10.2016         | 26.10.2016         |
| Zelllinie:                         | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 |
| Blutentnahme:                      | 09.11.2016         | 09.11.2016         | 09.11.2016         |
| 3. Boosterung:                     | 09.11.2016         | 09.11.2016         | 09.11.2016         |
| Zelllinie:                         | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 |
| Blutentnahme:                      | 25.11.2016         | 25.11.2016         | 25.11.2016         |
| 4. Boosterung:                     | 25.11.2016         | 25.11.2016         | 25.11.2016         |
| Zelllinie:                         | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 |
| Adjuvant:                          | 10 µl CpG          | 10 µl CpG          | 10 µl CpG          |

|                   |                    |                    |                    |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Blutentnahme:     | 09.12.2016         | 09.12.2016         | 09.12.2016         |
| 5. Boosterung     | 14.12.2016         | 14.12.2016         | 12.12.2016         |
| Zelllinie:        | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 |
| Adjuvant:         | 10 µl CpG          | 10 µl CpG          | 10 µl CpG          |
| Blutentnahme:     | 22.12.2016         | 22.12.2016         | 22.12.2016         |
| 6. Boosterung     | 23.12.2016         | 23.12.2016         | 23.12.2016         |
| Zelllinie:        | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 |
| Adjuvant:         |                    |                    | 10 µl CpG          |
| Blutentnahme:     | 13.01.2017         | 13.01.2017         | 13.01.2017         |
| 7. Boosterung     | 18.01.2017         | 18.01.2017         | 13.01.2017         |
| Zelllinie:        | C1R DLA-88*50101   | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 |
| Besonderheiten:   |                    |                    | <i>i. v.</i> Boost |
| Blutentnahme:     | 01.02.2017         | 01.02.2017         | 16.01.2017         |
| 8. Boosterung     | 03.02.2017         | 03.02.2017         |                    |
| Zelllinie:        | Sp2/0 DLA-88*50101 | Sp2/0 DLA-88*50101 |                    |
| Besonderheiten:   |                    |                    | Fusion 16.01.2017  |
| Blutentnahme:     | 22.02.2017         | 22.02.2017         |                    |
| 9. Boosterung     | 10.03.2017         | 08.03.2017         |                    |
| Zelllinie/Zellen: | MDCK II            | PBMC's             |                    |
| Besonderheiten:   | <i>i. v.</i> Boost |                    |                    |
| Blutentnahme:     | 14.03.2017         | 04.04.2017         |                    |
| 10. Boosterung    |                    | 07.04.2017         |                    |
| Zelllinie/Zellen: |                    | PBMC's             |                    |
| Besonderheiten:   | Fusion 14.03.2017  | <i>i. v.</i> Boost |                    |
| Blutentnahme:     |                    | 11.04.2017         |                    |
| Besonderheiten:   |                    | Fusion 11.04.2017  |                    |

### 4.3.1 Nachweis der Immunreaktion im Serum von BALB/c Mäusen

Das Serum welches vor der ersten Immunisierung gewonnen wurde, wurde als Präimmunserum (PS) bezeichnet. Die darauffolgenden Seren wurden als Hyperimmunserum (HIS) bezeichnet.

Um zu untersuchen, ob die immunisierten Mäuse eine Reaktion gegen das injizierte Antigen bildeten, wurde das Serum regelmäßig auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen DLA-88 getestet. Das PS wurde bei jeder Analyse der Seren als Negativkontrolle verwendet. Es zeigte sich erst ab der vierten Immunisierung eine Reaktion der Mäuse, auf das injizierte Antigen (siehe Abbildung 31). Zuvor konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum PS erkannt werden.



**Abbildung 31: Nachweis der Immunreaktion im Serum.**

Das Serum wurde auf C1R DLA-88\*50101 Zellen getestet. Als Vergleich diente das jeweilige Präimmunserum (PS) der Mäuse (rot). Das erste Mal war eine Reaktion nach der 4. Immunisierung zu erkennen (blau). Die Seren wurden 1:20 in FACS-Puffer verdünnt.

Abhängig von der Menge an der Zelloberfläche exprimierten DLA-88 Molekülen und der Immunogenität dieser Proteine, kann sich die Immunreaktion der Maus auf das Antigen verzögern.

Die Seren wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen getestet. Dabei zeigte sich, dass eine 1:50 Verdünnung in FACS-Puffer das beste Ergebnis erbrachte. Weshalb im weiteren Verlauf die Seren für die FACS-Analysen in einer 1:50 Verdünnung verwendet wurden.

Das Serum der Mäuse wurde folgendermaßen gekennzeichnet:

$$\text{Maus 1} = 1.(x+1)$$

$$\text{Maus 2} = 2.(x+1)$$

$$\text{Maus 3} = 3.(x+1)$$

Dabei repräsentiert  $x$  die Anzahl der durchgeführten Immunisierungen. Nachdem Maus 1 drei Mal Immunisiert wurde, lautete die Bezeichnung des dazugehörigen Hyperimmunserums 1.4. Je nach Häufigkeit der Immunisierungen, wurde aufsteigend nummeriert. Insgesamt wurde bis 1.11, 2.12 und 3.9 nummeriert. Als Kennzeichnung für das Präimmunserum der Mäuse wurde bei Maus 1 die Abkürzung 1.1 verwendet, bei Maus 2: 2.1 und bei Maus 3: 3.1.

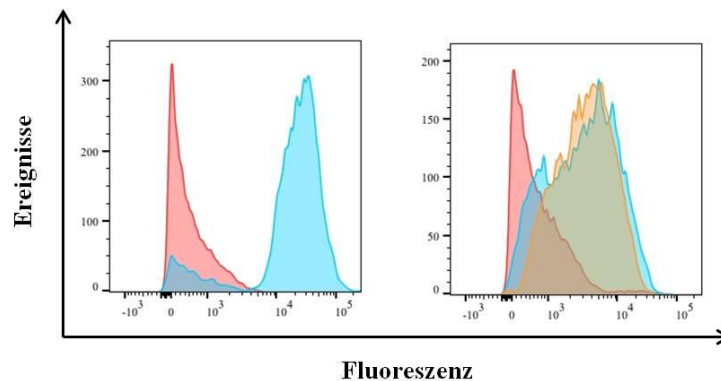
#### Maus 1

Maus 1 wurde einmalig mit C1R DLA-88\*50101 Zellen immunisiert. Als Resultat zeigte sich eine deutlich verbesserte Immunreaktion, sowohl bei der Analyse auf C1R DLA-88\*50101, K562 DLA-88\*50101 und MDCK II Zellen (siehe Abbildung 34 und Abbildung 35).

Diese Zellen zeigen einerseits eine hohe Expressionsrate von transfizierten MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche und sind andererseits humane Zellen. Es fand deshalb nicht nur eine Immunreaktion gegen das transfizierte DLA-88 statt, sondern auch hauptsächlich gegen weitere Oberflächenproteine dieser Zelle, was einen zusätzlichen Adjuvant-Effekt verursacht. Um die Ausbildung einer sekundären Immunantwort zu verhindern, wurde nur einmalig mit C1R DLA-88 immunisiert, damit möglichst nur auf den schon bekannten DLA-88 Teil der Zelle eine Reaktion stattfinden sollte. Der Nachteil dieses Vorgehens war, dass bei der Fusion zur Herstellung von Hybridomen auch solche generiert wurden, die Antikörper gegen andere Oberflächenproteine sezernierten, was das Screening auf die relevanten Antikörper erschwerte. Außerdem wurde der finale Boost mit MDCK II Zellen durchgeführt. Hierdurch sollte die Immunreaktion nochmals deutlich verstärkt werden (siehe Abbildung 32).

Maus 2

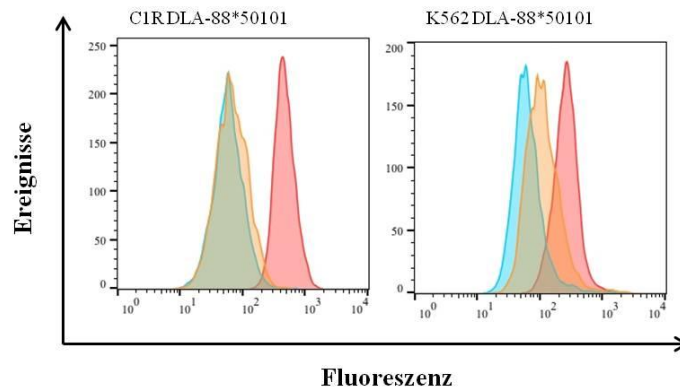
Maus 2 wurde zusätzlich einmalig (*i. p.*) mit Hunde PBMC's immunisiert, der *i. v.* Boost erfolgte ebenso mit diesen Zellen. Die darauffolgenden getesteten Seren wiesen eine erheblich höhere Reaktion in der FACS-Analyse auf, als die zuvor getesteten Seren dieser Maus (siehe Abbildung 32, Abbildung 34 und Abbildung 35).

**Abbildung 32: Vergleich der Präimmunsere mit den Hyperimmunsere.**

C1R DLA-88\*50101 Zellen wurden mit den Präimmunsere 1.1, 2.1 (rot) und den Hyperimmunsere der jeweiligen Maus 1.11, 2.11 (blau) und 2.12 (orange) behandelt. Es zeigt sich, dass bei Maus 1 (links) ein signifikanter Unterschied zwischen dem PS (rot) und dem HIS (blau), welches nach dem *i. v.* Boost gewonnen wurde, zu erkennen ist. Dieses Ergebnis resultiert aus der erhöhten Antikörperproduktion dieser Maus. Bei Maus 2 (rechts) ist dieses Ergebnis nicht so deutlich wie bei Maus 1. Dennoch ist eine erhöhte Antikörperproduktion des HIS (blau) und dem HIS, welches nach dem *i. v.* Boost gewonnen wurde (orange) im Vergleich zum PS (rot) zu erkennen. Es wurden bei beiden Mäusen, Antikörper gegen DLA-88\*50101 nachgewiesen.

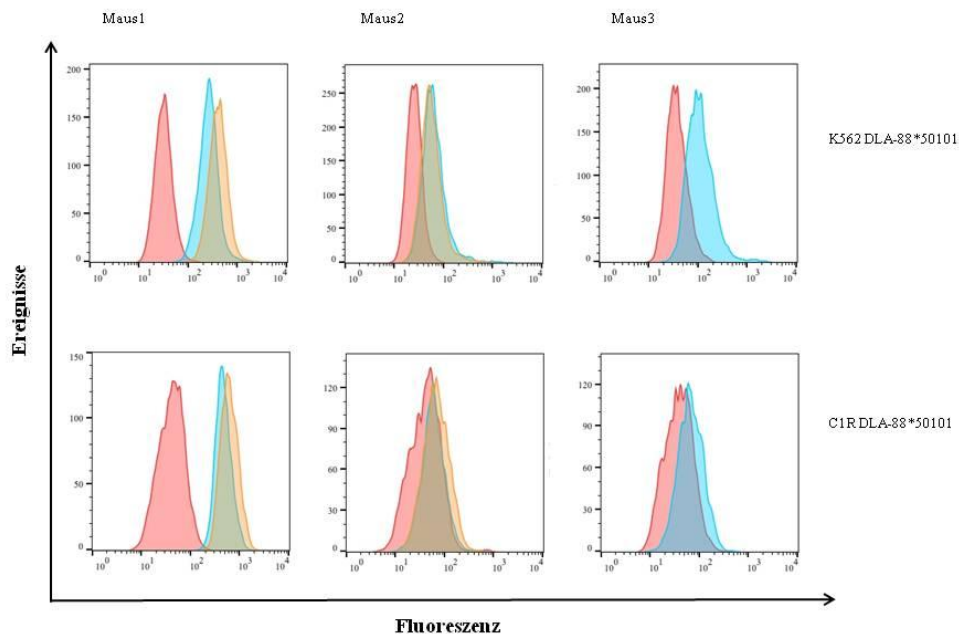
Maus 3

Maus 3 wurde ausschließlich mit Sp2/0 DLA-88\*50101 Zellen immunisiert. Nach Zugabe von CpG zu der Injektionssuspension, konnte eine leicht erhöhte Antikörperproduktion festgestellt werden.



**Abbildung 33: Vergleich von Serumproben in der FACS-Analyse.**

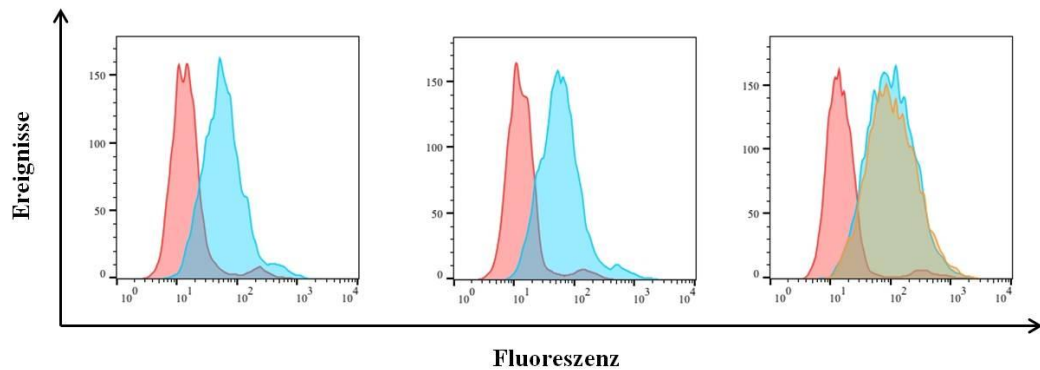
Hier sind die getesteten Seren der drei Mäuse auf C1R DLA-88\*50101 und K562 DLA-88\*50101 Zellen im Vergleich dargestellt. Serum 1.9 (rot), Serum 2.9 (blau), Serum 3.9 (orange). Es zeigt sich, dass das Hyperimmunserum (HIS) von Maus 1 (rot), im Vergleich zu den HIS der beiden anderen Mäuse, bei beiden Zelllinien die beste Antikörperproduktion erreicht hat. Bei den C1R DLA-88\*50101 Zellen gibt es kaum einen Unterschied zwischen dem HIS von Maus 2 (blau) und Maus 3 (orange). Ausschließlich Maus 1, die einmalig mit C1R DLA-88\*50101 Zellen immunisiert wurde, zeigt die beste Reaktion auf dieser Zelllinie. Bei den K562 DLA-88\*50101 Zellen zeigt Maus 2 (blau) die geringste Reaktion, gefolgt von Maus 3 (orange) und Maus 1 (rot). Aufgrund dieses Ergebnisses, wurde Maus 2 anschließend mit Hunde PBMC's immunisiert, um eine höhere Immunreaktion zu erreichen.



**Abbildung 34: Vergleich der Präimmunseren und Hyperimmunseren der drei Mäuse.**

Die Zelllinien K562 DLA-88\*50101 und C1R DLA-88\*50101 wurden jeweils mit einem Präimmunserum: 1.1, 2.1, 3.1, rot und den Hyperimmunseren der jeweiligen Maus behandelt: 1.9, 2.9, 3.9 (blau) und 1.10, 2.10 (orange). Es zeigt sich auf beiden Zelllinien, bei Maus 1 eine erhöhte Fluoreszenzintensität der HIS, was auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen DLA-88\*50101 hindeutet. Bei Maus 2 und 3 ist zu erkennen, dass sich bei K562 DLA-88\*50101 Zellen ein besseres Ergebnis in der FACS-Analyse der HIS darstellt, als bei C1R DLA-88\*50101 Zellen.

Die Seren der Mäuse wurden auch auf MDCK II Zellen getestet, um zu untersuchen, ob der Antikörper Allel-spezifisch bindet (siehe Abbildung 35).



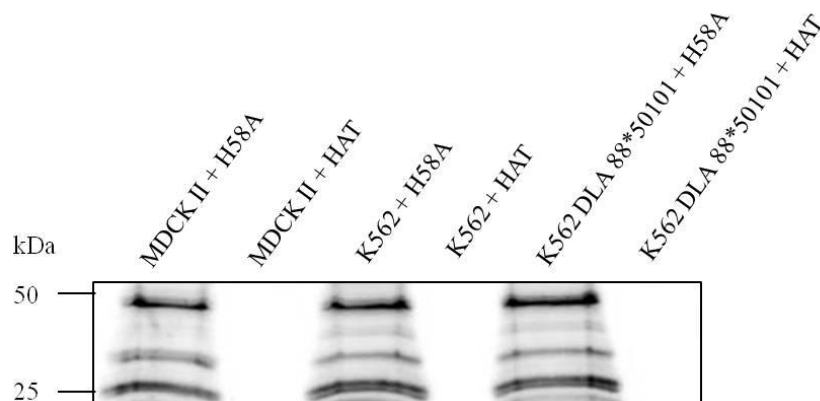
**Abbildung 35: FACS-Analyse der Seren auf MDCK II Zellen.**

Von links nach rechts sind im Histogramm die Analysen der Mäuse 1 bis 3 dargestellt. Die MDCK II Zellen wurden mit den Präimmunsere: 1.1, 2.1, 3.1 (rot) und dem HIS der jeweiligen Maus behandelt: 1.8, 2.8, 3.8 (blau) und 3.9 (orange, wurde nach dem *i. v.* Boost gewonnen). Es zeigt sich bei allen drei HIS der Mäuse eine positive Reaktion in der FACS-Analyse, es werden Antikörper gegen DLA-88 produziert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Antikörper gegen DLA-88 produziert werden, die nicht Allel-spezifisch sind.

Bei allen Mäusen konnte anhand der FACS-Analysen, der Präimmunsere im Vergleich zu den als letztes gewonnenen Seren (nach dem *i. v.* Boost) eine deutliche Antikörperproduktion gegen DLA-88 erkannt werden (siehe Abbildung 32: Serum 1.11 und 2.12. und Abbildung 34: Serum 3.9). Somit konnte jede Maus für eine Fusion verwendet werden.

#### 4.4 Nachweis von MHC-Fragmenten im Western Blot

Im Western Blot können MHC-Fragmente durch eine Bande sichtbar gemacht werden. Es wurden jeweils MDCK II, K562 und K562 DLA-88\*50101 Zellen auf ihr Vorhandensein von MHC-Klasse-I-Molekülen untersucht. Von diesen Zelllinien wurden Lysate hergestellt, welche jeweils mit dem H58A Antikörper (Positivkontrolle) und mit HAT Zellkulturmedium (Negativkontrolle) inkubiert wurden. Bei den Positivkontrollen sollten jeweils drei Banden sichtbar werden. Eine Bande bei 50 kDa, die für die schwere Kette steht und eine Bande bei 25 kDa, die für die leichte Kette des Antikörpers steht. Die dritte Bande bei 45 kDa entspricht der Molekularen Masse des MHC-Moleküls (135). Bei den Negativkontrollen mit HAT sollte keine Bande sichtbar werden. Bei den getesteten Zellen konnte das Vorhandensein von MHC-Fragmenten bestätigt werden (siehe Abbildung 36).



**Abbildung 36: Nachweis von MHC-Fragmenten.**

Mittels Western Blot Analyse wurden die MHC-Fragmente von MDCK II, K562 und K562 DLA-88\*50101 Zellen nachgewiesen. Es zeigen sich bei allen Proben Banden bei 45 kDa, was der Molekularen Masse des MHC-Moleküls entspricht (135). Durch diese Banden können die MHC-Fragmente identifiziert werden. Die hellgrauen Banden (ca. 35 kDa) weisen unspezifische Bindungen auf. Der Antikörper H58A bindet an denaturiertes Protein.



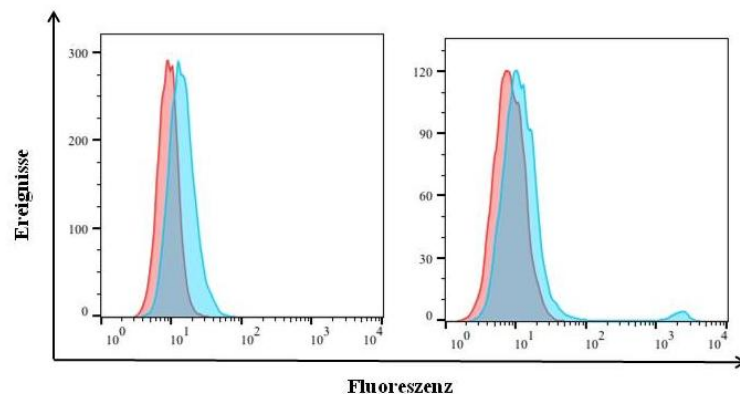
## 4.5 Nachweis von DLA spezifischen Antikörpern aus Fusion 1

### 4.5.1 Durchflusszytometrie der Hybridomaüberstände

Hybridome sezernieren Antikörper, weswegen die Überstände regelmäßig auf spezifische Antikörper gegen DLA-88 getestet wurden.

Das Screening der Hybridomaüberstände wurde jeweils mit  $2 \times 10^6$  oder je nach Antikörpermischung mit  $4 \times 10^6$  K562 DLA-88\*50101 Zellen, sowie in einem nachfolgenden Schritt auch mit MDCK II Zellen und C1R DLA-88\*50101 durchgeführt. MDCK II Zellen tragen das DLA-88\*03201 Allel, welches nicht zur Immunisierung verwendet wurde. Das Screening der Hybridomaüberstände auf MDCK II Zellen diente der Feststellung, ob mögliche Antikörper spezifisch für ein Allel sind oder mehrere Allele erkannt werden.

Insgesamt wurden 124 Klone getestet. Es wurde nur ein Klon gefunden, der eine leichte Antikörperreaktion in der FACS-Analyse zeigte, dies war der Klon 23.D10 (siehe Abbildung 37).



**Abbildung 37: Ergebnisse des Klons aus Fusion 1 in der FACS-Analyse.**

Ergebnisse des Überstandes des Klons 23.D10 (blau). Links getestet auf K562 DLA-88\*50101 Zellen, rechts auf MDCK II Zellen. Als Negativkontrolle ist die jeweilige Zelllinie mit HAT Zellkulturmedium inkubiert worden (rot). Es zeigt sich eine leichte Rechtsverschiebung der blauen Kurve, es ist eine geringe Antikörperreaktion, durch die leichte Fluoreszenzerhöhung zu erkennen.

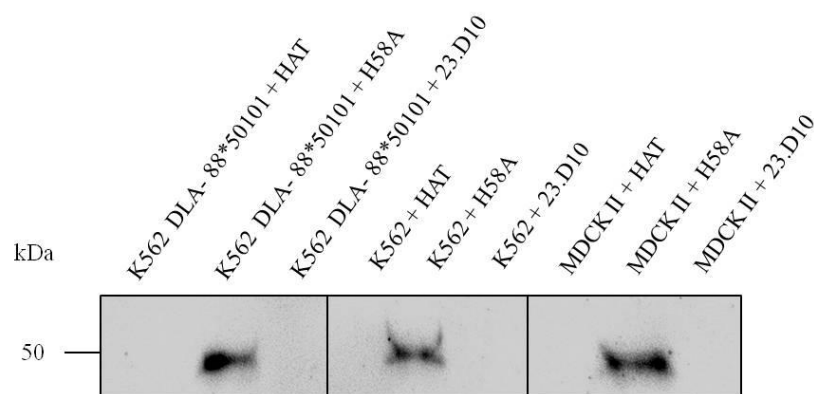
Zur weiteren Untersuchung des Klons auf seine DLA-88 Spezifität, wurde eine Immunpräzipitation mit dem Überstand durchgeführt (siehe Abbildung 38).

### 4.5.2 Immunpräzipitation von Hybridomaüberständen

Um die Spezifität des Hybridomaüberstandes von dem Klon 23.D10 zu analysieren, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde HAT Zellkulturmedium verwendet und als Positivkontrolle der Antikörper H58A (1:50). Bei der Immunpräzipitation zeigt sich bei allen drei Zelllinien, die mit dem Antikörper H58A inkubiert wurden, eine Bande bei 45 kDa für die schwere Kette der MHC-Fragmente. Das  $\beta_2$ M konnte nicht deutlich nachgewiesen werden, es sollte sich bei 12 kDa darstellen. Die leichte Kette ist nicht deutlich zu sehen, welche bei 25 kDa zu erwarten ist. Die schwere Kette ist bei 50 kDa zu erkennen. Die Bande für das MHC-Fragment sollte bei 45 kDa vorhanden sein, leider lässt sich diese schwer von der 50 kDa Bande unterscheiden, da diese sehr dicht beieinander liegen. Der Überstand des Klons 23.D10 zeigt keine Bande in der Immunpräzipitation und ist somit negativ.

Bei K562 Zellen zeigt sich eine positive Reaktion, wie bei der Western Blot Analyse (siehe Abbildung 38). In der Immunpräzipitation bindet der Antikörper an native Proteine, die Denaturierung erfolgt erst nach der Antikörperbindung.

In Fusion 1 konnte keine Hybridomzelle mit spezifisch sezernierenden Antikörpern gegen DLA-88 gefunden werden, weshalb eine zweite Fusion durchgeführt wurde.



**Abbildung 38: Immunpräzipitation eines Klons von Fusion 1.**

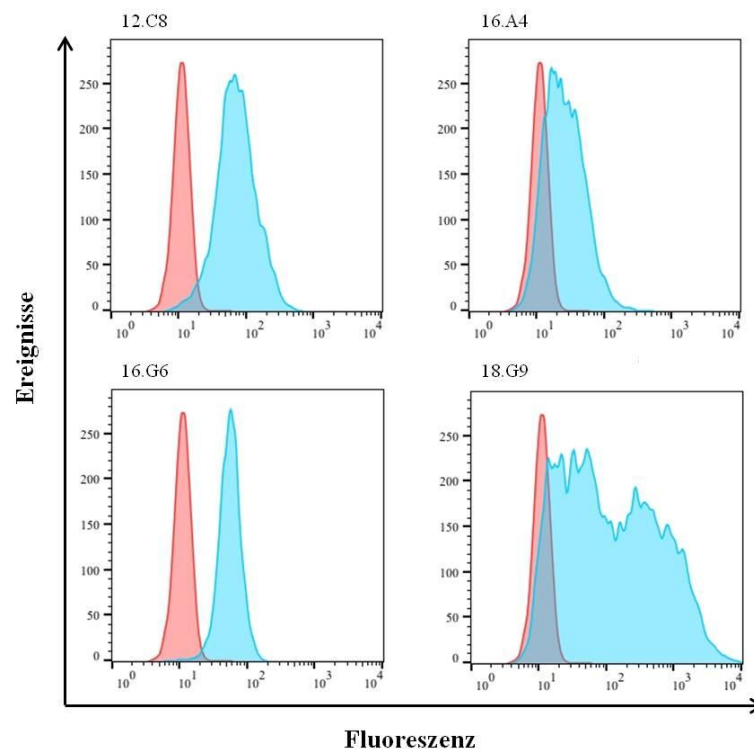
Der Klon 23.D10 aus Fusion 1 wurde auf K562 DLA-88\*50101 und MDCK II Zellen getestet. Es zeigt sich nur bei den Zellen, die mit H58A inkubiert wurden und somit als Positivkontrolle dienen, eine Bande bei 45 kDa. Somit ist der getestete Klon 23.D10 nicht in der Lage DLA-88 zu binden.

## 4.6 Nachweis von DLA spezifischen Antikörpern aus Fusion 2

### 4.6.1 Durchflusszytometrie der Hybridomaüberstände

Das Screening der Hybridomaüberstände wurde mit K562 DLA-88\*50101 Zellen, sowie in einem nachfolgenden Schritt auch mit MDCK II Zellen und C1R DLA-88\*50101 durchgeführt. Insgesamt wurden 662 Klone getestet.

Es wurden vier Klone gefunden, die auf K562 DLA8-88\*50101 Zellen eine Antikörperreaktion zeigten: 12.C8, 16.A4, 16.G6 und 18.G9 (siehe Abbildung 39). Diese Klone wurden außerdem auf MDCK II Zellen getestet, dort wiesen sie ebenfalls eine positive Reaktion auf. Der Klon 16.G6 zeigte aber eine geringere Fluoreszenz, als auf den K562 DLA-88\*50101 Zellen. Nur bei dem Klon 12.C8, wurde nach weiteren Untersuchungen eine Limiting Dilution angefertigt. Davon wurde der Klon 12.C8F6 weiter kultiviert und verwendet. Da dieser eine sehr gute Reaktion in der FACS-Analyse zeigte.

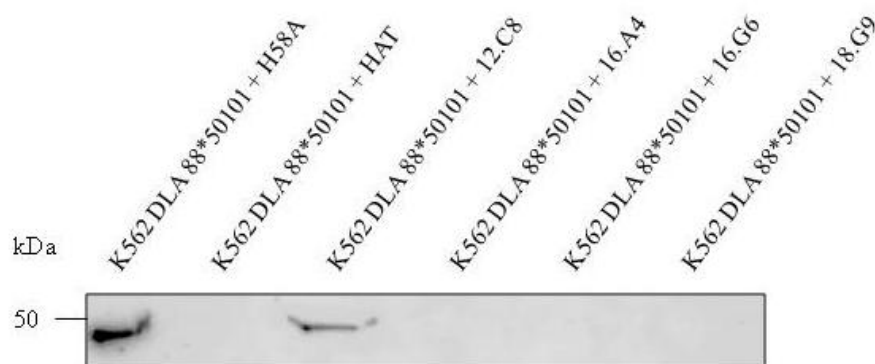


**Abbildung 39: Ergebnisse der Hybridomaüberstände aus Fusion 2 in der FACS-Analyse.**

Es wurden die Klone 12.C8, 16.A4, 16.G6 und 18.G9 (blau) auf K562 DLA-88\*50101 Zellen getestet. Als Negativkontrolle diente HAT Zellkulturmedium, welches mit den transfizierten K562 Zellen inkubiert wurde (rot). Die Klone 12.C8 und 16.G6 zeigen eine sehr gute Antikörperreaktion, die in einer erhöhten Fluoreszenzintensität resultiert (blau).

#### 4.6.2 Immunpräzipitation von Hybridomaüberständen

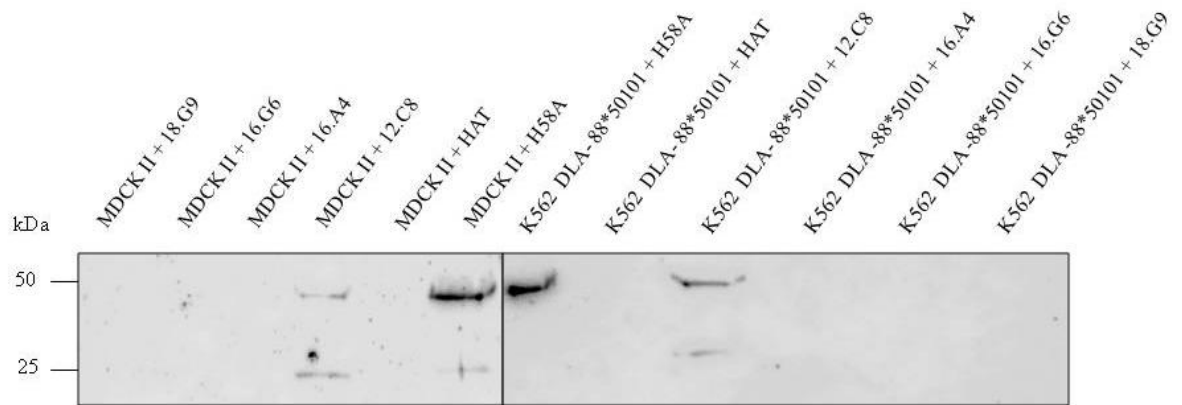
Um die Spezifität der Hybridomaüberstände aus Fusion 2 weiter zu testen, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde HAT Zellkulturmedium verwendet und als Positivkontrolle der Antikörper H58A Antikörper. Hierbei war erkennbar, dass der getestete Klon 12.C8 Antikörper gegen DLA-88 sezerniert (siehe Abbildung 40). Es ist eine Bande bei 45 kDa zu erkennen, die der Molekularen Masse von DLA entspricht. Bei keinem anderen getesteten Klon konnte dies nachgewiesen werden. Keiner der anderen getesteten Klone konnte Antikörper gegen DLA-88 sezernieren.



**Abbildung 40: Immunpräzipitation der Klone aus Fusion 2 mit K562 DLA-88\*50101 Zellen.**

Bei den Klonen 12.C8, 16.A4, 16.G6 und 18.G9 wurde auf K562 DLA-88\*50101 Zellen eine Immunpräzipitation durchgeführt. Es zeigt sich eine Bande bei 45 kDa, bei der Positivkontrolle mit dem Antikörper H58A. Außerdem ist auf derselben Höhe eine Bande bei dem Antikörper des Klons 12.C8 zu erkennen. Somit sezerniert dieser Klon Antikörper gegen DLA-88 und ist in der Lage DLA-88 zu präzipitieren.

Die Klone wurden außerdem auf MDCK II Zellen getestet. Auch hierbei zeigte nur der Klon 12.C8 eine Bande bei 45 kDa. Somit erkennt der Antikörper DLA-88 nicht Allel-spezifisch, es können somit auch andere Allele gebunden werden. Wodurch der Antikörper hinsichtlich seines Einsatzes für die MHC-Präzipitation von DLA-88 geeignet ist.

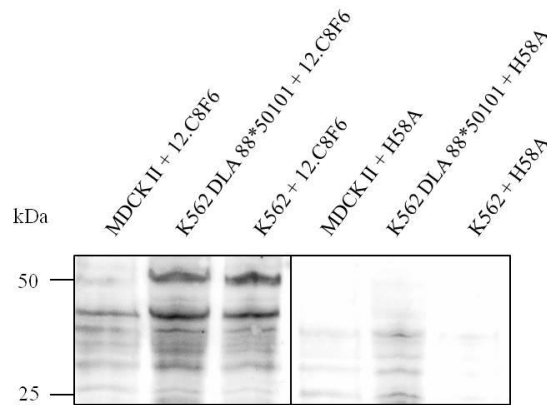


**Abbildung 41: Immunpräzipitation der Klone aus Fusion 2 mit zwei Zelllinien, im Vergleich.** Es wurden eine Immunpräzipitation der Klone 12.C8, 16.A4, 16.G6 und 18.G9 jeweils auf MDCK II und K562 DLA-88\*50101 Zellen durchgeführt. HAT Zellkulturmedium diente als Negativkontrolle und H58A als Positivkontrolle. Auch hier zeigt der Klon 12.C8 eine Bande bei 45 kDa, somit wurde DLA-88 in der Immunpräzipitation erfolgreich gebunden. Dies ist auf beiden Zelllinien zu erkennen.

Nur der Klon 12.C8 war sowohl in der FACS-Analyse als auch in der Immunpräzipitation positiv. Von diesem Klon wurde eine Limiting Dilution angesetzt.

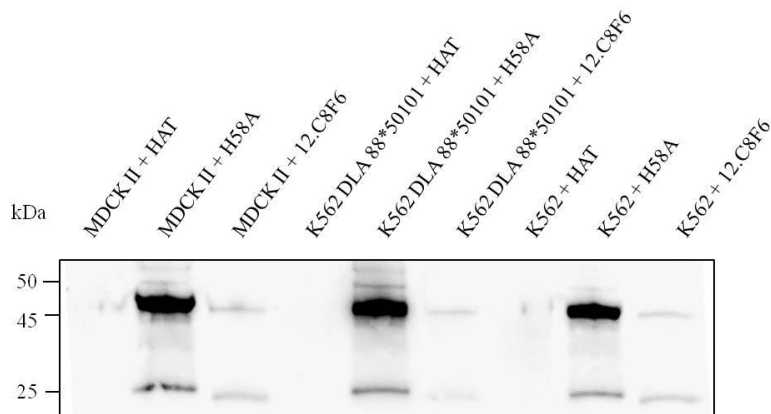
#### 4.6.3 Western Blot und Immunpräzipitation von 12.C8F6

Aus der Limiting Dilution des Klons 12.C8, wurde der Klon 12.C8F6 für die weitere Verwendung ausgewählt, da dieser die besten Ergebnisse in der FACS-Analyse und in der Immunpräzipitation zeigte (siehe Abbildung 43 und Abbildung 48). Es konnten MHC-Fragmente in der Western Blot Analyse (siehe Abbildung 42) und in der Immunpräzipitation (siehe Abbildung 43) identifiziert werden.



**Abbildung 42: Western Blot Analyse des Antikörpers 12.C8F6.**

Die Bindung des Antikörpers wurde auf MDCK II, K562 DLA-88\*50101 und K562 Zellen getestet. Als Positivkontrolle wurde H58A verwendet. Bei allen getesteten Zelllinien ist mit Inkubation des Antikörpers 12.C8F6, eine Bande bei 45 kDa zu erkennen. Somit wurde das MHC-Fragment, im denaturierten Zustand erkannt. Auf allen Zelllinien ist dieser Nachweis zu finden, auch auf den K562 Zellen. Die Membran der Positivkontrolle konnte nur mangelhaft ausgewertet werden, hier sind die Banden nicht gut zu erkennen. Es war jedoch durch einstellen eines Kontrastes am Chemolumineszenz-Messgerät zu erkennen, dass auch hier Banden vorlagen. Jedoch ist die Aussagekraft nicht wie gewünscht erkennbar.



**Abbildung 43: Immunpräzipitation des Antikörpers 12.C8F6.**

Die Immunpräzipitation wurde auf MDCK II, K562 DLA-88\*50101 und K562 Zellen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde H58A Antikörper verwendet, als Negativkontrolle HAT Zellkulturmedium. Bei der Inkubation der Antikörper 12.C8F6 und H58A mit den verwendeten Zelllinien, ist eine Bande bei 45 kDa zu erkennen. Somit wurde das DLA-88, im nativen Zustand gebunden. Auch auf K562 Zellen ist dies zu erkennen. Der Antikörper 12.C8F6 konnte DLA-88 präzipitieren.

#### 4.6.4 Isotypbestimmung von 12.C8F6

Für die Isotypbestimmung wurde aufgereinigter Antikörper von 12.C8F6 verwendet. Das Testfeld zeigt jeweils eine rote Linie bei C, was der Kontrolllinie entspricht (siehe Abbildung 44). Außerdem ist eine Linie bei G<sub>3</sub> zu erkennen. Es handelt sich hierbei um einen Antikörper der Subklasse IgG<sub>3</sub>.



**Abbildung 44: Isotypbestimmung des Antikörpers 12.C8F6.**

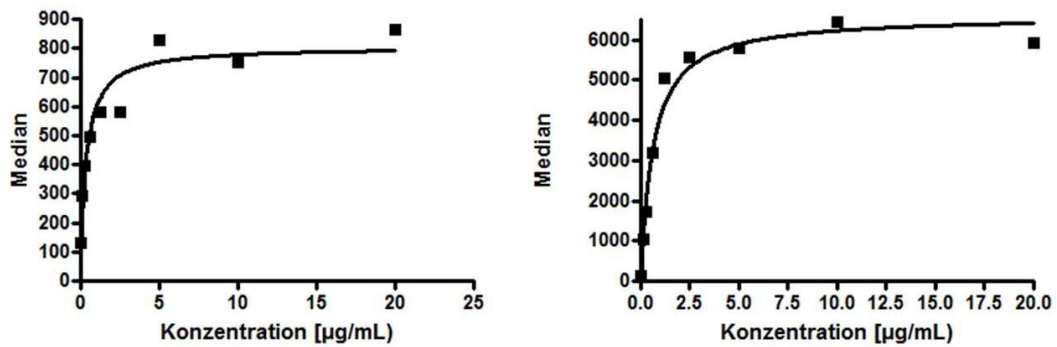
Die Isotypbestimmung wurde mit dem "Iso-Gold™ Rapid Mouse-Monoklonales Isotyping Kit" durchgeführt. Zu erkennen ist im linken und rechten Testfeld die Kontrolllinie, welche bei "C" angezeigt wird und rechts ist die rote Linie bei G<sub>3</sub> zu erkennen. Somit handelt es sich bei dem getesteten Antikörper um einen IgG<sub>3</sub> Isotyp.

#### 4.6.5 Konzentrationsbestimmung des Antikörpers 12.C8F6

Nach der Aufreinigung des Antikörpers, konnte die OD280 gemessen werden. Diese wurde in Elutionspuffer und nach der Umpufferung in PBS gemessen. Die Konzentration des aufgereinigten Antikörpers in Elutionspuffer lag bei 0,13 mg/ml. Nach der Umpufferung in PBS lag die Konzentration des Antikörpers bei 3,4mg/ml.

#### 4.6.6 Bindekapazität des Antikörpers 12.C8F6

Um zu untersuchen wie gut der Antikörper in der FACS-Analyse DLA-88 binden kann, wurde eine Bindekapazitätsbestimmung, mit K562 DLA-88\*50101 und MDCK II Zellen, durchgeführt. Dadurch konnte die Konzentration bestimmt werden, bei der alle DLA-Moleküle der Zelloberfläche von dem Antikörper gebunden werden, der Antikörper somit in Sättigung vorlag. Auf beiden Zelllinien trat eine Sättigung bei 2,5 µg/ml ein.



**Abbildung 45: Bindekapazität des Antikörpers 12.C8F6.**

Die Bindekapazität von 12.C8F6 wurde auf K562 DLA-88\*50101 Zellen (links) und MDCK II Zellen (rechts) getestet.

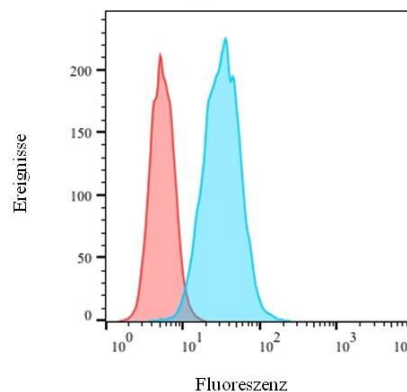
In beiden Analysen, zeigte sich eine Sättigung bei 2,5 µg/ml, danach wird ein Plateau erreicht. Bei dieser Konzentration sind alle MHC-Moleküle der Zelloberfläche vom Antikörper gebunden.

## 4.7 Nachweis von DLA spezifischen Antikörpern aus Fusion 3

### 4.7.1 Durchflusszytometrie der Hybridomaüberstände

Das Screening der Hybridomaüberstände wurde mit K562 DLA-88\*50101 Zellen durchgeführt. Insgesamt wurden 1072 Klone getestet.

Der Klon 2.A9 zeigte in der FACS-Analyse eine Antikörperproduktion gegen das gewünschte Antigen (siehe Abbildung 46).



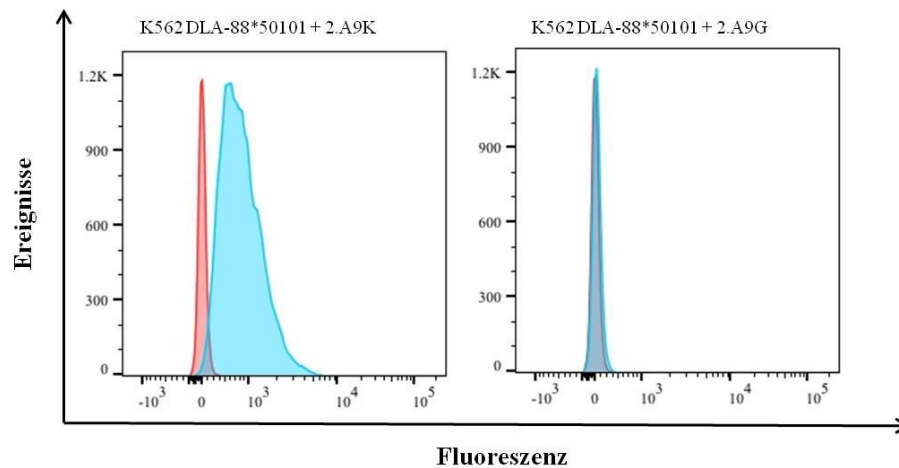
**Abbildung 46: Ergebnisse des Klons aus Fusion 3 in der FACS-Analyse.**

Inkubation von K562 DLA-88\*50101 Zellen mit HAT Zellkulturmedium (rot) und dem Hybridomaüberstand des Klons 2.A9 (blau) welcher eine erhöhte Fluoreszenz in der FACS-Analyse aufwies. Die blaue Kurve zeigt einen deutlichen Unterschied zur Negativkontrolle (rot), welcher sich in einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität darstellt.

In dem Well 2.A9 befanden sich zwei Klone, damit sicher bestätigt werden konnte, welcher Klon die gewünschten Antikörper sezernierte, mussten diese Klone vereinzelt kultiviert werden.



Es gab einen größeren Klon, welcher im weiteren Verlauf als 2.A9G bezeichnet wurde, und einen kleineren Klon, 2.A9K. Nun konnte jeder Überstand der beiden Klone noch einmal separat in der FACS-Analyse getestet werden (siehe Abbildung 47). Hierbei zeigte sich, dass nur der Klon 2.A9K eine positive Reaktion in der FACS-Analyse zeigte. Somit war dies der Klon, der die gewünschten Antikörper sezerniert.

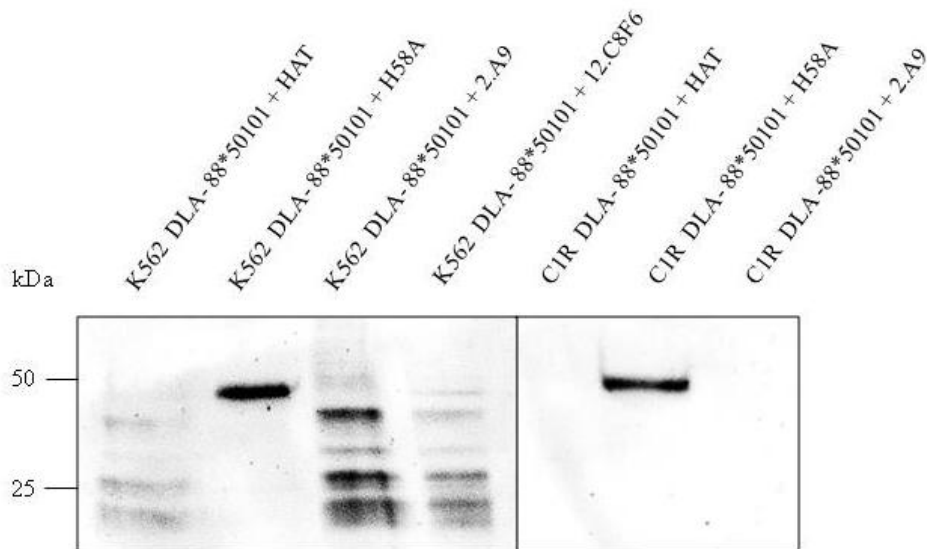


**Abbildung 47: Ergebnisse der Klone aus Fusion 3 in der FACS-Analyse.**

Der Klon 2.A9K zeigt eine Antikörperproduktion gegen DLA-88\*50101 (links, blau) auf K562 DLA-88\*50101 Zellen. Der Klon 2.A9G zeigt keine positive Reaktion in der FACS-Analyse und ist somit negativ (rechts, blau). Als Negativkontrolle wurde für die Inkubation HAT Zellkulturmedium verwendet (rot).

#### 4.7.2 Immunpräzipitation von Hybridomaüberständen

Um die Spezifität des Hybridomaüberstandes des Klons 2.A9 weiter zu testen, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde HAT Zellkulturmedium verwendet und als Positivkontrolle der Antikörper H58A. Es war erkennbar, dass der getestete Klon 2.A9 Antikörper gegen DLA-88 sezernierte (siehe Abbildung 48). Es ist eine Bande bei 45 kDa zu erkennen, der molekularen Masse von DLA. Zum Vergleich wurde der schon positiv getestete Klon 12.C8F6 noch einmal mit getestet. Auf C1R DLA-88\*50101 Zellen zeigte sich nur bei dem Antikörper H58A eine Bande bei 45 kDa.



**Abbildung 48: Immunpräzipitation der Klone: 12.C8F6 aus Fusion 2 und 2.A9 aus Fusion 3.** Als Negativkontrolle wurde HAT Zellkulturmedium und als Positivkontrolle H58A verwendet. Beide Klone wurden auf K562 DLA-88\*50101 und C1R DLA-88\*50101 Zellen getestet. Beide getesteten Klone zeigen auf K562 DLA-88\*50101 Zellen eine Bande bei 45 kDa und können somit DLA-88 in einer Immunpräzipitation binden. Bei den C1R DLA-88\*50101 Zellen konnte keiner der Klone eine Bande hervorrufen.

Leider konnte der Klon 2.A9K, aufgrund der geringen Zelldichte, im weiteren Verlauf nicht dauerhaft kultiviert werden.

## 4.8 Nachweis von Peptiden aus der MHC-Präzipitation

Es konnte ein Antikörper (12.C8F6) gefunden werden, der DLA-88 bindet, dieser wurde ausgewählt für die Kultivierung, Reklonierung und weiteren Tests mit anschließender MHC-Präzipitation. Bei der MHC-Präzipitation wurden Peptide, welche von caninen MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert wurden, von K562 DLA-88\*50101 und MDCK II Zellen eluiert.

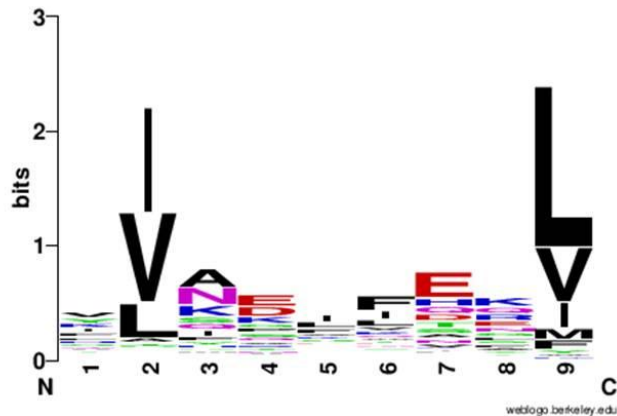
### K562 DLA-88\*50101 Zellen mit 12.C8F6 Antikörper

Für die Präzipitation von Peptiden aus DLA-88, wurden  $1,1 \times 10^9$  Zellen verwendet. Der aufgereinigte Antikörper 12.C8F6, wurde dafür an Sepharose gekoppelt und in eine Immunoaffinitätssäule gegeben. Mit Hilfe der Säulenimmunpräzipitation konnten Peptide eluiert werden, die von DLA-88 präsentiert wurden. Somit sollte die Funktionalität des Antikörpers bestätigt werden.

Es konnten 9 Peptide eluiert werden (siehe Tabelle 4.2) Bei vier dieser Peptide konnten dieselben Ankerpositionen identifiziert werden, die das gefundene Bindemotiv von Barth *et al.* aufweist. An Position 2 kommen vor allem die Aminosäuren Isoleucin, Valin oder Leucin vor. An Position 9 ist überwiegend ein Leucin, Valin oder Isoleucin zu finden (siehe Abbildung 49). Es wurde auch ein Peptid gefunden, das bei Barth *et al.* identifiziert wurde (IIQSIRMGM) (95).

**Tabelle 4.2: Eluierte Peptide der MHC-Präzipitation von K562 DLA-88\*50101 Zellen unter der Verwendung des Antikörpers 12.C8F6**

| Peptide      | Länge | Anker<br>Position 2 | Anker C-<br>Terminus | Binder |
|--------------|-------|---------------------|----------------------|--------|
| IIQSIRMGM    | 9     | I                   | M                    | ✓      |
| KLFIGGLSF    | 9     | L                   | F                    | ✓      |
| RDFLGGLAF    | 9     | D                   | F                    | -      |
| DALRSILTI    | 9     | A                   | I                    | ✓      |
| YTIEILKVE    | 9     | T                   | E                    | -      |
| YDESGPSIVH   | 10    | D                   | H                    | -      |
| AKDIGIKLD    | 10    | K                   | D                    | -      |
| GLETEKADVQL  | 11    | L                   | L                    | ✓      |
| VNVEINVAPGKD | 12    | N                   | D                    | -      |

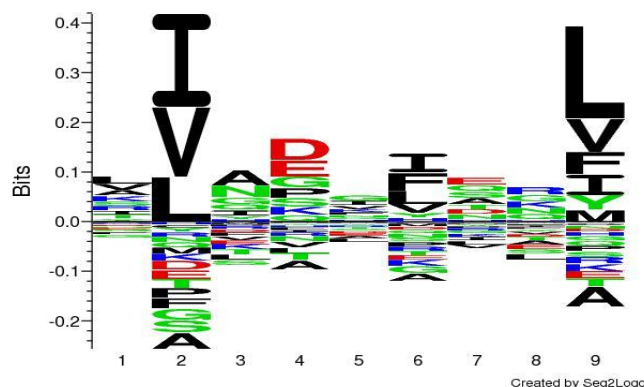


**Abbildung 49: Bindemotiv von DLA-88\*50101.**

Als Ankerpositionen sind Position 2 und Position 9 (C-Terminus) identifiziert worden. An Position 2 kommt vor allem ein Isoleucin, Valin oder Leucin vor. An Position 9 ist überwiegend ein Leucin, Valin oder Isoleucin zu finden. Je häufiger eine Aminosäure an einer Position vorkam, desto größer ist diese in der Abbildung dargestellt. Quelle: (95).

#### K562 DLA-88\*50101 Zellen mit BBM.1 Antikörper

Bei der Präzipitation der K562 DLA-88\*50101 Zellen mit dem BBM.1-Antikörper wurden insgesamt 296 Peptide gefunden. Die durchschnittliche Länge der Peptide betrug 9 Aminosäuren (n=161). Es konnten Peptide gefunden werden, die auch bei Barth et. al identifiziert wurden. Zusätzlich konnte ein Bindemotiv ermittelt werden (siehe Abbildung 50), dieses deckt sich ebenfalls mit dem ermittelten Bindemotiv von Barth *et al.* (siehe Abbildung 49).



**Abbildung 50: Bindemotiv von K562 DLA-88\*50101 Zellen.**

Das Bindemotiv konnte durch die MHC-Präzipitation mit dem BBM.1 Antikörper generiert werden, dieses deckt sich mit den Ergebnissen von Barth et. al. Auch hier sind die Ankeramino-säuren an Position 2 und 9 zu finden.

MDCK II Zellen und 12.C8F6 Antikörper

Bei der Präzipitation der MDCK II Zellen mit dem selbst hergestellten 12.C8F6 Antikörper wurden insgesamt 39 Peptide gefunden. Die durchschnittliche Länge der Peptide betrug 9 Aminosäuren (n=12). Die Tabelle zeigt die gefundenen Peptide mit einer Länge von 9 Aminosäuren (siehe Tabelle 4.3).

Es konnte kein Bindemotiv ermittelt werden, da zu wenig aussagekräftige Peptide gefunden wurden. Jedoch konnte das gleiche Peptid (IIQSIRMGGM) identifiziert werden, das auch bei den K562 DLA-88\*50101 Zellen mit dem BBM.1 Antikörper, sowie mit dem Antikörper 12.C8F6 und auch bei Barth et. al eluiert werden konnte.

**Tabelle 4.3: Eluierte Peptide der MHC-Präzipitation von MDCK II Zellen unter der Verwendung des Antikörpers 12.C8F6**

| <b>Peptid</b>     | <b>Länge</b> |
|-------------------|--------------|
| DTAAQITQR         | 9            |
| ASLSTFQQM         | 9            |
| VFGQSGAGN         | 9            |
| DTIEIITDR         | 9            |
| DLDYDFQRD         | 9            |
| LIVIQNPTE         | 9            |
| <b>IIQSIRMGGM</b> | 9            |
| MSFCIPTEY         | 9            |
| ENSDLKVMN         | 9            |
| LLKGFELMD         | 9            |
| ASLSTFQQM         | 9            |

Der Antikörper 12.C8F6 war in der Lage DLA-88 in einer Säulenimmunpräzipitation zu binden, wodurch Peptide, die von DLA präsentiert wurden eluiert werden konnten.

## 5 DISKUSSION

Die Immuntherapie ist keine neue Therapie in der Veterinärmedizin, allerdings ist die adaptive T-Zell-Immuntherapie ein neues Forschungsgebiet, bei Menschen und Hunden gleichermaßen (136).

Die Entwicklung therapeutischer, personalisierter Peptidimpfstoffe, gegen Tumorerkrankungen ist ein vielversprechender Ansatz der Immuntherapie (89) (137). Sie stellen außerdem eine Therapie dar, für Tumoren mit bisher relativ wenigen medizinischen Behandlungsmöglichkeiten (138). Der Vorteil ist, dass die Vakzinierung für jeden Patienten individuell angepasst werden kann, um so eine spezifische immunologische Antwort zu induzieren. Die individualisierte Impfung hat jedoch in humanen Studien den Nachteil, dass spätestens in der Phase III von klinischen Studien die Wirksamkeit bewiesen werden muss. Die Zusammensetzung des Impfstoffes wird auf den Tumor des Patienten individuell abgestimmt und zeigt nur bei ihm seine spezifische Wirkung. Es ist deshalb notwendig, eine große Anzahl an Probanden zu untersuchen. Forschungsergebnisse zu der Wirksamkeit und Verträglichkeit beim Hund, könnten somit auch die Therapiezulassung beim Menschen beschleunigen.

Der Hund eignet sich zur Etablierung des „Tübingen Approach“, auch aufgrund der beschriebenen Homologien zwischen HLA- und DLA-Gen-Sequenzen (139) (140), das menschliche und canine Genom zeigen insgesamt große Übereinstimmungen (141). Diese Ähnlichkeit lässt sich dadurch erklären, dass Mensch und Hund schon sehr lange in einer Gemeinschaft leben. Sie sind denselben Pathogenen ausgesetzt, entwickeln dadurch ähnliche Krankheiten und im gleichen Maße spontan entstehende Tumoren (142).

Außerdem stellt der Hund ein ideales Modell für Tumorerkrankungen dar (70) (143) (144) (145) (146) (147) (148). Der Mammatumor des Hundes, kann zur Untersuchung von menschlichem Brustkrebs genutzt werden, da Homologien dieser beiden Erkrankungen festgestellt wurden (65) (70) (146) (149). Etwa 400 erbliche Erkrankungen sind bei domestizierten Hunden charakterisiert, von denen die meisten auch für den Menschen relevant sind.

Es gibt mehrere hundert isolierte Populationen von Hunden (Rassen) und jede hat im Vergleich zum Menschen eine stark reduzierte genetische Variation. Dies vereinfacht das Krankheitsmapping und die Pharmakogenomik. Hunde altern fünf bis achtfach schneller als Menschen, teilen Umgebungen mit ihren Besitzern, werden in der Regel bis zum hohen Alter als Haustier gehalten und erhalten ein hohes Maß an Gesundheitsversorgung (143).

Natürlich vorkommende Krebsarten bei Haustieren und Menschen teilen viele Merkmale, einschließlich dem histologischen Aussehen, der Tumorgenetik, den molekularen Targets, dem biologischen Verhalten und den Reaktionen auf konventionelle Therapien. Die Erforschung von Krebs bei Hunden, gibt wahrscheinlich eine wertvolle Perspektive, die sich von denjenigen unterscheidet, die durch die Forschung von Humanen- oder Nagetier-Tumoren alleine erzeugt werden kann (150).

Sowohl der Hund, als auch der Mensch profitiert von diesem Ansatz des Modells, da es Hunden den Zugang zu innovativen Krebsbehandlungen bietet und hilft, Behandlungen beim Menschen besser verstehen und verbessern zu können (144).

Wir erhoffen uns den „Tübingen Approach“ auf den Hund übertragen zu können. Eine erfolgreiche klinische Anwendung dieser Therapieform beim Hund, kann dann wiederum einen Erkenntnisgewinn für die Anwendung beim Menschen bewirken, da Modifikationen der Therapie in der veterinärmedizinischen Anwendung flexibler durchführbar sind.

Der Kenntnisstand über canine MHC-Moleküle ist noch nicht so detailliert erforscht, wie beim Menschen. Es müssen Grundlagen geschaffen werden, mit dem Wissen über deren Peptid-Liganden und spezifisch an DLA bindende Antikörper. Es ist nötig, einen spezifischen Antikörper gegen DLA-88 zu generieren. Mit diesem Antikörper können MHC-Präzipitationen durchgeführt werden, welche die fehlenden Erkenntnisse liefern können. Es ist zwar bekannt, dass der IgG<sub>2</sub> Anti-MHC-Klasse-I-Antikörper H58A auch an DLA bindet (151), allerdings ist nicht bekannt, an welches MHC-Klasse-I-Molekül dieser bindet. Um sicherzustellen, dass der Antikörper nicht auch an ein MHC-Klasse-Ib-Molekül bindet, wären weitere Untersuchungen nötig.

Für die MHC-Präzipitation wird außerdem eine sehr große Menge Antikörper benötigt, diese hätte nur durch den Kauf ein H58A-Klon produziert werden können, was aus finanziellen Gründen nicht favorisiert wurde. Dennoch konnte der H58A Antikörper für FACS-Analysen, den Western Blot und die Immunpräzipitation als Positivkontrolle verwendet werden.

Um einen monoklonalen Antikörper gegen DLA-88 herstellen zu können, mussten Mäuse mit dem gewünschten Antigen immunisiert werden. Dafür wurde eine Zelllinie benötigt, die DLA-88\*50101 in hohem Maß exprimiert. Um eine spezifische Immunantwort zu erhalten, wurden mauseigene Sp2/0 Zellen mit DLA-88\*50101 stabil transfiziert. Damit die Immunreaktion gezielt gegen das gewünschte Antigen gerichtet wird, da die mauseigenen Oberflächenproteine keine Immunreaktion auslösen sollten. Man erhält spezifische Antikörper, aber durch den geringen Anteil an Fremdanigen auf der Zelloberfläche der transfizierten Zellen, kann es erschwert sein eine Immunantwort zu generieren. Es wurde nur die  $\alpha$ -Kette des DLA-88\*50101 für die Transfektion verwendet. Das für den Komplex benötigte  $\beta_2M$  wurde von der Zelle die transfiziert wurde bereit gestellt, weshalb kein Antikörper gegen das  $\beta_2M$  von DLA-88\*50101 generiert werden konnte. Das  $\beta_2M$  des Allels stand nicht zur Verfügung und konnte nicht in die Transfektion der Zellen mit einbezogen werden.

Direkt nach der Nukleofektion wurden die Zellen in einer 6 Well Platte kultiviert. Davon konnten die Zellen des Wells B2 nicht kultiviert werden, sie wurden zwei Tage nach der Transfektion in einem Selektionsmedium kultiviert. Das Absterben der Zellen lag wahrscheinlich an dem zu früh verwendeten Zellkulturmedium mit G418. Die frisch transfizierten Zellen sollten erst nach vier Tagen mit einem Selektionsmedium kultiviert werden, um ein Wachstum zu erreichen.

Es war von großer Bedeutung, die transfizierten Zellen auf ihr Vorhandensein von DLA zu untersuchen. Nur wenn tatsächlich an der Oberfläche DLA-88\*50101 exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass dieses als Antigen erkannt wird. Daraufhin wird eine Immunantwort auslöst, welche zur Bildung DLA-spezifischer Antikörper führt. Nur wenn das DLA an der Oberfläche exprimiert wird, kann es von Makrophagen und DCs erkannt werden. Sie nehmen das Fremdmaterial auf, um dieses im lymphatischen Gewebe den B- und T-Zellen präsentieren zu können.



Dieser Kontakt bewirkt anschließend die Differenzierung von naiven B-Zellen zu Antikörper sezernierenden B-Plasmazellen und der Differenzierung von naiven T-Zellen in T-Effektorzellen wie zytotoxischen T-Zellen oder den für die Sekundärantwort wichtigen Gedächtniszellen. Die Expression des DLA-88 induziert demnach die erwünschte Immunantwort, bei der Lymphozyten differenziert werden, die gegen DLA gerichtet sind.

Wäre das DLA-88 nicht an der Oberfläche exprimiert, könnte eine Immunantwort gegen andere Oberflächenmoleküle der Zelle erfolgen, woraufhin kein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen DLA-88 generiert werden könnte.

Mit Hilfe des Antikörpers H58A konnten die transfizierten Zellen getestet und der Klon mit der besten Expression gefunden werden. Für die Immunisierungen wurde der Klon A6 der Sp2/0 DLA-88\*50101 Zellen verwendet.

## 5.1 Immunreaktionen der Mäuse

Die Immunantwort der jeweiligen Maus, kann in der FACS-Analyse anhand der Untersuchungen verschiedener HIS, durch ansteigen der Fluoreszenz, mit Zunahme der Immunisierungen nachvollzogen werden. Die ersten vier Immunisierungen lieferten im Serum noch keine nachweisbare Antikörperreaktion. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass noch nicht genügend B-Lymphozyten vorhanden waren, die DLA spezifische Antikörper sezernierten. Durch den geringen Anteil an Fremdanigen, war es schwieriger eine Immunreaktion bei den Mäusen auszulösen. Nachdem mit einem Adjuvant (CpG) gearbeitet wurde, konnten die Ergebnisse leicht verbessert werden. Aufgrund der niedrigen Immunreaktionen, wurde das Immunisierungsschema von Maus 1 und 2 abgewandelt.

Im Verlauf weiterer Immunisierungen und wiederholtem Boostern mit DLA-88 tragenden Zellen wurden erhöhte, weiter ansteigende Fluoreszenzintensitäten in der FACS-Analyse erreicht. Es wurden Gedächtniszellen gegen das Antigen gebildet. Im Vergleich zu naiven T-Zellen, hat sich eine niedrigere Aktivierungsschwelle für T-Gedächtniszellen gebildet, dies ist eine Folge der erhöhten Reaktivität der Zelle. Die schrittweise Verschiebung der Floreszenzen in den Serummessungen, lässt zudem darauf schließen, dass Antikörper mit starker Affinität produziert wurden.

Diese Affinitätsreifung ist das Ergebnis der Immunisierungen, durch die während der immunantwort B-Zell-Rezeptoren und damit Antikörper im Bezug auf eine progressiv zunehmende Affinität für Antigene selektiert wurden (152). Diesbezüglich hat die Affinität der Antikörper gegenüber DLA-88 zugenommen, was das Ziel der Immunisierungen war.

Die Serumverdünnungen wurden in den ersten FACS-Analysen in einer 1:20 Verdünnung, in FACS-Puffer, eingesetzt. Es zeigte sich bei weiteren Untersuchungen in der FACS-Analyse, dass das beste Ergebnis mit einer 1:50 Verdünnung erreicht wurde. Wahrscheinlich waren bei einer geringeren Verdünnung noch zu viele Lipide vorhanden, welche ein Binden des Antikörpers erschwerten.

Das Screening der Seren und der anschließend generierten Hybridomaüberständen, wurde mit C1R DLA-88\*50101 und K562 DLA-88\*50101 Zellen durchgeführt. Es wurde immer eine Zelllinie eingesetzt, die nicht für die Immunisierung verwendet wurde, damit unspezifische Antikörperbindungen in den Analysen ausgeschlossen werden konnten. Deshalb wurden MDCK II Zellen für weitere Untersuchung verwendet, um unspezifische Bindungen auszuschließen, denn sie tragen ein anderes Allel.

Maus 1 wurde einmalig mit C1R DLA-88\*50101 Zellen immunisiert, was auch die besseren Ergebnisse in den FACS-Analysen mit C1R DLA-88\*50101 Zellen erklärt, im Vergleich zu den Seren der anderen Mäuse, welche kaum eine Reaktion zeigten. Durch das einmalige Immunisieren, sollte ein Adjuvant Effekt erreicht werden, da durch die fremden Oberflächenantigene eine starke Immunreaktion hervorgerufen wird. Eine sekundäre Antikörperreaktion sollte nur gegen DLA-88\*50101 erreicht werden, da dies das gemeinsame Merkmal der Sp2/0- und C1R-transfizierten Zellen war. Es ist aber nicht auszuschließen, dass sich auch Antikörper gegen Oberflächenproteine von C1R DLA-88\*50101 generiert haben, was die Ergebnisse der FACS-Analysen erklären würden. Der finale Boost wurde mit MDCK II Zellen durchgeführt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass bei der für die Fusion entnommenen Milz nur B-Zellen aktiviert werden, die spezifische Antikörper gegen DLA produzieren und nicht gegen sämtliche Oberflächenproteine der Zelllinie.

Das gemeinsame Merkmal aller verwendeten Zelllinien für die Immunisierung von Maus 1, war die Expression von DLA-88, denn die MDCK II Zellen tragen ein anderes Allel (DLA-88\*03201).

Maus 2 wurde einmalig mit Hunde PBMC's immunisiert und der finale Boost erfolgte ebenfalls mit Hunde PBMC's. Das Allel der PBMC's war nicht bekannt. Dadurch sollte die Immunreaktion nochmals verstärkt werden (153), was mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität in der FACS-Analyse einherging. Durch die Verwendung von PBMC's werden auch unspezifische Antikörper gegen andere Oberflächenproteine generiert. Außerdem war nicht bekannt welches Allel die verwendeten Zellen trugen.

Maus 3 wurde ausschließlich mit Sp2/0 DLA-88\*50101 Zellen immunisiert. Die Seren dieser Maus zeigen insgesamt die geringste Antikörperproduktion, was durch die geringe Immunantwort erklärt werden kann. Durch die alleinige Immunisierung mit Sp2/0 DLA-88\*50101 Zellen, wird keine hohe, aber dafür eine spezifisch Immunreaktion ausgelöst.

Auf C1R DLA-88\*50101 Zellen wurden in den FACS-Analysen keine so hohen Antikörperreaktionen gemessen, wie mit K562 DLA88-50101 und MDCK II Zellen. Es könnte sein, dass die C1R DLA-88\*50101 zu wenig DLA exprimierten, weshalb die bisherigen Versuche mit dem Serum relativ schwach ausfielen. Vergleicht man die FACS-Analysen der Bindung von C1R Zellen die mit H58A inkubiert wurden und C1R DLA-88\*50101, die ebenfalls mit dem Antikörper H58A inkubiert wurden, sieht man, dass es nur einen geringen Unterschied zwischen den Kurven dieser zwei Zelllinien gibt. Denn der Antikörper H58A bindet sowohl auf caninen, als auch auf humanen MHC-Klasse-I-Molekülen. Mit einem QUIFI Kit hätte untersucht werden können, ob die C1R DLA-88\*50101 Zellen noch genügend DLA exprimieren. Hätten die Zellen zu wenig DLA exprimiert, würde dies die schlechten Ergebnissen erklären. Die C1R DLA-88\*50101 Zellen waren für das weitere Screening ungeeignet. Für weitere Versuche wurden deshalb K562 DLA-88\*50101 Zellen verwendet.

## 5.2 Fusionen

Genau vier Tage nach dem finalen Boost wurde die Milz der jeweiligen Maus für die Fusion entnommen, da erst dann eine effektive, primäre Immunantwort und somit Bildung von Antikörper produzierenden B-Lymphozyten gegen unbekannte Oberflächenantigene (MDCK II und Hunde PBMC's) stattfinden würde (154). Da alle verwendeten Zelllinien DLA exprimierten, löste der finale Boost eine sekundäre Immunantwort gegen das canine Antigen aus. Es werden genau die B-Gedächtniszellen aktiviert, die sich während den vorherigen Immunisierungen für das immunologische Gedächtnis gebildet haben und die somit spezifisch gegen das DLA-88 gerichtet sind (152). Der finale Boost, bewirkt eine vermehrte B-Zellproduktion von DLA spezifischen Antikörpern, und eine Ansammlung dieser Zellen in der Milz.

In der ersten Fusion wurden insgesamt nur 124 Klone mittels FACS-Analyse getestet. Es konnte kein positiver Klon gefunden werden. Gründe für die niedrige Anzahl an generierten Klonen könnte gewesen sein, dass die kompletten Milzzellen auf einmal fusioniert wurden. Außerdem wurde das Selektionsmedium direkt nach der Fusion angewendet. Für die nachfolgenden Fusionen wurden aus den Milzzellen einer Milz vier Fusionen durchgeführt. Anstatt der Makrophagen, die als „feeder“ Zellen dienten, wurde ein Hybridomasupplement verwendet, da dieses bei anderen Arbeitsgruppen etabliert ist und sehr gute Resultate zeigte. Außerdem fällt eine Kontaminationsgefahr der aus dem Peritoneum von Mäusen gewonnenen Makrophagen weg. Zusätzlich wurde das HAT Zellkulturmedium erst einen Tag später hinzugegeben, damit sich die Zellen von der Anstrengung der Fusion erholen konnten, bevor sie selektiert wurden.

In der zweiten Fusion konnten insgesamt 662 Klone getestet werden, davon konnte der Klon 12.C8 als positiv identifiziert werden. Er ist ein IgG<sub>3</sub> Antikörper. Für diese Fusion wurden die Milzzellen auf vier Fusionsansätze aufgeteilt und es wurde ein Hybridomasupplement verwendet, das HAT Zellkulturmedium wurde erst einen Tag später hinzugegeben. Die Anzahl der generierten Antikörper war deutlich höher als die der ersten Fusion. Dieses Vorgehen hat sehr gut funktioniert, weswegen in der nächsten Fusion ebenso verfahren wurde.

In der letzten Fusion konnten insgesamt 1072 Klone mittels FACS-Analyse getestet werden.

Dass so viele Klone generiert werden konnten, lag vermutlich an der Immunisierung mit Hunde PBMC's, dies hatte eine Reihe von unspezifischen Bindungen zur Folge.

Es konnte von allen getesteten Klonen nur ein Klon als positiv identifiziert werden, dieser war der Klon 2A9. In diesem Well befanden sich aber zwei Klone, ein großer (2.A9G) und ein sehr kleiner (2.A9K). Diese Klone wurden „gepickt“ damit ein Überwachsen von einem Klon vermieden werden konnte und die Antikörperproduktion von jedem Klon einzeln getestet werden konnte. Der Klon 2.A9G zeigte sich in den anschließenden FACS-Analyse und der Immunpräzipitation als negativ. Der Klon 2.A9K zeigte ein positives Ergebnis. Da dieser Klon aber leider aus nur sehr wenigen Zellen bestand, was eine Kultivierung erschwerte, konnte dieser nicht hochgezogen werden und es konnten keine weiteren Versuche durchgeführt werden.

Nur mit dem Klon 12.C8, aus Fusion 2, konnte weiter gearbeitet werden und eine MHC-Präzipitationen durchgeführt werden, um Peptide eluieren und analysieren zu können.

### **5.3 Biochemische Untersuchungen**

Obwohl K562 Zellen keine MHC-Moleküle an ihrer Oberfläche exprimieren, zeigten sie eine positive Reaktion im Western Blot. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass K562 Zellen MHC-Fragmente besitzen, diese sich aber nicht vollständig zu einem Komplex prozessieren, weswegen sie nicht an der Zelloberfläche exprimiert werden können. Es befinden sich jedoch Teile davon in der Zelle. Diese können eine positive Reaktion im Western Blot hervorrufen, da sie bei lysierten Zellen als Bruchstücke vorliegen, denn der Antikörper bindet an denaturiertes Protein. Da die K562 Zellen nach der Transfektion DLA-88\*50101 exprimieren können und dafür das  $\beta_2$ M der K562 Zelle benötigt wird um einen Komplex zu bilden, müssen sie die MHC-Fragmente für einen MHC-Komplex besitzen. Die K562 Zellen sollten keine Reaktion in der Immunpräzipitation zeigen, da sie einen Defekt in der MHC Präsentation besitzen und der Antikörper an natives Protein bindet. Die K562 Zellen wurden daraufhin mittels FACS-Analyse getestet und zeigten eine positive Reaktion nach Inkubation mit dem Antikörper H58A.

Es ist nicht auszuschließen, dass diese Zellen wenn sie länger in Kultur sind, doch MHC-Komplexe exprimieren können, was die Ergebnisse erklären würde. Da diese Zellen nicht verlässlich in ihrem Verhalten der MHC-Expression sind, konnten sie nicht als Negativkontrolle für die K562 DLA-88\*50101 Zellen verwendet werden. Deshalb wurde mit den MDCK II Zellen gearbeitet. Diese Zelllinie ist nicht transfiziert, sondern exprimiert DLA physiologisch auf der Zelloberfläche und besitzt ein anderes Allel (DLA-88\*03201). Somit konnte untersucht werden, ob der Antikörper Allel-spezifisch bindet oder gegen möglichst viele DLA-88 gerichtet ist. Zusätzlich konnte durch eine Bindung an das DLA dieser Zelle, eine unspezifische Bindung des Antikörpers auf möglichen humanen Zelllinien ausgeschlossen werden.

Der Antikörper bindet in keiner der durchgeführten Untersuchungen (FACS-Analyse, Immunpräzipitation) auf C1R DLA-88\*50101 Zellen. Es könnte sein, dass diese transfizierten Zellen das DLA auf Ihrer Oberfläche anders falten und der Antikörper dieses deshalb nicht erkennen kann. Eine unspezifische Bindung des Antikörpers ist unwahrscheinlich, da in der FACS-Analyse keine Reaktion analysiert werden konnte.

#### **5.4 Antikörper 12.C8F6**

Bei der Messung der Konzentration des aufgereinigten Antikörpers, konnten zwei unterschiedliche Ergebnisse gemessen werden. Als Tara für das Messgerät wurde PBS verwendet. Die Bestimmung der Konzentration des Antikörpers erfolgte mittels Elutionspuffer, deshalb konnte kein genauer Wert ermittelt werden. Deshalb ist es wichtig den Antikörper in PBS um-zu-puffern. Mit der Verwendung in PBS ist man auch flexibler in der Versuchsdurchführung bei Einsatz des Antikörpers.

Bei dem vorliegenden Antikörper handelt es sich um einen IgG<sub>3</sub> Antikörper. Für die Aufreinigung wäre eine Protein G Säule besser geeignet gewesen, als eine Protein A Säule. Da sich aber in dem Kultivierungsmedium ein Anteil von 10 % FCS befand und diese Säule auch Bovine IgG bindet (155), eignet sich dieses Verfahren auch nur bedingt. Ein Versuch mit einer Protein G Säule kann gemacht werden, dennoch wird über die Aufreinigung mit einer Protein A Säule ein reineres Ergebnis erzielt, denn es werden nur Antikörper des gewünschten Antigens aufgereinigt. Jedoch wird weniger Antikörper gewonnen, da diese Säule den Antikörper nicht so gut binden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre die Nutzung einer Protein L Säule, diese stand nicht zur Verfügung.

Aufgrund der geringen Antikörperausbeute des IgG<sub>3</sub> Isotyps, können verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Der Antikörper könnte sequenziert werden und in ein E.coli Plasmid transferiert werden. Dieser Vektor kann anschließend in Sp2/0 Zellen, mit dem etablierten Nukleofektor Programm transfiziert werden. Mittels Kultivierung dieser Transfektanten könne massenhaft Antikörper geerntet und für weitere Versuche zur Verfügung stehen/verwendet werden. Der Antikörper könnte in einen IgG<sub>2</sub> Antikörper umkloniert werden, was die Aufreinigung über eine Protein A Säule erleichtern würde.

## 5.5 MHC-Präzipitation

MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren typischerweise Peptide mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren, wobei bei vielen Liganden am häufigsten Nonamere zu finden sind (27) (156). Dies gleicht sich auch mit den Ergebnissen der durchgeführten MHC-Präzipitationen.

In der MHC-Präzipitation von K562 DLA-88\*50101 Zellen mit dem Antikörper 12.C8F6 wurden sehr wenige Peptide gefunden (n=9). Ein Peptid wurde auch schon in Barth *et al.* beschrieben. Außerdem konnten drei neue Peptide mit demselben Bindemotiv gefunden werden. Der Antikörper bindet an DLA-88. Die geringe Anzahl an Peptiden kann unterschiedliche Gründe haben. Es muss deshalb zuerst untersucht werden, wie gut der Antikörper an die Sepharose gekoppelt werden kann und ob genügend Antikörper vorhanden war, um die Zellen zu präzipitieren. Dafür muss die Konzentration vor und nach der Kopplung bestimmt werden.

Die MHC-Präzipitation wurde außerdem noch mit K562 DLA88\*50101 und dem Antikörper BBM.1 durchgeführt, um zu kontrollieren, ob die Zellen noch genügend DLA exprimieren, woraus sich auch die geringe Anzahl an vorhandenen Peptiden erklären lassen würde. Zudem wurde noch mit MDCK II Zellen, die ein anderes Allel tragen, eine Präzipitation mit dem Antikörper 12.C8F6 durchgeführt, um die positiven Ergebnisse der FACS-Analysen und der Immunpräzipitation weiter zu untersuchen.

Bei der Präzipitation mit K562 DLA-88\*50101 Zellen und dem Antikörper BBM.1, konnten mehr Peptide eluiert werden (n=287), als mit dem Antikörper 12.C8F6. Außerdem konnte das Bindemotiv, das für DLA-88\*50101 charakterisiert wurde, ebenfalls gefunden werden. Der BBM.1-Antikörper ist nicht spezifisch für DLA-Moleküle, sondern bindet an das humane  $\beta_2M$ . Da K562 Zellen kein humanes MHC präsentieren können, auf den transfizierten Zellen aber für die Faltung des Komplexes das humane  $\beta_2M$  benötigt wird, wird bei den transfizierten Zellen die  $\alpha$ -Kette des DLA und das humane  $\beta_2M$  präsentiert. Weshalb dieser Antikörper auch für die Präzipitation von K562 DLA-88\*50101 Zellen als Kontrolle verwendet werden kann. Ein weiterer Vorteil dieser Zelllinie ist, dass keine HLA-Moleküle in der Säule gebunden werden und somit nur DLA-Liganden identifiziert werden können. Eine Kontrolle der Probe mit K562 Zellen war nicht unbedingt notwendig, da diese aufgrund eines Defektes kein MHC auf ihrer Zelloberfläche exprimieren können. Es konnten nicht so viele Peptide eluiert werden, wie bei Barth *et al.* (n=709). Dies könnte an einem Expressionsverlust der K562 DLA-88\*50101 Zellen liegen.

Die MHC-Präzipitationen der transfizierten K562 Zellen, sollten mit frisch aufgetauten K562 DLA-88\*50101 Zellen wiederholt werden. Durch ein QUIFI Kit, könnte die tatsächliche Anzahl von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche ermittelt werden.

Auch bei der Präzipitation von MDCK II Zellen mit dem Antikörper 12.C8F6, wurden wenige Peptide gefunden (n=38), aber mehr wie bei der Präzipitation mit K562 DLA-88\*50101 Zellen. In allen drei Präzipitationen wurde ein Peptid gefunden (IIQSIRMGM), welches auch schon in Barth *et al.* beschrieben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass der Antikörper 12.C8F6 an DLA-88 bindet.



Die geringe Anzahl an Peptiden kann unterschiedliche Gründe haben. Es könnte daran liegen, dass die Zellen zu lange in Kultur waren. Jedoch sollte zuerst untersucht werden, wie gut der Antikörper an die Sepharose gekoppelt werden kann, da es sich um einen IgG<sub>3</sub> Isotyp handelt. Hierfür muss die OD280 vor und nach der Kopplung bestimmt werden. Außerdem sollte der pH-Wert des Elutionspuffers kontrolliert werden, denn dieser hat Einfluss auf das Herauslösen der Peptide aus den DLA-Komplexen. Ist der pH-Wert nicht richtig eingestellt, können gebundene Peptidliganden nicht eluiert werden. Daher sollte der pH-Wert überprüft werden, ob dieser bei einem pH-Wert von 3,3 liegt. Es kann aber auch entgegen diesem empfohlenen pH-Wert sein, dass der optimale pH-Wert für die Isolierung der DLA-88\*50101 Liganden in einem anderen Bereich liegt.

Außerdem könnten Versuche mit Influenza infizierten MDCK II Zellen erfolgen, da bei einer Präzipitation, Influenza spezifische Peptide eluiert werden können, die bekannt sind. Desweiteren könnten FACS-Analysen und MHC-Präzipitationen mit HDHR Zellen hilfreich sein. Diese adhären Zellen, sind Hunde Herzzellen und tragen das Allel DLA-88\*03401. Durch diese Möglichkeiten, könnte zusätzlich ein Funktionalitätsbeweis des Antikörpers erreicht werden.

## AUSBLICK

Es war das Ziel, einen monoklonalen Antikörper gegen möglichst viele DLA-88 Allele herzustellen, um eine breite Einsatzmöglichkeit in der Forschung zu erreichen. Dies ist gelungen. Mit Hilfe des Antikörpers 12.C8F6, kann nun Normal- und Tumorgewebe präzipitiert werden. Anhand des Bindemotivs von DLA-88\*50101 kann entschieden werden, ob ein Peptid von diesem DLA gebunden werden kann oder nicht. Somit können Peptide identifiziert werden, die von DLA präsentiert werden. Durch eine MHC-Präzipitation ist es möglich Peptide von Normal- und Tumorgewebe zu vergleichen und so tumorspezifische Antigene zu identifizieren.

In weiteren Untersuchungen sollen Allele von Hunderassen typisiert werden, um die zehn häufigsten Allele zu identifizieren und deren Bindemotiv bestimmt werden. Anschließend sollen die Peptide der häufigsten Tumorerkrankungen identifiziert werden. Somit lässt sich für diese Allele ein Peptidimpfstoff herstellen, der für eine Vielzahl an Hunden zur Verfügung stehen kann. Beim Hund soll nicht die personalisierte Impfung im Vordergrund stehen, da sie aus Kostengründen nicht breitgefächert eingesetzt werden kann. Sie ist aber auf Wunsch eines Besitzers dennoch möglich, wenn ein Hund keines der identifizierten Allele trägt. Nach Identifizierung des Allels, Bestimmung des Bindemotivs und Untersuchung des Normal- und Tumorgewebes, kann dann ein individueller Peptid-Cocktail hergestellt werden, mit diesem der Patient vakziniert werden kann. Die Herstellung dieses Antikörpers stellt eine unentbehrliche wissenschaftliche Grundlage in der Etablierung einer Immuntherapie beim Hund dar.



## ZUSAMMENFASSUNG

### Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen MHC-Klasse-I-Moleküle des Hundes

Um eine Immuntherapie beim Hund nach Vorbild des „Tübingen Approach“ etablieren zu können, musste ein Antikörper gegen MHC-Klasse-I-Moleküle des Hundes hergestellt werden. Dieser sollte in einer Säulenimmunpräzipitation DLA-88 binden, damit Peptide die von DLA-88 präsentiert wurden, eluiert und analysiert werden konnten. Um einen Antikörper herstellen zu können, mussten Mäuse mit Zellen, welche mit DLA-88\*50101 transfiziert wurden, immunisiert werden. Konnten spezifische Antikörper gegen DLA-88 im Serum einer Maus nachgewiesen werden, wurde deren Milz für die Fusion, zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet. In einem Überstand der Hybridomzellen konnte ein Antikörper gefunden werden, welcher sich in der FACS-Analyse und der Immunpräzipitation positiv darstellte. Um zu untersuchen, ob der Antikörper Allel-spezifisch bindet, wurden alle Versuche auch mit MDCK II Zellen, welche ein anderes Allel tragen, durchgeführt. Auch hier waren die Resultate positiv, somit zeigte der Antikörper eine Bindung an DLA-88. Der Antikörper konnte daraufhin in einer Säulenimmunpräzipitation mit K562 DLA-88\*50101 Zellen und MDCK II Zellen verwendet werden. Bei beiden Zelllinien konnten Peptide eluiert werden. Ein Peptid, welches bei beiden Zelllinien nachgewiesen werden konnte, wurde auch bei Barth *et al.* nachgewiesen. Somit bindet der Antikörper DLA-88 auch in einer Säulenimmunpräzipitation. Die Untersuchung von Peptiden aus Normal- und Tumorgewebe, wird durch diesen Antikörper nun möglich gemacht, dadurch können weitere wichtige Erkenntnisse für die Immuntherapie beim Hund gewonnen werden, was einen großen wissenschaftlichen Fortschritt darstellt.



## SUMMARY

### Preparation of a monoclonal antibody against MHC-class-I-molecules of the dog

In order to be able to establish an immunotherapy in the dog according to the “Tübingen Approach”, an antibody against MHC-class-I-molecules of the dog had to be produced. This should bind DLA-88 in a column immunoprecipitation so that peptides presented by DLA-88 could be eluted and analyzed. To be able to produce an antibody, mice had to be immunized with transfected DLA-88\*50101 cells. When specific antibodies against DLA-88 were detected in a mouse, their spleen was used for fusion, for the production of monoclonal antibodies. An antibody could be found in a supernatant of the Hybridoma cells, which showed a positive result in the flow cytometry and the immunoprecipitation. To investigate whether the antibody specifically binds alleles, all assays were also performed on MDCK II cells, which carrying another allele, so the antibody showed binding to DLA-88. The antibody could then be used in a column immunoprecipitation with K562 DLA-88\*50101 cells and MDCK II cells. Peptides could be eluted at both cell lines. A peptide which could be detected in both cell lines was also detected by Barth *et al.* Thus, the antibody DLA-88 binds in a column immunoprecipitation. The examination of peptides from normal and tumor tissue is now possible, by this antibody. A great step towards the immunotherapy in the dog has been made.



**LITERATURVERZEICHNIS**

1. Cohen IR. Discrimination and dialogue in the immune system. *Semin Immunol*, 2000.
2. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*, 1998.
3. Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*, 2003.
4. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 2010.
5. Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway Immunobiologie*. 7. Auflage. Springer Spektrum, 2014.
6. Lodoen M, Lanier L. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol*, 2006. 18(4): p. 391-8.
7. Lin K, Jacek T, Jacek R. Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity. *J Cancer Res Ther*, 2006. 2(2): p. 35-40.
8. Cohen J. Thymus-derived lymphocytes sequestered in the bone marrow of hydrocortisone-treated mice. *J Immunol*, 1972. 108(3): p. 841-4.
9. Breves G, von Engelhardt W, Diner M, Gäbel G. *Physiologie der Haustiere*. 5. Auflage. Enke (Verlag), 2015.
10. Kurts C, Heath W, Carbone F, Allison J, Miller J, Kosaka H. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med*, 1996. 184(3): p. 923-30.
11. Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature*, 1974. 251: p. 547-8.
12. Stoop JW, Zegers BJM, Sander PC, Ballieux RE. Serum immunoglobulin levels in healthy children and adults. *Clin Exp Immuno*, 1969. 4(1): p. 101-112.



13. Hufnagel A, Brettschneider K. „Rekombinante Antikörper – Eine vollkommen neue Ära für Therapie und Diagnostik“ [Internet], 2013. [cited 2017 Aug 5]. Available from: <http://archiv.aktuelle-wochenschau.de/2013/w40/woche40.html>
14. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 1–17.
15. Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*. 3.Auflage, 2011.
16. Little M. *Antikörper in der Krebsbekämpfung* [Internet]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015. [cited 2017 Sep 20]. Available from: [https://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjBlpbEpLTWAhWTDRoKHef9Cx8QFggmMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.springer.com%2Fcd%2Fcontent%2Fdocument%2Fcd\\_downloaddocument%2F9783662451137-c1.pdf%3FSGWID%3D0-0-45-1494347-](https://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjBlpbEpLTWAhWTDRoKHef9Cx8QFggmMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.springer.com%2Fcd%2Fcontent%2Fdocument%2Fcd_downloaddocument%2F9783662451137-c1.pdf%3FSGWID%3D0-0-45-1494347-)
17. Vollmers HP. Tumor-specific apoptosis induced by the human monoclonal antibody SC-1: A new therapeutical approach for stomach cancer. *Oncol Rep*, 1998. 5(1): p. 35–40.
18. Rommer PS, Stüve O, Goertsches R, Mix E, Zettl UK. Monoclonal antibodies in the therapy of multiple sclerosis: an overview. *Journal of Neurology*, 2008. 255(6): p. 28–35.
19. Moyaert H, Van Brussel L, Borowski S, Escalada M, Mahabir S, Walters R, et al. A blinded, randomized clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to ciclosporin in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 2017.
20. Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet*, 1948. 49(2): p. 87–108.
21. Breuning MH, van den Berg-Loonen EM, Bernini LF, Bijlsma JB, van Loghem E, Meera Khan P, et al. Localization of HLA on the short Arm of Chromosome 6. *Hum Genet*, 1977. 37: p. 131–9.
22. Dutra AS, Mignot E, Puck JM. Gene localization and syntenic mapping by FISH in the dog. *Cytogenet Cell Genet*, 1996. 74(1-2): p. 113-7.

23. Xie T, Rowen L, Aguado B, Ahearn ME, Madan A, Qin S, et al. Analysis of the Gene Dense Major Histocompatibility Complex Class III Region and Its Comparison to Mouse. *Genome Res*, 2003. 13(12): p. 2621–36.
24. Tizard I. *Veterinary Immunology*, 2013.
25. Sarmiento UM, Storb RF. RFLP analysis of DLA class I genes in the dog. *Tissue Antigens*, 1989.
26. Bjorkman P, Saper M, Samraoui B, Bennett W, Strominger J, Wiley D. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 1987. 329: p. 506-512.
27. Falk K, Rötzschke O, Stevanović S, Jung G, Rammensee H. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 1991. 351(6324): p. 290-6.
28. Barouch D, Friede T, Stevanović S, Tussey L, Smith K, Rowland-Jones S, et al. HLA-A2 subtypes are functionally distinct in peptide binding and presentation. *J Exp Med*, 1995. 182(6): p. 1847–1856.
29. Graumann MB. Polymorphismusanalyse von vier MHC Klasse I Genen im Hund. Universität Marburg, Deutschland, 2005.
30. Venkataraman G, Geraghty D, Fox J, Graves S, Zellmer E, Storer B, et al. Canine DLA-79 gene: An improved typing method, identification of new alleles and its role in graft rejection and graft-versus-host disease. *Tissue Antigens*, 2013. 81(4): p. 204–11.
31. Burnett R, DeRose S, Wagner J, Storb R. Molecular analysis of six dog leukocyte antigen class I sequences including three complete genes, two truncated genes and one full-length processed gene. *Tissue Antigens*, 1997.
32. Allen RL, Hogan L. *Non-Classical MHC Class I Molecules (MHC-Ib)*. eLS, 2013.
33. Graumann MB, DeRose S a, Ostrander E a, Storb R. Polymorphism analysis of four canine MHC class I genes. *Tissue Antigens*, 1998. 51(4 PT 1): p. 374-81.
34. Wagner J, Creer S, Storb R. Dog class I gene DLA-88 histocompatibility

- typing by PCR-SSCP and sequencing. *Tissue Antigens*, 2000. 55(6): p. 564–7.
35. Graumann MB, DeRose S., Ostrander EA, Strob R. Polymorphism analysis of four canine MHC class I genes. *Tissue Antigens*, 1998. 51(4).
  36. Kennedy L, Altet L, Angles J, Barnes A, Carter S, Francino O, et al. Nomenclature for factors of the Dog Major Histocompatibility System (DLA), 1998: First report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *Tissue Antigens*, 1999. 54(3): p. 312–21.
  37. Kennedy L, Angles J, Barnes A, Carter S, Francino O, Gerlach J, et al. Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA), 2000: Second report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *Tissue Antigens*, 2001. 58(1): p. 55–70.
  38. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G-I, De los Santos K, Sparwasser T, et al. In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens. *Immunity*, 2002. 17(2): p. 211–220.
  39. Donohue K, Grant J, Tewalt E, Palmer D, Theoret M, Restifo N, et al. Cross-priming utilizes antigen not available to the direct presentation pathway. *Immunology*, 2006. 119(1): p. 63–73.
  40. Velarde G, Ford RC, Rosenberg MF, Powis SJ. Three-dimensional Structure of Transporter Associated with Antigen Processing (TAP) Obtained by Single Particle Image Analysis. *J Biol Chem*, 2001. 276: p. 46054–46063.
  41. Hammond C, Braakman I, Helenius A. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci*, 1994. 91(3): p. 913–7.
  42. Ellgaard L, Helenius A. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. 13(4): p. 431–7.
  43. Degen E, Cohen-Doyle MF, Williams DB. Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both beta 2-microglobulin and peptide. *J Exp Med*, 1992. 175(6):

- p. 1653–61.
44. Sadasivan B, Lehner P, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*, 1996. 5(2): p. 103–14.
  45. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchok M. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 2002.
  46. Hardt C, Ferencik S, Tak R, Hoogerbrugge PM, Wagner V, Grosse-Wilde H. Sequence-based typing reveals a novel DLA-88 allele, DLA-88\*04501, in a beagle family. *Tissue Antigens*, 2006. 67(2): p. 163–5.
  47. Venkataraman GM, Stroup P, Graves SS, Storb R. An improved method for dog leukocyte antigen 88 typing and two new major histocompatibility complex class I alleles, DLA-88\*01101 and DLA-88\*01201. *Tissue Antigens*, 2007. 70(1): p. 53–7.
  48. Tsai KL, Starr-Moss AN, Venkataraman GM, Robinson C, Kennedy LJ, Steiner JM, et al. Alleles of the major histocompatibility complex play a role in the pathogenesis of pancreatic acinar atrophy in dogs. *Immunogenetics*, 2013. 65(7): p. 501–9.
  49. Burnett RC, DeRose SA, Wagner JL, Storb R. Molecular analysis of six dog leukocyte antigen sequences including three complete genes, two truncated genes and one full-length processed gene. *Tissue Antigens*, 1997. 49(5): p. 484–95.
  50. Venkataraman G, Kennedy L, Little M, Graves S, Harkey M, Torok-Storb B, et al. Thirteen novel canine dog leukocyte antigen-88 alleles identified by sequence-based typing. *HLA*, 2017. 90(3): p. 165–70.
  51. Ross P, Buntzman A, Vincent B, Grover E, Gojanovich G, Collins E, et al. Allelic diversity at the DLA-88 locus in Golden Retriever and Boxer breeds is limited. *Tissue Antigens*, 2012. 80(2): p. 175–83.
  52. Ross P, Holmes JC, Gojanovich GS, Hess PR. A cell-based MHC stabilization assay for the detection of peptide binding to the canine classical class I molecule, DLA-88. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012. 150(3–4): p. 206–12.

53. Xiao J, Xiang W, Chai Y, Haywood J, Qi J, Ba L, et al. Diversified Anchoring Features the Peptide Presentation of DLA-88\*50801: First Structural Insight into Domestic Dog MHC Class I. *J Immunol*, 2016. 197(6): p. 2306–15.
54. O'Brien C, Flower DR, Feighery C. Peptide length significantly influences in vitro affinity for MHC class II molecules. *Immunome Res*, 2008.
55. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Müller M, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005. 102(22): p. 7922–7.
56. Dr. Hönscher C. Tumor [Internet]. [cited 2017 Mar 20]. Available from: <http://flexikon.doccheck.com/de/Tumor>
57. Hodges GM, Rowlatt C. *Developmental Biology and Cance*, 1994.
58. Baumgärtner W, Gruber AD. *Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin*, 2015.
59. Baumgärtner W. *Pathohistologie für die Tiermedizin*, 2012.
60. Siegmann O, Neumann U. *Kompodium der Geflügelkrankheiten*, 2012.
61. Kessler M. *Kleintieronkologie*. Enke, 2013.
62. Martin M. Vaccine-associated fibrosarcoma in a cat. *Can Vet J*, 2003.
63. IVH Industrieverband Heimtierbedarf (IVH) e.V.; ZZF Zentralverband Zoologischer Fachbetriebe Deutschlands e.V. 2016 Der Deutsche Heimtiermarkt Struktur und Umsatzsaten. *Heimtiere in Deutschland*, 2016.
64. Statisches Bundesamt. Todesursachen [Internet]. [cited 2017 Mar 20]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>
65. Melin M, Rivera P, Arendt M, Elvers I, Murén E, Gustafson U, et al. Genome-Wide Analysis Identifies Germ-Line Risk Factors Associated with Canine Mammary Tumours. *PLoS Genet*, 2016. 12(5).
66. Schwens C, Thom N, Moritz A. Reaktive und neoplastische histiozytäre

- erkrankungen beim Hund. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere, 2011. 39(3): p. 176–90.
67. Tierklinik Hofheim. Häufige Tumoren bei Hund und Katze [Internet]. [cited 2017 Mar 22]. Available from: <http://www.tierklinik-hofheim.de/die-klinik/fachbereiche/onkologie/haeufige-tumorerkrankungen.html>
68. Kaim U, Moritz A, Failing K, Baumgärtne W. The regression of a canine Langerhans cell tumour is associated with increased expression of IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and iNOS mRNA. *Immunology*, 2006.
69. Carvalho MI, Silva-Carvalho R, Pires I, Prada J, Bianchini R, Jensen-Jarolim E, et al. A Comparative Approach of Tumor-Associated Inflammation in Mammary Cancer between Humans and Dogs. *Biomed Res Int*, 2016.
70. Queiroga FL, Raposo T, Carvalho MI, Prada J, Pires I. Canine Mammary Tumours as a Model to Study Human Breast Cancer: Most Recent Findings. *In Vivo*, 2011. 25(3): p. 455–65.
71. Ettlin J, Clementi E, Amini P, Malbon A, Markkanen E. Analysis of Gene Expression Signatures in Cancer-Associated Stroma from Canine Mammary Tumours Reveals Molecular Homology to Human Breast Carcinomas. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(5).
72. Babo V, Höinghaus R, Bühler V, Schröder H. Magen-Darm-Tumoren beim Hund. *Prakt Tierarzt*, 2015.
73. Schiffman JD, Breen M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*, 2015. 370(1673).
74. Dahme E, Weiss E. Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Enke, 2007.
75. Royal Canin. Krebserkrankung beim Hund [Internet]. [cited 2017 Mar 20]. Available from: <https://www.royal-canin.de/hund/krankheiten-und-pflege/die-haeufigsten-hunde-erkrankungen/krebserkrankungen-beim-hund.html>
76. Killick DR, Stell AJ, Catchpole B. Immunotherapy for canine cancer - Is it

- time to go back to the future? *J Small Anim Pract*, 2015. 56(4): p. 229–41.
77. Kirkwood JM. Immunotherapy of Cancer in 2012. *CA Cancer J Clin*, 2012. 62(5): p. 309–35.
78. Regan D, Guth A, Coy J, Dow S. Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. *Vet J*, 2016. 207: p. 20–8.
79. Singh-Jasuja H, Emmerich NPN, Rammensee H-G. The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. 53(3): p. 187–95.
80. Weide B, Carralot JP, Reese A, Scheel B, Eigentler TK, Hoerr I, et al. Results of the First Phase I/II Clinical Vaccination Trial With Direct Injection of mRNA. *J Immunother*, 2008. 31(2).
81. Weide B, Pascolo S, Scheel B, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, et al. Direct Injection of Protamine-protected mRNA: Results of a Phase ½ Vaccination Trial in Metastatic Melanoma Patients. *J Immunother*, 2009. 32(5).
82. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 1991. 254(5038): p. 1643-7.
83. Greenspan I, Brown ER, Schwartz SO. Immunologically Specific Antigens in Leukemic Tissues. *Blood*, 1963. 21: p. 717-728.
84. Criscitiello C. Tumor-Associated Antigens in Breast Cancer. *Breast Care*, 2012. 7(4): p. 262–6.
85. Allison JP, McIntyre BW, Bloch D. Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. *J Immunol*, 1982. 129(5).
86. Moore M. Tumor-specific antigens: their possible significance in the etiology and treatment of malignant disease. *J Bone Jt Surg*, 1971. 53(1): p. 13-2.
87. Rammensee HG. Entwicklung therapeutischer Peptidimpfstoffe gegen

- Krebs. Arzneimittelforschung, 2012.
88. Stulting R, Berke G. Nature of lymphocyte-tumor interaction. A general method for cellular immunoabsorption. *J Exp Med*, 1973. 137(4): p. 932-42.
89. Rammensee H, Weinschenk T, Gouttefangeas C, Stevanović S. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol Rev*, 2002. 188: p. 164-76.
90. Di Marco M, Peper J, Rammensee H. Identification of Immunogenic Epitopes by MS/MS. *Cancer J*, 2017. 23(2): p. 102-107.
91. Guía Dentistas. Bild Impfung [Internet]. [cited 2017 Sep 20]. Available from: <http://blog.deenty.com/tratando-el-bruxismo-con-botox/>
92. The Atlantic Monthly Group. Bild DNA [Internet]. 2017 [cited 2017 Sep 20]. Available from: <https://www.theatlantic.com/technology/archive/2012/11/what-dna-actually-looks-like/265713/>
93. Natasha Sinegina. Silhouette Hund [Internet]. [cited 2017 Sep 20]. Available from: <http://www.supercoloring.com/de/silhouetten/sitzender-hund>
94. MediDesign Frank Geisler. Krebsentstehung [Internet]. [cited 2017 Sep 20]. Available from: <https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsentstehung.php>
95. Barth SM, Schreitmüller CM, Proehl F, Oehl K, Lumpp LM, Kowalewski DJ, et al. Characterization of the canine MHC Class I DLA-88\*50101 peptide binding motif as a prerequisite for canine T cell immunotherapy. *PLoS One*, 2016. 11(11): p. 1–19.
96. Löffler MW, Chandran PA, Laske K, Schroeder C, Bonzheim I, Walzer M, et al. Case Report Personalized peptide vaccine-induced immune response associated with long-term survival of a metastatic cholangiocarcinoma patient. *J Hepatol*, 2016. 65(4): p. 849–55.
97. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Auflage, 2011.



98. Zemmour J, Little AM, Schendel DJ, Parham P. The HLA-A,B “negative” mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J Immunol*, 1992. 148(6).
99. Parasar P, Wilhelm A, Rutigliano HM, Thomas AJ, Teng L, Shi B, et al. Expression of bovine non-classical major histocompatibility complex class I proteins in mouse P815 and human K562 cells. *Res Vet Sci*, 2016. 107: p. 161–70.
100. Nishimura M, Mitsunaga S, Akaza T, Mitomi Y, Tadokoro K, Juji T. Protection against natural killer cells by interferon-gamma treatment of K562 cells cannot be explained by augmented major histocompatibility complex class I expression. *Immunology*, 1994. 83(1): p. 75–80.
101. Jansohn M, Rothhämel S. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Auflage, 2012.
102. Davies J, Jimenez A. A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am J Trop Med Hyg*, 1980.
103. Hadfield C et al. G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 1990.
104. Peters JH, Baumgarten H. *Monoklonale Antikörper*. 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1990.
105. Zählkammer Neubauer improved [Internet]. [cited 2017 Mar 3]. Available from: [https://www.carlroth.com/de/de/Laborbedarf/Laborglas,-GefäÙe,-Verbrauchsmaterial/Zählkammern/Zählkammern-Neubauer-improved/p/0000000000014b2c00030023\\_de](https://www.carlroth.com/de/de/Laborbedarf/Laborglas,-GefäÙe,-Verbrauchsmaterial/Zählkammern/Zählkammern-Neubauer-improved/p/0000000000014b2c00030023_de)
106. Thermo Fisher Scientific. *NanoDrop 2000/2000c Spektralphotometer (Kurzanleitung)*, 2015.
107. DUTTA S, JONES A, STACEY M. The separation of desoxypentosenucleic acids and pentosenucleic acids. *Biochim Biophys Acta*, 1953.
108. Biosolve BV. *Water HPLC* [Internet]. [cited 2017 Mar 17]. Available from: <http://shop.biosolve-chemicals.eu/detail.php?id=2481>

109. Neumann E et al. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal*, 1982.
110. Sukharev SI, Blount P. A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature*, 1994.
111. Ehrenberg B, Farkas DL. Membrane potential induced by external electric field pulses can be followed with a potentiometric dye. *Biophys J*, 1987.
112. Kay Terpe. Transfektion [Internet]. *Laborjournal online*. 2005 [cited 2017 Mar 8]. Available from: <http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v59.lasso>
113. Edita Aksamitiene. 69 Well Plate [Internet]. 2012 [cited 2017 Mar 5]. Available from: <http://cellsignet.com/media/plates/96.jpg>
114. Becton Dickinson and Company. Introduction to Flow Cytometry [Internet]. 2002 [cited 2017 Mar 9]. p. 58. Available from: <http://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>
115. Dako. QIFIKIT for Quantitative Analysis of Indirect Immunofluorescence Staining in Flow Cytometry [Internet]. 2015 [cited 2017 Mar 17]. p. 2. Available from: [http://www.medesa.cz/wp-content/uploads/2015/03/QIFKIT\\_Dako-13016.pdf](http://www.medesa.cz/wp-content/uploads/2015/03/QIFKIT_Dako-13016.pdf)
116. Eri Kinoshita. Isotyp Kontrollantikörper [Internet]. 2013 [cited 2017 Mar 7]. Available from: <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1223/isotyp-kontrollantikoerper/>
117. Dako. QIFIKIT, 2008.
118. Budzikiewicz H, Schäfer M. Massenspektrometrie – Eine Einführung. Wiley-VHC, Weinheim, 2005.
119. H. Nakamura. BALB/c Mouse. Elsevier Inc [Internet]. 2013; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749840001339>
120. Miltenyi Biotech. Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation [Internet]. 2008 [cited 2017 Mar

- 8]. p. 2. Available from:  
[https://www.miltenyibiotec.com/~media/Files/Navigation/Research/Stem Cell/SP\\_MC\\_PB\\_density\\_gradient.ashx](https://www.miltenyibiotec.com/~media/Files/Navigation/Research/Stem Cell/SP_MC_PB_density_gradient.ashx)
121. Alpha Diagnostic Intl Inc . Product Specification Sheet ODN 1826-Type B- Murine TLR9 agonist Controls and Conjugates, 2007.
122. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant (author manuscript). *Expert Rev Vaccines*, 2011. 10(4): p. 499–511.
123. Dr. Hönscher C. Agarose-Gelelektrophorese [Internet]. 2017 [cited 2017 Mar 11]. Available from: <http://flexikon.doccheck.com/de/Agarose-Gelelektrophorese>
124. Dr. Ostendorf N. Gelelektrophorese [Internet]. 2017 [cited 2017 Mar 18]. Available from: <http://flexikon.doccheck.com/de/Gelelektrophorese>
125. Joppien S, Maier SL, Wendling DS. Experimentelle Doktorarbeit, 2011.
126. Dr. Ostendorf N. SDS - PAGE [Internet]. 2017 [cited 2017 Mar 18]. Available from: <http://flexikon.doccheck.com/de/SDS-Page>
127. The Human Protein Atlas. Western Blot [Internet]. [cited 2017 Feb 12]. Available from: <http://www.proteinatlas.org/learn/method/western+blot>
128. Leinco Technologies. General Western Blot Protocol [Internet]. Available from: [https://www.leinco.com/general\\_wb](https://www.leinco.com/general_wb)
129. Kaboord B, Perr M. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol*, 2008.
130. Leinco Technologies. Immunoprecipitation [Internet]. Available from: <https://www.leinco.com/immunoprecipitation>
131. AMSBIO. Iso-Gold™ Rapid Mouse-Monoclonal Isotyping Kit [Internet]. Available from: <http://www.amsbio.com/datasheets/ISOT-001.pdf>
132. Kinoshita E. Antikörperbindende Proteine zur Antikörperaufreinigung [Internet]. 2013. Available from: <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1267/antikoerperbindende-proteine-zur-antikoerperaufreinigung/>

133. Richman DD, Cleveland PH, Oxman MN, Johnson KM. The binding of Staphylococci protein A by the sera of different animal species. *J Immunol*, 1982.
134. Invitrogen Corporation. pcDN3.1(+) [Internet]. 2010 [cited 2017 Mar 13]. Available from: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pcdna3\\_1\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pcdna3_1_man.pdf)
135. Ferm M, Grönberg A. Human MHC class I antigens are associated with a 90-kDa cell surface protein. *Scand J immunology*, 1991.
136. O'Connor CM, Wilson-Robles H. Developing T cell cancer immunotherapy in the dog with lymphoma. *ILAR J*, 2014. 55(1).
137. Klopfleisch R. Personalised medicine in veterinary oncology: One to cure just one. *Veterinary Journal*, 2015. 205(2): p. 128–35.
138. Atherton MJ, Morris JS, McDermott MR, Lichty BD. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. Vol. 169, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2016.
139. Sarmiento UM, Storb RF. Nucleotide sequence of a dog class I cDNA clone. *Immunogenetics*, 1990. 31: p. 400–4.
140. Sarmiento UM, Storb R. Cellular, serological, and molecular polymorphism of the class I and class II loci of the canine Major Histocompatibility Complex. *Tissue Antigens*, 2002. 59(3): p. 205–10.
141. O'Brien SJ, Murphy WJ. A dog's breakfast? *Science*, 2003. 301(5641): p. 1854–5.
142. Withrow SJ, Vail D. *Small Animal Clinical Oncology*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2006.
143. Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE. Dog Models of Naturally Occurring Cancer, 2012. 17(7): p. 380–8.
144. Gardner HL, Fenger JM, London CA. *Dogs as a Model for Cancer*, 2016.
145. Ito D, Frantz AM, Modiano JF. Canine Lymphoma as a Comparative Model for Human NonHodgkin Lymphoma: Recent Progress and Applications. *Vet Immunol Immunopathol*, 2014. 15(9): p. 192–201.

146. Liu D, Xiong H, Ellis AE, Northrup NC, Jr COR, Regan MO, et al. Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. *Cancer Res*, 2014. 74(18): p. 5045–56.
147. Khanna C, Lindblad-Toh K, Vail D, London C, Bergman P, Barber L, et al. The dog as a cancer model. *Nat Biotechnol*, 2006. 24(9): p. 1065–6.
148. Macewen EG. Spontaneous tumors in dogs and cats : Models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev*, 1990. 9(2): p. 125–36.
149. Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL. A role for T-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors. *BioMed Research International*, 2014.
150. Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(2): p. 147–56.
151. Davis W, Marusic S, Lewin H, Splitter G, Perryman L, McGuire T, et al. The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species. *Vet Immunol Immunopathol*, 1987. 15(4): p. 337–76.
152. Murphy K. *Janeway's Immunobiology*, 2012.
153. Kametani Y, Ohshima S, Miyamoto A, Shigenari A, Takasu M, Imaeda N, et al. Production of a Locus- and Allele-Specific Monoclonal Antibody for the Characterization of SLA-1\*0401 mRNA and Protein Expression Levels in MHC-Defined Microminipigs. *PLoS One*, 2016.
154. Martin M, Resch K. *Immunologie*. 1th ed. UTB Basics-Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 2009.
155. Schmerr M, Patterson J, Van der Maaten M, Miller J. Conditions for binding bovine IgG1 to protein A-Sepharose. *Mol Immunol*, 1985.
156. Kubo RT, Sette A, Grey HM, Appella E, Sakaguchi K, Zhu NZ, et al. Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles. *J Immunol*, 1994. 152(8): p. 3913–24.

**ANHANG****Sequenzen von Peptiden aus DLA-88\*03201:**

| <b>Peptidlänge</b> |                    |                     |                     |                     |                      |
|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| <b>Nr.</b>         | <b>8<br/>(n=2)</b> | <b>9<br/>(n=11)</b> | <b>10<br/>(n=9)</b> | <b>11<br/>(n=7)</b> | <b>12<br/>(n=10)</b> |
| 1                  | GIQYLRDY           | DTAAQITQR           | YDESGPSIVH          | LQIAGISPHGN         | VSEKGTVQQADE         |
| 2                  | AVLPVSEK           | ASLSTFQQM           | SSFSRVGSSN          | VVGGEEARPNS         | DPPMEAAGFTAQ         |
| 3                  |                    | VFGQSGAGN           | NIQGITKPAI          | LTEAPLNPKAN         | VNAIINSGPRED         |
| 4                  |                    | DTIEIITDR           | ILLAELEQLK          | PPMEAAGFTAQ         | VNVEINVAPGKD         |
| 5                  |                    | DLDYDFQRD           | TNEGIQYLRD          | YASGRTTGIVM         | DPPMEAAGFTAQ         |
| 6                  |                    | LIVIQNPTTE          | VFGQSGAGNN          | NIITKDSHALP         | YASGRTTGIVMD         |
| 7                  |                    | IIQSIRMGM           | AVLVDKSDSD          | AGHVEHMRTDR         | AVMGFSGFGSTK         |
| 8                  |                    | MSFCIPTEY           | NVEWAKPSTN          |                     | TAADTAAQITQR         |
| 9                  |                    | ENSDLKVNMM          | KHSGSYTSVF          |                     | YRGGSSISVQVNS        |
| 10                 |                    | LLKGFELMD           |                     |                     | VNLGGSKSISIS         |
| 11                 |                    | ASLSTFQQM           |                     |                     |                      |

**Sequenzen von Peptiden aus DLA-88\*50101:**

| <b>Peptidlänge</b> |                     |                      |                      |                      |                      |
|--------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Nr.</b>         | <b>8<br/>(n=20)</b> | <b>9<br/>(n=160)</b> | <b>10<br/>(n=53)</b> | <b>11<br/>(n=46)</b> | <b>12<br/>(n=17)</b> |
| 1                  | KINEIRQM            | TPEEKSAVT            | TPEEKSAVTA           | DVSTAGTGASR          | SSPGGVYATRSS         |
| 2                  | RILQESAR            | KVQAGNSSL            | STLPATALPL           | GGNFGGRSSGP          | GDSRGGGGNFGP         |
| 3                  | AVAPIERV            | KVIDTQQKV            | IDDGTSDRPY           | SPGGVYATRSS          | TAADTAAQITQR         |
| 4                  | SVNDIQRL            | RIAGEASRL            | VLSPADKTNV           | DSRGGGGNFGP          | VETGVLPKGMVV         |
| 5                  | IQSIRMGM            | LGASGNSLY            | YFYHQEEYVR           | SSSKGSLGGGF          | VETGVLPKGMVV         |
| 6                  | KVNPIQGL            | IVNDKSQNL            | VISQAAVVHA           | PRIASNAGSIA          | VQTKGTGASGSF         |
| 7                  | MIAHITGL            | DTAAQITQR            | HLDNLKGTFA           | VISASLGTAQP          | SGFLPKCADHDS         |
| 8                  | YVIYIERV            | KVQDIKNNL            | ALTNAVAHVD           | SVSTVLTSKYR          | VSEKGTVQQADE         |
| 9                  | KITDFIKF            | GVGVPV PARA          | YINQGVSHAL           | TPEEKSAVTAL          | VLSPADKTNVKA         |
| 10                 | AINSISKL            | KVADALTNA            | QIIQSIRMGM           | HVGS GDLFSGM         | DLSPDCLGHAGL         |
| 11                 | KEDDVRQY            | VVA AHLAGA           | YPARVPPPPP           | KITSFPESEGY          | VNLGGSKSISIS         |
| 12                 | KINEIRQM            | AVVTQVNKV            | IFDSRGNPTV           | RIAAQGFTVAA          | TTVGPASSPKI          |
| 13                 | DNLKGTFA            | IIQSIRMGM            | GDLSTPDAVM           | FPHFDLSHGSA          | LDGALGGTVTLQ         |
| 14                 | AVISTVRP            | LLGPAGARA            | KVADWTGATY           | KVSDIPQYSQL          | LENPTPEPPVPQ         |
| 15                 | FVNVQKEL            | SIHVGQAGV            | QIIQSIRMGM           | ADALTNVAHV           | LVNGAASSAGIP         |
| 16                 | YVSAFSKL            | AVGEGFHNY            | IVFTGEKEQL           | YIAGHPAFVNY          | GVAGVGAGLAYL         |
| 17                 | GLQFPVGR            | LLASADSQA            | IINDPRYSAL           | AVANEEGFVRL          | GWGDVASSTTRE         |
| 18                 | LGFGSVLL            | KIAEGVNSL            | YVFMPQHIMA           | VVAGGLGRQLL          |                      |
| 19                 | KLYEALKF            | GVYGDVQRV            | VVYGGGAAEI           | LPAEFTPAVHA          |                      |
| 20                 | VLLAIGP             | WVQDKITQM            | WINEKDINAV           | SVAKISVYGTL          |                      |
| 21                 |                     | QLNEKVAQL            | VVFTDEMAHF           | VVITEKGISDL          |                      |

|    |  |            |             |              |  |
|----|--|------------|-------------|--------------|--|
| 22 |  | IIQSIRMGGM | AVIDVGINRV  | VVQDPNSFAEY  |  |
| 23 |  | KIAPNTPQL  | DKNFINNPLA  | TIIDTKGVTAL  |  |
| 24 |  | KIIDIQEKV  | QIIQSIRMGGM | SIKAGILTTL   |  |
| 25 |  | SLAKIYTEA  | KIFSQEYINL  | SDPILYRPVAV  |  |
| 26 |  | FIADSHQNF  | VIFTSPIKAL  | RVFSGLVSTGL  |  |
| 27 |  | SPIENIQRV  | SLFAGGMLRV  | VDDMPNALSAL  |  |
| 28 |  | RISDAITHL  | QIFNGTFVKL  | KIFEMGPVFTL  |  |
| 29 |  | LDNLKGTFA  | GGVLPNIQAV  | VVISSDGQFAL  |  |
| 30 |  | LINKSGELL  | ILLAELEQLK  | AVAVAAAVGVL  |  |
| 31 |  | VIAQGIGKL  | FVNDIFERIA  | QVANS AFVERL |  |
| 32 |  | AITGNFKSL  | KLFPDTPAL   | SINPLGGFVHY  |  |
| 33 |  | KITDLQNQL  | KCIMDAFIKH  | LVNVFIGQAE   |  |
| 34 |  | SVSDQFYRY  | FGGPGTASRP  | PEPAKSAPAPK  |  |
| 35 |  | RLYQGINQL  | EEDLEAIRLR  | VLSPADKTNVK  |  |
| 36 |  | SANDGFVRL  | TIYDNAVQGL  | HVLESGGFRSL  |  |
| 37 |  | TANDGFVRL  | IIGARAEMTS  | PELADKNV PNL |  |
| 38 |  | TLNEKLTAL  | HINEGETAML  | SLPSASHFSQL  |  |
| 39 |  | ALNEQIARL  | FGGLGGGSVR  | TIGTIDEIQKL  |  |
| 40 |  | WVQDKITQM  | VIADPRGNTL  | KLIDEGLEVNL  |  |
| 41 |  | VVITDPEKL  | RVTELQQQPL  | YVGPADGSLYI  |  |
| 42 |  | RIATEFNQL  | IVYAKSTALQ  | DAGAGIALNDH  |  |
| 43 |  | IINGEATML  | SIYNGDMEKI  | VISGAEIVAGV  |  |
| 44 |  | TIMPKDIQL  | IIEPSLRQLA  | RNVSTGDVNVE  |  |
| 45 |  | QIQEFKEAF  | IIMLEALERV  | HVGS GDLFSGM |  |
| 46 |  | SVSSHVGVF  | AIMGSGILGL  | TAPAMAPAPPL  |  |
| 47 |  | IIQSIRMGGM | EIAGPGFINV  |              |  |
| 48 |  | QVIAGFNRL  | AEDALQALKV  |              |  |
| 49 |  | KLNDLIQRL  | VANEEGFVRL  |              |  |
| 50 |  | RIIDVVYNA  | SVALGSPQSH  |              |  |
| 51 |  | AIAEFARSL  | KIAEGVNSLL  |              |  |
| 52 |  | QIAEFKEAF  | VTAAQAKNLI  |              |  |
| 53 |  | YVQDYEDFM  | ADGDFAIVKF  |              |  |
| 54 |  | KVPEWVDTV  |             |              |  |
| 55 |  | VVAGIKEYF  |             |              |  |
| 56 |  | LIQSFTDRL  |             |              |  |
| 57 |  | AVTEAFVRL  |             |              |  |
| 58 |  | SINDKIHEL  |             |              |  |
| 59 |  | IPNEIHAL   |             |              |  |
| 60 |  | GIAQMLEKY  |             |              |  |
| 61 |  | VIAEILRGV  |             |              |  |
| 62 |  | SVSTQLSLV  |             |              |  |
| 63 |  | VVYPWTQRF  |             |              |  |
| 64 |  | VVVDPIQSV  |             |              |  |
| 65 |  | FISPFHGHL  |             |              |  |
| 66 |  | TINEIEDTF  |             |              |  |
| 67 |  | FVNEIISRI  |             |              |  |
| 68 |  | LITGMFQRL  |             |              |  |

|     |  |            |  |  |  |
|-----|--|------------|--|--|--|
| 69  |  | VLKVFLNV   |  |  |  |
| 70  |  | YVKDIYAYL  |  |  |  |
| 71  |  | YVQDFLNHL  |  |  |  |
| 72  |  | VVAPAGITL  |  |  |  |
| 73  |  | LLGPPVGV   |  |  |  |
| 74  |  | ALFAGFRAL  |  |  |  |
| 75  |  | FIASVFMLH  |  |  |  |
| 76  |  | FVNDIFERI  |  |  |  |
| 77  |  | SIAAFIQL   |  |  |  |
| 78  |  | AFADIIHSL  |  |  |  |
| 79  |  | AIFEYIDRL  |  |  |  |
| 80  |  | QIYDIFQKL  |  |  |  |
| 81  |  | MIGQFGVGF  |  |  |  |
| 82  |  | TIAEGFVKA  |  |  |  |
| 83  |  | APEEHPVLL  |  |  |  |
| 84  |  | LIQDITQL   |  |  |  |
| 85  |  | LKAEDKSQL  |  |  |  |
| 86  |  | TINGHNAEV  |  |  |  |
| 87  |  | LGAFLLAPLL |  |  |  |
| 88  |  | LGDPQVLLL  |  |  |  |
| 89  |  | RVQDLMAQM  |  |  |  |
| 90  |  | AVADKHELL  |  |  |  |
| 91  |  | KANEVISKL  |  |  |  |
| 92  |  | VITNVLQPP  |  |  |  |
| 93  |  | TITSREIQT  |  |  |  |
| 94  |  | LIQRMESGY  |  |  |  |
| 95  |  | LLGNIMAWF  |  |  |  |
| 96  |  | RISDFHETY  |  |  |  |
| 97  |  | VINGNIKTV  |  |  |  |
| 98  |  | KVADGFKVV  |  |  |  |
| 99  |  | RVQDLMAQM  |  |  |  |
| 100 |  | AQASFRDGL  |  |  |  |
| 101 |  | IIGAWNYPF  |  |  |  |
| 102 |  | HIIGRIESY  |  |  |  |
| 103 |  | SVHKGFAFV  |  |  |  |
| 104 |  | VSTVLTSKY  |  |  |  |
| 105 |  | RLNKVISEL  |  |  |  |
| 106 |  | SIKTGFQAV  |  |  |  |
| 107 |  | SVAVIHQSL  |  |  |  |
| 108 |  | VIANEIEKV  |  |  |  |
| 109 |  | TINQEIQKI  |  |  |  |
| 110 |  | LLNELASVK  |  |  |  |
| 111 |  | AIAPNTNNL  |  |  |  |
| 112 |  | FIAPTGHSL  |  |  |  |
| 113 |  | ASLSTFQQM  |  |  |  |
| 114 |  | VVHDGFEGFL |  |  |  |
| 115 |  | LIHSEISNL  |  |  |  |



|     |  |           |  |  |  |
|-----|--|-----------|--|--|--|
| 116 |  | LENTIKNLQ |  |  |  |
| 117 |  | LINDKVAQL |  |  |  |
| 118 |  | VIKGFETI  |  |  |  |
| 119 |  | SIADKIQQI |  |  |  |
| 120 |  | RIADQFLGA |  |  |  |
| 121 |  | WISEGFLKA |  |  |  |
| 122 |  | KINNVIDNL |  |  |  |
| 123 |  | WEKVGSGGF |  |  |  |
| 124 |  | GAYKYIQEL |  |  |  |
| 125 |  | LITGMFQRL |  |  |  |
| 126 |  | LNKSRGNNF |  |  |  |
| 127 |  | IVNFVHTNL |  |  |  |
| 128 |  | FIAHFQDNL |  |  |  |
| 129 |  | QIQKIETL  |  |  |  |
| 130 |  | IIEKNFDYL |  |  |  |
| 131 |  | KVGPVPLV  |  |  |  |
| 132 |  | YIEEAIEKL |  |  |  |
| 133 |  | KIWPGYSEL |  |  |  |
| 134 |  | TIMPKDIQL |  |  |  |
| 135 |  | RITDLYTDL |  |  |  |
| 136 |  | NVNGAFAEL |  |  |  |
| 137 |  | RSMLVLKDI |  |  |  |
| 138 |  | YIRTGFINL |  |  |  |
| 139 |  | QILTDFPKL |  |  |  |
| 140 |  | RFFDSFGNL |  |  |  |
| 141 |  | GVLPNIQAV |  |  |  |
| 142 |  | NVIGQITQL |  |  |  |
| 143 |  | RDFLGGLAF |  |  |  |
| 144 |  | VINELIGNL |  |  |  |
| 145 |  | FIASVNTLV |  |  |  |
| 146 |  | IIVDIFHGL |  |  |  |
| 147 |  | VGISGAIQH |  |  |  |
| 148 |  | KIQESIERL |  |  |  |
| 149 |  | VLGAVRSYA |  |  |  |
| 150 |  | LAQARATLP |  |  |  |
| 151 |  | SINQGLDRL |  |  |  |
| 152 |  | AVAVLRDLL |  |  |  |
| 153 |  | SIFDDFSHY |  |  |  |
| 154 |  | KDALNISIK |  |  |  |
| 155 |  | GVIKVFNDM |  |  |  |
| 156 |  | TSLLICQGL |  |  |  |
| 157 |  | LSDQTKEKE |  |  |  |
| 158 |  | TQAPTKASE |  |  |  |
| 159 |  | KLKGEALLQ |  |  |  |
| 160 |  | QILQTLIQR |  |  |  |

## DANKSAGUNG

Als Erstes möchte ich mich bei meinen beiden Betreuern Prof. Dr. Oliver Planz und Prof. Dr. Thomas Göbel bedanken. Für die Betreuung, den Rückhalt und die Unterstützung, die ich von ihnen bekommen habe.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Institut anfertigen zu können, von welchem ich vom Fachwissen und von der hervorragenden Arbeitsatmosphäre profitiert habe.

Beate Pömmerl und Claudia Falkenburger möchte ich für ihre Unterstützung im Labor danken.

Bei Ralf Amann möchte ich mich für die Hilfe bei der Transfektion der Zellen bedanken.

Timo Manz und Fabian Vogt, vielen Dank für eure unzähligen Ratschläge, Erklärungen und euren unermüdlichen Einsatz, mir bei jeder Frage die ich hatte weiter zu helfen.

Michael Ghosh möchte ich insbesondere für die massenspektrometrischen Analysen danken.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Planz für die tolle Zeit, die wir zusammen verbracht haben, bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Julia Koch, für die praktische und mentale Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit, wodurch eine tolle Freundschaft entstanden ist, die ich sehr schätze.

Außerdem auch ein großes Dankeschön an Stefanie Zwisele und Christian Schreitmüller, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir immer zur Seite standen, wenn es mal im Labor nicht so lief wie gewollt.

Meiner Familie möchte ich von ganzem Herzen danken, vor allem meinen Eltern und meinen Großeltern. Danke für eure Unterstützung, während aller Phasen meines Lebens. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.