

Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner

**Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern
gegen das Autoantigen
Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lena Kristina Pfeffer
aus
Landshut
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Edgar Meinel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Nathalie Albert
apl. Prof. Dr. Uwe Ködel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen
Prüfung: 20.05.2021

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Immunreaktionen im zentralen Nervensystem.....	3
2.2	Autoimmunität im zentralen Nervensystem	4
2.2.1	Multiple Sklerose (MS)	5
2.2.2	Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen (NMOSE)	9
2.3	Zielstrukturen und pathophysiologische Bedeutung von Autoantikörpern bei entzündlichen, demyelinisierenden Erkrankungen des zentralen Nervensystems	10
2.3.1	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)	12
2.3.2	Aquaporin-4 (AQP-4).....	13
2.3.3	Andere Kandidaten-Autoantigene	13
2.4	Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein (OMGP)	14
2.4.1	Struktur	14
2.4.2	Lokalisation und Funktion.....	15
2.5	Fragestellungen und Zielsetzungen	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Materialien	17
3.1.1	Geräte.....	17
3.1.2	Reagenzien, Puffer und Gele	18
3.1.3	Medien und Lösungen für die Zellkultur	20
3.1.4	Zelllinien	21
3.1.5	Plasmide.....	21
3.1.6	Proteine und Peptide	22
3.1.7	Kit-Systeme	22
3.1.8	Antikörper	23
3.1.9	Verbrauchsmaterialien.....	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	Generierung monoklonaler anti-OMGP Antikörper.....	25
3.2.2	Herstellung von Plasmid-DNA	27
3.2.2.1	Hitzeschock-Transformation	27
3.2.2.2	Midi-/Maxi-Präparation.....	27
3.2.3	Zellkultur	27
3.2.3.1	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	27
3.2.3.2	Kultivierung von HeLa-Zellen.....	27
3.2.3.3	Transfektion von HeLa-Zellen.....	28
3.2.3.4	Isolierung und Kultivierung muriner Oligodendrozyten	28
3.2.3.5	Aussaat und Differenzierung muriner OPCs.....	29
3.2.3.6	Komplement-Assay: Luminometrische Bestimmung der Viabilität muriner OPCs nach Inkubation mit anti-OMGP Antikörpern und Komplement.....	30
3.2.4	Immunologische Methoden	31
3.2.4.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	31
3.2.4.2	Western Blot	32
3.2.4.3	Immunzytochemische Färbung muriner OPCs und Oligodendrozyten.....	33

3.2.4.4	Zellbasierter Assay - Durchflusszytometrie	34
3.2.5	Proteinanalytik	38
3.2.5.1	Proteinherstellung und -aufreinigung	38
3.2.5.2	Proteinbestimmung (BCA-Assay)	39
3.2.5.3	Gelelektrophorese	39
3.2.5.4	Deglykosylierung von rekombinantem hOMGP und von hOMGP auf pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierten Zellen	39
3.2.5.5	Biotinylierung von hOMGP	40
3.2.5.6	Extraktion von hOMGP aus transient transfizierten Zellen	40
3.3	Statistische Analyse	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Charakterisierung des rekombinanten hOMGP	42
4.2	Identifizierung OMGP-spezifischer Hybridome durch Screening der Hybridom-Überstände im FACS	43
4.3	Weitere Charakterisierung der OMGP-Reaktivität der ausgewählten monoklonalen anti-OMGP Antikörper anhand von Verdünnungsreihen in ELISA und Durchflusszytometrie	46
4.4	Untersuchungen zur Rolle der Glykosylierung von hOMGP für die Bindung durch anti-OMGP Antikörper	49
4.4.1	Nachweis des HNK-1-Epitops	49
4.4.2	Behandlung pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierter Zellen mit Tunicamycin zur Inhibierung der N-Glykosylierung	50
4.4.3	Auswirkung der enzymatischen Deglykosylierung von hOMGP auf die Reaktivität von anti-OMGP Antikörpern	51
4.4.3.1	Effekt der enzymatischen Deglykosylierung von rekombinantem hOMGP auf die Reaktivität von anti-OMGP Antikörpern im Streptavidin-ELISA	52
4.4.3.2	Effekt der Behandlung pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierter HeLa-Zellen mit dem Enzym PNGase F auf die Reaktivität von anti-OMGP Antikörpern in der Durchflusszytometrie.....	54
4.5	Immunzytochemische Färbung muriner OPCs und Oligodendrozyten mit monoklonalen anti-OMGP Antikörpern	56
4.6	Untersuchungen zur komplementvermittelten Lyse muriner OPCs durch monoklonale anti-OMGP Antikörper <i>in vitro</i>	58
5	Diskussion	60
5.1	Der zellbasierte Assay als Methode zum Screening der Hybridomüberstände	60
5.2	Auswahl geeigneter monoklonaler anti-OMGP Antikörper	63
5.3	Bedeutung der Glykosylierung des Antigens hOMGP für dessen Erkennung durch monoklonale anti-OMGP Antikörper.....	65
5.4	Monoklonale anti-OMGP Antikörper binden sowohl murine OPCs als auch reife Oligodendrozyten <i>in vitro</i>	67
5.5	Untersuchungen zur komplementvermittelten Lyse	70
5.6	Ausblick.....	72
6	Literaturverzeichnis	73

7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	88
7.1	Abbildungen	88
7.2	Tabellen	89
8	Abkürzungsverzeichnis	90
9	Publikationsliste.....	92
10	Eidesstattliche Versicherung	93
11	Kooperationen	94
12	Danksagung.....	95

1 Zusammenfassung

ZNS-Autoimmunität (ZNS = Zentrales Nervensystem) spielt als pathogenetisches Fundament bei einer zunehmenden Anzahl neurologischer Krankheitsbilder eine wichtige Rolle. In den letzten Jahrzehnten rückten dabei die B-Zellen und Autoantikörper als wichtige *Player* in der Pathogenese chronisch-entzündlicher ZNS-Erkrankungen mehr und mehr in den Fokus. Die Suche nach neuen Zielantigenen und die Charakterisierung der Antikörper sind folglich wichtige Forschungsfelder. Bei einem Großteil der Patienten mit Multipler Sklerose (MS) sind die Zielstrukturen der vermuteten Autoimmunreaktion noch nicht identifiziert. Da die MS sowohl zu einer Entmarkung als auch zu einer Schädigung der grauen Substanz führt, wird in der Arbeitsgruppe von Prof. Edgar Meinl (AG Meinl) die Autoimmunität gegen das Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein (OMGP) im Detail untersucht. Dieses Protein wird sowohl von Oligodendrozyten als auch von Neuronen exprimiert und ist spezifisch für das ZNS.

Die vorliegende Dissertation fußt auf der Entdeckung von Autoantikörpern gegen OMGP bei einer Subgruppe von Patienten mit chronisch-entzündlichen ZNS-Erkrankungen durch die PhD-Studentin Ramona Gerhards aus der AG Meinl. OMGP ist ein GPI-verankertes (GPI = Glycosylphosphatidylinositol), stark glykosyliertes Protein, welches unter anderem als Inhibitor des axonalen Wachstums fungiert. Die genauere Charakterisierung von monoklonalen anti-OMGP Antikörpern *in vitro* ist das Ziel dieser Dissertation.

En détail wurden in Kooperation mit der *Monoclonal Antibody Core Facility* des Helmholtz-Zentrums München durch Immunisierung von Mäusen und Ratten mit dem humanen Protein (hOMGP) oder einem Peptid des OMGP der Ratte (rOMG-Peptid) 133 Hybridome generiert. Ziel dieser Doktorarbeit war es, aus diesen Hybridomen einige auszuwählen, die (1) hOMGP in einem zellbasierten Assay erkennen - auch dann, wenn es mit seinem natürlichen GPI-Anker in der Zellmembran lokalisiert ist - und die (2) eine Kreuzreaktivität mit OMGP der Ratte (rOMGP) und Maus (mOMGP) aufweisen. Die OMGP-Reaktivität der ausgewählten Antikörper sollte (3) anhand von Verdünnungsreihen weiter im ELISA und in der Durchflusszytometrie charakterisiert und mit derer von kommerziellen anti-OMGP Antikörpern verglichen werden. Weiterhin sollte herausgefunden werden, (4) ob

diese monoklonalen Antikörper (mAK) eher den Zucker- oder den Proteinanteil von hOMGP erkennen. Schließlich sollten mit den mAK (5) murine Oligodendrozyten verschiedener Reifungsstadien gefärbt und dabei (6) untersucht werden, ob die mAK komplementabhängig murine *oligodendrocyte progenitor cells* (OPCs) lysieren.

Anhand eines zellbasierten Assays wurden im Rahmen dieser Arbeit drei monoklonale anti-OMGP Antikörper (22H6, 14A9, 31A4) ausgewählt, welche eine mit kommerziellen anti-OMGP Antikörpern vergleichbare Reaktivität gegenüber hOMGP, mOMGP und rOMGP aufweisen. Diese mAK wurden verwendet, um den Effekt der Glykosylierung von hOMGP auf die Antikörper-Reaktivität zu überprüfen. Eine partielle enzymatische Deglykosylierung führte hierbei zu keiner Minderung der Reaktivität der mAK im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) und zellbasierten Assay, was dafür spricht, dass die getesteten mAK nicht die Zuckerketten, sondern den Proteinanteil erkennen. Die ausgewählten mAK färbten murine Oligodendrozyten sowohl im Stadium der OPCs als auch im differenzierten Stadium. Abschließend wurde die Fähigkeit der mAK zur Komplementaktivierung in einer murinen OPC-Kultur geprüft. Eine signifikante komplementvermittelte Zytotoxizität konnte dabei mit der verwendeten Methodik nicht nachgewiesen werden.

Zusammengefasst konnten in dieser Dissertation drei monoklonale anti-OMGP Antikörper (22H6, 14A9, 31A4) identifiziert werden, die sich dazu eignen, um im Rahmen weiterer *in vitro* und *in vivo* Experimente die Pathomechanismen der OMGP-spezifischen Autoimmunität besser zu verstehen. Die Ergebnisse der Deglykosylierungs-Experimente sprechen dafür, dass die Zuckerketten für die hOMGP-Reaktivität dieser mAK von untergeordneter Bedeutung sind.

2 Einleitung

2.1 Immunreaktionen im zentralen Nervensystem

In den 1920er Jahren machten Wissenschaftler anhand von tierexperimentellen Studien die Entdeckung, dass die heterologe Transplantation von Tumorgewebe in das Hirnparenchym nicht zu dessen Abstoßung führt, was in Kontrast zu den bis dato erworbenen Erkenntnissen über die Abstoßungsmechanismen peripherer Organe stand (Shirai 1921, Murphy and Sturm 1923). Ein weiterer bedeutender Meilenstein in der Erforschung immunologischer Prinzipien des ZNS wurde im Jahre 1948 durch den britischen Zoologen Sir Peter Brian Medawar (1915-1987) gelegt, der Autotransplantationen von Hautgewebe in das Hirnparenchym von Kaninchen unter verschiedenen Bedingungen erforschte (Louveau, Harris et al. 2015). Die Autotransplantate wurden zwar nicht abgestoßen, sofern sie keinen Kontakt zu den dortigen Blutgefäßen hatten - es kam jedoch zu einer Immunreaktion, wenn die Tiere zuvor peripher mit den Geweben immunisiert worden waren (Medawar 1948). Medawars Arbeiten prägten seither die Auffassung einer immunologischen Sonderstellung des ZNS (Louveau, Harris et al. 2015).

Anatomisch zeichnet sich das ZNS durch wichtige Barrieren aus, die es vor pathogenen Einflüssen schützen (Engelhardt, Vajkoczy et al. 2017). Die Hirnhäute formen die äußere Barriere und trennen das Hirnparenchym von dem mit Liquor gefüllten Subarachnoidalraum (Engelhardt, Vajkoczy et al. 2017). Auf der Oberfläche des Gehirns und Rückenmarks limitiert zudem die *Glia limitans* die Einwanderung von Leukozyten in das ZNS-Parenchym (Horng, Therattil et al. 2017). Zwischen Blutzirkulation und Nervengewebe trägt die Blut-Hirn-Schranke zu einem optimalen Milieu bei, um die neuronale Funktionsfähigkeit sicher zu stellen (Obermeier, Daneman et al. 2013, Siegenthaler, Sohet et al. 2013, Andreone, Lacoste et al. 2015). Ihre komplexe Struktur und Funktion unterscheidet sich dabei zwischen einzelnen Gefäßabschnitten (Obermeier, Daneman et al. 2013): Während der Transport von Nährstoffen ins ZNS vor allem durch die Kapillaren erfolgt (Obermeier, Daneman et al. 2013), findet die Einwanderung von Immunzellen über die postkapillären Venolen statt (Obermeier, Daneman et al. 2013, Engelhardt, Vajkoczy et al. 2017). Im Bereich des Plexus choroideus formen die Epithelzellen die Blut-Liquor-Schranke (Ransohoff, Kivisakk et al. 2003, Engelhardt, Vajkoczy et al. 2017), die vermutlich den Übertritt von Zellen des Immunsystems in den Liquor kontrolliert (Engelhardt, Carare et al. 2016, Engelhardt, Vajkoczy et al. 2017).

Innerhalb des ZNS-Parenchyms repräsentieren ortsständige, von Vorläufern aus dem embryonalen Dottersack stammende (Alliot, Godin et al. 1999, Ginhoux, Greter et al. 2010) Gewebsmakrophagen, sogenannte Mikroglia, die angeborene Immunabwehr (Engelhardt, Carare et al. 2016). Mit ihren Fortsätzen kontrollieren sie stetig die Umgebung (Herz, Filiano et al. 2017); zudem besitzen sie die Fähigkeit zur Phagozytose (Herz, Filiano et al. 2017) und Antigen-Präsentation (Ransohoff and Engelhardt 2012). Weder ortsständige T-Zellen (Engelhardt, Carare et al. 2016) noch klassische dendritische Zellen (Ransohoff and Engelhardt 2012) konnten bislang im ZNS-Parenchym detektiert werden. Im Liquor finden sich vor allem aktivierte CD4⁺ T-Gedächtniszellen, was annehmen lässt, dass Immunzellen dort insbesondere Funktionen in der Immunüberwachung inne haben (Kivisakk, Mahad et al. 2003).

Zusammengefasst erlaubt die Kompartimentierung des ZNS, dass einzelne Bereiche für periphere Immunzellen zugänglich sind und mit diesen interagieren können, während wiederum andere Kompartimente (z.B. ZNS-Parenchym) in hohem Maße geschützt sind. Aktuelle Forschungsarbeiten zeigen jedoch auch, dass ein starres Festhalten an alten Paradigmen weder sinnvoll noch möglich ist (Engelhardt, Vajkoczy et al. 2017). Der Begriff „Immunprivileg“ sollte aus heutiger Sicht mit Einschränkung verwendet werden, da es an einer dem aktuellen Erkenntnisstand angepassten Definition mangelt (Ransohoff and Engelhardt 2012).

2.2 Autoimmunität im zentralen Nervensystem

Selbsttoleranz ist eine essenzielle Fähigkeit des Immunsystems. Versagt der Mechanismus, kann daraus die Destruktion körpereigenen Gewebes resultieren (Bell and Bird 2005). Im 20. Jahrhundert beschrieb der deutsche Mediziner und Nobelpreisträger Paul Ehrlich erstmals das Konzept der Autoimmunität und betonte deren schwere Folgen mit dem Begriff *horror autotoxicus* (Bell and Bird 2005, Murphy and Weaver 2018). Die Prävalenz von Autoimmunerkrankungen liegt in der westlichen Population bei etwa 5 % (Murphy and Weaver 2018). Tatsächlich sind autoreaktive Lymphozyten auch physiologischerweise vereinzelt im Immunsystem zu finden (Murphy and Weaver 2018). Um jedoch eine Autoimmunerkrankung zu entwickeln, ist wohl ein komplexes Zusammenwirken aus prädisponierenden Genvarianten (z.B. Mutationen von HLA-Molekülen; HLA = humanes Leukozyten-Antigen) und Umweltfaktoren (z.B. Infektionen) verantwortlich (Rioux and Abbas 2005, Wang, Wang et al. 2015, Murphy and Weaver 2018). Obwohl das ZNS ein immunologisch geschütztes Organ ist, kann es trotzdem zum Ziel von Immunreaktionen werden.

In der Frage nach den Ursachen ZNS-gerichteter Autoimmunität nehmen Tiermodelle eine wichtige Rolle ein. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein verbreitetes Modell zur Erforschung der MS (Gold, Linington et al. 2006). Im Jahre 1981 gelang erstmals die Induktion einer sogenannten *adoptive-transfer* EAE (AT-EAE) in gesunden Tieren durch den Transfer MBP-spezifischer (MBP = Myelin-Basisches Protein) CD4+ T-Zellen (Ben-Nun, Wekerle et al. 1981). Eine weitere Annäherung an die humane Pathologie ermöglichte die Identifizierung des Myelinproteins MOG (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein) als Zielstruktur demyelinisierender Antikörper (Lebar, Lubetzki et al. 1986, Gold, Linington et al. 2006). Autoantikörper vermögen die Blut-Hirn-Schranke physiologischerweise nicht zu überschreiten (Litzenburger, Fassler et al. 1998, Lassmann and Bradl 2017). Eine systemische Injektion von anti-MOG Antikörpern nach Induktion einer AT-EAE durch autoaggressive T-Zellen führt jedoch zu einer Aggravierung der Symptomatik und ausgeprägten Demyelinisierung (Linington, Bradl et al. 1988). Auch wenn viele Erkenntnisse der Neuroimmunologie auf Tiermodelle zurückzuführen sind, existiert noch keines, das die humane Pathologie in ihrer Komplexität imitieren kann (Lassmann and Bradl 2017). So sind gewisse Eigenschaften der MS wie die Bedeutung von CD8+ T-Zellen in aktuellen Modellen noch unterrepräsentiert (Lassmann and Bradl 2017).

Aus klinischer Sicht gewann das Konzept der Autoimmunität im letzten Jahrzehnt bei vielen neurologischen Krankheiten an Relevanz (Bradl and Lassmann 2016). Die Einteilung von Autoimmunerkrankungen unterscheidet zwischen systemischen und Organ-spezifischen Erkrankungen (Murphy and Weaver 2018). Viele Systemerkrankungen wie der systemische Lupus Erythematoses können das ZNS involvieren und dabei zu oft schwerwiegenden Verläufen führen. Innerhalb der Organ-spezifischen Autoimmunerkrankungen bilden die entzündlichen, demyelinisierenden ZNS-Erkrankungen eine wichtige Subgruppe und sollen im Folgenden anhand zweier Beispiele genauer betrachtet werden.

2.2.1 Multiple Sklerose (MS)

Die MS betrifft etwa 2-3 Millionen Personen weltweit (Thompson, Baranzini et al. 2018). Das Manifestationsalter liegt dabei meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Bittner, Meuth et al. 2015), wobei auch ein Beginn in der Kindheit oder im höheren Alter möglich ist (Thompson, Baranzini et al. 2018). Aus weitgehend unbekanntem Gründen sind etwa 75 % der Erkrankten weiblich (Orton, Herrera et al. 2006, Reich, Lucchinetti et al. 2018). Geographisch besteht eine Abnahme der Prävalenz mit steigender Nähe zum Äquator (Bittner, Meuth et al. 2015, Thompson,

Baranzini et al. 2018). Entsprechend ist die Häufigkeit in Nordamerika, Nordeuropa und Teilen Australiens besonders hoch (Bittner, Meuth et al. 2015, Collaborators 2019). Die Ursache der MS ist noch unklar. Angenommen wird ein multifaktorielles, interindividuell variables Zusammenspiel aus Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition (Reich, Lucchinetti et al. 2018, Thompson, Baranzini et al. 2018). Der HLA DRB1*1501 Haplotyp weist beispielsweise eine starke MS-Korrelation auf (Patsopoulos, Barcellos et al. 2013, Reich, Lucchinetti et al. 2018). Zu den wichtigsten umweltassoziierten Faktoren zählen Tabakkonsum, ein niedriger Vitamin D-Spiegel (Ascherio, Munger et al. 2014, Ramanujam, Hedstrom et al. 2015, Thompson, Baranzini et al. 2018) sowie eine durchgemachte Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) (Reich, Lucchinetti et al. 2018, Thompson, Baranzini et al. 2018).

Klinisch manifestiert sich die MS als chronisches Geschehen, das in drei Verlaufsformen unterteilt werden kann (Lublin and Reingold 1996). In 85 % der Fälle beginnt die MS als schubförmige Erkrankung (RRMS = *relapsing remitting MS*) ohne Progredienz der Behinderung zwischen den Schüben (Bittner, Meuth et al. 2015). Bei etwa 15 % der Erkrankten liegt von Beginn an eine progrediente Behinderung (PPMS = *primary progressive MS*) vor (Bittner, Meuth et al. 2015, Thompson, Baranzini et al. 2018). Auch ein Übergang einer RRMS in eine progrediente Behinderung (SPMS = *secondary progressive MS*) ist möglich (Bittner, Meuth et al. 2015, Thompson, Baranzini et al. 2018). Art und Ausprägung der Symptome sind interindividuell unterschiedlich. Häufige Erstmanifestationen sind eine Optikusneuritis und Sensibilitätsstörungen, im Verlauf tragen oft Paresen sowie Blasen- und Mastdarmstörungen zu einer abnehmenden Mobilität bei (Bittner, Meuth et al. 2015).

Die erste ausführliche Charakterisierung von MS-Läsionen (*la sclérose en plaque*) erfolgte im Jahre 1868 durch den französischen Neurologen und Pathologen Jean-Martin Charcot (1825-1893) (Pearce 2005, Kumar, Aslinia et al. 2011). Grundsätzlich können Läsionen im gesamten ZNS auftreten (Höftberger and Lassmann 2018, Reich, Lucchinetti et al. 2018), sie betreffen jedoch meist Orte mit einer hohen Dichte venöser Gefäße (Höftberger and Lassmann 2018). Sie sind gekennzeichnet durch Inflammation, Demyelinisierung, Neurodegeneration und astrozytäre Gliose (Höftberger and Lassmann 2018, Reich, Lucchinetti et al. 2018).

Areale der Demyelinisierung finden sich bei der MS sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz (Kutzelnigg, Lucchinetti et al. 2005, Lucchinetti, Popescu et al. 2011). Als Mechanismus der Entmarkung nimmt man eine inflammatorische

Grundlage an (Lucchinetti, Bruck et al. 2000, Höftberger and Lassmann 2018), wobei sich die dominierenden Immunzelltypen interindividuell unterscheiden (Lucchinetti, Bruck et al. 2000). Eine Remyelinisierung entmarkter Strukturen ist möglich (Höftberger and Lassmann 2018), jedoch von Patient zu Patient unterschiedlich (Höftberger and Lassmann 2018) und unter anderem vom Krankheitsstadium (Foote and Blakemore 2005) und dem Ort der Läsion (Patrikios, Stadelmann et al. 2006) abhängig.

Die Neurodegeneration beginnt bereits früh im Krankheitsverlauf und stellt das wesentliche pathologische Korrelat der Behinderung dar (Dendrou, Fugger et al. 2015, Thompson, Baranzini et al. 2018). Als Ursachen werden unter anderem eine mitochondriale Dysfunktion (Höftberger and Lassmann 2018) und ein Verlust an neurotrophen Faktoren (Thompson, Baranzini et al. 2018) angenommen. Zudem konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Prozesse zur Bildung intraneuronaler Protein-Aggregate führen (Schattling, Engler et al. 2019). Remyelinisierung und Neurodegeneration sind vielversprechende Ansatzpunkte der modernen MS-Therapie (Luessi, Siffrin et al. 2012, Gruchot, Weyers et al. 2019).

In allen Stadien lassen sich Zeichen der Inflammation feststellen (Dendrou, Fugger et al. 2015): Während das Bild der frühen MS-Läsion von einer lokalisierten Invasion durch Makrophagen und CD8+ T-Zellen und zu einem geringeren Anteil B-Zellen, Plasmazellen und CD4+ T-Zellen geprägt ist (Dendrou, Fugger et al. 2015), zeigt sich im Verlauf ein diffuseres Bild aus T-Zell-Infiltraten, aktivierten Mikroglia und Astrozyten (Dendrou, Fugger et al. 2015) sowie einem steigenden Anteil an B-Zellen und Plasmazellen (Frischer, Bramow et al. 2009, Dendrou, Fugger et al. 2015). Das spätere Krankheitsstadium zeichnet sich trotz Abnahme der Inflammation durch eine fortschreitende Neurodegeneration aus, weshalb die Frage nach den Mechanismen und therapeutischen Ansatzpunkten der progredienten Behinderung eine bleibende Herausforderung darstellt (Dendrou, Fugger et al. 2015). Eine Übersicht der histopathologischen Merkmale der MS ist in *Abbildung 2-1* dargestellt.

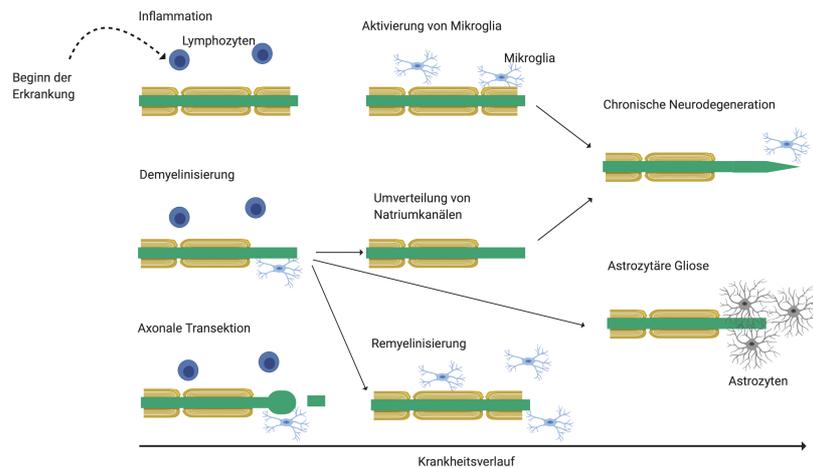


Abbildung 2-1 Pathogenese der MS

Vereinfachte Darstellung der Pathogenese der MS. Es wird angenommen, dass die Einwanderung autoreaktiver Lymphozyten den Beginn der Erkrankung markiert. Die akute Inflammation kann unter anderem durch eine Demyelinisierung von Axonen oder eine axonale Transektion zur Einschränkung der neuronalen Leitfähigkeit führen. Eine Remyelinisierung entmarkter Strukturen ist möglich. Andererseits können Prozesse wie die Umverteilung von Natriumkanälen in entmarkten Axonen in einer chronischen Neurodegeneration resultieren. Ebenso kann die astrozytäre Narbenbildung negative Effekte auf das Regenerationspotenzial haben. Die Aktivierung von Mikroglia kann sowohl regenerative als auch schädigende Einflüsse aufweisen. Diese Abbildung wurde in Anlehnung an Compston and Coles (Compston and Coles 2008) mit BioRender erstellt.

Die Hypothese, dass es sich bei der MS um eine Autoimmunerkrankung handelt, wird durch einige Argumente wie die Histopathologie und die Assoziation zu bestimmten HLA-Molekülen gestützt (Bittner, Meuth et al. 2015). Es wird angenommen, dass vor allem T-Zellen (CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen) und B-Zellen bedeutende *Player* in der Entstehung der MS darstellen (Hohlfeld, Dornmair et al. 2016, Hohlfeld, Dornmair et al. 2016, Thompson, Baranzini et al. 2018), wobei ZNS-spezifische Antigene als Zielstrukturen dieser Immunreaktion vermutet werden (Thompson, Baranzini et al. 2018). Im Gegensatz zu anderen neuroinflammatorischen Krankheitsbildern konnte für die MS bislang jedoch kein einheitliches Autoantigen identifiziert werden (Hohlfeld, Dornmair et al. 2016, Thompson, Baranzini et al. 2018), obwohl etliche Kandidaten-Autoantigene diskutiert werden (siehe *Kapitel 2.3*). Die Suche nach den Zielantigenen stellt also ein wichtiges Forschungsfeld dar (Hohlfeld, Dornmair et al. 2016, Hohlfeld, Dornmair et al. 2016). Bezüglich der Frage nach der Aktivierung autoreaktiver Zellen gibt es zwei Hypothesen: Im intrinsischen Modell markieren ZNS-immanente Ereignisse (z.B. virale Infektionen) den Beginn der Erkrankung (Dendrou, Fugger et al. 2015, Thompson, Baranzini et al. 2018). Hingegen besagt das extrinsische Modell, dass Immunzellen peripher (z.B. durch molekulares *Mimikry*) aktiviert werden (Dendrou, Fugger et al. 2015).

2.2.2 Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen (NMOSE)

Die NMOSE bilden eine Gruppe chronischer Krankheitsbilder mit meist schubförmigem Verlauf (Borisow, Mori et al. 2018) und einem oft insuffizienten Ansprechen auf immunmodulatorische Therapien (Kleiter, Gahlen et al. 2016, Borisow, Mori et al. 2018). Histopathologisch zeigen sich häufig demyelinisierende Läsionen des Sehnervs und Rückenmarks (Höftberger and Lassmann 2018); das Großhirn (Borisow, Mori et al. 2018) und der Hirnstamm (z.B. *Area postrema*) (Kremer, Mealy et al. 2014) können jedoch ebenso betroffen sein. Die Entdeckung von Autoantikörpern gegen das Wasserkanalprotein Aquaporin-4 (AQP-4) (Lennon, Wingerchuk et al. 2004, Lennon, Kryzer et al. 2005), die bei etwa 70-80 % der Patienten nachweisbar (Borisow, Mori et al. 2018) und heute Teil der Diagnosekriterien sind (Wingerchuk, Banwell et al. 2015), grenzte die NMOSE als eigenständiges Krankheitsbild ab (Höftberger and Lassmann 2018). Mit dem Myelinprotein MOG konnte ein weiteres Autoantigen identifiziert werden (Kitley, Woodhall et al. 2012). Trotz vieler Überlappungen bestehen jedoch unter anderem hinsichtlich der Klinik und Histopathologie bedeutende Unterschiede zwischen den AQP4- und MOG-Autoantikörper-assoziierten NMOSE (*Kapitel 2.3*) (Wingerchuk, Banwell et al. 2015). Die sogenannte MOG-assoziierte Enzephalomyelitis wird deshalb zum Teil als eigene Entität abgegrenzt (Dos Passos, Oliveira et al. 2018, Jarius, Paul et al. 2018).

Dies veranschaulicht, wie wichtig die Stratifizierung von Patienten anhand von Immunzellen und deren Zielantigenen ist, um das Verständnis der Pathogenese neuroimmunologischer Krankheiten zu verbessern und die Basis für ein individualisiertes klinisches Management zu schaffen.

2.3 Zielstrukturen und pathophysiologische Bedeutung von Autoantikörpern bei entzündlichen, demyelinisierenden Erkrankungen des zentralen Nervensystems

Wie bereits beschrieben, konnte die Bedeutung autoreaktiver T-Zellen in der Entstehung ZNS-gerichteter Autoimmunität bereits im 20. Jahrhundert im EAE-Modell untermauert werden (Ben-Nun, Wekerle et al. 1981, Wekerle 1993). In den letzten Jahren wurde auch der Rolle von B-Zellen und Autoantikörpern in der Pathogenese demyelinisierender ZNS-Erkrankungen vermehrt Beachtung geschenkt (Brimberg, Mader et al. 2015, Hausser-Kinzel and Weber 2019, Sabatino, Probstel et al. 2019). Dabei waren folgende experimentelle und klinische Erkenntnisse entscheidend (Probstel and Hauser 2018):

- Im EAE-Modell konnte gezeigt werden, dass durch ein Zusammenspiel von T-Zellen und Antikörpern eine entzündliche Demyelinisierung induziert werden kann, die dem histopathologischen Bild der MS ähnelt (Gold, Lington et al. 2006, Lassmann and Bradl 2017).
- Eine Therapie mit anti-CD20 Antikörpern wie Rituximab (Hauser, Waubant et al. 2008, Ineichen, Moridi et al. 2020) oder Ocrelizumab (Kappos, Li et al. 2011) zeigt bei einer Gruppe von MS-Patienten einen positiven Effekt.
- Histopathologisch sind Immunglobuline und Komplementfaktoren in einem Teil der akuten MS-Läsionen nachweisbar (Storch, Piddlesden et al. 1998, Lucchinetti, Bruck et al. 2000)
- Im Liquor von MS-Patienten spiegeln sogenannte oligoklonale Banden, die aufgrund ihres breiten Vorkommens (etwa 90 % der MS-Patienten) (Dobson, Ramagopalan et al. 2013) in der MS-Diagnostik genutzt werden (Sabatino, Probstel et al. 2019), eine intrathekale Antikörper-Produktion durch klonal expandierte B-Zellen wieder (Sabatino, Probstel et al. 2019). Diese Antikörper stammen vermutlich von intrathekalen B-Zellen ab (Obermeier, Mentele et al. 2008).

Aufgrund ihrer vielseitigen Funktionen, die neben der Antikörperproduktion auch die Antigen-Präsentation und Zytokinproduktion beinhalten (Hausser-Kinzel and Weber 2019, Sabatino, Probstel et al. 2019), können B-Zellen auf mannigfaltige Weise zur Entstehung und Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse des ZNS beitragen, was die Entschlüsselung ihrer Bedeutung zu einer komplexen Aufgabe macht. Dies wird dadurch erschwert, dass die Rolle von B-Zellen und Autoantikörpern zwischen einzelnen demyelinisierenden Krankheitsbildern differiert: Während Antikörper bei den NMOSE vermutlich das primäre pathophysiologische Korrelat darstellen (Hausser-Kinzel and Weber 2019, Sabatino, Probstel et al. 2019), geht man bei der

MS von einem komplexen Zusammenspiel aus T-Zellen und B-Zellen aus, in dem neben der Antikörperproduktion vor allem interaktive Funktionen der B-Zellen von Bedeutung sind (Probstel, Sanderson et al. 2015). Grundsätzlich können Autoantikörper sowohl apathogen sein als auch zum Funktionsverlust ihres Zielantigens führen (Bradl and Lassmann 2016). Die Schädigungsmechanismen pathogener Autoantikörper sind vielfältig und unterscheiden sich je nach Zielantigen, teilweise sind sie sogar Epitop-spezifisch (Ludwig, Vanhoorelbeke et al. 2017). Über lange Zeit standen Myelinproteine als Autoantigene bei entzündlichen, demyelinisierenden ZNS-Erkrankungen im Vordergrund (Fraussen, Claes et al. 2014). Inzwischen ist jedoch klar, dass sich Autoantikörper im Rahmen dieser Krankheitsbilder auch gegen Zielstrukturen auf Neuronen, Astrozyten und weiteren ZNS-Bestandteilen richten können (Fraussen, Claes et al. 2014). *Abbildung 2-2* zeigt die Lokalisation wichtiger Myelin- und Myelin-assoziiierter neuronaler ZNS-Antigene.

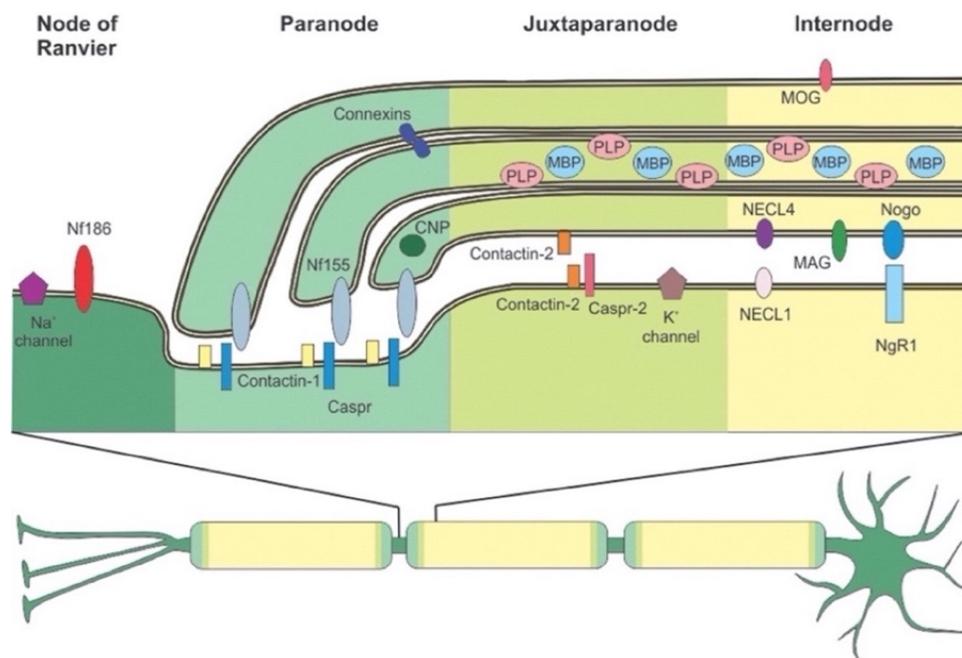


Abbildung 2-2 Lokalisation der zentralen Myelinproteine und Myelin-assoziierten neuronalen Proteine

Vergrößerter Ausschnitt eines myelinisierten Axons im ZNS mit den typischen nodalen, paranodalen, juxtapanodalen und internodalen Proteinen. Während die Myelinproteine MOG, MBP und PLP (PLP = Proteolipid-Protein; alle drei jeweils oberflächlich im Bereich der Myelinschicht lokalisiert) sowie MAG (Myelin-assoziiertes Glykoprotein) vor allem im Bereich des Internodiums exprimiert werden, zählen die Proteine NF155 (Neurofascin-155) und Contactin-1 zu den paranodalen Strukturen. Juxtapanodal finden sich die Proteine Caspr-2 (Contactin-associated protein-like 2) und Contactin-2. (Mayer and Mehl 2012)

Die Heterogenität unterschiedlicher ZNS-spezifischer Autoantikörper hinsichtlich ihrer Zielantigene und Pathomechanismen wird im Folgenden am Beispiel verschiedener ZNS-Autoantigene aufgezeigt.

2.3.1 Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)

MOG ist ein ZNS-spezifisches (Sabatino, Probstel et al. 2019), in der äußeren Myelinschicht lokalisiertes (Brunner, Lassmann et al. 1989) Glykoprotein. Ausgehend von den Effekten von anti-MOG Antikörpern im EAE-Modell wurde zunächst angenommen, dass diese auch in der Pathogenese der MS eine bedeutende Rolle spielen würden (Weber, Derfuss et al. 2018). Die Untersuchung von Liquor- und Serumproben humaner MS-Kohorten mittels ELISA und Western Blot ergab jedoch ein kontroverses Bild (Mayer and Meinl 2012), das weder die Annahme einer klaren Krankheitsassoziation (Xiao, Linington et al. 1991, Lindert, Haase et al. 1999, Reindl, Linington et al. 1999) noch einer prognostischen Bedeutung (Berger, Rubner et al. 2003, Kuhle, Pohl et al. 2007) von anti-MOG Autoantikörpern zuließ. Dies war unter anderem der methodischen Schwäche geschuldet, dass das Antigen zur Testung nicht in seiner intakten Konformation verwendet worden war (Mayer and Meinl 2012, Probstel, Sanderson et al. 2015).

Im Jahre 2007 wiesen O'Connor et al. anhand eines MOG-Tetramers das Vorkommen von anti-MOG Antikörpern bei einigen Patienten mit ADEM (Akute disseminierte Enzephalomyelitis), einer meist in der Kindheit auftretenden entzündlichen, demyelinisierenden ZNS-Erkrankung (Pohl, Alper et al. 2016), nach, während diese bei adulten MS-Patienten nur selten detektierbar waren (O'Connor, McLaughlin et al. 2007). Dieser Befund konnte bei ADEM-Patienten durch verschiedene Arbeitsgruppen bestätigt werden (Brilot, Dale et al. 2009, Probstel, Dornmair et al. 2011). Zudem wurden anti-MOG Antikörper mittels zellbasierter Verfahren unter anderem bei Patienten mit APQ-4-negativer NMOSE (Kitley, Woodhall et al. 2012, Probstel, Rudolf et al. 2015) und bei einer Subgruppe adulter MS-Patienten mit schwerer Rückenmarks- und Hirnstammbeteiligung (Spadaro, Gerdes et al. 2016) nachgewiesen.

Humane anti-MOG Autoantikörper besitzen meist den Komplement-bindenden IgG1-Isotyp und sind in hohen Konzentrationen zur komplementvermittelten Zytotoxizität *in vitro* fähig (Mader, Gredler et al. 2011, Peschl, Schanda et al. 2017). Zudem führen sie im Tiermodell zusammen mit Myelin-spezifischen T-Zellen zu einer Demyelinisierung und Komplementaktivierung (Spadaro, Winklmeier et al. 2018).

2.3.2 Aquaporin-4 (AQP-4)

AQP-4 ist ein Wasserkanalprotein, welches auf der Oberfläche von Astrozyten (insbesondere im Bereich der Fußfortsätze), jedoch auch in extrazerebralen Organen lokalisiert ist (Lennon, Kryzer et al. 2005, Jarius, Paul et al. 2008). Bezüglich seines Expressionsmusters innerhalb des ZNS bestehen lokale Unterschiede, wobei - entsprechend der Klinik und Histopathologie der NMOSE - die Dichte des Proteins im Bereich des Nervus opticus und Rückenmarks besonders hoch ist (Matiello, Schaefer-Klein et al. 2013). Die Läsionen zeichnen sich durch eine Zerstörung von Astrozyten bei gleichzeitiger Ablagerung von Komplement und Antikörpern aus (Roemer, Parisi et al. 2007). Das Ausmaß der komplementvermittelten Lyse durch anti-AQP-4 Autoantikörper (hauptsächlich IgG1) *in vitro* korreliert dabei mit der Prognose (Hinson, McKeon et al. 2009). Bezüglich der Ursache der Demyelinisierung wird unter anderem ein sekundäres Phänomen infolge der Zerstörung von Astrozyten (Astrozytopathie) angenommen (Weber, Derfuss et al. 2018), denen regulative Funktionen im Rahmen der Myelinisierung zugeschrieben werden (Sorensen, Moffat et al. 2008).

2.3.3 Andere Kandidaten-Autoantigene

Im Jahre 2009 wurden bei MS-Patienten Antikörper und T-Zellen detektiert, die sich gegen das juxtapanodale lokalisierte (Traka, Dupree et al. 2002), axogliale Protein Contactin-2 richten (Derfuss, Parikh et al. 2009). Während Contactin-2-spezifische T-Zellen im EAE-Modell eine Pathologie der grauen und weißen Substanz induzierten, wiesen anti-Contactin-2 Antikörper im Tierversuch keine pathogenen Eigenschaften auf (Derfuss, Parikh et al. 2009). Eine fehlende Zugänglichkeit des Antigens wird als Ursache angenommen (Derfuss, Parikh et al. 2009).

Mit dem Chloridkanal-Protein Anoctamin-2 (ANO2) wurde im Jahre 2013 anhand eines Antigen-*Microarrays* eine neue Zielstruktur von Autoantikörpern bei MS-Patienten identifiziert (Ayoglu, Haggmark et al. 2013). ANO2 wird unter anderem von Neuronen und Gliazellen des Hippocampus und Cortex exprimiert, im Bereich von MS-Läsionen ist die Expression des Proteins erhöht (Ayoglu, Mitsios et al. 2016). Im Jahre 2019 wiesen Tengvall et al. eine Kreuzreaktivität von anti-ANO2 Antikörpern zu dem in seiner Sequenz dem Protein ANO2 ähnelnden *Ebstein Barr nuclear antigen 1* (EBNA-1) nach (Tengvall, Huang et al. 2019). Daraus ergibt sich die interessante Hypothese der Autoren, dass eine EBV-Infektion über den Mechanismus des molekularen *Mimikry*s zur Entstehung ZNS-gerichteter anti-ANO2 Autoantikörper führen könnte (Tengvall, Huang et al. 2019).

Bei dem Flotillin-1/2 Heterokomplex handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes Membranprotein, welches unter anderem an der axonalen Regeneration beteiligt ist (Zhao, Zhang et al. 2011, Hahn, Trendelenburg et al. 2017). Im Jahre 2017 wurden durch Hahn et al. bei 1-2 % der Patienten mit *bona fide* MS anti-Flotillin-1/2 Antikörper nachgewiesen (Hahn, Trendelenburg et al. 2017). Bislang ist nicht geklärt, ob diese Antikörper auch eine pathogene Bedeutung haben (Hahn, Trendelenburg et al. 2017). Eine komplementvermittelte Pathogenität ist aufgrund des IgG1-Isotyps der Antikörper denkbar (Hahn, Trendelenburg et al. 2017).

Das Wissen über die Zielantigene und Eigenschaften von Autoantikörpern trägt maßgeblich zu unserem Verständnis der Pathogenese chronisch-entzündlicher ZNS-Erkrankungen bei, weshalb die Identifizierung neuer ZNS-Antigene im Bereich der grauen und weißen Substanz von großem Interesse ist. Ein neues, potenzielles ZNS-Antigen ist das Protein OMGP, dessen Struktur, Lokalisation und Funktion im Folgenden erläutert wird.

2.4 Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein (OMGP)

2.4.1 Struktur

OMGP ist ein aus 440 Aminosäuren (UNIPROT, P23515) bestehendes Glykoprotein, dessen genetischer Bauplan auf einem Intron des Neurofibromin-1-Gens lokalisiert ist (Habib, Gulcher et al. 1998). Anhand von strukturellen Analysen des reifen Proteins konnten die vier Domänen *cysteine-rich domain*, *leucin-rich-repeat-domain*, *serine/threonine-rich domain* und GPI identifiziert werden (Vourc'h and Andres 2004). Zusätzlich kann das Protein das HNK-1-Epitop aufweisen (HNK-1 = *human natural killer-1*), welches unter anderem als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül fungiert (Mikol, Gulcher et al. 1990).

Zusammen mit seinem GPI-Anker, der das Protein in die äußere Plasmamembran integriert, weist OMGP ein Molekulargewicht von 120 kDa auf (Vourc'h and Andres 2004). Dabei tragen O-verlinkte (30 kDa) (Vourc'h and Andres 2004) und N-verlinkte (25 kDa) (Mikol and Stefansson 1988) Zuckerketten fast die Hälfte zu dieser Masse bei. OMGP kann durch das Enzym Phospholipase C geschnitten werden, wobei das verbleibende lösliche Protein ein Molekulargewicht von 105 kDa aufweist (Mikol, Alexakos et al. 1990).

2.4.2 Lokalisation und Funktion

Der erstmalige und namensgebende Nachweis des Proteins auf humanen Oligodendrozyten der weißen ZNS-Substanz und auf kultivierten Oligodendrozyten des Schafs erfolgte im Jahre 1988 (Mikol and Stefansson 1988). Zudem wurde OMGP auf zentralen Neuronen detektiert (Habib, Marton et al. 1998). Zusammen mit den Proteinen MAG (Domeniconi, Cao et al. 2002) und Nogo (Chen, Huber et al. 2000) gehört OMGP einer Gruppe Myelin-assoziiierter Proteine an, die unter anderem durch Bindung an den Nogo-Rezeptor (Kottis, Thibault et al. 2002, Wang, Koprivica et al. 2002) und den *paired immunoglobulin-like receptor* (Atwal, Pinkston-Gosse et al. 2008) das Neuritenwachstum nach einer ZNS-Verletzung inhibieren. Eine besondere Rolle spielt dabei vermutlich die Spezies-übergreifend hoch konservierte (Vourc'h and Andres 2004) *leucin-rich-repeat-domain* des Proteins (Wang, Koprivica et al. 2002, Vourc'h, Moreau et al. 2003). Die Bedeutung von OMGP in der Myelinisierung und axoglialen Kommunikation ist nicht abschließend geklärt: Während frühere Studien eine Abhängigkeit der (para-)nodalen Architektur von der Intaktheit des Proteins nachwiesen (Huang, Phillips et al. 2005, Nie, Ma et al. 2006), konnte dies in einer weiteren Arbeit nicht bestätigt werden (Chang, Susuki et al. 2010).

Seine Lokalisation auf der Oberfläche zentraler Neuronen und Oligodendrozyten macht OMGP zu einem interessanten Zielantigen für Autoantikörper.

2.5 Fragestellungen und Zielsetzungen

Diese Arbeit basiert auf der vorausgehenden Detektion humaner Autoantikörper gegen das auf Neuronen und Oligodendrozyten exprimierte Protein OMGP durch die PhD-Studentin Ramona Gerhards (AG Meinel) und nahm sich zum Ziel, die antikörpervermittelte Autoimmunität gegen OMGP weiter zu charakterisieren. In Zusammenarbeit mit dem Helmholtz-Zentrum München wurden hierfür 133 Hybridom-Überstände durch Immunisierung von Mäusen und Ratten mit dem Protein hOMGP oder dem rOMG-Peptid hergestellt. Ausgehend davon wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation sechs Ziele gesetzt:

- 1) Identifizierung und Auswahl geeigneter monoklonaler anti-OMGP Antikörper aus 133 Hybridom-Überständen anhand der Messung ihrer hOMGP-Reaktivität im zellbasierten Assay
- 2) Bestimmung der Kreuzreaktivität gegenüber rOMGP und mOMGP für weitere *in vitro* und *in vivo* Versuche
- 3) Weitere Charakterisierung der OMGP-Reaktivität der ausgewählten mAK anhand von Verdünnungsreihen im ELISA und zellbasierten Assay
- 4) Untersuchung des Effekts der Deglykosylierung des Proteins hOMGP auf die Reaktivität der monoklonalen anti-OMGP Antikörper
- 5) Ermittlung der Reaktivität der ausgewählten mAK gegenüber nativen murinen Oligodendrozyten zu verschiedenen Reifungsstadien in der Immunzytochemie
- 6) Untersuchung des Effekts monoklonaler anti-OMGP Antikörper in Verbindung mit Komplement auf die Viabilität muriner OPCs *in vitro*

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Tabelle 3-1: Geräte

Gerät	Modell	Quelle
Blotkammer	---	AG Meinl
Brutschrank	Galaxy® 170 S	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Durchflusszytometer	BD FACSVerser™ 8 color Flow Cytometer	Becton, Dickinson and Company (San Jose, CA, USA)
ELISA-Gerät	Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2™ Microplate Reader	Global Medical Instrumentation Inc. (Ramsey, MN, USA)
Gel-Elektrophorese	XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Hood	FlowSafe® B-[MaxPro]²-160	Berner International GmbH (Elmshorn, D)
Laser-Scan-Mikroskop	LSM 700	Carl Zeiss AG (Oberkochen, DE)
Lichtmikroskop	Wilovert®	Helmut Hund GmbH (Wetzlar, DE)
Luminometer	GloMax®-Multi+Microplate Multimode Reader	Promega Corporation (Madison, WI, USA)
Neubauerzählkammer	Neubauer improved Bright Line	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda Königshofen, DE)
pH-Meter	WTW Tisch-pH-Meter pH 521	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, WTW (Weilheim, DE)
Plattformschüttler	Sarstedt TPM-2 Schüttler	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Proteinaufreinigungssystem	ÄKTA™ start	GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, SWE)
Spectrophotometer	NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Tangentialfluss-filtrationssystem	Minimate™ TFF System Masterflex® P/S	Pall Corporation (Port Washington, NY, USA) Thermo Fisher Scientific Inc.
Vortexer	Vortex-Genie™ 2	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, NY, USA)
Western Blot Imaging System	Odyssey® Fc Imaging System	LI-COR Biosciences (NE, USA)
Zentrifugen	Centrifuge 5417R, 5424 R Multifuge 3 S-R Megafuge 1.0 R	Eppendorf AG Thermo Fisher Scientific Inc. Thermo Fisher Scientific Inc.

3.1.2 Reagenzien, Puffer und Gele

Tabelle 3-2: Reagenzien, Puffer und Gele

Produkt	Hersteller / Katalognummer
cOmplete™ ULTRA Tablets, glass vials Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, DE) / 05892988001
Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye	Thermo Fisher Scientific Inc. / 20279
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Mounting Medium	bereitgestellt durch AG Kuhlmann
ECL™ Blotting Reagents	GE Healthcare / RPN2109
ECL™ Prime Western Blotting System	GE Healthcare / RPN2232
Eisessig	Honeywell International Inc. (Morristown, NJ, USA) / 33209
HisTrap™ Säulen	GE Healthcare / 17-5247-01
Imidazol	Carl Roth GmbH + Co. KG / X998.4
Kanamycin	bereitgestellt durch AG Meinel
Kaninchen-Komplement	Cedarlane (Burlington, Ontario, Canada) / CL3111
Magermilchpulver	Spinnrad GmbH
Methanol	Merck KGaA (Darmstadt, DE) / 106009
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG / 9265
Natrium-Deoxycholat	Merck / 106504
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat NP-40 (10 %)	Merck / 106346
NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 15-well	New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main, DE) / B2704-S
NuPAGE™ lithium dodecyl sulfate (LDS) Sample Buffer (4X)	Thermo Fisher Scientific Inc. / NP0007
NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific Inc. / NP0001
NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X)	Thermo Fisher Scientific Inc. / NP0009
NuPAGE™ Transfer Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific Inc. / NP0006
Polyetherimid	bereitgestellt durch AG Meinel
Parafolmaldehyd (PFA), 4 % in PBS	bereitgestellt durch AG Kuhlmann
Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4	Thermo Fisher Scientific / 10010015
Propidiumiodid (PI)	Sigma Aldrich / P4864
Schwefelsäure Supra-Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG / HN52.2
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG / 4360.1
Streptavidin (Alexa Fluor® 647-konjugiert)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA) / 016-600- 084
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich (St, Louis, MO, USA) / T8665
Triton X-100 (0.5 % in PBS)	bereitgestellt durch AG Kuhlmann
Trizma® base	Sigma-Aldrich / T1503
Tunicamycin	Sigma-Aldrich / T7765
Tween 20	Bio-Rad Laboratories GmbH / 1706531
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Thermo Fisher Scientific Inc. / 10977035

<p>Auftragspuffer SDS-Gel, nicht reduzierend 25 % LDS-Probenpuffer in H₂O</p>	<p>Auftragspuffer SDS-Gel, reduzierend 25 % LDS-Probenpuffer 10 % reduzierendes Agens in H₂O</p>
<p>Coomassie-Entfärber 50 % Methanol 7 % Eisessig in H₂O</p>	<p>Coomassie-Färbelösung 0.1 % Coomassie Brilliant Blue G250 50 % Methanol 7 % Eisessig in H₂O</p>
<p>Coomassie-Fixierlösung 7 % Eisessig in H₂O</p>	<p>Dialyse-Puffer (pH = 7.5) 0.5 M NaCl 20 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O 10 mM Imidazol</p>
<p>ELISA Blocking-Puffer 3 % bovines Serumalbumin (BSA) in 1x PBS</p>	<p>ELISA Coating-Puffer 15 mM Na₂CO₃ 35 mM NaHCO₃ 3 mM NaN₃</p>
<p>ELISA Inkubations-Puffer 0.5 % BSA in 1x PBS</p>	<p>Elutions-Puffer (pH = 7.5) 0.5 M NaCl 20 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O 1 M Imidazol</p>
<p>FACS-Puffer 1 % FCS in 1x PBS</p>	<p>Lysogeny broth (LB) medium 5 g Bacto Tryptone 2.5 g Bacto Yeast Extract 5 g NaCl 500 ml H₂O</p>
<p>PBS (pH = 7.4) 130 mM NaCl 3.5 mM Na₂HPO₄ 1.5 mM NaH₂PO₄ x H₂O</p>	<p>PBST 0.05 % Tween in 1x PBS</p>
<p>Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) Puffer (pH = 8) 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.5 % Natrium-Deoxycholat, 50 mM Tris, 0.1 % SDS in 50 ml H₂O</p>	

3.1.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Tabelle 3-3: Medien und Lösungen für die Zellkultur

Produkt	Hersteller / Katalognummer
Bacto™ TC Lactalbumin Hydrolysat	Becton, Dickinson and Company / 259962
Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)	Peprtech (Hamburg, DE) / 450-13
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich / D8418
Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich / D5796
Fetal calf serum (FCS)	Merck / S0615
Freestyle™ 293 Expressionsmedium	Thermo Fisher Scientific Inc. / 12338018
Geneticin	Thermo Fisher Scientific Inc. / 10131035
Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific Inc. / 11668019
Neurotrophin-3 (NT3)	Peprtech / 450-03
Opti-MEM™ Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific Inc. / 31985062
OptiPRO™ Serum Free Medium	Thermo Fisher Scientific Inc. / 12309019
Platelet-derived growth factor AA (PDGF-AA)	Peprtech / 100-13A
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc. / 15140122
Pluronic™ F-68 Non-ionic Surfactant	Thermo Fisher Scientific Inc. / 24040032
Poly-L-lysine (PLL) hydrobromide	Sigma-Aldrich / P6282
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences, Inc. (PA, USA) / 23966
Trypsin-Ethylendiamintetraacetat Lösung 1X	Sigma-Aldrich / 59417C

<p>DMEM 10 % FCS 1 % Penicillin-Streptomycin in DMEM</p>	<p>Einfrriermedium 10 % DMSO in FCS</p>
<p>HEK-EBNA-Medium Freestyle™ Medium 0.1 % Pluronic™ 25 µg Geneticin</p>	<p>OPC-Sato-Medium 400 ml DMEM high glucose with Glutamax 8 ml B27 supplement (50x) 4 ml OPC-Sato stock (100x) 4 ml Penicillin-Streptomycin-Glutamin stock (100x) 4 ml N-acetyl-cysteine stock (100x) 400 µl Insulin stock (5 mg/ml, 1000x) 400 µl Spurenelement B (1000x) 40 µl Biotin stock (10000x) 40 µl Forscolin stock</p>
<p>Trypanblau 0.05 % Trypanblau in 1x PBS</p>	

3.1.4 Zelllinien

Tabelle 3-4: Zelllinien

Zellart	Quelle
HEK293-EBNA1	Dr. Dieter E. Jenne (Perera, Wiesmuller et al. 2013)
HEK-293S-GnT-I	ATCC® CRL-3022™ / VA, USA
HeLa	AG Meinel
Murine OPCs und Oligodendrozyten	AG Kuhlmann

Erklärung der in dieser Tabelle verwendeten Abkürzungen: HEK = human embryonic kidney; GnT-I = N-Acetylglucosaminyltransferase I; HeLa = Henrietta Lacks

3.1.5 Plasmide

Tabelle 3-5: Plasmide

Name	Vektor	Insert	Expression	Quelle	Erklärungen
pEGFP	pEGFP-N1	/	Zelloberfläche	AG Meinel	---
pEGFP-hOMGP-TM	pEGFP-N1	CD80-hOMGP	Zelloberfläche, transmembran verankert	AG Meinel	---
pEGFP-hOMGP-GPI	pEGFP-N1	T2A-hOMGP-GPI	Zelloberfläche, GPI-verankert	AG Meinel	T2A-Sequenz führt über <i>ribosome skipping</i> zur Entstehung zweier getrennter Proteine: OMGP (über GPI-Anker auf Zelloberfläche); EGFP (im Zellinneren)
pEGFP-mOMGP-GPI	pEGFP-N1	T2A-mOMGP-GPI	Zelloberfläche, GPI-verankert	AG Meinel	siehe pEGFP-hOMGP-GPI
pEGFP-rOMGP-GPI	pEGFP-N1	T2A-rOMGP-GPI	Zelloberfläche, GPI-verankert	AG Meinel	siehe pEGFP-hOMGP-GPI
pTT5-hOMGP-Avi-His	PTT5	hOMGP-GPI	löslich	AG Meinel	---

Erklärung der in dieser Tabelle verwendeten Abkürzungen: EGFP = enhanced green fluorescent protein; T2A = thosea asigna virus 2A; His = histidine tag

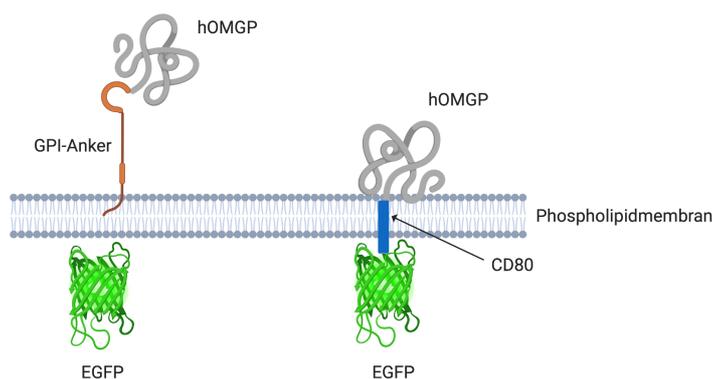


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide pEGFP-hOMGP-TM und pEGFP-hOMGP-GPI

Für die Evaluierung der hOMGP-Reaktivität anhand des zellbasierten Assays wurden zwei unterschiedliche Konstrukte zur Transfektion der HeLa-Zellen verwendet und miteinander verglichen: Zellen, die mit pEGFP-hOMGP-GPI transfiziert worden sind, exprimieren hOMGP (grau) infolge des durch die T2A-Sequenz induzierten ribosome skippings über einen GPI-Anker (orange) auf der Zelloberfläche, während EGFP (grün) im Zellinneren exprimiert wird. hOMGP als Fusionsprotein mit dem transmembranären Anteil des Typ-I-Membranproteins CD80 (blau) hingegen ist auf pEGFP-hOMGP-TM-transfizierten Zellen transmembran verankert. Diese Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

3.1.6 Proteine und Peptide

Tabelle 3-6: Proteine und Peptide

Name	Beschreibung	Expressionssystem	Quelle
rOMG-Peptid	C-ETTANVKTQPPS	synthetisch hergestellt	Peps4LS GmbH (Heidelberg, DE)
mOMGP	rekombinantes mOMGP	murine Myeloma-Zelllinie	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) / 1674-MG-025
hOMGP	rekombinantes hOMGP	HEK293-EBNA1-Zellen	AG Meinl

3.1.7 Kit-Systeme

Tabelle 3-7: Kit-Systeme

Kits	Quelle / Katalognummer
HiSpeed® Plasmid Midi und Maxi Kit	Qiagen / 12643 und 12663
IgG (Total) Rat uncoated ELISA kit	Thermo Fisher Scientific Inc. / 88-50490
IgG (Total) Mouse uncoated ELISA kit	Thermo Fisher Scientific Inc. / 88-50400
Pierce™ bicinchoninic acid (BCA) Protein-Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. / 23227
Peptide:N-glycosidase F (PNGase F)	New England Biolabs GmbH / P0704L
BirA Biotin-Protein Ligase Kit	Avidity
Protein Deglycosylation Mix	New England Biolabs GmbH / P6039S
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega Corporation / G7570

3.1.8 Antikörper

Tabelle 3-8: Antikörper

Spezifität	Konjugat	Klon	Spezies, Isotyp	Quelle / Katalognummer
HNK-1	---	monoklonal (VC 1.1)	Maus, IgM	Sigma-Aldrich / C6680
mOMGP, hOMGP (35 % Kreuz- reaktivität)	---	polyklonal	Ziege, IgG	R&D Systems / AF1674
hOMG, mOMGP	---	monoklonal (240527)	Ratte, IgG1	R&D Systems / MAB1674
Ziege IgG	Biotin	polyklonal	Esel, IgG	Jackson ImmunoResearch / 705-065-003
Maus IgM	Biotin	polyklonal	Ziege, IgM	Jackson ImmunoResearch / 115-067-020
Ratte IgG	Biotin	polyklonal	Ziege, IgG	Jackson ImmunoResearch / 112-065-062
Human IgG	Biotin	polyklonal	Ziege, IgG	Jackson ImmunoResearch / 109-066-098
Ratte IgG	Alexa Fluor® 647	polyklonal	Maus, IgG	Jackson ImmunoResearch / 212-605-082
Maus IgG	Alexa Fluor® 647	polyklonal	Ratte, IgG	Jackson ImmunoResearch / 415-605-166
Maus IgM	HRP	polyklonal	Ziege, IgG	Jackson ImmunoResearch / 115-035-075
GFP	HRP	polyklonal	Ziege	Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA) / MB-0712
Ratte IgG	HRP	polyklonal	Ziege, IgG	Jackson ImmunoResearch / 112-035-175
Ziege IgG	HRP	polyklonal	Esel, IgG	Jackson ImmunoResearch / 705-035-003
Ratte IgG	HRP	polyklonal	Ziege IgG	Jackson ImmunoResearch / 112-035-003
Maus IgG	HRP	polyklonal	Ziege, IgG	Jackson ImmunoResearch 115-036-072
Maus/Ratte MBP	---	polyklonal	Kaninchen, IgG	Abcam (Cambridge, UK) / ab40390
O4	---	monoklonal (O4)	Maus, IgM	R&D Systems / MAB1326
unbekannt	---	monoklonal (A95-1)	Ratte, IgG2B	Becton, Dickinson and Company / 556968
unbekannt	---	monoklonal (MCP-11)	Maus, IgG2B	Becton, Dickinson and Company / 559530
unbekannt	---	monoklonal (G155-178)	Maus, IgG2A	Becton, Dickinson and Company / 554645
unbekannt	---	monoklonal (R35-95)	Ratte, IgG2A	Becton, Dickinson and Company / 553926

Spezifität	Konjugat	Klon	Spezies, Isotyp	Quelle / Katalognummer
unbekannt	---	polyklonal	Kaninchen, IgG	Abcam / ab37415
unbekannt	---	polyklonal	Ziege, IgG	R&D Systems / AB-108-C
Maus IgG	Alexa Fluor® 488	polyklonal	Esel, IgG	Thermo Fisher Scientific Inc. / A-21202
Maus IgG + IgM	Alexa Fluor® 488	polyklonal	Ziege, IgG	Jackson ImmunoResearch / 115-545-044
Ratte IgG	Alexa Fluor® 594	polyklonal	Ziege, IgG	Thermo Fisher Scientific Inc. / A-11007
Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 488	polyklonal	Ziege, IgG	Thermo Fisher Scientific Inc. / A-11008
Maus IgG	Cy3	polyklonal	Ziege, IgG	Jackson ImmunoResearch / 115-165-062
Ziege IgG	Alexa Fluor® 594	polyklonal	Esel, IgG	Thermo Fisher Scientific Inc. / A-11058
Ziege IgG	Alexa Fluor® 488	polyklonal	Esel, IgG	Thermo Fisher Scientific Inc. / A-11055

Erklärung der in dieser Tabelle verwendeten Abkürzungen: Ig = Immunglobulin; HRP = horseradish peroxidase; Cy3 = Cyaninfarbstoff 3

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3-9: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller / Katalognummer
Amicon Ultra-15, PLQK Ultracel-PL Membran, 50 kDa	Merck / UFC905024
Dialyse-Schläuche	Carl Roth GmbH + Co. KG
ELISA-Platten - Polystyrol-beschichtet, 96-well - Streptavidin-beschichtet, 96-well	Thermo Fisher Scientific Inc. / 442404 Thermo Fisher Scientific Inc. / 436014
Falcons (50 ml, 15 ml)	Corning, Inc. (NY, USA) / 352070, 352096
Kryokonservierungsröhrchen (2 ml)	Kisker Biotech GmbH & Co. KG (Steinfurt, DE) / 390708
Millipore® Stericup® filter units	Sigma-Aldrich / Z660507
Nunc™ MicroWell™ 96-well Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific Inc. / 243656
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Kisker Biotech GmbH & Co. KG / 713110 - 713112
Safe-Lock Tubes (1,5 ml)	Eppendorf AG / 0030120086
Zellkulturflaschen (175 cm ² , 75 cm ²)	Corning, Inc. / 353118, 353136
Zellkultur-Platten (100 mm, 60 mm)	Corning, Inc. / 353003, 353004

3.2 Methoden

3.2.1 Generierung monoklonaler anti-OMGP Antikörper

Die Generierung monoklonaler anti-OMGP Antikörper erfolgte durch die Mitarbeitenden der *Monoclonal Antibody Core Facility* des Helmholtz-Zentrums München (Leiterin: Dr. Regina Feederle) nach der Hybridom-Technik. Diese Technik wurde durch die Wissenschaftler Georges J.F. Köhler (1946-1995) und César Milstein (1927-2002) entwickelt (Kohler and Milstein 1975), wofür diese 1984 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet wurden. Für ausführliche methodische Angaben sei auf die Veröffentlichungen der *Monoclonal Antibody Core Facility* verwiesen (Lichtmannegger, Leitzinger et al. 2016, Simons, Mohrluder et al. 2019). Die wichtigsten Grundprinzipien werden im Folgenden zusammengefasst.

Zunächst erfolgte die Immunisierung von Mäusen und Ratten mit dem rekombinanten Protein hOMGP, welches durch die PhD-Studentin Ramona Gerhards (AG Meinl) hergestellt worden war. Alternativ wurde bei einem Teil der Tiere das kommerziell erworbene rOMG-Peptid zur Immunisierung verwendet. Insgesamt wurden 71 % der Tiere mit hOMGP und 29 % mit dem rOMG-Peptid immunisiert (*Abbildung 3-3*). Nach sechs Wochen fand eine erneute *Boost*-Injektion statt. Im nächsten Schritt wurden die Splenozyten der Tiere extrahiert und mit der murinen Myeloma-Zelllinie P3X63-Ag8.653 fusioniert. Die Überstände der Zellkulturen wurden im ELISA auf IgG-Antikörper gegen hOMGP oder rOMG-Peptid getestet, wobei positive Hybridoma-Kandidaten weiter expandiert wurden.

Schließlich wurden 133, im ELISA positiv auf hOMGP und/oder rOMG-Peptid getestete Hybridom-Überstände als Vorkulturen der AG Meinl zur weiteren Testung übergeben. Eine Übersicht über die Verteilung der Spezies und Isotypen der 133 Überstände wird in *Abbildung 3-3* dargestellt. Anhand der Ergebnisse des durchflusszytometrischen Screenings (siehe *Kapitel 4.2*), welches Inhalt dieser Arbeit ist, erfolgte die Auswahl von vier Hybridom-Überständen. Die Subklonierung der entsprechenden Hybridoma-Zelllinien sowie die Aufreinigung der mAK mittels Protein-G-Chromatografie wurde wiederum in Kooperation mit dem *Monoclonal Antibody Core Facility* durchgeführt. Die beschriebenen Schritte der Generierung monoklonaler anti-OMGP Antikörper sind zusammenfassend in *Abbildung 3-2* dargestellt.

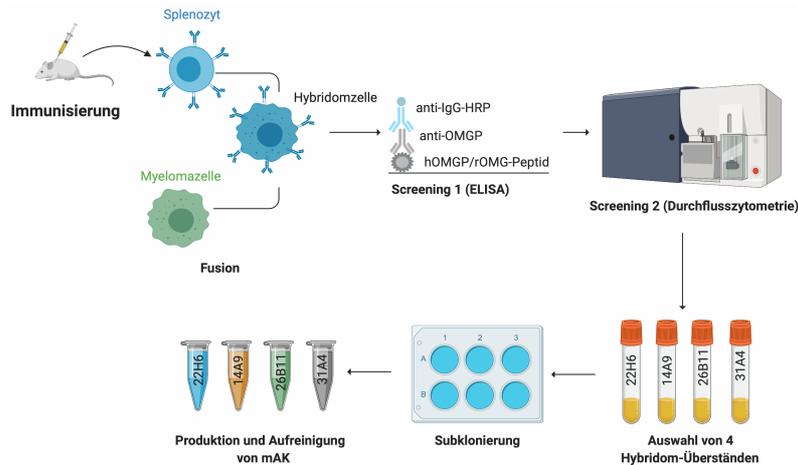


Abbildung 3-2: Generierung monoklonaler anti-OMGP Antikörper

In Kooperation mit der Monoclonal Antibody Core Facility des Helmholtz-Zentrums München wurden für diese Arbeit monoklonale anti-OMGP Antikörper mithilfe der Hybridomtechnik hergestellt. Nach Immunisierung von Ratten und Mäusen mit hOMGP respektive rOMG-Peptid wurden den Tieren Splenozyten entnommen und diese mit einer murinen Myeloma-Zelllinie fusioniert, wodurch Hybridomzellen entstanden. Anhand eines ELISA-Tests wurden 133 hOMGP- und/oder rOMG-Peptid-positive Überstände ausgewählt und der AG Meinel zur Testung übergeben. Die weitere Validierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie und ist Teil dieser Arbeit. Schließlich wurden vier Hybridom-Überstände (Hybridom-ÜS) ausgewählt. Die Subklonierung der entsprechenden Klone und die Aufreinigung der mAK erfolgte in Kooperation mit der Monoclonal Antibody Core Facility. Diese Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

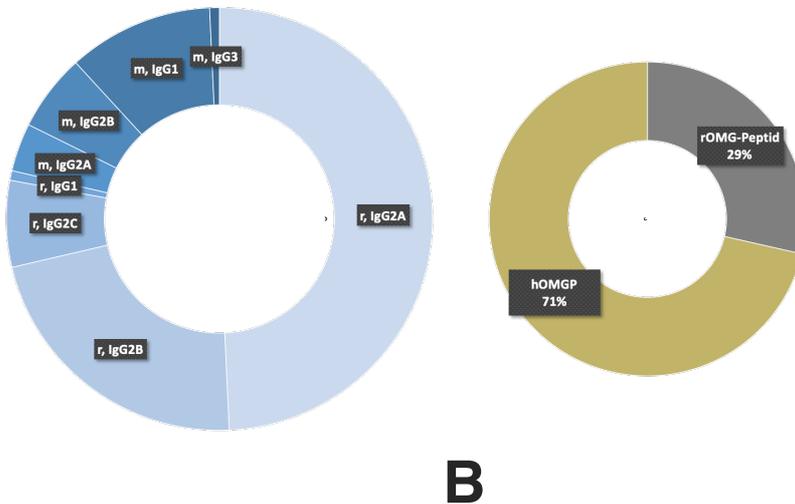


Abbildung 3-3: Eigenschaften der Hybridom-Überstände

133 Hybridom-Überstände wurden in Kooperation mit der Monoclonal Antibody Core Facility des Helmholtz-Zentrums München generiert (siehe Abbildung 2-2), deren OMGP-Reaktivität (hOMGP, mOMGP, rOMGP) im Rahmen dieser Arbeit durchflusszytometrisch untersucht wurde. **(A) Verteilung der Spezies und Isotypen der 133 Hybridom-Überstände:** Insgesamt wurden $n=106$ Überstände aus Ratten (r ; IgG2A $n=67$, IgG2B $n=30$, IgG2C $n=9$, IgG1 $n=1$) und $n=27$ Überstände aus Mäusen (m ; IgG2A $n=5$, IgG2B $n=8$, IgG1 $n=15$, IgG3 $n=1$) generiert. **(B) Übersicht über die Art der Immunisierung:** Bei 71 % der Tiere wurde rekombinantes hOMGP (in Oliv) zur Immunisierung verwendet, während 29 % mit dem rOMG-Peptid (in Grau) immunisiert wurden.

3.2.2 Herstellung von Plasmid-DNA

3.2.2.1 Hitzeschock-Transformation

Für die Transformation von Plasmid-DNA (DNA = *deoxyribonucleic acid*) in Bakterienzellen wurde die Hitzeschock-Methode verwendet. Hierbei wurden 50 μ l kommerzielle DH5-alpha E. coli Bakterien (*New England Biolabs*) zusammen mit 1-2 μ l Plasmid-DNA (200 ng/ μ l) in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und dieses für 20 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die DNA-Bakterien-Suspension für 90 s bei 42 °C in einem Hitzeblock inkubiert, um die Plasmid-DNA in das bakterielle Genom einzubringen. Nach einer weiteren fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden 200-250 μ l LB-Medium hinzugegeben und das Gefäß zur Regeneration der E. coli Bakterien für 30 min bei 37 °C bebrütet. Im nächsten Schritt wurden 150 μ l der transformierten Zellen entnommen, zusammen mit 50 μ g/ml Kanamycin und 200 ml LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben überführt und über Nacht bei 37 °C im Zellkulturschüttler inkubiert.

3.2.2.2 Midi-/Maxi-Präparation

Die Midi-/Maxi-Präparation erfolgte unter Verwendung des *HiSpeed® Plasmid Midi/Maxi Kits* nach Protokoll des Herstellers. Für die anschließende Quantifizierung der DNA-Menge wurde ein Spektralphotometer verwendet. Die hergestellte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C eingefroren.

3.2.3 Zellkultur

3.2.3.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Teil der Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt (1:2-1:10), einem Farbstoff, der als Indikator für die Zellviabilität dient, indem er lediglich in das Zytosol abgestorbener Zellen durch deren perforierte Zellmembran eindringen kann. Die Zählung der Zellen erfolgte in der Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop.

3.2.3.2 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die dauerhafte Lagerung von HeLa-Zellen erfolgte bei -80 °C. Zum Auftauen der Zellen wurden diese auf 37 °C erwärmt, anschließend erfolgte eine Verdünnung in 5 ml DMEM. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in frischem DMEM aufgenommen und die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche

transferiert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 10 % in Zellkulturflaschen mit einer Adhäsionsfläche von 75 oder 175 cm² kultiviert. Um eine Konfluenz der Zellen von über 95 % zu vermeiden, wurden diese im Abstand von zwei bis drei Tagen *gesplittet*. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und nach einer fünfminütigen Inkubation mit Trypsinlösung unter leichtem Beklopfen des Flaschenbodens von der Oberfläche abgelöst. Die proteolytische Wirkung des Trypsins wurde nachfolgend durch das Hinzugeben von 5 ml DMEM gestoppt, da das im Medium enthaltene FCS kompetitiv an das Enzym bindet und hierdurch dessen Aktivität inhibiert. Schließlich wurden 0.5-1 ml der Zellsuspension in einer neuen Flasche mit frischem Medium verdünnt.

Um HeLa-Zellen auszusäen, wurden diese analog zum *Splitting* zunächst gewaschen und durch Trypsinierung von der Oberfläche abgelöst. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 400 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml frischem DMEM aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen erneut in DMEM verdünnt, um die gewünschte Konzentration zu erhalten, und in einer Konzentration von 2-2.5 x 10⁵ Zellen/ml auf Zellkulturplatten (60 mm oder 100 mm) ausgesät.

Zum Einfrieren der Zellen wurde das Zellpellet nach Zentrifugation in Einfriermedium aufgenommen. Das im Medium enthaltene DMSO reduziert das Risiko einer zellschädigenden Eiskristall-Bildung während des Einfrierens. Die Zellsuspension wurde in ein Kryokonservierungsröhrchen transferiert und bei -80 °C gelagert - zunächst in einer isolierenden Styroporbox, um einem zu abrupten Temperaturabfall entgegen zu wirken.

3.2.3.3 Transfektion von HeLa-Zellen

Die Transfektion wurde 16-18 h nach Aussaat der Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen über 2 h bei 37 °C mit einer Transfektionslösung inkubiert, welche neben *Opti-MEM™* Medium (6.4 ml für 100 mm Platte) und der Plasmid-DNA (14 µg für 100 mm Platte) das Transfektionsreagenz *Lipofectamin®* (68 µl für 100 mm Platte) enthielt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Transfektionsmedium durch DMEM ersetzt.

3.2.3.4 Isolierung und Kultivierung muriner Oligodendrozyten

Die Isolierung und Kultivierung muriner OPCs erfolgte durch die Wissenschaftlerinnen aus der AG Prof. Tanja Kuhlmann am Institut für Neuropathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Für ausführlichere Informationen zur angewendeten Methodik sei auf die Versuchsprotokolle (Kontakt: Dr. rer. nat. Stefanie Albrecht) und Publikationen (Preisner, Albrecht et al. 2015) der AG verwiesen. Die Grundprinzipien werden im Folgenden erklärt: Zur Isolierung muriner OPCs wurde die *Immunopanning*-Methode (Emery and Dugas 2013) angewandt, deren zugrunde liegendes Prinzip die negative und positive Selektion mittels Antikörper- und Lektin-beschichteter Zellkulturplatten ist. Zusammengefasst wurden das Cerebrum und Rückenmark aus 6-9 Tage alten Mäusen extrahiert und dissoziiert. Zunächst erfolgte die Inkubation der Zellsuspension auf mit *Griffonia (Bandeireia) Simplicifolia Lectin I* (L-1100, Vector Labs) beschichteten Platten (Preisner, Albrecht et al. 2015), was der Entfernung von Mikroglia diente (Emery and Dugas 2013). Anschließend wurde der Überstand auf eine mit anti-PDGFR- α Antikörpern (135902, Biolegend; PDGFR = *platelet-derived growth factor receptor*) beschichtete Platte transferiert (Preisner, Albrecht et al. 2015), um OPCs positiv zu selektionieren (Emery and Dugas 2013).

Die verbleibenden Zellen wurden abgelöst, in eine mit PLL (1:3 in destilliertem H₂O (dH₂O)) beschichtete 75 cm² Zellkulturflasche überführt und in OPC-Sato-Medium (ergänzt durch NT3 (5 ng/ml) und PDGF-AA (10 ng/ml) (Preisner, Albrecht et al. 2015)), bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die im Rahmen dieser Methodik erreichte Reinheit der Kultur liegt bei etwa 95 % (Preisner, Albrecht et al. 2015)

3.2.3.5 Aussaat und Differenzierung muriner OPCs

Die folgenden Versuche wurden während eines Forschungsaufenthalts in Münster in Zusammenarbeit mit der AG Kuhlmann nach deren Versuchsprotokoll (Kontakt: Dr. rer. nat. Stefanie Albrecht) durchgeführt. Für die Aussaat muriner OPCs wurden die Zellen circa 7 Tage nach Isolierung einmalig mit PBS gewaschen und anschließend durch dreiminütige Trypsinierung von der Oberfläche abgelöst. Nach Abstoppen der Reaktion mit DMEM (angereichert mit 5 % *High Ovo*) wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde im nächsten Schritt in 1 ml OPC-Sato-Medium aufgenommen und die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen in OPC-Sato-Medium (entsprechend *Kapitel 3.2.3.4*) auf mit PLL (4:1 in dH₂O) beschichteten Zellkulturplatten. Die Differenzierung wurde induziert, indem 24 h nach Aussaat der OPCs das Medium abgenommen und gegen neues OPC-Sato-Medium ausgetauscht wurde, das die Wachstumsfaktoren CNTF (10 ng/ml) und NT3 (5 ng/ml) enthielt (Preisner, Albrecht et al. 2015).

3.2.3.6 Komplement-Assay: Luminometrische Bestimmung der Viabilität muriner OPCs nach Inkubation mit anti-OMGP Antikörpern und Komplement

Die folgenden Versuche wurden während eines Forschungsaufenthalts in Münster in Kooperation mit der AG Kuhlmann durchgeführt. Für die Evaluierung der Zellviabilität wurde der *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* gemäß Protokoll des Herstellers verwendet. Grundlage des Assays ist eine ATP-abhängige Luciferase-Reaktion: Die Oxygenierung von Luciferin wird in Gegenwart von ATP, Mg²⁺ und molekularem O₂ durch das Enzym Luciferase katalysiert, wodurch neben Oxy-Luciferin Licht entsteht (Crouch, Kozlowski et al. 1993). Über die luminometrische Messung lässt sich somit indirekt die Menge an ATP bestimmen und je höher die Menge an ATP, desto höher ist wiederum der Anteil metabolisch aktiver, lebender Zellen (Crouch, Kozlowski et al. 1993).

Zunächst wurden OPCs in einer Konzentration von 1.5 x 10⁴/ml (in 100 µl) auf einer 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. 24 h nach Aussaat der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden für 24 h mit einem monoklonalen anti-OMGP Antikörper (22H6, 14A9; jeweils in der Verdünnung 20 µg/ml) zusammen mit Kaninchen-Komplement (4 % oder 6 % in dH₂O) in Differenzierungsmedium (*Kapitel 3.2.3.5*) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als negative Kontrollen wurden die Isotypkontrollen der eingesetzten Antikörper in äquivalenter Konzentration zusammen mit Komplement (4 % oder 6 % in dH₂O) eingesetzt. Die einzelnen Versuchsbedingungen sind in *Tabelle 3-10* aufgelistet. Die luminometrische Messung der Zellviabilität erfolgte insgesamt 48 h nach Aussaat der Zellen. Hierfür wurden die Zellen 30 min vor der Messung bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Nachfolgend wurde 50 µl Medium aus jedem *Well* entnommen und jeweils 100 µl *Cell-Titer-Glo*-Lösung hinzugegeben. Nach einer zehnmütigen Inkubation wurden aus jedem *Well* 80 µl in eine weiße Platte umpipettiert und das Lumineszenzsignal im *Glo-Max®* Luminometer gemessen.

Tabelle 3-10: Komplement-Assay - Versuchsbedingungen

Antikörper	Kontrolle
1a 14A9 (20 µg/ml) + 4 % K	1b Isotypkontrolle (20 µg/ml) + 4 % K
1c 14A9 (20 µg/ml) + 6 % K	1d Isotypkontrolle (20 µg/ml) + 6 % K
2a 22H6 (20 µg/ml) + 4 % K	2b Isotypkontrolle (20 µg/ml) + 4 % K
2c 22H6 (20 µg/ml) + 6 % K	2d Isotypkontrolle (20 µg/ml) + 6 % K

Erklärung der in dieser Tabelle verwendeten Abkürzung: K = Komplement

3.2.4 Immunologische Methoden

3.2.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene ELISA-Techniken angewandt. Der Streptavidin-ELISA (a) wurde verwendet, um die hOMGP- und rOMG-Peptid-Reaktivität der einzelnen monoklonalen anti-OMGP Antikörper anhand von Verdünnungsreihen vergleichend zu quantifizieren und um den Effekt der Deglykosylierung von hOMGP auf die Bindung durch monoklonale anti-OMGP Antikörper zu bestimmen. Um die Menge an IgG in den subklonierten Hybridom-Überständen zu quantifizieren, wurde ein kommerziell erhältlicher IgG-ELISA (b) eingesetzt. Der *MaxiSorp*-ELISA (c) diente der Bestimmung der Reaktivität der monoklonalen anti-OMGP Antikörper gegenüber mOMGP anhand von Verdünnungsreihen.

a) Streptavidin-ELISA: Biotinyliertes, rekombinant hergestelltes hOMGP sowie biotinyliertes rOMGP-Peptid wurden in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ auf eine Streptavidin-beschichtete 96-*Well*-Platte pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden fünf Waschschriffe mit PBST durchgeführt. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit den verschiedenen monoklonalen anti-OMGP Antikörpern 22H6, 14A9, 26B11, 31A4, MAB1674 und AF1674 (Verdünnungsreihen: 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml in PBST; Experimente zur Deglykosylierung: 10 $\mu\text{g/ml}$ in PBST) respektive mit dem anti-HNK-1 Antikörper (1:500 in PBST) bei 4 °C über Nacht. Nach etwa 18 h wurde die Platte für 1 h mit einem HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper (anti-Maus-IgG-HRP, anti-Maus-IgM-HRP, anti-Ratte-IgG-HRP, anti-Ziege-IgG-HRP; jeweils 1:7000 in PBST) inkubiert. Der ELISA wurde anschließend mit 100 μl TMB pro *Well* entwickelt und die Reaktion nach 20 min mit 1 M H_2SO_4 (50 $\mu\text{l/Well}$) gestoppt.

b) IgG-ELISA: Für die quantitative IgG-Bestimmung der subklonierten Hybridom-Überstände wurden das *eBioscience Rat IgG total ELISA Ready-SET-Go! Kit* und das *eBioscience Mouse IgG total ELISA Ready-SET-Go! Kit* verwendet und gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

c) MaxiSorp-ELISA: Zunächst wurden pro *Well* 100 μl des Proteins in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ in PBS *gecoatet* und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde BSA in äquivalenter Konzentration verwendet. Anschließend wurde die Platte viermalig mit 250 μl PBST gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Blockierung mit 200 μl BSA (3 % in PBST) über 2 h bei RT. Nach vier erneuten

Waschschritten wurden die monoklonalen anti-OMGP Antikörper 22H6, 14A9, 26B11, 31A4, MAB1674 und AF1674 (jeweils in den Konzentrationen 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 10 ng/ml in 0.5 % BSA in PBST) aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert. Daran anschließend wurde die Platte erneut viermalig gewaschen und es erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem sekundären, HRP-markierten Antikörper (anti-Maus-IgG-HRP, anti-Ratte-IgG-HRP, anti-Ziege-IgG-HRP; jeweils 1:7000 in 0.5 % BSA in PBST) bei RT. Abschließend wurde die Platte über 15 min mit 100 μl TMB-Substrat pro *Well* inkubiert. Die Reaktion wurde mit jeweils 50 μl H_2SO_4 pro *Well* abgestoppt.

Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm und zusätzlich 540 nm (Hintergrund-Signal der Platte) im *Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader*. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm *Microsoft Excel* verwendet. Hierbei wurde die Differenz der beiden ODs (450-540 nm) gebildet. Für den IgG-ELISA wurde zunächst auf Basis der im Kit enthaltenen Standards eine Standardkurve erstellt, welche im nächsten Schritt zur quantitativen Bestimmung der IgG-Mengen in den Proben diente. Für den Streptavidin-ELISA und den *MaxiSorp*-ELISA wurde kein Standard verwendet, sondern die OD mit dem Hintergrundsignal (Streptavidin, BSA) verglichen.

3.2.4.2 Western Blot

Der Western Blot wurde verwendet, um das in HEK293-EBNA1-Zellen hergestellte hOMGP nachzuweisen und um den Effekt der Deglykosylierung selbigen Proteins darzustellen. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese im nächsten Schritt mithilfe der *semi-dry Electroblothing* Methode auf eine semi-trockene Membran übertragen. Grundprinzip des *Electroblottings* ist die Nutzung der negativen Ladung von Proteinen, die entlang eines senkrecht stehenden elektrischen Feldes vom kathodenseitigen Gel auf eine anodenseitige Membran wandern. En détail wurden zunächst drei *Whatman*-Papiere auf Seiten der Anode platziert. Um die Effektivität der Übertragung zu erhöhen, wurden diese zuvor in einen Transferpuffer getränkt. Auf die *Whatman*-Papiere wurde eine PVDF-Membran (PVDF = Polyvinylidenfluorid) gelegt, die ebenfalls in Transferpuffer sowie zusätzlich in Methanol eingeweicht worden war. Letzteres dient dazu, die nachteilige Hydrophobizität der Membran zu reduzieren. Auf die PVDF-Membran wurden das Gel sowie drei weitere *Whatman*-Papiere platziert. Das *Electroblothing* erfolgte über eine Zeitdauer von 90 min bei einer Spannung von 60 mA. Für die Antikörperfärbung wurde die PVDF-Membran nach dem *Electroblothing* zunächst 1 h in 5 % Milchpulver in PBST eingelegt, um eine unspezifische Antikörperbindung zu

blockieren. Es folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper (MAB1674 1:1500, anti-HNK-1 1:4000, jeweils in 5 % Milchpulver in PBST) bei 4 °C über Nacht sowie eine einstündige Inkubation mit dem HRP-markierten Sekundär-Antikörper (anti-Ratte-IgG-HRP, anti-Maus-IgM-HRP; jeweils 1:2500 in 5 % Milchpulver in PBST) bei RT. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Membran jeweils dreimal mit PBST gewaschen. Zur Entwicklung des Blots wurde *ECL™ Prime* verwendet, die Lumineszenz wurde anschließend im *Odyssey® Fc Imaging System* detektiert.

3.2.4.3 Immunzytochemische Färbung muriner OPCs und Oligodendrozyten

Die folgenden Versuche wurden im Rahmen eines Forschungsaufenthalts in Münster in Kooperation mit der AG Kuhlmann und nach deren Versuchsprotokoll (Kontakt: Dr. rer. nat. Stefanie Albrecht) durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, ob die ausgewählten monoklonalen anti-OMGP Antikörper 22H6, 14A9, 26B11 und 31A4 ihr Antigen auf murinen OPCs und/oder Oligodendrozyten binden. Um anhand der Immunfärbungen die mOMGP-Expression in Abhängigkeit von der Reifung der Zellen beurteilen zu können, wurden Zellen in drei verschiedenen Differenzierungsstadien fixiert: 1) undifferenzierte OPCs (24 h nach Aussaat), 2) OPCs nach 24 h Differenzierung, 3) reife Oligodendrozyten (48 h nach Induktion der Differenzierung). *Abbildung 3-4* veranschaulicht die ausgewählten Zeitpunkte, zu denen die OPCs respektive Oligodendrozyten fixiert wurden:

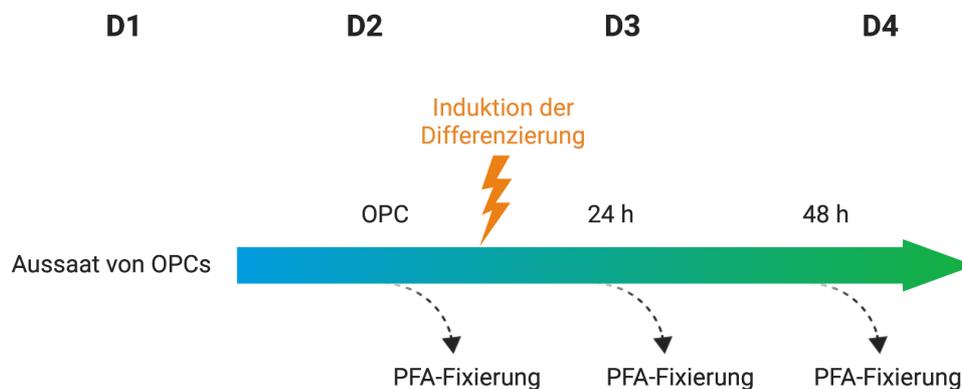


Abbildung 3-4: Versuchsaufbau für immunzytochemische Färbungen muriner Oligodendrozyten und OPCs

In dieser Arbeit wurden murine OPCs und Oligodendrozyten mit den verschiedenen anti-OMGP Antikörpern gefärbt. Hierfür wurden die Zellen in unterschiedlichen Reifungsstadien fixiert. Murine OPCs wurden an Tag 1 ausgesät, an Tag 2 erfolgte die Induktion der Differenzierung. Die Fixierung der Zellen in 4 % PFA erfolgte in drei unterschiedlichen Stadien: 1) undifferenzierte OPCs, 24 h nach Aussaat; 2) OPCs nach 24 h Differenzierung; 3) reife Oligodendrozyten (48 h nach Induktion der Differenzierung). Diese Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

Zur Fixierung der Zellen wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen, um die Zellen einmalig mit PBS zu waschen. Anschließend wurden diese für 10 min in 4 % PFA (in PBS) bei RT fixiert, danach dreimal mit PBS gewaschen und schließlich bis zur Immunfärbung (mit Parafilm) luftdicht verschlossen bei 4 °C gelagert.

Im Rahmen der Reifung von Oligodendrozyten gilt das Antigen O4 als ein früher Marker der oligodendrogialen Linie (Bansal and Pfeiffer 1989, Reynolds and Hardy 1997). Das Protein MBP hingegen ist ein etablierter Marker für Oligodendrozyten im differenzierten Stadium (Bradl and Lassmann 2010). Doppelfärbungen von undifferenzierten OPCs sowie OPCs nach 24 h Differenzierung wurden deshalb mit einem anti-O4 Antikörper durchgeführt, während für Doppelfärbungen von reifen Oligodendrozyten ein anti-MBP Antikörper verwendet wurde. Die für die anti-MBP Doppelfärbung vorgesehenen Zellen wurden zunächst mit Triton-X permeabilisiert, da MBP auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran exprimiert wird (Barbarese, Barry et al. 1988). Für die anti-O4 Doppelfärbungen wurde auf diesen Schritt verzichtet, da es sich bei O4 um ein auf der Zelloberfläche exprimiertes Antigen handelt (Schachner, Kim et al. 1981, Bansal, Warrington et al. 1989).

Die auf den Deckgläschen fixierten OPCs und Oligodendrozyten wurden mit jeweils 300 μ l FCS (5 % in PBS) bei RT geblockt. Nachfolgend wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit dem anti-OMGP Antikörper (AF1674: 5 μ g/ml, mAκ: 20-50 μ g/ml für Einzelfärbungen, 20 μ g/ml für Doppelfärbungen; jeweils in 5 % FCS in PBS) sowie für die Doppelfärbungen zusätzlich mit dem anti-O4 Antikörper oder dem anti-MBP Antikörper (jeweils 10 μ g/ml in 5 % FCS in PBS) inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die OPCs und Oligodendrozyten 1 h bei RT mit dem Sekundär-Antikörper (anti-Kaninchen-IgG-Alexa488, anti-Maus-IgG-Alexa488, anti-Maus-IgM+IgG-Alexa488, anti-Maus-IgG-Cy3, anti-Ratte-IgG-Alexa594, anti-Ziege-IgG-Alexa488, anti-Ziege-IgG-Alexa594; jeweils 10 μ g/ml) inkubiert und nachfolgend dreimal mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Deckgläschen einmalig mit dH₂O gewaschen, in 9 μ l DAPI-Medium auf dem Objektträger fixiert und bei RT getrocknet.

3.2.4.4 Zellbasierter Assay - Durchflusszytometrie

Für das Screening der Hybridom-Überstände und für die weitere Charakterisierung der neu hergestellten monoklonalen anti-OMGP Antikörper wurde ein zellbasierter Assay angewandt, der primär zur Detektion von anti-MOG Antikörpern etabliert (Spadaro and Meinl 2016) und durch die PhD-Studentin Ramona Gerhards (AG Meinl) modifiziert worden war (Gerhards, Pfeffer et al. 2020). Die Evaluierung der Antikörper-Reaktivität erfolgte mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS).

Zunächst wurden HeLa-Zellen mit dem jeweiligen Plasmid (pEGFP, pEGFP-hOMGP-TM, pEGFP-hOMGP-GPI, pEGFP-mOMGP-GPI, pEGFP-rOMGP-GPI) transient transfiziert (*Kapitel 3.2.3.3*). Nach einer Inkubation von 22-24 h wurden die Zellen mit gekühltem PBS von der Zellkultur-Platte abgelöst und in eine 96-Well-Platte (5×10^4 Zellen/Well) transferiert. Es folgten zwei Waschschrte mit FACS-Puffer, wobei die Zellen nach jedem Waschschrte jeweils für 5 min bei 400 g zentrifugiert wurden und der Überstand anschließend verworfen wurde. Im nächsten Schrit wurden die Zellen mit den primären Antikörpern (verdünnt in FACS-Puffer) resuspendiert. Für das Screening der primären Hybridom-Überstände wurden diese in einer 1:2 Verdünnung eingesetzt. Für alle weiteren Versuche wurden die monoklonalen anti-OMGP Antikörper standardgemäß in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. Die kommerziellen anti-OMGP Antikörper MAB1674 und AF1674 wurden einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. Im Rahmen der Verdünnungsreihen wurden alle Antikörper auf 10 µg/ml, 1 µg/ml, 100 ng/ml und 10 ng/ml verdünnt. Der anti-HNK-1 Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

Die Zellsuspension wurde anschließend für 45 min bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrten wurden die Zellen mit 50 µl biotinyliertem Sekundär-Antikörper (1:500 in FACS-Puffer) und anschließend mit 50 µl Alexa647-Streptavidin (1:2000 in FACS-Puffer) resuspendiert und für jeweils 30 min inkubiert, wobei die Zellen zwischen den beiden Schritten erneut dreimal gewaschen wurden. Abschließend wurden die Zellen in 100 µl PI (1:2000 in PBS) resuspendiert, einem Farbstoff, der nur in abgestorbene Zellen eindringen kann und deshalb zur Identifikation der Lebendpopulation genutzt wird. Die Messung der Antikörper-Reaktivität wurde im *BD FACSVers 8 color* Durchflusszytometer durchgeführt. *Tabelle 3-11* enthält eine Auflistung der verwendeten Geräte-Einstellungen. Die anschließende Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe der Software *FlowJo* (LLC, Ashland, Oregon).

Tabelle 3-11: FACS-Geräteinstellungen

Gemessene Events	15,000-20,000
FSC	66.2 Volt
SSC	243.7 Volt
PE (Detektion des Propidiumiodid-Signals)	201.9 Volt
FITC (Detektion des EGFP-Signals)	168.3 Volt
APC (Detektion des Alexa647-Signals)	220.7 Volt

Erklärung der in dieser Tabelle verwendeten Abkürzungen: FSC = forward scatter; SSC = side scatter; PE = Phycoerythrin; FITC = Fluoresceinisothiocyanat; APC = Allophycocyanin

Zur Auswertung wurde zunächst anhand der PI-Färbung (PE-Kanal) die Lebendzellpopulation eingegrenzt. Um untransfizierte Zellen zu exkludieren, wurden innerhalb dieser Population nur Zellen betrachtet, deren EGFP-Signal (FITC-Kanal) oberhalb einer Fluoreszenzintensität von 500 lag. Zur Detektion von anti-OMGP Antikörpern wurden nun in Abhängigkeit von dem zur Transfektion verwendeten Konstrukt zwei verschiedene Auswertesysteme verwendet.

a) TM-Konstrukt (pEGFP-hOMGP-TM): Für das Screening der Hybridom-Überstände wurde die FACS-Ratio zur Auswertung verwendet. Dabei wurde die *mean fluorescence intensity* (MFI) der pEGFP-hOMGP-TM-transfizierten Zellen (APC-Kanal) durch die MFI der pEGFP-transfizierten Kontrollzellen (APC-Kanal) geteilt. Für alle weiteren Versuche wurde die FACS-Differenz (FACS-Diff) verwendet, da nach Aufreinigung der neu hergestellten mAK die MFI der Kontrollzellen auf Werte gegen 0 fiel, sodass sich die Bildung einer Differenz zum Vergleich der Antikörper-Reaktivitäten besser eignete.

- **FACS-Ratio** = $\frac{\text{MFI (pEGFP-hOMGP-TM-transfizierte Zellen)}}{\text{MFI (pEGFP-transfizierte Kontrollzellen)}}$
- **FACS-Diff** = MFI (pEGFP-hOMGP-TM-transfizierte Zellen) - MFI (pEGFP-transfizierte Kontrollzellen)

b) GPI-Konstrukte (pEGFP-hOMGP-GPI, pEGFP-mOMGP-GPI, pEGFP-rOMGP-GPI): Die T2A-Sequenz der GPI-verankerten Konstrukte führt zum *ribosome skipping*, wodurch EGFP im Zellinneren und OMGP GPI-verankert auf der Zelloberfläche exprimiert wird (siehe *Kapitel 3.1.5, Abbildung 3-1*). Bezüglich der Quantifizierung der OMGP-Reaktivität gab es aus diesem Grund bei den GPI-verankerten Konstrukten eine Schwierigkeit: Ein Teil der transfizierten Zellen exprimiert lediglich EGFP, nicht jedoch OMGP. Um diese Population FITC-positiver Zellen nicht fälschlicherweise als OMGP-positive Zellen zu werten, wurde eine zweite horizontale Grenze auf Höhe einer Fluoreszenzintensität von 100 (APC-Kanal) gesetzt, wodurch vier Quadranten Q1-Q4 entstanden (*Abbildung 3-5*). Der $\Delta Q2$ -Wert wurde dann folgendermaßen berechnet:

- **$\Delta Q2$** : Zellzahl Q2 in % der Gesamtzellzahl Q1-4 (pEGFP-OMGP-GPI-transfizierte Zellen) - Zellzahl Q2 in % der Gesamtzellzahl Q1-4 (pEGFP-transfizierte Kontrollzellen)

Die beiden unterschiedlichen Auswertesysteme sind vergleichend in *Abbildung 3-5* dargestellt.

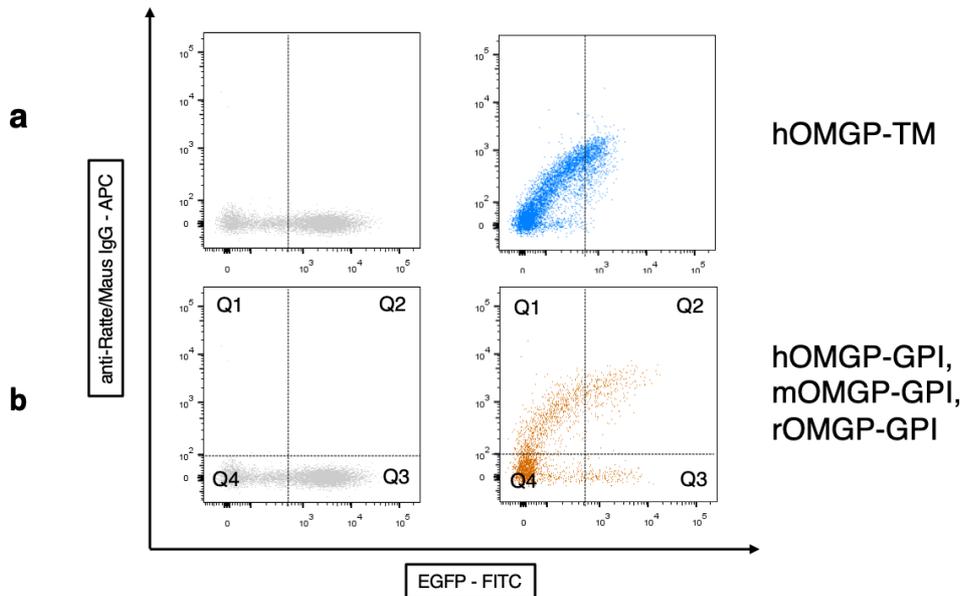


Abbildung 3-5: Vergleichende Darstellung der Auswertesysteme für die Evaluierung der OMGP-Reaktivität gegenüber TM- und GPI-verankerten OMGP-Konstrukten

Zur Messung der hOMGP-Reaktivität sowie der Kreuzreaktivität gegenüber mOMGP und rOMGP der monoklonalen anti-OMGP Antikörper wurden HeLa-Zellen mit dem transmembranen Konstrukt pEGFP-hOMGP-TM oder mit den GPI-verankerten Konstrukten pEGFP-hOMGP-GPI, pEGFP-mOMGP-GPI oder pEGFP-rOMGP-GPI transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit einem anti-OMGP-Antikörper als primären Antikörper und danach mit einem biotinylierten anti-Ratte-IgG oder anti-Maus-IgG Antikörper als sekundären Antikörper sowie Alexa647-Streptavidin inkubiert. Auf der x-Achse ist die im FITC-Kanal gemessene Fluoreszenzintensität abgebildet, die dem EGFP-Signal entspricht. Die y-Achse stellt die im APC-Kanal gemessene Fluoreszenzintensität entsprechend dem Alexa647-Signal dar. Zunächst galt es, innerhalb der Lebendzellpopulation die untransfizierten Zellen zu exkludieren. Aus diesem Grund wurden nur Zellen oberhalb einer Fluoreszenzintensität von 500 im FITC-Kanal betrachtet. Dies ist in der vorliegenden Abbildung durch die vertikalen Linien dargestellt. Nun wurden zwei unterschiedliche Auswertesysteme angewendet. **(a) TM-Konstrukte (pEGFP-hOMGP-TM):** Für die Bestimmung der Reaktivität von Antikörpern gegenüber pEGFP-hOMGP-TM-transfizierten Zellen wurde die FACS-Ratio berechnet, indem jenseits der genannten vertikalen Grenze die MFI der pEGFP-hOMGP-TM-transfizierten Zellen (blau) durch die MFI der pEGFP-transfizierten Kontrollzellen (grau) geteilt wurde. Alternativ wurde zur Berechnung der FACS-Diff die Differenz zwischen der MFI pEGFP-hOMGP-TM-transfizierter Zellen und der MFI der Kontrollzellen gebildet. **(b) GPI-verankerte Konstrukte (pEGFP-hOMGP-GPI, pEGFP-mOMGP-GPI, pEGFP-rOMGP-GPI):** Die Reaktivität von Antikörpern gegenüber pEGFP-hOMGP-GPI-, pEGFP-mOMGP-GPI- und pEGFP-rOMGP-GPI-transfizierten Zellen (orange) wurde hingegen anhand des $\Delta Q2$ -Werts quantifiziert: Zusätzlich zur vertikalen Grenze wurde eine weitere horizontale Grenze auf Höhe einer Fluoreszenzintensität von 100 (APC-Kanal) gesetzt, wodurch 4 Quadranten entstanden. Zur Auswertung wurde die Zellzahl in Q2 (in % der Gesamtzellzahl Q1-4) der pEGFP-transfizierten Kontrollzellen von der Zellzahl in Q2 (in % der Gesamtzellzahl Q1-4) der pEGFP-OMGP-GPI-transfizierten Zellen subtrahiert.

3.2.5 Proteinanalytik

3.2.5.1 Proteinherstellung und -aufreinigung

Rekombinantes hOMGP wurde mit Unterstützung durch die Technische Mitarbeiterin Heike Rübsamen (AG Meinel) in HEK293-EBNA1-Zellen hergestellt. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte mittels Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie.

Zunächst wurden HEK293-EBNA1 Zellen (1×10^6 Zellen/ml) mit Plasmid-DNA (pTT5-hOMGP-Avi-His) transfiziert. Hierfür wurden die Suspensionszellen mit einem Transfektionsreagenz gemischt, das Plasmid-DNA ($1 \mu\text{g}/1 \text{ ml}$ Zellsuspension), *OptiPRO™* Medium (1/10 der Zellsuspension) und PEI ($2 \mu\text{g}/1 \text{ ml}$ Zellsuspension) enthielt. Nach 24 h wurde Lactalbumin hinzugegeben und die Zellen wurden weitere 96 h kultiviert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 6 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), um sie von dem sich im Überstand befindlichen hOMGP zu trennen. Dieser Überstand wurde schließlich nach erneuter Zentrifugation (2500 rpm, 15 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) durch einen Sterilfilter ($0.22 \mu\text{g}$) filtriert.

Anschließend erfolgte die Aufkonzentrierung mithilfe des *Minimate TFF* Systems, welche das Volumen des Überstands von 550 ml auf 100 ml reduzierte. Der Überstand wurde in Dialyseschläuche (50 k) transferiert und über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in Dialysepuffer inkubiert. Die weitere Aufreinigung wurde mithilfe einer Nickel-Säule und anschließender Elution mittels Imidazol-Gradienten am *Äkta™* Proteinaufreinigungssystem durchgeführt. Zunächst wurden die Pumpen und Schläuche mit *Millipore* H₂O gespült. Die Säule wurde mit 15 ml H₂O gewaschen und anschließend mit 15 ml Dialysepuffer equilibriert. Anschließend wurde der Überstand auf eine Nickel-Säule geladen ($0.5 \text{ ml}/\text{min}$), wobei die Affinität des mit dem Protein fusionierten Polyhistidin-Tags zu Nickelionen genutzt wurde. Nach einem erneuten Waschgang wurde das Protein mittels eines linearen Imidazol-Gradienten (0.05-1 M) von der Säule eluiert, wobei 10 verschiedene Fraktionen je 2 ml entstanden. Mittels der aufgezeichneten Absorptionskurve konnte anhand der maximalen UV-Absorption (gemessen bei einer Wellenlänge von 280 nm) der Zeitpunkt der Elution des Zielproteins detektiert werden.

Die 10 Fraktionen wurden zur Kontrolle im SDS-Gel aufgetragen. Nach dem *Pooling* der hOMGP enthaltenden Fraktionen 6 und 7 erfolgte eine zweite Kontrolle anhand des SDS-Gels sowie die anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration im BCA-Assay.

3.2.5.2 Proteinbestimmung (BCA-Assay)

Hierfür wurde das *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* verwendet. Das Versuchsprotokoll wurde den Angaben des Herstellers entnommen.

3.2.5.3 Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von hOMGP erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese. Zunächst wurden die Proben vorbereitet, indem hOMGP mit dem *NuPage™ LDS Puffer (4X)* und H₂O sowie mit einem *NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X)* versetzt wurde. Letzterer enthält 500 mM Dithiothreitol, welches die Disulfidbrücken der Proteine spaltet. Um die Denaturierung des Proteins zu unterstützen, erfolgte anschließend eine zehnminütige Inkubation bei 90 °C. Für einzelne Versuche wurde das Protein im nativen Zustand belassen. Hierfür wurde auf letzteren Schritt sowie auf die Zugabe des reduzierenden Puffers verzichtet.

3.2.5.4 Deglykosylierung von rekombinantem hOMGP und von hOMGP auf pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierten Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Effekt der Glykosylierung des Proteins hOMGP auf die Antikörperbindung untersucht werden. In einem ersten Ansatz sollte hierfür die N-Glykosylierung transient mit pEGFP-hOMGP-GPI transfizierter Zellen durch Behandlung mit der Substanz Tunicamycin inhibiert werden. In einem zweiten Ansatz wurde sowohl hOMGP-GPI auf transfizierten Zellen als auch rekombinant hergestelltes hOMGP enzymatisch mittels PNGase F und eines Deglykosylierungsmix deglykosyliert.

a) Behandlung hOMGP-GPI-exprimierender HeLa-Zellen mit Tunicamycin: Bei der Substanz Tunicamycin handelt es sich um ein Gemisch homologer Antibiotika, das erstmals im Bakterium *Streptomyces lysosuperificus* nachgewiesen wurde (Takatsuki, Arima et al. 1971) und sowohl eine antibakterielle, als auch eine antivirale Wirksamkeit aufweist (Takatsuki, Arima et al. 1971, Takatsuki, Kawamura et al. 1977). Aufgrund seiner Fähigkeit, die eukaryotische N-Glykosylierung zu hemmen (Esko, Bertozzi et al. 2015, Stanley, Taniguchi et al. 2015) wird Tunicamycin in der Wissenschaft unter anderem angewandt, um die Rolle der N-verlinkten Zuckerketten von Proteinen zu untersuchen (Esko, Bertozzi et al. 2015). In dieser Arbeit wurden hOMGP-GPI-exprimierende HeLa-Zellen mit Tunicamycin behandelt, um deren N-Glykosylierung zu hemmen. Hierfür wurden zunächst HeLa-Zellen ausgesät und mit dem Plasmid pEGFP-hOMGP-GPI transfiziert. 2 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium abgenommen. Die Zellen wurden anschließend für 4-5 h mit

Tunicamycin (1 $\mu\text{g/ml}$, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62.5 ng/ml in DMEM) sowie mit Ethanol als Lösungsmittelkontrolle (in äquivalenter Konzentration) inkubiert. Nach der Behandlung wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden bis zum Folgetag in DMEM inkubiert.

b) Enzymatische Deglykosylierung von hOMGP-GPI-exprimierenden HeLa-Zellen und von rekombinatem hOMGP: Die enzymatische Deglykosylierung wurde mit dem Enzym PNGase F und einem Deglykosylierungsmix gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Bei der PNGase F handelt es sich um eine Amidase, deren enzymatische Aktivität eine komplette Entfernung der N-verlinkten Zuckerketten von Glykoproteinen ermöglicht (Norris, Stillman et al. 1994). Der Deglykosylierungsmix enthält zusätzlich Enzyme zur Entfernung O-verlinkter Zuckerketten. Um auf pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierten Zellen exprimiertes hOMGP enzymatisch zu deglykosylieren, wurden HeLa-Zellen mit pEGFP-hOMGP-GPI transfiziert. Nach 22-24 h wurden die Zellen mit PBS abgelöst. Pro Konstrukt wurden jeweils 2 x 300 μl Zellsuspension in zwei Eppendorfgefäße überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation (4 °C, 400 g) wurde der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden anschließend entweder mit 250 μl PNGase F (1:10 in DMEM) oder 250 μl DMEM als Kontrolle verdünnt. Nach sechsständiger Inkubation bei 37 °C und erneuter Zentrifugation mit Verwerfen des Überstands wurden die Zellpellets in FACS-Puffer verdünnt. Um den Effekt der Deglykosylierung auf das Molekulargewicht zu überprüfen, wurde ein Teil der Zellsuspension aufgehoben und daraus das Protein isoliert (*Kapitel 3.2.5.6*), um es im Western Blot (*Kapitel 3.2.4.2*) mithilfe eines anti-OMGP Antikörpers (MAB1674, 1:1500) darzustellen. Die Behandlung von rekombinatem hOMGP mittels PNGase F und dem Deglykosylierungsmix wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Die vergleichende Charakterisierung zwischen deglykosyliertem und unbehandeltem, rekombinatem hOMGP erfolgte mittels Gelelektrophorese (*Kapitel 3.2.5.3*).

3.2.5.5 Biotinylierung von hOMGP

Die Biotinylierung von rekombinatem hOMGP erfolgte mit dem *BirA Biotin-Protein Ligase Kit*, das Versuchsprotokoll wurde den Herstellerangaben entnommen.

3.2.5.6 Extraktion von hOMGP aus transient transfizierten Zellen

Um den Proteinanteil aus transient transfizierten Zellen zu isolieren, wurden diese mit 200 μl RIPA-Puffer und einem Proteaseinhibitor (1:25) über 1 h bei 4 °C inkubiert und anschließend für 15 min zentrifugiert (13000 rpm), wobei das Pellet verworfen wurde.

3.3 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurde die Software *GraphPad Prism 7* verwendet. Der *Spearman*-Test wurde angewendet, um die Reaktivität von monoklonalen anti-OMGP Antikörpern gegenüber pEGFP-hOMGP-TM-transfizierten Zellen mit deren Reaktivität gegenüber pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierten Zellen zu korrelieren. Die Darstellung der Daten erfolgte jeweils als Mittelwert der einzelnen Replikate \pm SEM (SEM = *standard error of the mean*). P-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des rekombinanten hOMGP

Rekombinantes hOMGP wurde im Rahmen dieser Arbeit in HEK293-EBNA1-Zellen hergestellt. Nach Aufkonzentrierung des Proteins mittels des *Minimate TFF System* und anschließender Dialysierung erfolgte zuletzt die Aufreinigung des Proteins an einer Nickel-Säule mit anschließender Elution anhand eines Imidazol-Gradienten

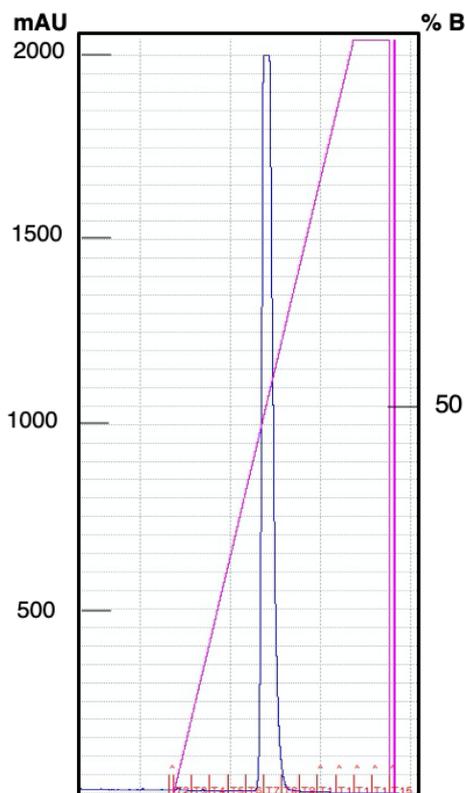
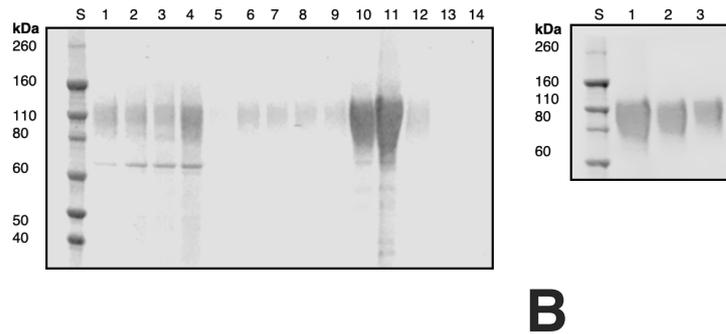


Abbildung 4-1 Ausschnitt aus der Absorptionskurve während der Elution von hOMGP

Der Überstand aus einer mit pTT5-hOMGP-Avi-His transfizierten HEK-EBNA-Kultur wurde nach erfolgter Aufkonzentrierung und Dialyse auf eine Nickelsäule aufgetragen und mittels eines Imidazol-Gradienten eluiert. Dargestellt sind die UV-Absorption (mAU, blau; gemessen bei einer Wellenlänge von 280 nm) und die Imidazol-Konzentration (% B, rosa; 0.05-1 M). Die x-Achse zeigt die einzelnen Fraktionen. Bei einer Imidazol-Konzentration von 0.6-0.7 M zeigt sich ein maximaler Anstieg der UV-Absorption, was die Elution des Proteins anzeigt.

(0.05-1 M). Insgesamt wurden zehn Fraktionen je 2 ml eluiert, wobei die maximale UV-Absorption (gemessen bei einer Wellenlänge von 280 nm) bei einer Imidazol-Konzentration von 0.6-0.7 M (entsprechend den Fraktionen 6 und 7) gemessen wurde (Abbildung 4-1). Die einzelnen Fraktionen 1-10 wurden im nächsten Schritt zur Überprüfung auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abbildung 4-2 A): In den Fraktionen 6 und 7 (entsprechend der maximalen UV-Absorption in Abbildung 4-1) zeigte sich eine breite Bande auf Höhe eines Molekulargewichts von 105 kDa, dem zu erwartenden Molekulargewicht von löslichem hOMGP (Mikol and Stefansson 1988). Nachdem die Fraktionen 6 und 7 *gepoolt* und aufgereinigt worden waren, erfolgte eine erneute Überprüfung im SDS-Gel (Abbildung 4-2 B). Als Kontrolle wurde rekombinantes hOMGP aufgetragen, das durch die PhD-Studentin Ramona Gerhards (AG Meinl) nach identischem Protokoll hergestellt worden war. Kontrolle und neu hergestelltes hOMGP wiesen ein äquivalentes Molekulargewicht auf. Die im BCA-Assay ermittelte Proteinkonzentration nach *Pooling* und finaler Aufreinigung der Fraktionen 6 und 7 betrug 4.6 mg/ml.



A **B**
Abbildung 4-2: Darstellung des neu hergestellten rekombinanten hOMGP im SDS-Gel

Rekombinantes hOMGP wurde in HEK293-EBNA1-Zellen hergestellt. Nach der Aufkonzentrierung, Aufreinigung an der Nickelsäule und Elution des Proteins mittels eines linearen Imidazol-Gradienten (0.05-1 M) erfolgte die **(A) Beurteilung der 10 eluierten Fraktionen im SDS-Gel** (5-14 = Fraktion 1-10). Wash (1,2) flow-through (3) und load (4) wurden ebenfalls zur Kontrolle aufgetragen. Fraktionen 6 und 7 (10, 11) enthalten das eluierte hOMGP. Die **(B) abschließende Beurteilung des neu hergestellten hOMGP im SDS-Gel** erfolgte nach dem Pooling der Fraktionen 6 und 7 sowie nach deren erneuter Aufreinigung. Zum Vergleich wurde rekombinantes hOMGP auf das Gel aufgetragen, welches nach identischem Protokoll von der PhD-Studentin Ramona Gerhards (AG Meinel) hergestellt worden war (3). Daneben wurde das neu hergestellte hOMGP (vor finaler Aufreinigung = 1, nach finaler Aufreinigung = 2) aufgetragen. Das Molekulargewicht des neu hergestellten Proteins betrug 105 kDa, was mit der in der Literatur angegebenen Größe von löslichem hOMGP übereinstimmt (Mikol, Gulcher et al. 1990).

4.2 Identifizierung OMGP-spezifischer Hybridome durch Screening der Hybridom-Überstände im FACS

Die OMGP-Reaktivität von 133 Hybridomen wurde anhand des Screenings ihrer Überstände im zellbasierten Assay mit anschließender Messung in der Durchflusszytometrie getestet. HeLa-Zellen wurden transient mit den Konstrukten pEGFP-hOMGP-GPI, pEGFP-hOMGP-TM, pEGFP-rOMGP-GPI oder pEGFP (negative Kontrolle) transfiziert. Die Auswertung der Reaktivität gegenüber hOMGP-TM erfolgte mittels Berechnung der FACS-Ratio, für die GPI-verankerten Konstrukte wurde der $\Delta Q2$ -Wert ermittelt (siehe Kapitel 3.2.4.4). Die Ergebnisse des Screenings sind in *Abbildung 4-3* gezeigt. Die Reaktivität der Überstände gegenüber pEGFP-hOMGP-TM-transfizierten Zellen korrelierte positiv mit deren Reaktivität gegenüber pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierten Zellen (*Abbildung 4-4*). Überstände, die durch Immunisierung mit dem rOMG-Peptid produziert worden waren, wiesen keine Reaktivität gegenüber hOMGP-TM oder hOMGP-GPI auf, sondern erkannten lediglich Zellen, die rOMGP-GPI exprimierten (*Abbildung 4-5*). Hingegen wies ein Teil der Überstände, die durch Immunisierung mit rekombinantem hOMGP generiert worden waren, eine Kreuzreaktivität gegenüber rOMGP-GPI auf (*Abbildung 4-5*).

Schließlich wurden anhand der Ergebnisse des Screenings die vier Hybridom-Überstände 22H6, 14A9, 26B11 und 31A4 ausgewählt. Die Charakteristika der ausgewählten Hybridom-Überstände sind in *Tabelle 4-1* zusammengefasst.

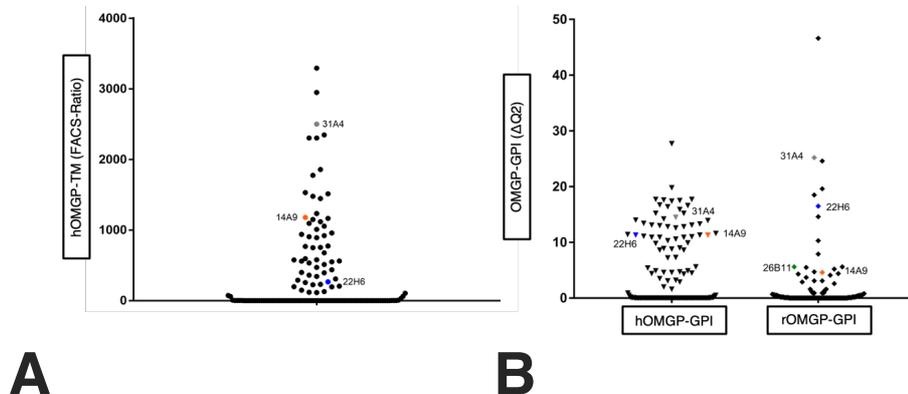


Abbildung 4-3: Ergebnisse des zellbasierten Screenings der Hybridom-Überstände

Die OMGP-Reaktivität der 133 Hybridom-Überstände wurde im zellbasierten Assay evaluiert. HeLa-Zellen wurden hierfür mit den Konstrukten pEGFP-hOMGP-TM, pEGFP-hOMGP-GPI, pEGFP-rOMGP-GPI und pEGFP (negative Kontrolle) transfiziert. Es folgte die Inkubation mit den Hybridom-Überständen (1:2), einem biotinylierten Sekundär-Antikörper (1:500) und Alexa647-Streptavidin (1:2000). Die Messung der Reaktivität erfolgte in der Durchflusszytometrie. In der Abbildung sind die für die einzelnen Überstände ermittelten Reaktivitäten gegenüber den unterschiedlichen OMGP-Konstrukten als einzelne Messwerte ($n=1$) abgebildet, die ausgewählten Überstände 22H6 (blau), 14A9 (orange), 26B11 (grün) und 31A4 (grau) sind farblich markiert. Für die Auswertung der **(A) Reaktivität der Überstände gegenüber pEGFP-hOMGP-TM-transfizierten Zellen** wurde die FACS-Ratio und für die Evaluierung der **(B) Reaktivität der Überstände gegenüber hOMGP-GPI und rOMGP-GPI** der $\Delta Q2$ -Wert ermittelt.

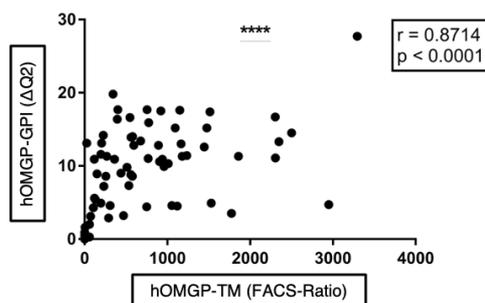


Abbildung 4-4: Korrelation zwischen der hOMGP-TM-Reaktivität und der hOMGP-GPI-Reaktivität der Hybridom-Überstände

133 Hybridom-Überstände wurden im zellbasierten Assay gescreent und deren Reaktivität gegenüber hOMGP-GPI, hOMGP-TM und rOMGP-GPI bestimmt. Die Reaktivität der Überstände gegenüber hOMGP-TM und hOMGP-GPI wurde miteinander korreliert. Auf der x-Achse ist die Reaktivität der Überstände gegenüber hOMGP-TM (FACS-Ratio) abgebildet, die y-Achse zeigt die hOMGP-GPI-Reaktivität ($\Delta Q2$). Die Punkte markieren die für die einzelnen Überstände gemessenen Reaktivitäten ($n=1$). Zur statistischen Auswertung wurde der Korrelationskoeffizient mittels Spearman-Test berechnet. Es zeigte sich eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Gruppen ($r=0.87$, $p<0,0001$).

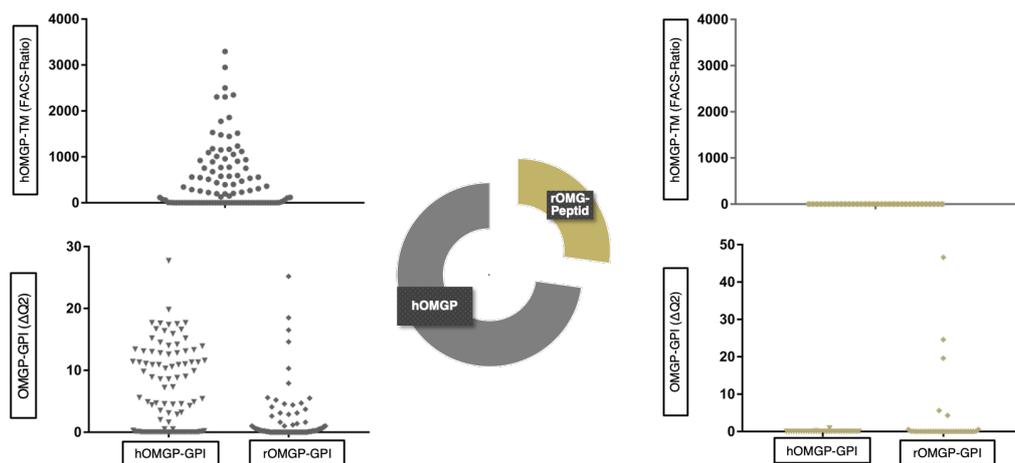


Abbildung 4-5: OMGP-Reaktivität der Hybridom-Überstände in Abhängigkeit von der Art der Immunisierung

Zur Untersuchung der Autoimmunität gegenüber OMGP wurden in Kooperation mit der Monoclonal Antibody Core Facility des Helmholtz-Zentrums München monoklonale anti-OMGP Antikörper nach der Hybridomtechnik generiert. Dafür wurden Mäuse und Ratten entweder mit hOMGP oder rOMG-Peptid immunisiert. En détail wurden 71 % der Überstände durch Immunisierung mit rekombinant hergestelltem hOMGP generiert (in Grau), während bei 29 % das rOMG-Peptid zur Immunisierung verwendet wurde (in Oliv). Die vorliegende Abbildung stellt die Reaktivitäten der Überstände aus Abbildung 4-3 getrennt nach dem zur Immunisierung verwendeten Konstrukt dar: Einige der Überstände, welche durch eine hOMGP-Injektion generiert worden waren, zeigte eine hohe Reaktivität gegenüber den Konstrukten hOMGP-TM und hOMGP-GPI. Zudem wies ein Teil dieser Überstände zusätzlich eine Kreuzreaktivität gegenüber rOMGP-GPI-transfizierten Zellen auf. Hingegen erkannten Überstände, die durch Injektion des rOMG-Peptids hergestellt worden waren, lediglich rOMGP-GPI, ohne dass eine Kreuzreaktivität gegenüber hOMGP-GPI oder -TM bestand.

Tabelle 4-1: Charakteristika der ausgewählten Hybridom-Überstände

Klon	Spezies/ Isotyp	Antigen	Leicht- ketten	Reaktivität hOMGP-TM (FACS-Ratio)	Reaktivität hOMGP-GPI (ΔQ2)	Reaktivität rOMGP- GPI (ΔQ2)
22H6	Ratte/ IgG2A	hOMGP	lambda	626.5*	11.3*	16.5*
14A9	Ratte/ IgG2B	hOMGP	lambda	1178.2	11.3	4.6
26B11	Maus/ IgG2A	rOMG- Peptid	kappa	0	0	5,6
31A4	Maus/ IgG2B	hOMGP	kappa	2500.0	14.5	25.2

*arithmetischer Mittelwert aus n=3

4.3 Weitere Charakterisierung der OMGP-Reaktivität der ausgewählten monoklonalen anti-OMGP Antikörper anhand von Verdünnungsreihen in ELISA und Durchflusszytometrie

Anhand verschiedener Kriterien (siehe *Kapitel 5.2, Tabelle 5-1*) wurden - basierend auf den Ergebnissen des zellbasierten Screenings - die vier Hybridom-Überstände 22H6, 14A9, 26B11 und 31A4 ausgewählt.

Um reine mAK zu erhalten, wurden die entsprechenden Hybridoma-Zelllinien in Kooperation mit der *Monoclonal Antibody Core Facility* des Helmholtz-Zentrums München subkloniert und die Antikörper zusätzlich aufgereinigt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte nun die weitere Charakterisierung der 4 mAK mittels Durchflusszytometrie und ELISA. Anhand von Verdünnungsreihen sollte dabei die Reaktivität dieser Antikörper mit derer eines kommerziellen anti-OMGP Antikörpers verglichen werden.

a) Charakterisierung der neu hergestellten mAK 22H6, 14A9, 26B11 und 31A4 anhand von Verdünnungsreihen im zellbasierten Assay: Um die neu hergestellten Antikörper 22H6, 14A9, 26B11 und 31A4 weiter zu charakterisieren, wurde deren Reaktivität gegenüber hOMGP-TM, hOMGP-GPI, mOMGP-GPI und rOMGP-GPI mit der Reaktivität des kommerziell erworbenen Antikörpers MAB1674 im zellbasierten Assay verblichen. Hierfür erfolgte die transiente Transfektion von HeLa-Zellen mit den Konstrukten pEGFP-hOMGP-TM, pEGFP-hOMGP-GPI, pEGFP-mOMGP-GPI und pEGFP-rOMGP-GPI sowie mit pEGFP als Kontrolle. Die Antikörper wurden als Verdünnungsreihe (10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml , 10 ng/ml) eingesetzt. Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß Protokoll des zellbasierten Assays (siehe *Kapitel 3.2.4.4*). Zur Auswertung der OMGP-Reaktivität wurde die FACS-Diff (für pEGFP-hOMGP-TM-transfizierte Zellen) respektive der ΔQ2 -Wert (für pEGFP-hOMGP-GPI-, pEGFP-mOMGP-GPI- und pEGFP-rOMGP-GPI-transfizierte Zellen) ermittelt. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 4-6* dargestellt.

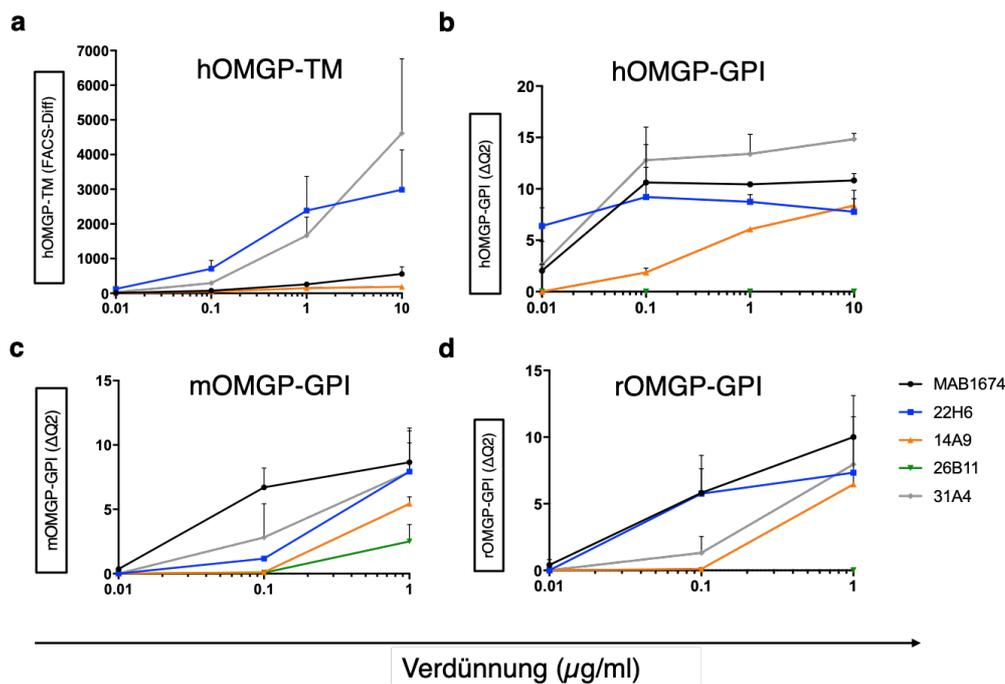


Abbildung 4-6: Vergleich der OMGP-Reaktivität der neu hergestellten mAK mit der Reaktivität des kommerziellen anti-OMGP Antikörpers MAB1674 im zellbasierten Assay

In dieser Arbeit wurden aus 133 Hybridom-Überständen die vier monoklonalen anti-OMGP Antikörper 22H6 (blau), 14A9 (orange), 31A4 (grau) und 26B11 (grün) ausgewählt, deren OMGP-Reaktivität nun weiter charakterisiert und mit derer des kommerziellen Antikörpers MAB1674 (schwarz) verglichen werden sollte. Im zellbasierten Assay wurde deshalb eine Verdünnungsreihe angefertigt. In der vorliegenden Abbildung sind die Ergebnisse der Verdünnungsreihen für die einzelnen Konstrukte hOMGP-TM, hOMGP-GPI, mOMGP-GPI und rOMGP-GPI abgebildet. Dabei ist die eingesetzte Verdünnung der mAK auf der x-Achse und die OMGP-Reaktivität (FACS-Diff für die Reaktivität gegenüber hOMGP-TM, $\Delta Q2$ für die Reaktivität gegenüber den GPI-verankerten Konstrukten) auf der y-Achse eingezeichnet. Es sind die Mittelwerte ($n=2$) \pm SEM zweier unabhängiger Messungen abgebildet. Es zeigte sich, dass die mAK 22H6 und 14A9 auch in niedriger Verdünnung (bis zu 10 ng/ml) eine höhere Reaktivität gegenüber **hOMGP-TM (a)** aufwiesen als der kommerziell erworbene mAK MAB1674. Bezüglich der Reaktivität gegenüber **hOMGP-GPI (b)** waren die Reaktivitäten der mAK 22H6, 14A9 und 31A4 in höheren Konzentrationen mit der des mAK MAB1674 vergleichbar, während bei Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ und weniger die Reaktivität des mAK 14A9 im Vergleich deutlich abnahm. Ähnliches war bezüglich der Reaktivität gegenüber **mOMGP (c)** zu beobachten: In einer Verdünnung von 1 $\mu\text{g/ml}$ erkannten die mAK 22H6, 14A9 und 31A4 mOMGP ähnlich stark wie der kommerzielle mAK. Ab einer Konzentration von 100 ng/ml fiel die Reaktivität der mAK 14A9 und 31A4 im Vergleich ab. **rOMGP (d)** wurde von allen 4 mAK gebunden, wenn diese in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt wurden, wobei die Reaktivität der mAK 14A9 und 26B11 im Vergleich zu den mAK 22H6, 31A4 und MAB1674 schwächer war. Ab einer Konzentration von 100 ng/ml war eine im Vergleich zum kommerziellen mAK MAB1674 niedrigere Reaktivität aller neu hergestellten mAK sichtbar.

b) Charakterisierung der ausgewählten monoklonalen anti-OMGP Antikörper 22H6, 14A9, 26B11 und 31A4 im ELISA: Um die Reaktivität der neu hergestellten mAK mit einer zweiten Methode zu evaluieren, wurde der ELISA angewendet. Die Charakterisierung der Reaktivität der mAK gegenüber hOMGP und rOMG-Peptid erfolgte im Streptavidin-ELISA. Zusammengefasst wurden hOMGP und rOMG-Peptid biotinyliert und auf eine Streptavidin-beschichtete ELISA-Platte *gecoatet*. Im nächsten Schritt wurde die Platte mit den mAK 22H6, 14A9, 26B11, 31A4 und MAB1674 (10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml und 10 ng/ml) inkubiert. Die folgenden Versuchsschritte wurden protokollgemäß durchgeführt. Die Reaktivität gegenüber mOMGP wurde mittels *MaxiSorp*-ELISA ermittelt. Kommerziell erworbenes mOMGP wurde hierfür *gecoatet* und mit den oben genannten mAK (in äquivalenter Konzentration) inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach Protokoll. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 4-7* veranschaulicht.

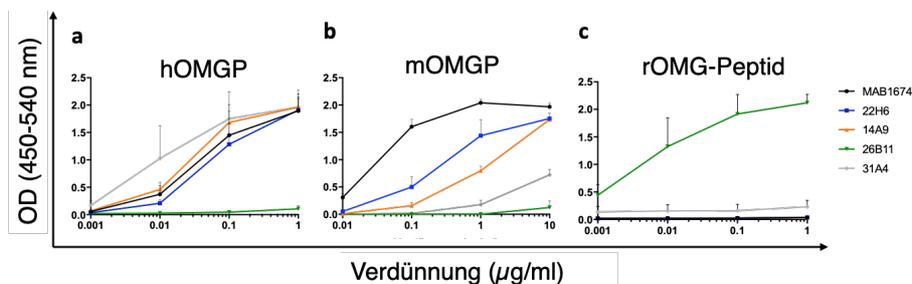


Abbildung 4-7: Vergleich der OMGP-Reaktivität der neu hergestellten mAK mit der Reaktivität des kommerziellen anti-OMGP Antikörpers MAB1674 im ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus 133 Hybridom-Überständen vier monoklonale anti-OMGP Antikörper ausgewählt, deren OMGP-Reaktivität zunächst anhand der Durchflusszytometrie im Detail untersucht wurde. Die weitere Charakterisierung der Reaktivität der mAK 22H6 (blau), 14A9 (orange), 26B11 (grün), 31A4 (grau) und MAB1674 (schwarz) gegenüber hOMGP, mOMGP und rOMG-Peptid erfolgte im ELISA. Zur Messung der Reaktivität gegenüber hOMGP und rOMG-Peptid wurde eine Streptavidin-beschichtete ELISA-Platte mit rekombinantem, biotinyliertem hOMGP oder biotinyliertem rOMG-Peptid *gecoatet* und anschließend mit den monoklonalen anti-OMGP Antikörpern in den Konzentrationen (10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml , 10 ng/ml (und 1 ng/ml)) inkubiert. Die weiteren Schritte wurden standardgemäß durchgeführt. Die Messung der Reaktivität gegenüber mOMGP erfolgte ebenfalls als Verdünnungsreihe mittels *MaxiSorp*-ELISA. In der Abbildung ist die Reaktivität der einzelnen Antikörper als ΔOD (450-540 nm) auf der y-Achse in Abhängigkeit von der Verdünnung (x-Achse) für die einzelnen Konstrukte hOMGP, mOMGP und rOMG-Peptid (von links nach rechts) aufgetragen. Die Punkte geben den Mittelwert ($n=3$) \pm SEM der drei unabhängigen Messungen an. Bezüglich der **Reaktivität gegenüber hOMGP (a)** wiesen die mAK 22H6, 14A9, 26B11 und 31A4 eine mit dem kommerziell erworbenen mAK MAB1674 vergleichbare Reaktivität auf. Der Antikörper 26B11 zeigte keine Reaktivität gegenüber dem humanen Protein. Die **Reaktivität zu mOMGP (b)** war bei dem kommerziellen mAK MAB1674 am höchsten. Die mAK 22H6 und 14A9 zeigten bei hohen Konzentrationen zwar vergleichbare Reaktivitäten, eine Verdünnung auf 1 $\mu\text{g/ml}$ und weniger führte jedoch zu einem Abfall der Reaktivität im Vergleich zum mAK MAB1647. Eine **Reaktivität gegenüber rOMG-Peptid (c)** wies lediglich der mAK 26B11 auf.

4.4 Untersuchungen zur Rolle der Glykosylierung von hOMGP für die Bindung durch anti-OMGP Antikörper

4.4.1 Nachweis des HNK-1-Epitops

Zur Beantwortung der Frage, ob pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierte HeLa-Zellen das HNK-1-Epitop exprimieren, wurde der zellbasierte Assay angewandt. HeLa-Zellen wurden mit pEGFP-hOMGP-GPI oder mit pEGFP (negative Kontrolle) transfiziert und anschließend mit einem anti-HNK-1 Antikörper als primären Antikörper (1:100 in FACS-Puffer) und mit einem biotinylierten anti-Maus-IgM-Antikörper (1:500 in FACS-Puffer) als sekundären Antikörper sowie zur Detektion mit dem Streptavidin-gekoppelten Farbstoff Alexa647 (1:2000 in FACS-Puffer) inkubiert. Die Evaluierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wiesen pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierte Zellen eine höhere Fluoreszenzintensität im APC-Kanal (Alexa647-Signal) auf (*Abbildung 4-8 A*).

Anhand des Streptavidin-ELISAs wurde in einem zweiten Ansatz untersucht, ob auch rekombinant hergestelltes hOMGP das HNK-1-Epitop exprimiert. Eine Streptavidin-beschichtete Platte wurde hierfür mit rekombinatem, biotinyliertem hOMGP *gecoatet* und mit einem HNK-1-Antikörper (1:500 in PBST) über Nacht inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Maus-IgM-HRP, 1:7000 in PBST). Zur Auswertung wurde die ΔOD (450-540 nm) der hOMGP-beschichteten Wells mit der ΔOD der BSA-beschichteten Wells verglichen. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 4-8 B* veranschaulicht. Es zeigte sich in den hOMGP-beschichteten Wells eine im Vergleich zum BSA-Leerwert erhöhte OD (BSA = 0.10, hOMGP = 0.50).

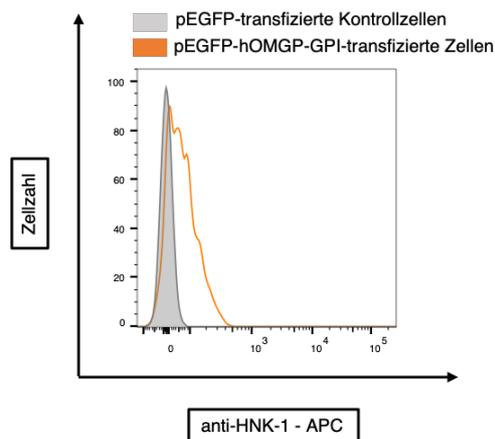
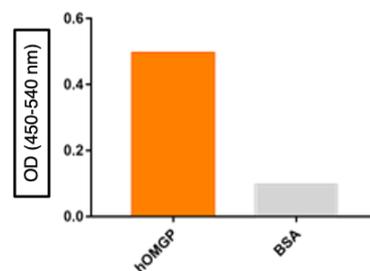
**A****B**

Abbildung 4-8: Darstellung des HNK-1 Epitops auf pEGFP-transfizierten Zellen und auf rekombinatem hOMGP

Nach der Herstellung von rekombinatem hOMGP sollte untersucht werden, ob dieses das HNK-1-Epitop exprimiert. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. **(A) Nachweis des HNK-1-Epitops im zellbasierten Assay:** pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierte HeLa-Zellen sowie pEGFP-transfizierte Kontrollzellen wurden mit einem anti-HNK-1 Antikörper (1:100 in FACS-Puffer) inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte jeweils die Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (1:500 in FACS-Puffer) sowie mit dem Streptavidin-gekoppelten Farbstoff Alexa647 (1:2000 in FACS-Puffer). Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie, wobei das Signal des Farbstoffs Alexa647 im APC-Kanal detektiert wurde. Im vorliegenden Histogramm ist die Fluoreszenzintensität im APC-Kanal (x-Achse) gegen die Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Es zeigte sich eine erhöhte Fluoreszenzintensität der pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierten Zellen (orange) im Vergleich zu den pEGFP-transfizierten Kontrollzellen (grau). **(B) Nachweis des HNK-1-Epitops im Streptavidin-ELISA:** Um das HNK-1-Epitop auf rekombinatem hOMGP nachzuweisen, wurde das Protein biotinyliert und auf eine Streptavidin-beschichtete ELISA-Platte gecoatet (orange). Als negative Kontrolle wurde BSA (grau) in äquivalenter Konzentration verwendet. Es folgte die Inkubation mit dem anti-HNK-1 Antikörper (1:500 in PBST) sowie daran anschließend mit einem HRP-markierten anti-Maus-IgM-Antikörper (1:7000 in PBST). Zur Auswertung wurde die ΔOD (450-540 nm) bestimmt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines Versuchs ($n=1$). Es zeigte sich eine erhöhte ΔOD für das hOMGP-gecoatete Well im Vergleich zum BSA-Leerwert (BSA: $OD = 0.1$, hOMGP: $OD = 0.5$).

4.4.2 Behandlung pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierter Zellen mit Tunicamycin zur Inhibierung der N-Glykosylierung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Glykosylierung von hOMGP einen Einfluss auf dessen Erkennung durch anti-OMGP Antikörper hat. In einem ersten Ansatz erfolgte die Behandlung pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierter HeLa-Zellen mit dem Antibiotika-Gemisch Tunicamycin (siehe *Kapitel 3.2.5.4*), um die Bildung N-verlinkter Zuckerketten zu inhibieren.

HeLa-Zellen wurden hierfür 2 h nach ihrer Transfektion mit pEGFP-hOMGP-GPI für 4-5 h mit Tunicamycin (1 $\mu\text{g/ml}$, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62.5 ng/ml) behandelt. Anschließend wurde das Protein aus den Zellen extrahiert und im Western Blot mithilfe eines primären anti-OMGP Antikörpers (MAB1674, 1:500 in 5 % Milchpulver in PBST) und eines sekundären HRP-markierten Antikörpers (anti-Ratte-IgG-HRP, 1:2500 5 % Milchpulver in PBST) dargestellt. Der Effekt der Behandlung auf die Glykosylierung wurde anhand des *size shifts* im Vergleich zu hOMGP aus den Kontrollzellen beurteilt. Es zeigte sich, dass Tunicamycin-Konzentrationen ab 125 ng/ml zu einem Absterben der Zellen führten. Niedrigere Konzentrationen waren zwar für die Zellen tolerabel, das aus den Zellen isolierte hOMGP wies im Western Blot jedoch kein verändertes Molekulargewicht im Vergleich zu den Kontrollen auf (*Abbildung 4-9*).

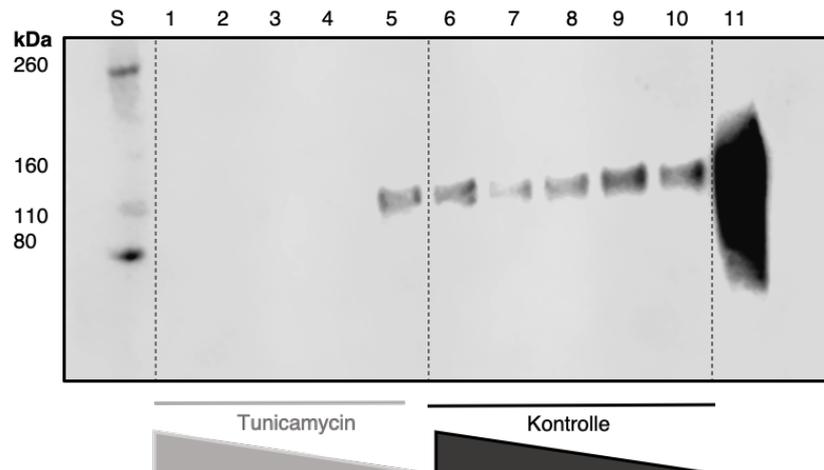


Abbildung 4-9: Behandlung pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierter HeLa-Zellen mit Tunicamycin

HeLa-Zellen wurden transient mit dem Plasmid pEGFP-hOMGP-GPI transfiziert. 2 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Inhibierung der N-Glykosylierung für 4-5 h mit dem Antibiotika-Gemisch Tunicamycin (1 = 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 = 500 ng/ml, 3 = 250 ng/ml, 4 = 125 ng/ml, 5 = 62.5 ng/ml in DMEM) oder mit Ethanol (6 = 1 $\mu\text{g/ml}$, 7 = 500 ng/ml, 8 = 250 ng/ml, 9 = 125 ng/ml, 10 = 62.5 ng/ml) als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Anschließend wurde das Protein aus den Zellen extrahiert und im Western Blot dargestellt (primärer Antikörper: MAB1674, 1:500 in 5 % Milchpulver in PBST; sekundärer Antikörper: anti-Ratte-IgG-HRP, 1:2500 in 5 % Milchpulver in PBST). Als zusätzliche Kontrolle wurde rekombinantes hOMGP verwendet (11). Anhand des size shifts im Vergleich zu den Kontrollen (6-11) wurde nun der Effekt der Tunicamycin-Behandlung auf die Glykosylierung beurteilt. Es zeigte sich, dass höhere Tunicamycin-Konzentrationen ab 125 ng/ml (1-4) zu einem Absterben der Zellen führten, während eine niedrige Konzentration von 62.5 ng/ml (5) zu keinem sichtbaren Verlust von Zuckerketten führte. S = Standard.

4.4.3 Auswirkung der enzymatischen Deglykosylierung von hOMGP auf die Reaktivität von anti-OMGP Antikörpern

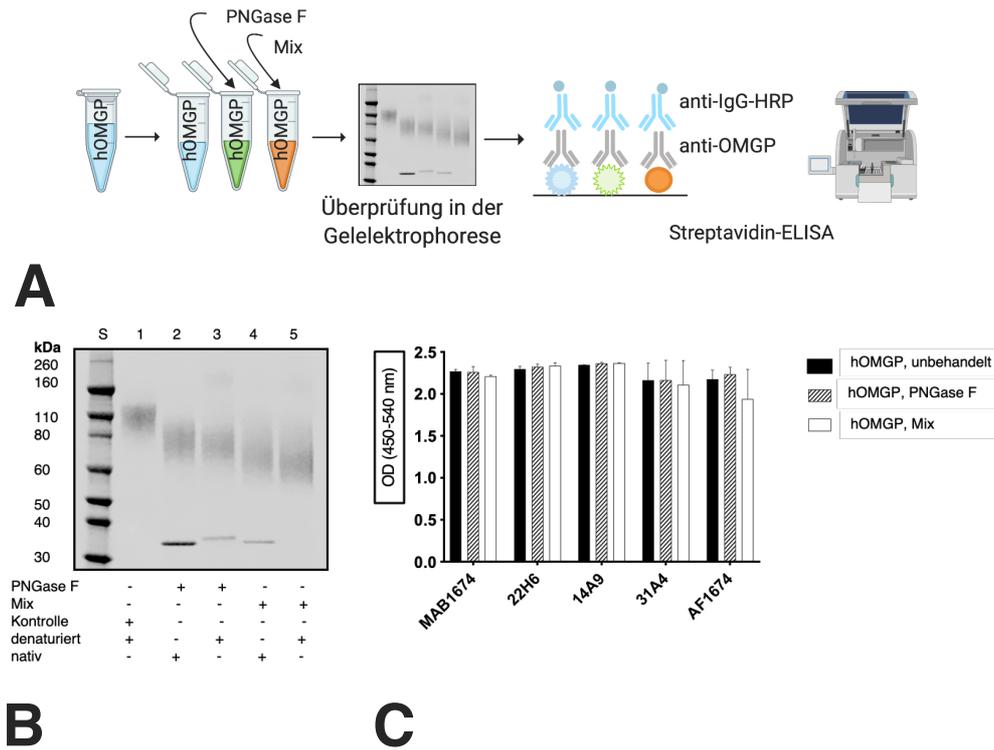
In einem zweiten Ansatz wurde die Methode der enzymatischen Deglykosylierung mit dem Enzym PNGase F (Entfernung der N-verlinkten Zuckerketten) und einem Deglykosylierungsmix aus verschiedenen Enzymen (Entfernung sowohl N-, als auch O-verlinkter Zuckerketten) gewählt. Dabei sollte sowohl rekombinantes hOMGP als auch hOMGP auf pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierten HeLa-Zellen deglykosyliert werden. Zur Auswertung der Antikörper-Reaktivität wurden anschließend zwei verschiedene Ansätze gewählt: Die Antikörper-Reaktivität gegenüber rekombinatem hOMGP wurde im Streptavidin-ELISA ausgewertet, während die Evaluierung der Reaktivität gegenüber pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie erfolgte.

4.4.3.1 Effekt der enzymatischen Deglykosylierung von rekombinatem hOMGP auf die Reaktivität von anti-OMGP Antikörpern im Streptavidin-ELISA

Zur enzymatischen Deglykosylierung von rekombinatem hOMGP wurde das Protein mit dem Enzym PNGase F oder dem Deglykosylierungsmix nach Herstellerprotokoll behandelt und anschließend in der Gelelektrophorese zusammen mit unbehandeltem rekombinatem hOMGP vergleichend dargestellt. Der Versuchsaufbau ist in *Abbildung 4-10 A* zusammengefasst. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit dem Enzym PNGase F zu einer Reduzierung des Molekulargewichts von hOMGP um etwa 20-25 kDa führte. Nach Inkubation mit dem Deglykosylierungsmix betrug die Größenänderung des Proteins in der Gelelektrophorese insgesamt zwischen 30-35 kDa im Vergleich zum unbehandelten Protein (*Abbildung 4-10 B*).

Zur Messung der Antikörper-Reaktivität anhand des Streptavidin-ELISAs wurde das Protein biotinyliert und auf einer Streptavidin-beschichteten ELISA-Platte *gecoatet*. Als Versuchsbedingungen wurden unbehandeltes hOMGP, mit dem Enzym PNGase F behandeltes hOMGP und mit dem Deglykosylierungsmix behandeltes hOMGP gewählt. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit den neu hergestellten mAK 22H6, 14A9 und 31A4 sowie mit den beiden kommerziellen anti-OMGP Antikörpern MAB1674 und AF1674 (jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ in PBST). Die weiteren Schritte sowie die anschließende Messung und Auswertung erfolgten gemäß Protokoll des Streptavidin-ELISAs. Die einzelnen Versuchsschritte sind in *Abbildung 4-10 A* resümiert.

Die Ergebnisse des Streptavidin-ELISAs sind in *Abbildung 4-10 C* dargestellt. Es zeigte sich kein respektive ein nur minimaler Unterschied in der Reaktivität der anti-OMGP Antikörper 22H6, 14A9, 31A4, MAB1674 und AF1674 gegenüber unbehandeltem im Vergleich zu mit PNGase F oder dem Deglykosylierungsmix behandeltem rekombinatem hOMGP.



A

C

Abbildung 4-10: Effekt einer enzymatischen Deglykosylierung von rekombinatem hOMGP auf die Bindung durch anti-OMGP Antikörper im Streptavidin-ELISA

(A) Versuchsaufbau: Um den Effekt der Deglykosylierung von rekombinatem hOMGP auf die Reaktivität von anti-OMGP Antikörpern zu evaluieren, wurde das rekombinante Protein zunächst enzymatisch deglykosyliert. Hierfür wurde hOMGP 48 h mit PNGase F (grün) oder mit einem Deglykosylierungsmix (orange) inkubiert und als Kontrolle im unbehandelten Zustand belassen (blau). Die Beurteilung des Proteins erfolgte anschließend in der Gelelektrophorese. Der Effekt der Deglykosylierung auf die Reaktivität der anti-OMGP Antikörper wurde im Streptavidin-ELISA untersucht: Eine mit Streptavidin beschichtete ELISA-Platte wurde dafür mit rekombinatem, biotinyliertem, unbehandeltem hOMGP sowie mit rekombinatem, biotinyliertem, mittels PNGase F oder Deglykosylierungsmix behandeltem hOMGP gecoatet und mit anti-OMGP Antikörpern (jeweils 10 µg/ml in PBST) sowie einem sekundären HRP-markiertem Antikörper (anti-Maus-IgG-HRP, anti-Ratte-IgG-HRP, anti-Ziege-IgG-HRP; jeweils 1:7000 in PBST) inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten standardgemäß nach Protokoll des Streptavidin-ELISAs. Diese Abbildung wurde mit BioRender erstellt. **(B) Überprüfung des deglykosylierten Proteins im SDS-Gel:** Zur Auftragung auf das Gel wurden die verschiedenen Fraktionen entweder denaturiert und reduziert (1, 3, 5) oder im nativen Zustand belassen (2, 4). S = Standard. In der Abbildung ist sichtbar, dass die Behandlung mit dem Enzym PNGase F zu einem Größenunterschied des Proteins von 20-25 kDa geführt hat. Eine Behandlung mit dem Deglykosylierungsmix führte zu einer Reduktion des Molekulargewichts von insgesamt 30-35 kDa. **(C) Effekt der Deglykosylierung von rekombinatem hOMGP auf die Antikörper-Reaktivität im Streptavidin-ELISA:** Es erfolgte die Messung der hOMGP-Reaktivität der anti-OMGP Antikörper 22H6, 14A9, 31A4, MAB1674 und AF1674 (x-Achse) gegenüber unbehandeltem (schwarz), mit PNGase F behandeltem (schwarz-weiß) und mit dem Deglykosylierungsmix behandeltem (weiß) rekombinanten hOMGP. Im Diagramm sind die Mittelwerte (n=3) +/- SEM der ODs (450-540 nm) aus drei unabhängigen Versuchen abgebildet. Die enzymatische Zucker-Reduktion führte zu keiner (MAB1674, 22H6, 14A9, 31A4) respektive zu einer nur minimalen (AF1674) Reduktion der Antikörper-Reaktivität gegenüber deglykosyliertem versus unbehandeltem hOMGP.

4.4.3.2 Effekt der Behandlung pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierter HeLa-Zellen mit dem Enzym PNGase F auf die Reaktivität von anti-OMGP Antikörpern in der Durchflusszytometrie

Neben der enzymatischen Entfernung der Zuckerketten des rekombinanten hOMGP erfolgte parallel auch die Behandlung pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierter HeLa-Zellen mit dem Enzym PNGase F. Zunächst wurden hierfür standardgemäß HeLa-Zellen transient mit den Konstrukten pEGFP-hOMGP-GPI sowie mit pEGFP (Kontrollzellen) transfiziert sowie anschließend gemäß Herstellerprotokoll mittels PNGase F deglykosyliert. Ein Teil der Zellen wurde aufbewahrt, um daraus das Protein hOMGP zu isolieren. Dieses wurde im Western Blot mithilfe eines anti-OMGP Antikörpers (MAB1674, 1:500 in 5 % Milchpulver in PBST) als primären Antikörper und eines sekundären Antikörpers (anti-Ratte-IgG-HRP, 1:2500 in 5 % Milchpulver in PBST) dargestellt, sodass anhand des Größenunterschieds zwischen unbehandeltem und behandeltem Protein der Erfolg der Deglykosylierung überprüft werden konnte. Der Versuchsaufbau ist in *Abbildung 4-11 A* dargestellt. Es zeigte sich nach Behandlung mit der PNGase F ein Größenunterschied des extrahierten Proteins von etwa 10-15 kDa im Vergleich zu hOMGP aus unbehandelten Zellen (*Abbildung 4-11 B*).

Für die Evaluierung der Antikörper-Reaktivität in der Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit dem neu hergestellten mAK 22H6 (10 $\mu\text{g/ml}$) sowie mit den kommerziell erworbenen anti-OMGP Antikörpern MAB1674 (10 $\mu\text{g/ml}$) und AF1674 (10 $\mu\text{g/ml}$) und daran anknüpfend mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (1:500) und Alexa647-Streptavidin (1:2000) inkubiert. Alle Antikörper wurden in FACS-Puffer verdünnt. Die Messung der Antikörper-Reaktivität erfolgte in der Durchflusszytometrie. Zur Auswertung wurde der ΔQ2 -Wert ermittelt und zwischen behandelten und unbehandelten Zellen verglichen. *Abbildung 4-11 A* fasst die einzelnen Versuchsschritte zusammen.

Es zeigte sich für die getesteten Antikörper kein oder ein nur minimaler Unterschied in der hOMGP-Reaktivität (gemessen als ΔQ2 -Wert) zu den unbehandelten im Vergleich zu den mit dem Enzym PNGase F behandelten pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierten Zellen (*Abbildung 4-11 C*).

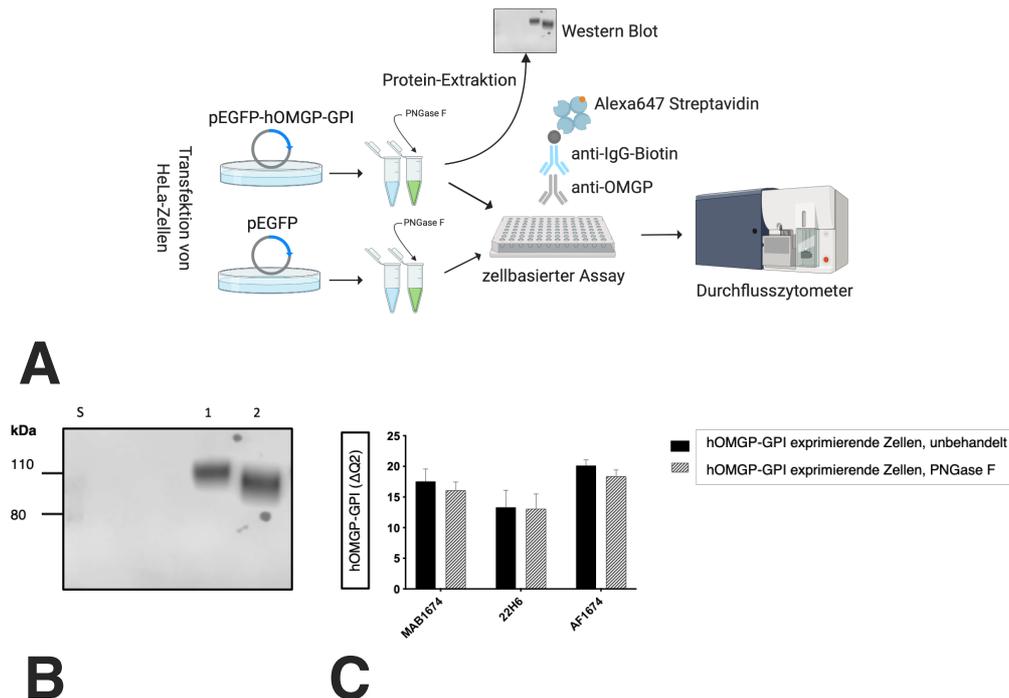


Abbildung 4-11: Effekt der enzymatischen Entfernung N-verlinkter Zuckerketten pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierter Zellen auf die Reaktivität von anti-OMGP Antikörpern in der Durchflusszytometrie

(A) Versuchsaufbau: Um den Effekt einer Entfernung N-verlinkter Zuckerketten von hOMGP-GPI-exprimierenden Zellen auf deren Bindung durch anti-OMGP Antikörper durchflusszytometrisch zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen standardmäßig mit dem Plasmid pEGFP-hOMGP-GPI oder mit pEGFP (Kontrollzellen) transfiziert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem Enzym PNGase F (grün) gemäß Herstellerprotokoll, als Kontrolle wurde ein Teil der Zellen unbehandelt belassen (blau). Ein Anteil der Zellen wurde aufbewahrt, um daraus das Protein hOMGP zu extrahieren und den Effekt der Deglykosylierung im Western Blot zu überprüfen. Für den Vergleich der Reaktivität von anti-OMGP Antikörpern gegenüber behandelten und unbehandelten pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierten HeLa-Zellen wurden die verbleibenden Zellen mit einem primären anti-OMGP Antikörper (22H6, MAB1674, AF1674; jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ in FACS-Puffer) und anschließend mit einem sekundären, biotinylierten Antikörper (1:500) und Alexa647-Streptavidin (1:2000) inkubiert und die Reaktivität im Durchflusszytometer mittels FACS bestimmt. Diese Abbildung wurde mit BioRender erstellt. **(B) Überprüfung der Deglykosylierung im Western Blot:** Das behandelte (2) und das unbehandelte (1) extrahierte hOMGP wurden mit einem primären anti-OMGP Antikörper (MAB1674, 1:500 in 5 % Milchpulver in PBST) und einem sekundären, HRP-markierten Antikörper (anti-Maus-IgG-HRP, anti-Ratte-IgG-HRP, anti-Ziege-IgG-HRP; jeweils 1:2500 in 5 % Milchpulver in PBST) dargestellt und der size shift zwischen den beiden extrahierten Proteinen ermittelt. S = Standard (Markierungen zusätzlich eingezeichnet). Es zeigte sich ein Größenunterschied von etwa 10-15 kDa zwischen behandeltem und unbehandeltem hOMGP. **(C) Effekt der Deglykosylierung auf die Reaktivität von anti-OMGP Antikörpern in der Durchflusszytometrie:** Die OMGP-Reaktivität der Antikörper MAB1674, 22H6 und AF1674 (x-Achse) gegenüber unbehandelten (schwarz) und mit PNGase F behandelten (schwarz-weiß) hOMGP-exprimierenden Zellen wurde standardgemäß durch Berechnung des $\Delta\text{Q}2$ -Werts bestimmt. Im Diagramm sind die Mittelwerte ($n=2$) \pm SEM zweier unabhängiger Versuche abgebildet. Es zeigte sich nach Behandlung mit dem Enzym PNGase F keine (22H6) respektive eine nur minimale (MAB1674, AF1674) Reduktion der hOMGP-Reaktivität.

In Zusammenschau veränderte sich durch die enzymatische Entfernung N-verlinkter Zuckerketten weder die Reaktivität der getesteten anti-OMGP Antikörper gegenüber pEGFP-hOMGP-transfizierten Zellen in der Durchflusszytometrie noch deren Reaktivität gegenüber rekombinatem hOMGP im ELISA in einem wesentlichen Ausmaß. Auch die Entfernung O-verlinkter Zuckerketten, deren Auswirkung nur an rekombinatem hOMGP im Streptavidin-ELISA bestimmt wurde, zeigte keinen oder einen nur minimalen Effekt auf die Antikörper-Reaktivität.

4.5 Immunzytochemische Färbung muriner OPCs und Oligodendrozyten mit monoklonalen anti-OMGP Antikörpern

Im Rahmen der Immunfärbungen wurde untersucht, ob die neu hergestellten mAK ihr Antigen *in vitro* auf murinen OPCs und Oligodendrozyten binden und ob die OMGP-Expression vom Zeitpunkt der Oligodendrozyten-Differenzierung abhängig ist. Die zu färbenden Zellen wurden in drei unterschiedlichen Differenzierungsstadien in 4 % PFA fixiert (undifferenzierte OPCs, OPCs nach 24 h Differenzierung, reife Oligodendrozyten nach 48 h Differenzierung). Die Zellen wurden zunächst mit den anti-OMGP Antikörpern 22H6, 14A9, 26B11, 31A4, MAB1674 und AF1674 (5-50 $\mu\text{g/ml}$) und anschließend mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (anti-Maus-IgG-Alexa488, anti-Maus-IgG-Cy3, anti-Ratte-IgG-Alexa594, anti-Ziege-IgG-Alexa488, anti-Ziege-IgG-Alexa594; jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt. Als Negativkontrollen der primären Antikörper wurden die jeweiligen Isotypkontrollen in äquivalenter Konzentration verwendet. In den Einzelfärbungen zeigten zwei der neu hergestellten mAK (14A9, 22H6) in einer Verdünnung von 20 $\mu\text{g/ml}$ eine ausgeprägte Färbung von OPCs und Oligodendrozyten in allen drei Differenzierungsstadien. Die Intensität der Färbung war vergleichbar mit der Färbung durch den kommerziellen Antikörper AF1674, wenn jener in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt wurde. Die anti-OMGP Antikörper 26B11 und 31A4 mussten auf Konzentrationen von bis zu 50 $\mu\text{g/ml}$ konzentriert werden, um eine sichtbare Färbung der OPCs und Oligodendrozyten zu erzielen. Der kommerzielle Antikörper MAB1674 zeigte keine Färbung der Zellen. Anhand von Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen die etablierten Oligodendrozyten-Marker O4 (Expression bereits im OPC-Stadium (Bradl and Lassmann 2010)) und MBP (Expression erst im Stadium der differenzierten Oligodendrozyten (Bradl and Lassmann 2010)) wurde im nächsten Schritt die OMGP-Expression auf murinen OPCs und Oligodendrozyten im Rahmen ihrer Differenzierung weiter charakterisiert. Hierfür wurden erneut OPCs und Oligodendrozyten in den bereits beschriebenen drei Reifungsstadien fixiert und

gemäß Protokoll der AG Kuhlmann gefärbt. Die anti-OMGP Antikörper (14A9 oder 22H6) wurden in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt und mit den oben genannten sekundären Antikörpern detektiert. Undifferenzierte OPCs und OPCs nach 24 h Differenzierung wurden mit dem anti-O4 Antikörper, differenzierte Oligodendrozyten mit dem anti-MBP Antikörper gefärbt (jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$). Als sekundäre Antikörper wurden ein anti-Maus-IgM+IgG-Alexa488 Antikörper für die anti-O4- und ein anti-Kaninchen-IgG-Alexa-488 für die anti-MBP-Färbung eingesetzt. Sowohl auf undifferenzierten OPCs als auch auf OPCs nach 24 h Differenzierung ließ sich eine Koexpression von OMGP und O4 nachweisen. Ebenso wurde OMGP auf einem großen Anteil MBP-positiver Oligodendrozyten exprimiert. Eine exakte Quantifizierung des Anteils OMGP-positiver Zellen erfolgte nicht. Bezüglich der angefärbten Zellanteile lässt sich sagen, dass die anti-OMGP Färbung die Zellfortsätze der OPCs und Oligodendrozyten in allen drei Stadien weitgehend aussparte, während diese durch den anti-O4 Antikörper und den anti-MBP Antikörper in allen Stadien angefärbt wurden. Die Ergebnisse der Einzelfärbungen sind am Beispiel des mAK 14A9 in *Abbildung 4-12* dargestellt. *Abbildung 4-13* zeigt die Ergebnisse der Doppelfärbungen am Beispiel des mAK 22H6.

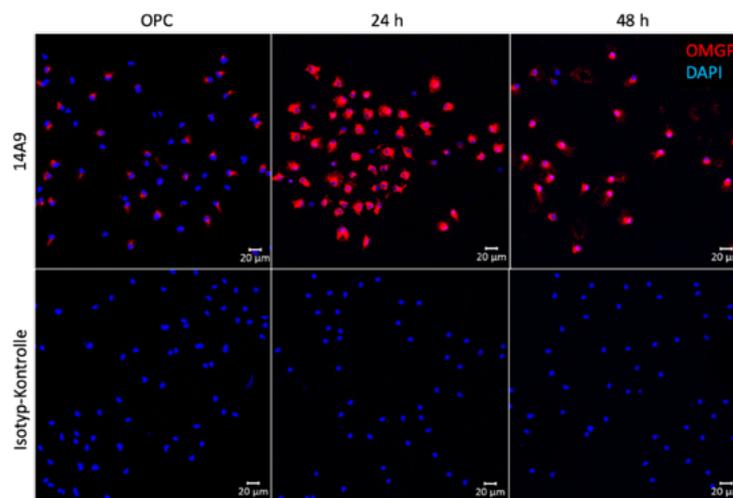


Abbildung 4-12: Einzelfärbungen muriner OPCs und Oligodendrozyten mit anti-OMGP Antikörpern

Murine Oligodendrozyten und OPCs wurden mit anti-OMGP-Antikörpern gefärbt, wovon exemplarisch die **Ergebnisse der Färbung mit dem mAK 14A9** dargestellt sind. Zellen der oligodendroglialen Linie wurden kultiviert und in drei verschiedenen Reifestadien in 4 % PFA fixiert: 1) undifferenzierte OPCs, 2) OPCs nach 24 h Differenzierung, 3) reife Oligodendrozyten nach 48 h Differenzierung. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen mit dem anti-OMGP Antikörper 14A9 (20 $\mu\text{g/ml}$) und mit einem sekundären, Alexa594-markierten Antikörper (10 $\mu\text{g/ml}$) gemäß Protokoll der AG Kuhlmann. Als Kontrolle wurde die Isotypkontrolle des primären Antikörpers in äquivalenter Konzentration verwendet. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Färbung mit dem mAK 14A9 (20 $\mu\text{g/ml}$) sowie seiner Isotypkontrolle. Es zeigte sich eine Färbung von Zellen mit dem mAK in allen drei Reifungsstadien, die Kontrollen führten zu keiner Färbung.

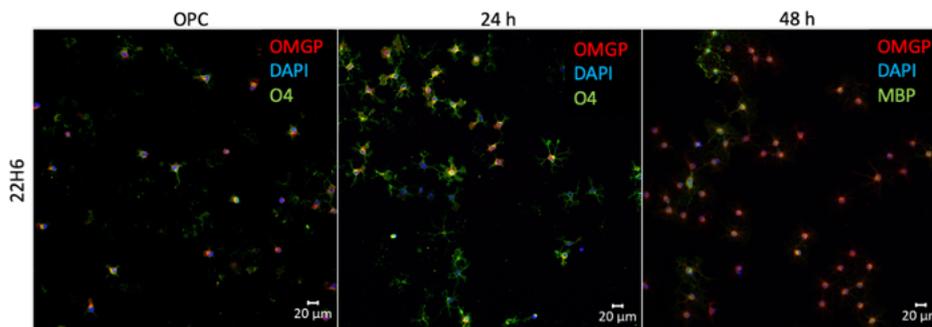


Abbildung 4-13: Darstellung der anti-O4/anti-OMGP und anti-MBP/anti-OMGP Doppelfärbungen muriner OPCs und Oligodendrozyten

Zusätzlich zu den Einzelfärbungen wurden in dieser Arbeit Doppelfärbungen von Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen mit anti-OMGP Antikörpern und Antikörpern gegen etablierte Oligodendrozyten-Marker (anti-O4, anti-MBP) durchgeführt. O4 ist ein Marker für OPCs, während MBP erst von reifen Oligodendrozyten exprimiert wird (Bradl and Lassmann 2010). Zellen der oligodendroglialen Linie wurden standardgemäß in drei verschiedenen Differenzierungsstadien fixiert: 1) undifferenzierte OPCs, 2) OPCs nach 24 h Differenzierung, 3) reife Oligodendrozyten. Undifferenzierte OPCs und OPCs nach 24 h Differenzierung wurden mit einem anti-O4 Antikörper (10 µg/ml) und den monoklonalen anti-OMGP Antikörpern 22H6 (hier exemplarisch dargestellt) oder 14A9 (jeweils 20 µg/ml) gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden Alexa488- (für die anti-O4 Färbung) und Alexa594-markierte Antikörper (für die anti-OMGP Färbung) verwendet. Auf undifferenzierten OPCs (links) sowie auf OPCs nach 24 h Differenzierung (Mitte) ließ sich eine Ko-Expression von OMGP (rot) und O4 (grün) nachweisen. Doppelfärbungen von differenzierten Oligodendrozyten (rechts) wurden mit einem anti-MBP Antikörper (10 µg/ml) und den monoklonalen anti-OMGP Antikörpern 22H6 (hier exemplarisch dargestellt) und 14A9 (jeweils 20 µg/ml) durchgeführt. Zur Detektion wurden ebenfalls Alexa488- (für die anti-MBP Färbung) und Alexa594-markierte Antikörper (für die anti-OMGP Färbung) verwendet. Es zeigte sich eine Koexpression von OMGP (rot) und MBP (grün).

4.6 Untersuchungen zur komplementvermittelten Lyse muriner OPCs durch monoklonale anti-OMGP Antikörper *in vitro*

Anhand des *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays* wurde untersucht, ob die neu produzierten mAK 14A9 und 22H6 in Verbindung mit Komplement zu einer Lyse muriner OPCs führen. Hierfür wurden OPCs standardgemäß in einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h erfolgte gemäß Protokoll die Induktion der Differenzierung durch einen Wechsel des Mediums, welches zusätzlich anti-OMGP Antikörper (14A9 oder 22H6, jeweils in der Konzentration 20 µg/ml) und Kaninchen-Komplement (4 % oder 6 %) enthielt. Als Negativkontrolle wurde ein Teil der Zellen mit den jeweiligen Isotypkontrollen (20 µg/ml) der mAK zusammen mit Komplement (4 % oder 6 %) behandelt. Nach einer Inkubation von 24 h wurde der Anteil an lebenden Zellen anhand der ATP-Menge standardgemäß im Luminometer bestimmt.

Zur Auswertung wurde der Lebendzellanteil in den mit Antikörpern behandelten *Wells* mit dem Lebendzellanteil in den mit den Isotypkontrollen behandelten *Wells* verglichen. *Abbildung 4-14* zeigt die Ergebnisse des Komplement-Assays. Es sind die Messwerte aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt. Zusammenfassend ließ sich bei einer Komplement-Konzentration von 4 % weder für den mAK 14A9 noch für den Antikörper 22H6 eine Reduktion metabolisch aktiver Zellen im Vergleich zu den Kontrollen beobachten. Im Falle einer Komplement-Konzentration von 6 % zeigte sich in beiden Versuchen eine leichte Reduktion des aus den drei technischen Replikaten gemittelten Lumineszenz-Signals (entsprechend der Zellviabilität) in den Antikörper-*Wells* im Vergleich zu den Kontroll-*Wells* bei insgesamt - auch in den Kontrollen - stark reduzierter Zellviabilität.

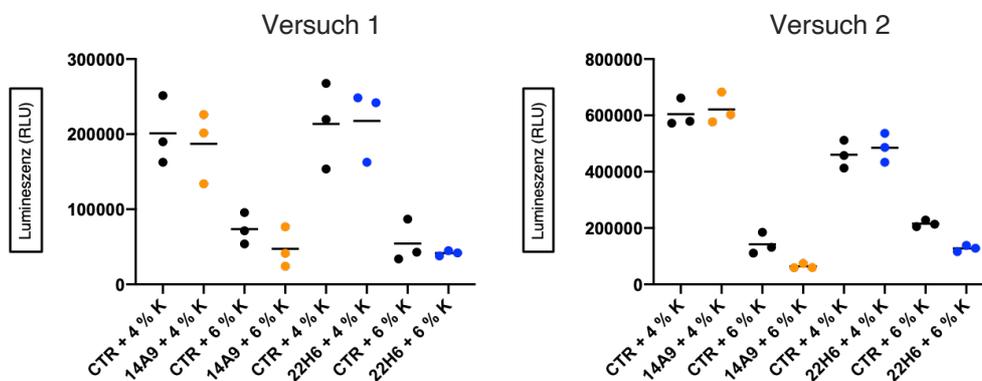


Abbildung 4-14: Ergebnisse der Untersuchungen zur komplementvermittelten Lyse muriner Oligodendrozyten mit den monoklonalen anti-OMGP Antikörpern 22H6 und 14A9

Um zu überprüfen, ob die neu hergestellten mAK 22H6 und 14A9 eine komplementvermittelte Lyse muriner OPCs induzieren, wurden murine OPCs an Tag 1 standardgemäß ausgesät. Nach 24 h wurde gemäß Protokoll die Differenzierung initiiert, wobei die monoklonalen anti-OMGP Antikörper (14A9, 22H6; jeweils 20 µg/ml) und Kaninchen-Komplement (4 % oder 6 %) dem Differenzierungsmedium hinzugefügt wurden. Als Negativ-Kontrollen wurden die jeweiligen Isotypkontrollen der Antikörper (Ratte IgG2A, Ratte IgG2B) in äquivalenter Verdünnung zusammen mit Komplement aufgetragen. Nach 24 h wurde mithilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays eine Luciferase-Reaktion initiiert, sodass anhand der Messung des Lichts im Glo-Max® Luminometer die ATP-Menge evaluiert werden konnte, welche wiederum ein Marker für den Anteil an lebenden Zellen innerhalb der Kultur ist (Crouch, Kozlowski et al. 1993). Die vorliegende Abbildung zeigt die Ergebnisse der beiden unabhängigen Versuche (n=2). Auf der x-Achse sind jeweils die unterschiedlichen Versuchsbedingungen abgebildet, während auf der y-Achse die gemessene Lumineszenz in RLU (entsprechend der Menge metabolisch aktiver Zellen) dargestellt ist. Die Punkte (blau = 22H6, orange = 14A9, schwarz = Kontrollen) markieren die technischen Replikate (n = 3) innerhalb der Versuche, die waagrechten Striche bilden die Mittelwerte dieser Replikate ab. Zusammengefasst führte die Behandlung mit den mAK in Verbindung mit 4 % Komplement zu keiner Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zu den Kontrollen. Setzt man die Komplementfaktoren in einer Konzentration von 6 % ein, ist zwar bei beiden mAK eine Reduktion des Anteils metabolisch aktiver Zellen zu erkennen, jedoch führt die Behandlung auch bei den Kontrollzellen zu einer starken Einschränkung der Zellviabilität.

5 Diskussion

5.1 Der zellbasierte Assay als Methode zum Screening der Hybridomüberstände

Die Reaktivität von Antikörpern gegenüber ihrem Zielantigen kann auf verschiedenen Wegen quantifiziert werden. In der Frage nach einer adäquaten Methodik zur Testung der OMGP-Reaktivität dienten insbesondere die Erkenntnisse aus der jahrelangen Evaluierung von anti-MOG Antikörpern als orientierende Grundlage, da es sich bei MOG (Weber, Derfuss et al. 2018) wie auch bei OMGP (Chang, Susuki et al. 2010) um ein oberflächlich lokalisiertes und somit gut für Antikörper zugängliches Glykoprotein handelt. Eine Vielzahl an Methoden zur Messung von anti-MOG Antikörpern wurde bereits angewendet und ausführlich diskutiert (Mayer and Meinel 2012, Reindl, Schanda et al. 2020), wobei zellbasierte Assays als derzeitiger Goldstandard gelten (Jarius, Paul et al. 2018). Kurzgesagt werden dabei Zellen transfiziert, sodass sie das Zielantigen exprimieren (Mayer and Meinel 2012). Die Reaktivität der Antikörper kann dann mittels Durchflusszytometrie (Probstel, Dornmair et al. 2011, Waters, Woodhall et al. 2015, Winklmeier, Schluter et al. 2019) oder Immunzytochemie (Jarius, Ruprecht et al. 2016) bestimmt werden. Der große Vorteil zellbasierter Methoden ist die Erhaltung des Proteins in seiner nativen Konformation (Mayer and Meinel 2012).

Zum Screening der Hybridom-Überstände wurde ein zellbasierter Assay verwendet, der durch Melania Spadaro, PhD (AG Meinel) für die Quantifizierung von anti-MOG Autoantikörpern etabliert (Spadaro and Meinel 2016) worden war. Grundprinzip ist die durchflusszytometrische Messung der Antikörper-Reaktivität gegenüber transfizierten HeLa-Zellen, wobei die Detektion der Antikörper mit einem biotinylierten anti-IgG Antikörper und *AlexaFluor®* 647-konjugiertem Streptavidin erfolgt (Spadaro and Meinel 2016). Um humane anti-OMGP Autoantikörper zu detektieren, wurde der Assay durch die PhD-Studentin Ramona Gerhards (AG Meinel) modifiziert. Als Besonderheit ist die Verwendung zweier unterschiedlicher hOMGP-Konstrukte hervor zu heben: Während hOMGP-GPI dem tatsächlichen Zustand des Proteins entspricht (Mikol and Stefansson 1988), wurde das Screening der hOMGP-TM-Reaktivität als zusätzliches Auswertesystem ergänzt, da aufgrund des im Vergleich zu den GPI-Konstrukten fehlenden *ribosome skipplings* eine höhere Stabilität bei der Evaluierung besteht (Gerhards, Pfeffer et al. 2020). Im Rahmen des zellbasierten Assays wurde die Reaktivität von 133 Hybridom-Überständen gegenüber hOMGP-TM, hOMGP-GPI und rOMGP-GPI bestimmt. Da die für

klinische Fragestellungen relevante Einteilung in positive und negative Proben bei der Testung der Hybridom-Überstände weniger entscheidend war als der Vergleich der Reaktivitäten untereinander, wurde kein *Cutoff* definiert. Außerdem erfolgte die Auswertung für die GPI-Konstrukte im Gegensatz zum Screening humaner Autoantikörper (Gerhards, Pfeffer et al. 2020) nicht mittels eines individuellen, horizontalen Gatings, da die Schwierigkeit eines schwankenden Hintergrundsignals bei der Testung der Hybridom-Überstände nicht bestand. Zunächst wurden alle Überstände in einer 1:2 Verdünnung eingesetzt, ohne dass deren exakte Konzentration bekannt war. Es muss deshalb angenommen werden, dass mitunter auch Variationen in der Antikörper-Konzentration zu Unterschieden in der OMGP-Reaktivität beigetragen haben könnten. In allen weiteren Versuchen wurde diese Problematik vermieden, da die IgG-Konzentration der ausgewählten mAK 22H6, 14A9, 26B11 und 31A4 bestimmt wurde und als Grundlage für die Verdünnung diente. Weiterhin muss bedacht werden, dass sich Schwankungen der Transfektionseffizienz zwischen einzelnen Versuchen (z.B. durch Unterschiede in der Konfluenz der Zellen) ebenfalls zuungunsten der Vergleichbarkeit der Ergebnisse auswirken können. Um dies in zukünftigen Versuchen zu verhindern, ist die Testung mithilfe einer stabilen Zelllinie eine Möglichkeit. Dieses Verfahren wird auch bei der Detektion von anti-MOG Autoantikörpern angewendet (Horellou, Wang et al. 2015).

Alle Überstände wurden primär durch die Mitarbeitenden des Helmholtz-Zentrums München anhand eines ELISA-Tests gescreent (je nach Immunisierung wurde die Reaktivität gegenüber hOMGP oder dem rOMG-Peptid bestimmt). Nur die OMGP-positiven Überstände wurden der AG Meinl übergeben und im Rahmen dieser Arbeit anhand des zellbasierten Assays evaluiert. Von den Überständen, die durch Immunisierung mit hOMGP generiert worden waren, zeigten dabei 5 % keine Reaktivität gegenüber hOMGP-TM und 35 % keine Reaktivität gegenüber hOMGP-GPI. Jedoch war die Korrelation zwischen der hOMGP-GPI- und der hOMGP-TM-Reaktivität sehr hoch ($r=0.87$). Innerhalb der Gruppe der Überstände, die durch Injektion des rOMG-Peptids erzeugt worden waren, wiesen 63 % keine Reaktivität gegenüber rOMGP-GPI auf. Es zeigte sich also sowohl eine Diskrepanz 1) zwischen den Ergebnissen des ELISA und des zellbasierten Assays als auch 2) zwischen der Reaktivität gegenüber den GPI-Konstrukten im Vergleich zum TM-Konstrukt. 1) Eine fehlende Konkordanz zwischen ELISA und zellbasierten Methoden ist auch für die Detektion humaner anti-MOG Autoantikörper beschrieben (Reindl, Schanda et al. 2020). Dieses Phänomen wird unter anderem mit der inkorrekten Konformation des Antigens bei der ELISA-Testung begründet (Mayer and Meinl 2012). 2) Die Unterschiede in der Reaktivität gegenüber hOMGP-TM im Vergleich zu den GPI-

verankertem rOMGP und hOMGP erklärten wir uns insbesondere durch die Instabilität der GPI-verankerten Konstrukte aufgrund des *ribosome skipplings*. Einige der durch hOMGP-Injektion generierten Überstände wiesen eine Kreuzreaktivität gegenüber rOMGP auf, was aufgrund der hohen Spezies-übergreifenden Übereinstimmung der OMGP-Aminosäuresequenz (Vourc'h and Andres 2004) als zu erwartender Befund gewertet wurde. Jedoch zeigte keiner der Überstände, die durch eine Immunisierung mit dem rOMG-Peptid hergestellt wurden, eine relevante Kreuzreaktivität gegenüber hOMGP. Die Sequenz des Polypeptids rOMG-Peptid (UNIPROT, Q7TQ25) weicht in drei Aminosäuren (Alanin statt Threonin, Glutamin statt Prolin, Prolin statt Leucin) von der entsprechenden humanen Sequenz (UNIPROT, P23515) ab (Abbildung 5-1).

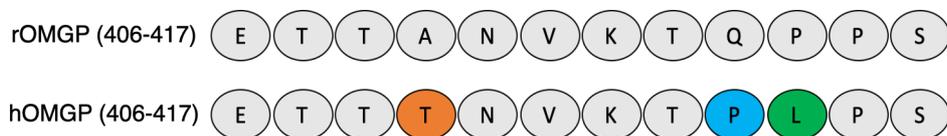


Abbildung 5-1 Darstellung der Aminosäure-Sequenz des zur Immunisierung verwendeten rOMG-Peptids und seiner Abweichungen zur entsprechenden humanen Sequenz

Um monoklonale anti-OMGP Antikörper zu generieren, wurde die Hybridom-Technik angewandt. Während die Mehrzahl der Tiere mit hOMGP immunisiert wurde, wurde bei einem kleineren Teil der Tiere das rOMG-Peptid verwendet, dessen Aminosäure-Sequenz oben abgebildet ist (UNIPROT, Q7TQ25). Im Vergleich mit der entsprechenden humanen Aminosäure-Sequenz (UNIPROT, P23515) zeigt sich eine Übereinstimmung von 75 %. Drei Aminosäuren unterscheiden sich von der humanen Sequenz (Alanin (A) statt Threonin (T), Glutamin (Q) statt Prolin (P), Prolin (P) statt Leucin (L)).

Es ist unklar, ob der Austausch einer einzelnen Aminosäure oder die Kombination entscheidend für den Verlust der Antikörper-Reaktivität war. Veränderungen in der Glykosylierung des Proteins sind vermutlich nicht ausschlaggebend, da die Aminosäure-Substitutionen keine Glykosylierungsstellen für O- oder N-verlinkte Zuckerketten betreffen (Hema Thanka Christlet and Veluraja 2001). Die exaktere Untersuchung immunogener Epitope durch Substitutionen einzelner Aminosäuren stellt ein interessantes Thema für zukünftige Versuche dar.

5.2 Auswahl geeigneter monoklonaler anti-OMGP

Antikörper

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war der Erhalt geeigneter monoklonaler anti-OMGP Antikörper. Diese mAK sollten anschließend im Rahmen dieser Arbeit und weiterer Projekte unter anderem für folgende Versuche verwendet werden:

- Versuche zur Charakterisierung des Antigens selbst (Immunfärbungen von Oligodendrozyten und Neuronen, Charakterisierung des Glykosylierungs-Musters im Western Blot)
- Untersuchung der antikörpervermittelten Autoimmunität gegenüber OMGP *in vitro* und *in vivo* hinsichtlich Pathogenität (Komplement-Assay, EAE-Modell) und Effekt der Deglykosylierung auf die Antikörperbindung (ELISA, zellbasierter Assay)

Da die Möglichkeit der stetigen Nachproduktion in großen Mengen von erheblichem Vorteil ist, sollten die mAK auch zur Etablierung von Versuchen verwendet werden, um diese im weiteren Verlauf mit kostbarem Patienten-Material zu wiederholen. Anhand der Ergebnisse des Screenings von 133 Hybridom-Überständen, die durch Immunisierung von Ratten und Mäusen mit hOMGP oder rOMG-Peptid generiert worden waren, wurden die vier Überstände 22H6, 14A9, 26B11 und 31A4 ausgewählt. Nach Subklonierung der entsprechenden Klone und anschließender Aufreinigung durch die Mitarbeitenden der *Monoclonal Antibody Core Facility* des Helmholtz-Zentrums München erhielten wir letztlich vier monoklonale anti-OMGP Antikörper. Entsprechend des geplanten Einsatzes der mAK im Rahmen vieler unterschiedlicher Methoden mussten bei der Auswahl verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Die Auswahlkriterien sind in *Tabelle 5-1* abgebildet.

Tabelle 5-1 Auswahlkriterien des Screenings der Hybridom-Überstände

Kriterien	22H6 (IgG2A)	14A9 (IgG2B)	26B11 (IgG2A)	31A4 (IgG2B)
Hohe Reaktivität gegenüber hOMGP im zellbasierten Assay	+	+		+
Hohe Reaktivität gegenüber rOMGP im zellbasierten Assay	+	+		+
Hohe Reaktivität gegenüber mOMGP im zellbasierten Assay*	+	+		+
Komplement-bindender Isotyp**		+	+	+
Unterschiedliche Spezies	Ratte	Ratte	Maus	Maus
Unterschiedliche Immunisierung	hOMGP	hOMGP	rOMG-Peptid	hOMGP

*nicht Teil des initialen Screenings, nachträgliche Testung ausgewählter Antikörper

**die Angaben wurden der Fachliteratur entnommen (Strohl and Strohl 2012, Collins 2016)

Eine wichtige Limitation stellte die Tatsache dar, dass die Auswahl der mAK anhand der Testung von Vorkulturen erfolgte, eine endgültige Beurteilung jedoch erst nach Subklonierung des entsprechenden Klons möglich ist (Holzlohner and Hanack 2017). Im Falle des Hybridoms 26B11 zeigte der mAK nach Subklonierung und Aufreinigung eine abgeschwächte rOMGP-Reaktivität in der Durchflusszytometrie, sodass dieser aufgrund seiner verringerten Reaktivität nicht weiter verwendet wurde.

Eine weitere Einschränkung stellen Isotyp-spezifische Besonderheiten dar, die einen Antikörper für funktionelle Experimente ungeeignet machen können. Humane anti-OMGP Autoantikörper weisen in der Mehrzahl der Fälle den Isotyp IgG1 auf (Gerhards, Pfeffer et al. 2020), der zur Komplementaktivierung fähig ist (Bruggemann, Williams et al. 1987). Der Antikörper 22H6 (Ratte, IgG2A) besitzt diese Fähigkeit allerdings aufgrund seines Isotyps nicht in physiologisch relevantem Maße (Strohl and Strohl 2012), sodass er einen möglicherweise wichtigen pathophysiologischen Aspekt der durch anti-OMGP Antikörper vermittelten Autoimmunität im Menschen nicht abbilden kann. Die Humanisierung von Antikörpern, erstmals gelungen im Jahre 1986 (Jones, Dear et al. 1986), bietet einen möglichen Lösungsansatz für diese Problematik: dabei werden lediglich die für die Antigen-Erkennung relevanten *complementarity-determining regions* in einen humanen Antikörper gespleißt (Murphy and Weaver 2018). Exemplarisch ist die Humanisierung des monoklonalen anti-MOG Antikörpers 8-18-C5 zu nennen (Lehmann-Horn, Wang et al. 2016). Zuletzt muss angemerkt werden, dass das Ziel-Epitop der drei mAK 22H6, 14A9 und 31A4 unklar ist, da diese durch Immunisierung mit dem kompletten Protein hOMGP generiert worden sind. Es ist möglich, dass sich humane Autoantikörper gegen andere Epitope richten als mAK der Maus und Ratte. Einen möglichen Ansatz, um dies zu untersuchen, stellt das sogenannte *Epitope Mapping* dar (Sinmaz, Nguyen et al. 2016).

Zusammengefasst stehen uns nun drei monoklonale anti-OMGP Antikörper zur Verfügung (22H6, 14A9, 31A4), die sich aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften und Vorteile für jeweils unterschiedliche funktionelle Methoden eignen. Im ELISA und zellbasierten Assay konnte anhand von Verdünnungsreihen dargestellt werden, dass die mAK 22H6 und 31A4 bei gleicher Konzentration eine mit dem kommerziellen mAK MAB1674 vergleichbare OMGP-Reaktivität aufweisen, wobei der Antikörper 22H6 konstrukt-übergreifend die konstantesten Werte aufwies und somit den potentesten Antikörper darstellt. Der mAK 14A9 ist - verglichen mit dem kommerziellen mAK - in seiner Reaktivität gegenüber allen Konstrukten etwas schwächer. Allen Antikörpern ist gemein, dass sie eine niedrigere mOMGP-Reaktivität besitzen als der mAK MAB1674. Allerdings weisen mAK auch ihre

Limitationen auf, sodass sie trotz ihrer Vorteile nicht die Anwendung humaner Autoantikörper im Rahmen von *in vitro* und *in vivo* Versuchen ersetzen können. Ihr Einsatz zur Etablierung von Versuchen kann allerdings zur Einsparung von Patientenmaterial genutzt werden.

5.3 Bedeutung der Glykosylierung des Antigens hOMGP für dessen Erkennung durch monoklonale anti-OMGP Antikörper

Inwiefern die Antigen-Reaktivität von Antikörpern durch die Glykosylierung des Antigens beeinflusst wird, kann nicht vereinheitlicht werden. Das Glykoprotein MOG besitzt insgesamt eine N-Glykosylierungsstelle (N31) (Mayer, Breithaupt et al. 2013). Anhand zweier verschiedener N31-Mutanten konnte bei 60 % der Patienten eine veränderte MOG-Reaktivität induziert werden, die sich auf einem breiten Spektrum zwischen einer verminderten bis hin zu einer gesteigerten Antigen-Reaktivität bewegte und zusammenfassend in sieben unterschiedliche Muster eingeteilt werden konnte (Marti Fernandez, Macrini et al. 2019). Dies unterstreicht einerseits die wichtige Rolle der N-Glykosylierung in der Antigen-Erkennung durch humane anti-MOG Autoantikörper und spiegelt andererseits die enorme Heterogenität dieser Antikörper wieder (Marti Fernandez, Macrini et al. 2019). Während die N-Glykosylierung von MOG im Rahmen dieser Studie bei keinem Patienten der bestimmende Faktor für die Antigen-Erkennung war (Marti Fernandez, Macrini et al. 2019), zeichnet sich für das Antigen Contactin-1 ein differentes Bild ab: Eine Untersuchung von anti-Contactin-1 Antikörpern bei vier Patienten mit chronischer inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie zeigte in drei von vier Fällen eine Abhängigkeit der Antigen-Bindung von der N-Glykosylierung (Labasque, Hivert et al. 2014). Wie eingangs beschrieben, ist OMGP stark glykosyliert (Mikol and Stefansson 1988). Zudem kann das Protein das (aus einem sulfatierten Trisaccharid bestehende (Voshol, van Zuylen et al. 1996)) HNK-1-Epitop exprimieren (Mikol, Gulcher et al. 1990), welches unter anderem bei einer Subgruppe von Patienten mit Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom als Zielantigen von Autoantikörpern beschrieben wurde (Armangue, Sabater et al. 2016).

In dieser Arbeit konnte das HNK-1-Epitop sowohl auf rekombinantem hOMGP als auch auf hOMGP-exprimierenden HeLa-Zellen mithilfe eines anti-HNK-1 Antikörpers nachgewiesen werden. In Zusammenschau stellt der Einfluss der Glykosylierung des Zielantigens auf die Reaktivität von anti-OMGP Autoantikörpern also eine naheliegende Fragestellung dar.

Zur vergleichenden Evaluierung der Antikörper-Reaktivität vor und nach Deglykosylierung des Antigens wurden zwei unterschiedliche Methoden gewählt, um die finale Aussagekraft der Ergebnisse zu steigern. Einerseits wurde rekombinantes hOMGP deglykosyliert und der Effekt der Antikörperbindung im ELISA überprüft. Zusätzlich erfolgte nach der Deglykosylierung hOMGP-exprimierender HeLa-Zellen eine Evaluierung der Antikörper-Reaktivität im zellbasierten Assay.

Für die Modifikation der Glykosylierung von Proteinen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde zunächst die Behandlung hOMGP-exprimierender HeLa-Zellen mit Tunicamycin (Inhibierung N-verlinkter Zuckerketten) mit der enzymatischen Deglykosylierung von hOMGP-GPI exprimierenden HeLa-Zellen und von rekombinant hergestelltem hOMGP mittels PNGase F (Entfernung N-verlinkter Zuckerketten) und eines Deglykosylierungsmix (Entfernung N- und O-verlinkter Zuckerketten) verglichen. Da Tunicamycin bereits in niedriger Dosis ein Absterben der Zellen induzierte, wurde die enzymatische Deglykosylierung bevorzugt. Die Methode wurde unter anderem auch durch Derfuss et al. verwendet, um den Effekt der Zuckerketten auf die Erkennung des in *Kapitel 2.3.3* beschriebenen Proteins Contactin-2 durch humane Autoantikörper zu untersuchen (Derfuss, Parikh et al. 2009).

Die Überprüfung der Deglykosylierung erfolgte in der Gelelektrophorese (rekombinantes hOMGP) oder im Western Blot (aus pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierten Zellen extrahiertes hOMGP). Das Molekulargewicht der Zuckerketten ist für das Protein OMGP bekannt (Vourc'h and Andres 2004) und der Größenunterschied durch fehlende Zuckermoleküle konnte dadurch sichtbar gemacht werden. Es muss angemerkt werden, dass es sich hierbei nur um eine indirekte und relativ ungenaue Messmethode handelt: Erstens erlaubt die Methodik in diesem Fall nur eine grobe Beurteilung des Molekulargewichts im Bereich mehrerer kDa und lässt nicht erkennen, ob einzelne Zuckerketten verblieben sind. Zweitens besteht das Problem, dass die Deglykosylierung möglicherweise eine Konformationsänderung des Proteins induziert, was auf diese Weise ebenfalls nicht beurteilt werden kann. Durch die enzymatische Deglykosylierung pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierter Zellen mittels PNGase F wurde ein Größenunterschied von etwa 10-15 kDa erreicht, was 10-15 kDa unter dem gemäß der Literatur zu erwartenden Größenunterschied lag (Vourc'h and Andres 2004). Die Behandlung des rekombinanten hOMGP mit dem Enzym PNGase F hingegen führte zu einer Reduzierung des Molekulargewichts um 20-25 kDa, was annähernd dem kompletten Molekulargewicht der N-verlinkten Zuckerketten entspricht (Mikol and Stefansson 1988). Jedoch konnte durch den umfassenderen Deglykosylierungsmix lediglich eine

Reduktion des Molekulargewichts von insgesamt 30-35 kDa erzielt werden. Dieser sollte das Protein jedoch vollständig von den Zuckerketten befreien und zu einer Reduktion des Molekulargewichts um 55 kDa führen (Vourc'h and Andres 2004). Es besteht somit eine Differenz von 20-25 kDa zur tatsächlichen Masse der Zuckerketten (Vourc'h and Andres 2004), sodass von einer nur partiellen Deglykosylierung des Proteins ausgegangen werden muss.

Die Ergebnisse der Deglykosylierungs-Experimente sprechen dafür, dass die anti-OMGP Antikörper 22H6, 14A9, 31A4, MAB1674 und AF1674 eher den Proteinanteil als die Zuckerketten von hOMGP erkennen und binden. Aufgrund der beschriebenen methodischen Schwachpunkte sind die Daten jedoch mit Einschränkungen zu betrachten. Mögliche Ansätze für eine Optimierung der Methodik sind an mehreren Punkten zu erwägen: Eine exakte Überprüfung der Deglykosylierung ist mittels Massenspektrometrie möglich. Diese Methode fand unter anderem in der oben beschriebenen Arbeit zur Deglykosylierung des Proteins MOG Anwendung (Marti Fernandez, Macrini et al. 2019). Eine weitere Option ist die Verwendung von Zelllinien mit eingeschränkter oder aberranter Glykosylierung. Beispielsweise weist die HEK293S GnT-I⁻ Zelllinie eine fehlende N-Glykosylierung auf (Reeves, Callewaert et al. 2002). Diese Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit über mehrere Wochen kultiviert. Da jedoch keine ausreichende Transfektionseffizienz erreicht wurde, musste der Ansatz verworfen werden. Um die Aussagekraft der Daten weiter zu erhöhen, ist zudem eine erneute Durchführung der Versuche mit humanem Material nötig, da Autoantikörper von Patienten möglicherweise andere Epitope binden als mAK der Maus und Ratte.

5.4 Monoklonale anti-OMGP Antikörper binden sowohl murine OPCs als auch reife Oligodendrozyten *in vitro*

Das Vorkommen von OMGP auf OPCs und Oligodendrozyten wurde im Rahmen einzelner Arbeiten beschrieben (Nie, Ma et al. 2006, Huang, Wang et al. 2012). Umstritten ist dabei, inwieweit das OMGP die Myelinisierung beeinflusst: Während Lee et al. unter anderem eine 20-prozentige Reduktion myelinisierter Rückenmarks-Axone in OMGP-Knockout-Mäusen beschrieben (Lee, Hu et al. 2011), lokalisierten Chang et al. das Protein anhand von murinen Rückenmarksschnitten außerhalb des kompakten Myelins (Chang, Susuki et al. 2010). Die Färbung muriner OPCs und Oligodendrozyten mit monoklonalen anti-OMGP Antikörpern erfolgte aus mehreren Gründen: Erstens sollte die OMGP-Expression in Abhängigkeit von der Oligodendrozyten-Reifung charakterisiert und mit der bestehenden Literatur

verglichen werden. Zweitens war es für uns in Hinblick auf zukünftige *in vivo* Versuche von Interesse, ob die neu produzierten mAK ihr Antigen auf murinen OPCs/Oligodendrozyten binden. Drittens sollten die Färbungen für zukünftige Versuche mit humanem Material etabliert werden.

Für die Immunfärbungen wurden murine OPCs/Oligodendrozyten gemäß Protokoll der AG Kuhlmann in drei unterschiedlichen Differenzierungsstadien fixiert, die ausführlich in *Kapitel 3.2.4.3* beschrieben werden. Die Auswahl dieser Zeiträume erfolgte in enger Beratung mit den Wissenschaftlerinnen der AG Kuhlmann, wobei folgende Überlegungen eine Rolle spielten: Die OMGP-Expression sollte auf Zellen eines möglichst breiten Differenzierungs-Spektrums verglichen werden, das sowohl undifferenzierte OPCs, als auch differenzierte Oligodendrozyten enthalten sollte. Aus diesem Grund sollten undifferenzierte OPCs das eine Ende dieses Spektrums markieren. Induziert man die Differenzierung von OPCs gemäß Protokoll der AG Kuhlmann, entwickeln sich diese Vorläuferzellen innerhalb von 48 h zu reifen, MBP-exprimierenden Oligodendrozyten (Preisner, Albrecht et al. 2015). Diese Zellen sollten also den Endpunkt der Differenzierung darstellen. Als Zwischenstadium wurden in Übereinstimmung mit vergangenen Publikationen der AG Kuhlmann (Preisner, Albrecht et al. 2015) Zellen nach 24 h Differenzierung ausgewählt. Eine mikroskopische Begutachtung der Zellen, im Rahmen derer anhand der Zellausläufer Rückschlüsse auf das Reifungsstadium der Zellen getroffen werden kann (Eyer mann, Czaplinski et al. 2012), diente vor Fixierung der Zellen als wichtige Kontrolle. Zudem erfolgte die Ko-Lokalisierung unseres Antigens mit den etablierten, für einzelne Reifungsstadien spezifischen Markern O4 und MBP (Bradl and Lassmann 2010). In Zusammenschau wurde dadurch eine hohe Präzision und Reproduzierbarkeit der Methodik gewährleistet. In einer Konzentration von 5-20 $\mu\text{g/ml}$ zeigten drei (AF1674, 22H6, 14A9) der insgesamt sechs anti-OMGP Antikörper eine deutliche Färbung muriner OPCs und Oligodendrozyten. Betrachtet man das Expressionsmuster im Rahmen der Differenzierung, zeigten unsere Färbungen eine OMGP-Expression in allen drei Reifungsstadien der OPCs/Oligodendrozyten. OMGP konnte dabei sowohl auf O4-positiven, als auch auf MBP-positiven Zellen detektiert werden. Dies steht im Einklang mit weiteren Forschungsarbeiten (Nie, Ma et al. 2006, Huang, Wang et al. 2012). Da keine Quantifizierung OMGP-exprimierender Oligodendrozyten erfolgte, können Unterschiede in der Expression zwischen den einzelnen Reifungsstadien nur als Tendenz angegeben werden: So besteht der optische Eindruck, dass Zellen nach 48 h Differenzierung etwas weniger OMGP exprimieren als jene nach 24 h Differenzierung. Die Beobachtung einer reduzierten OMGP-Expression auf reifen, MBP-positiven Oligodendrozyten im Vergleich zu deren unreifen Vorläufern wurde

bereits durch Huang et al. beschrieben (Huang, Wang et al. 2012). Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte die Freisetzung des Proteins sein: Wie eingangs beschrieben, kann das GPI-verankerte Protein OMGP durch das Enzym Phospholipase C geschnitten werden (Mikol and Stefansson 1988).

Gewisse Limitationen müssen an dieser Stelle benannt werden. Eine relevante Problematik von Immunfärbungen kann die mangelnde Spezifität der eingesetzten Antikörper sein. Auch in der OMGP-Literatur finden sich hierfür Beispiele. So testeten Chang et al. im Jahre 2010 einen anti-OMGP Antikörper, der unter anderem im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit von Habib et al. eine Färbung im Bereich der Ranvier'schen Schnürringe ergeben hatte (Habib, Marton et al. 1998). Anhand eines Knockout-Experiments wurde im Nachhinein jedoch eine Kreuzreaktivität dieses Antikörpers gegenüber dem extrazellulären Protein Versican V2 nachgewiesen (Chang, Susuki et al. 2010). Im Rahmen dieser Arbeit erzeugte der anti-OMGP Antikörper 26B11, dessen mOMGP-Reaktivität weder im ELISA, noch im zellbasierten Assay bestätigt werden konnte, bei Einsatz in höheren Konzentrationen (50 $\mu\text{g/ml}$) eine Färbung muriner OPCs/Oligodendrozyten, die wir folglich als unspezifisch werteten. Als eine Möglichkeit, um die Spezifität unserer Antikörper zu bestätigen, ist die Färbung von Zellen aus OMGP-Knockout Mäusen zu erwägen. Eine weitere Limitation ist die beschränkte Aussagekraft hinsichtlich quantitativer Merkmale der OMGP-Expression. Eine durchflusszytometrische Testung zur Quantifizierung des genauen Anteils OMGP-positiver Zellen wäre eine sinnvolle und objektive Option. Zuletzt muss - wie auch in vorherigen Kapiteln - erwähnt werden, dass die Färbung muriner Zellen mittels mAK der Ratte und Maus nicht die Färbung humaner Zellen mit humanem Material ersetzen kann, da sich sowohl die Ziel-Epitope der Antikörper, als auch die OMGP-Expression auf OPCs und Oligodendrozyten im humanen System unterscheiden können.

In Zusammenschau sprechen unsere Versuche für eine Expression von OMGP im Rahmen des gesamten Reifungsprozesses von OPCs bis hin zu reifen Oligodendrozyten. In Hinblick auf die antikörpervermittelte Autoimmunität gegenüber OMGP könnte diese Beobachtung verschiedene Folgen haben. OPCs sind die Mediatoren der Remyelinisierung (Höftberger and Lassmann 2018), eines Prozesses, der bei der MS vermutlich zu einem verbesserten Outcome beiträgt (Kremer, Akkermann et al. 2019). Durch die Bindung von OPCs könnten anti-OMGP Antikörper folglich diesen Prozess beeinflussen und damit eine Rolle in der Prognose der Erkrankung spielen. Da die Pathomechanismen humaner anti-OMGP Autoantikörper jedoch bislang nicht ausreichend bekannt sind, kann die exakte Rolle nicht weiter spezifiziert werden. Sowohl positive als auch negative Effekte sind

denkbar. Eine ausführliche Diskussion möglicher Pathomechanismen humaner anti-OMGP Autoantikörper findet sich in der Dissertation der PhD-Studentin Ramona Gerhards. Ferner lassen die Ergebnisse der Färbungen annehmen, dass unsere neu produzierten monoklonalen anti-OMGP Antikörper 14A9 und 22H6 ihr Antigen auch auf murinen Zellen erkennen, was für deren Eignung im Rahmen von *in vivo* Versuchen spricht. Eine Wiederholung der Versuche mit humanen Zellen und Antikörpern wird für die Zukunft anvisiert. Die durchgeführten Versuche legen dafür einen wichtigen Baustein.

5.5 Untersuchungen zur komplementvermittelten Lyse

Autoantikörper können auf verschiedene Weise pathogen auf ihre Zielzellen wirken, wobei die komplementvermittelte Zytotoxizität einen dieser Effektormechanismen darstellt (Ludwig, Vanhoorelbeke et al. 2017). Das Komplementsystem ist Teil der angeborenen Immunabwehr und besteht aus einer Gruppe löslicher Proteine (Murphy and Weaver 2018). Die Aktivierung dieses Systems kann auf drei verschiedene Arten erfolgen, wovon der antikörpervermittelte Weg eine Möglichkeit abbildet (Murphy and Weaver 2018). Gemeinsamer Endpunkt ist letztlich die Zerstörung von Krankheitserregern (Murphy and Weaver 2018). Wie in *Kapitel 2.3* beschrieben, konnte sowohl für humane anti-MOG Autoantikörper (Peschl, Schanda et al. 2017), als auch für humane anti-AQP-4 Autoantikörper (Jarius and Wildemann 2010) eine Fähigkeit zur Komplementaktivierung nachgewiesen werden (Mader, Kumpfel et al. 2020).

Humane anti-OMGP Autoantikörper besitzen meist den IgG1-Isotyp (Gerhards, Pfeffer et al. 2020), dessen Funktion als Aktivator der Komplementkaskade erwiesen ist (Bindon, Hale et al. 1988). Jedoch gibt es weitere Eigenschaften von Antikörpern, die für deren Fähigkeit zur Komplementaktivierung relevant sind: Diebolder et al. wiesen nach, dass IgG-Antikörper durch die Bildung von Antikörper-Hexameren auf der Zelloberfläche die Komplementkaskade aktivieren (Diebolder, Beurskens et al. 2014). Es wird angenommen, dass eine monovalente Antigen-Bindung diese Hexamerbildung und damit die Komplementaktivierung begünstigt (Diebolder, Beurskens et al. 2014). Ob die neu hergestellten mAK ihr Antigen monovalent binden, ist nicht bekannt. Auch ist die Art der Anordnung der Zielproteine auf den Zellen für die Komplementaktivierung durch Antikörper von Relevanz, wie kürzlich für anti-Aquaporin-4 Autoantikörper gezeigt werden konnte (Soltys, Liu et al. 2019). Auch darüber liegen für das Antigen hOMGP keine Daten vor.

In dieser Arbeit wurde die Fragestellung an murinen OPCs evaluiert. Basierend auf den Ergebnissen der Immunfärbungen wurden die monoklonalen anti-OMGP Antikörper 22H6 und 14A9 für den Komplement-Assay verwendet, da diese die höchste Reaktivität gegenüber murinen OPCs gezeigt hatten. Der Antikörper 22H6 weist den Isotyp IgG2A auf, welcher bei Ratten zu keiner signifikanten Komplement-Bindung fähig ist (Strohl and Strohl 2012). Folglich erwarteten wir von diesem Antikörper einen geringeren Effekt auf die Zellviabilität als von dem mAK 14A9. Letzterer besitzt den Isotyp IgG2B, der aufgrund seiner Komplement-aktivierenden Eigenschaften (Strohl and Strohl 2012) im Rahmen dieses Versuchs eine bessere Annäherung an die humanen Autoantikörper darstellte. Die Zugabe von Antikörpern und Komplement zu der murinen Zellkultur konnte bereits im OPC-Stadium erfolgen, da eine Bindung von OPCs durch die mAK 22H6 und 14A9 im Rahmen der Immunfärbungen bestätigt worden war. Die Wahl der Konzentrationen (4 %, 6 %) des Komplements war anhand von Vorversuchen etabliert worden, die eine alleinige Zelltoxizität in Abwesenheit der mAK bei Verwendung in Konzentrationen ab 8 % gezeigt hatten. Als möglicher Schwachpunkt des Ansatzes ist das Haften der Zellen am Boden der Zellkulturplatte zu diskutieren, was zu einer eingeschränkten Zugänglichkeit der Ziel-Epitope führen kann. Die luminometrische Messung der ATP-Konzentration weist den großen Vorteil auf, dass sie im Gegensatz zur Mikroskopie eine objektivere Beurteilung der Zellviabilität erlaubt.

Zusammengefasst ließ sich nach Inkubation der OPCs mit den mAK 14A9 und 22H6 zusammen mit 6 % Komplement eine Tendenz zur Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zu den Kontrollen erkennen. Erwartungsgemäß waren dabei die Effekte des mAK 14A9 bei einer Komplementkonzentration von 6 % ausgeprägter als die des mAK 22H6. Allerdings lag auch in den Kontrollen eine erhebliche Reduktion der Zellviabilität vor, was einen Schwachpunkt bei der Interpretation darstellt. Eine weitere Schwäche sind die starken Schwankungen der Zellzahl zwischen Versuch 1 und 2, welche die Vergleichbarkeit der Daten aus beiden Versuchen reduzieren. Insgesamt ist die Anzahl der vorliegenden Versuche (n=2) zudem nicht ausreichend, um ein statistisch signifikantes Ergebnis zu erreichen, sodass weitere Versuche zur Überprüfung nötig sein werden. Wichtige Ansätze für zukünftige Experimente sind die Humanisierung der monoklonalen anti-OMGP Antikörper, insbesondere des mAK 22H6, um ihre Effektormechanismen den humanen Autoantikörpern anzunähern. Zudem stellt eine Durchführung der Experimente mit humanen, von Patienten gewonnenen anti-OMGP Autoantikörpern auf humanen OPCs einen interessanten Ansatz dar.

5.6 Ausblick

Auf Basis der Entdeckung humaner Autoantikörper gegen OMGP, ein auf Neuronen und Oligodendrozyten exprimiertes, GPI-verankertes Glykoprotein, untersuchte diese Arbeit die Eigenschaften monoklonaler anti-OMGP Antikörper *in vitro*. Aus 133 Hybridom-Überständen, die in Zusammenarbeit mit der *Monoclonal Antibody Core Facility* des Helmholtz-Zentrums München durch Immunisierung mit dem Zielantigen generiert worden waren, wurden anhand eines zellbasierten Assays drei geeignete Kandidaten ausgewählt. Die drei mAK 22H6, 14A9 und 31A4 wurden mithilfe verschiedener immunologischer Methoden weiter evaluiert und sind in ihrer OMGP-Reaktivität mit einem kommerziellen mAK vergleichbar. Alle neu hergestellten mAK wiesen auch nach partieller Deglykosylierung des Zielantigens eine vergleichbare OMGP-Reaktivität auf, was darauf schließen lässt, dass diese mAK eher den Proteinanteil als die Zuckerketten ihres Zielantigens erkennen könnten - eine Beobachtung, die uns erste Erkenntnisse über die Rolle der Glykosylierung bei der Antigen-Erkennung gibt, die jedoch im Rahmen anderer Methoden weiter erörtert werden muss. Anhand von Immunfärbungen konnte zudem - im Einklang mit vorangegangenen wissenschaftlichen Arbeiten - sowohl auf OPCs, als auch auf differenzierten Oligodendrozyten eine OMGP-Bindung durch die neu hergestellten mAK nachgewiesen werden. Im Rahmen des Komplement-Assays erfolgte die Testung einer möglichen Effektorfunktion der neu hergestellten mAK. Es zeigte sich ein leichter negativer Einfluss der mAK auf die Zellviabilität, jedoch konnte eine signifikante komplementvermittelte Zytotoxizität nicht sicher nachgewiesen werden.

In Zusammenschau wurden mit dieser Arbeit erste Erkenntnisse über die Eigenschaften monoklonaler anti-OMGP Antikörper gesammelt, die im Rahmen weiterer Versuche spezifiziert und deren Übertragbarkeit auf das humane System gründlich überprüft werden muss. Die ausgewählten und charakterisierten mAK stellen *in vitro* und *in vivo* eine sinnvolle Ergänzung für zukünftige Fragestellungen zur Pathogenese der antikörpervermittelten Autoimmunität gegenüber OMGP dar, auch wenn ihre Limitationen selbstverständlich berücksichtigt werden müssen.

6 Literaturverzeichnis

Alliot, F., I. Godin and B. Pessac (1999). "Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain." Developmental Brain Research **117**(2): 145-152.

Andreone, B. J., B. Lacoste and C. Gu (2015). "Neuronal and vascular interactions." Annu Rev Neurosci **38**: 25-46.

Armangue, T., L. Sabater, E. Torres-Vega, E. Martinez-Hernandez, H. Arino, M. Petit-Pedrol, J. Planaguma, L. Bataller, J. Dalmau and F. Graus (2016). "Clinical and Immunological Features of Opsoclonus-Myoclonus Syndrome in the Era of Neuronal Cell Surface Antibodies." JAMA Neurol **73**(4): 417-424.

Ascherio, A., K. L. Munger, R. White, K. Kochert, K. C. Simon, C. H. Polman, M. S. Freedman, H. P. Hartung, D. H. Miller, X. Montalban, G. Edan, F. Barkhof, D. Pleimes, E. W. Radu, R. Sandbrink, L. Kappos and C. Pohl (2014). "Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression." JAMA Neurol **71**(3): 306-314.

Atwal, J. K., J. Pinkston-Gosse, J. Syken, S. Stawicki, Y. Wu, C. Shatz and M. Tessier-Lavigne (2008). "PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration." Science **322**(5903): 967-970.

Ayoglu, B., A. Haggmark, M. Khademi, T. Olsson, M. Uhlen, J. M. Schwenk and P. Nilsson (2013). "Autoantibody profiling in multiple sclerosis using arrays of human protein fragments." Mol Cell Proteomics **12**(9): 2657-2672.

Ayoglu, B., N. Mitsios, I. Kockum, M. Khademi, A. Zandian, R. Sjoberg, B. Forsstrom, J. Bredenberg, I. Lima Bomfim, E. Holmgren, H. Gronlund, A. O. Guerreiro-Cacais, N. Abdelmagid, M. Uhlen, T. Waterboer, L. Alfredsson, J. Mulder, J. M. Schwenk, T. Olsson and P. Nilsson (2016). "Anoctamin 2 identified as an autoimmune target in multiple sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(8): 2188-2193.

Bansal, R. and S. E. Pfeiffer (1989). "Reversible inhibition of oligodendrocyte progenitor differentiation by a monoclonal antibody against surface galactolipids." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(16): 6181-6185.

Bansal, R., A. E. Warrington, A. L. Gard, B. Ranscht and S. E. Pfeiffer (1989). "Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies O1, O4, and R-mAb used in the analysis of oligodendrocyte development." J Neurosci Res **24**(4): 548-557.

Barbarese, E., C. Barry, C. H. Chou, D. J. Goldstein, G. A. Nakos, R. Hyde-DeRuyscher, K. Scheld and J. H. Carson (1988). "Expression and localization of myelin basic protein in oligodendrocytes and transfected fibroblasts." J Neurochem **51**(6): 1737-1745.

Bell, E. and L. Bird (2005). "Autoimmunity." Nature **435**(7042): 583-583.

- Ben-Nun, A., H. Wekerle and I. R. Cohen (1981). "The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis." Eur J Immunol **11**(3): 195-199.
- Berger, T., P. Rubner, F. Schautzer, R. Egg, H. Ulmer, I. Mayringer, E. Dilitz, F. Deisenhammer and M. Reindl (2003). "Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event." N Engl J Med **349**(2): 139-145.
- Bindon, C. I., G. Hale, M. Bruggemann and H. Waldmann (1988). "Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q." J Exp Med **168**(1): 127-142.
- Bittner, S., S. Meuth and H. Wiendl (2015). Multiple Sklerose. Fragen und Antworten zur Neuroimmunologie. H. Wiendl. Bern, Hogrefe Verlag: 79-128.
- Borisow, N., M. Mori, S. Kuwabara, M. Scheel and F. Paul (2018). "Diagnosis and Treatment of NMO Spectrum Disorder and MOG-Encephalomyelitis." Front Neurol **9**: 888.
- Bradl, M. and H. Lassmann (2010). "Oligodendrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 37-53.
- Bradl, M. and H. Lassmann (2016). "Neurologic autoimmunity: mechanisms revealed by animal models." Handb Clin Neurol **133**: 121-143.
- Brilot, F., R. C. Dale, R. C. Selter, V. Grummel, S. R. Kalluri, M. Aslam, V. Busch, D. Zhou, S. Cepok and B. Hemmer (2009). "Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in children with inflammatory demyelinating central nervous system disease." Ann Neurol **66**(6): 833-842.
- Brimberg, L., S. Mader, Y. Fujieda, Y. Arinuma, C. Kowal, B. T. Volpe and B. Diamond (2015). "Antibodies as Mediators of Brain Pathology." Trends Immunol **36**(11): 709-724.
- Bruggemann, M., G. T. Williams, C. I. Bindon, M. R. Clark, M. R. Walker, R. Jefferis, H. Waldmann and M. S. Neuberger (1987). "Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies." J Exp Med **166**(5): 1351-1361.
- Brunner, C., H. Lassmann, T. V. Waehneltd, J. M. Matthieu and C. Linington (1989). "Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats." J Neurochem **52**(1): 296-304.
- Chang, K. J., K. Susuki, M. T. Dours-Zimmermann, D. R. Zimmermann and M. N. Rasband (2010). "Oligodendrocyte myelin glycoprotein does not influence node of ranvier structure or assembly." J Neurosci **30**(43): 14476-14481.
- Chen, M. S., A. B. Huber, M. E. van der Haar, M. Frank, L. Schnell, A. A. Spillmann, F. Christ and M. E. Schwab (2000). "Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1." Nature **403**(6768): 434-439.

Collaborators, G. B. D. M. S. (2019). "Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." Lancet Neurol **18**(3): 269-285.

Collins, A. M. (2016). "IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function." Immunol Cell Biol **94**(10): 949-954.

Compston, A. and A. Coles (2008). "Multiple sclerosis." The Lancet **372**(9648): 1502-1517.

Crouch, S. P. M., R. Kozlowski, K. J. Slater and J. Fletcher (1993). "The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity." Journal of Immunological Methods **160**(1): 81-88.

Dendrou, C. A., L. Fugger and M. A. Friese (2015). "Immunopathology of multiple sclerosis." Nat Rev Immunol **15**(9): 545-558.

Derfuss, T., K. Parikh, S. Velhin, M. Braun, E. Mathey, M. Krumbholz, T. Kumpfel, A. Moldenhauer, C. Rader, P. Sonderegger, W. Pollmann, C. Tiefenthaller, J. Bauer, H. Lassmann, H. Wekerle, D. Karagozeos, R. Hohlfeld, C. Linington and E. Meinl (2009). "Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(20): 8302-8307.

Diebold, C. A., F. J. Beurskens, R. N. de Jong, R. I. Koning, K. Strumane, M. A. Lindorfer, M. Voorhorst, D. Ugurlar, S. Rosati, A. J. Heck, J. G. van de Winkel, I. A. Wilson, A. J. Koster, R. P. Taylor, E. O. Saphire, D. R. Burton, J. Schuurman, P. Gros and P. W. Parren (2014). "Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface." Science **343**(6176): 1260-1263.

Dobson, R., S. Ramagopalan, A. Davis and G. Giovannoni (2013). "Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude." J Neurol Neurosurg Psychiatry **84**(8): 909-914.

Domeniconi, M., Z. Cao, T. Spencer, R. Sivasankaran, K. C. Wang, E. Nikulina, N. Kimura, H. Cai, K. Deng, Y. Gao, Z. He and M. T. Filbin (2002). "Myelin-Associated Glycoprotein Interacts with the Nogo66 Receptor to Inhibit Neurite Outgrowth." Neuron **35**(2): 283-290.

Dos Passos, G. R., L. M. Oliveira, B. K. da Costa, S. L. Apostolos-Pereira, D. Callegaro, K. Fujihara and D. K. Sato (2018). "MOG-IgG-Associated Optic Neuritis, Encephalitis, and Myelitis: Lessons Learned From Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder." Front Neurol **9**: 217.

Emery, B. and J. C. Dugas (2013). "Purification of oligodendrocyte lineage cells from mouse cortices by immunopanning." Cold Spring Harb Protoc **2013**(9): 854-868.

Engelhardt, B., R. O. Carare, I. Bechmann, A. Flugel, J. D. Laman and R. O. Weller (2016). "Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system." Acta Neuropathol **132**(3): 317-338.

Engelhardt, B., P. Vajkoczy and R. O. Weller (2017). "The movers and shapers in immune privilege of the CNS." Nat Immunol **18**(2): 123-131.

Esko, J. D., C. Bertozzi and R. L. Schnaar (2015). Chemical Tools for Inhibiting Glycosylation. Essentials of Glycobiology. ed, A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY): 701-712.

Eyermann, C., K. Czaplinski and H. Colognato (2012). "Dystroglycan promotes filopodial formation and process branching in differentiating oligodendroglia." J Neurochem **120**(6): 928-947.

Foote, A. K. and W. F. Blakemore (2005). "Inflammation stimulates remyelination in areas of chronic demyelination." Brain **128**(Pt 3): 528-539.

Fraussen, J., N. Claes, L. de Bock and V. Somers (2014). "Targets of the humoral autoimmune response in multiple sclerosis." Autoimmun Rev **13**(11): 1126-1137.

Frischer, J. M., S. Bramow, A. Dal-Bianco, C. F. Lucchinetti, H. Rauschka, M. Schmidbauer, H. Laursen, P. S. Sorensen and H. Lassmann (2009). "The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains." Brain **132**(Pt 5): 1175-1189.

Gerhards, R. Pfeffer, L. K. Lorenz, J. Starost, L. Nowack, L. Thaler, F. S. Schlüter, M. Rübsamen, H. Macrini, C. Winklmeier, S. Mader, S. Bronge, M. Grönlund, H. Feederle, R. Hsia, H. E. Lichtenthaler, S. F. Merl-Pham, J. Hauck, S. M. Kuhlmann, T. Bauer, I. J. Beltran, E. Gerdes, L. A. Mezydlo, A. Bar-Or, A. Banwell, B. Khademi, M. Olsson, T. Hohlfeld, R. Lassmann, H. Kümpfel, T. Kawakami, N. and E. Meinl (2020). "Oligodendrocyte myelin glycoprotein as a novel target for pathogenic autoimmunity in the CNS." Acta Neuropathol Commun. **30**;8(1):207.

Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, I. M. Samokhvalov and M. Merad (2010). "Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages." Science **330**(6005): 841-845.

Gold, R., C. Linington and H. Lassmann (2006). "Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research." Brain **129**(Pt 8): 1953-1971.

Gruchot, J., V. Weyers, P. Gottle, M. Forster, H. P. Hartung, P. Kury and D. Kremer (2019). "The Molecular Basis for Remyelination Failure in Multiple Sclerosis." Cells **8**(8).

Habib, A. A., J. R. Gulcher, T. Hognason, L. Zheng and K. Stefansson (1998). "The OMgp gene, a second growth suppressor within the NF1 gene." Oncogene **16**(12): 1525-1531.

Habib, A. A., L. S. Marton, B. Allwardt, J. R. Gulcher, D. D. Mikol, T. Hognason, N. Chattopadhyay and K. Stefansson (1998). "Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neurons in the mouse central nervous system." J Neurochem **70**(4): 1704-1711.

Hahn, S., G. Trendelenburg, M. Scharf, Y. Denno, S. Brakopp, B. Teegen, C. Probst, K. P. Wandinger, M. Buttman, A. Haarmann, F. Szabados, M. Vom Dahl, T. Kumpfel, P. Eichhorn, H. Gold, F. Paul, S. Jarius, N. Melzer, W. Stocker and L. Komorowski (2017). "Identification of the flotillin-1/2 heterocomplex as a target of autoantibodies in bona fide multiple sclerosis." J Neuroinflammation **14**(1): 123.

Hauser, S. L., E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R. J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould, C. H. Smith and H. T. Group (2008). "B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis." N Engl J Med **358**(7): 676-688.

Hausser-Kinzel, S. and M. S. Weber (2019). "The Role of B Cells and Antibodies in Multiple Sclerosis, Neuromyelitis Optica, and Related Disorders." Front Immunol **10**: 201.

Hema Thanka Christlet, T. and K. Veluraja (2001). "Database Analysis of O-Glycosylation Sites in Proteins." Biophysical Journal **80**(2): 952-960.

Herz, J., A. J. Filiano, A. Smith, N. Yogev and J. Kipnis (2017). "Myeloid Cells in the Central Nervous System." Immunity **46**(6): 943-956.

Hinson, S. R., A. McKeon, J. P. Fryer, M. Apiwattanakul, V. A. Lennon and S. J. Pittock (2009). "Prediction of neuromyelitis optica attack severity by quantitation of complement-mediated injury to aquaporin-4-expressing cells." Arch Neurol **66**(9): 1164-1167.

Höftberger, R. and H. Lassmann (2018). Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. Handbook of Clinical Neurology. G. Kovacs and I. Alafuzoff. Amsterdam, Elsevier. **145**: 263-283.

Hohlfeld, R., K. Dornmair, E. Meinl and H. Wekerle (2016). "The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets." The Lancet Neurology **15**(2): 198-209.

Hohlfeld, R., K. Dornmair, E. Meinl and H. Wekerle (2016). "The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8+ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research." Lancet Neurol **15**(3): 317-331.

Holzlohner, P. and K. Hanack (2017). "Generation of Murine Monoclonal Antibodies by Hybridoma Technology." J Vis Exp(119).

Horellou, P., M. Wang, V. Keo, P. Chretien, C. Serguera, P. Waters and K. Deiva (2015). "Increased interleukin-6 correlates with myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in pediatric monophasic demyelinating diseases and multiple sclerosis." J Neuroimmunol **289**: 1-7.

Horng, S., A. Therattil, S. Moyon, A. Gordon, K. Kim, A. T. Argaw, Y. Hara, J. N. Mariani, S. Sawai, P. Flodby, E. D. Crandall, Z. Borok, M. V. Sofroniew, C. Chapouly and G. R. John (2017). "Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis." J Clin Invest **127**(8): 3136-3151.

Huang, J. K., G. R. Phillips, A. D. Roth, L. Pedraza, W. Shan, W. Belkaid, S. Mi, A. Fex-Svenningsen, L. Florens, J. R. Yates, 3rd and D. R. Colman (2005). "Glial membranes at the node of Ranvier prevent neurite outgrowth." Science **310**(5755): 1813-1817.

Huang, J. Y., Y. X. Wang, W. L. Gu, S. L. Fu, Y. Li, L. D. Huang, Z. Zhao, Q. Hang, H. Q. Zhu and P. H. Lu (2012). "Expression and function of myelin-associated proteins and their common receptor NgR on oligodendrocyte progenitor cells." Brain Res **1437**: 1-15.

Ineichen, B. V., T. Moridi, T. Granberg and F. Piehl (2020). "Rituximab treatment for multiple sclerosis." Mult Scler **26**(2): 137-152.

Jarius, S., F. Paul, O. Aktas, N. Asgari, R. C. Dale, J. de Seze, D. Franciotta, K. Fujihara, A. Jacob, H. J. Kim, I. Kleiter, T. Kumpfel, M. Levy, J. Palace, K. Ruprecht, A. Saiz, C. Trebst, B. G. Weinshenker and B. Wildemann (2018). "MOG encephalomyelitis: international recommendations on diagnosis and antibody testing." J Neuroinflammation **15**(1): 134.

Jarius, S., F. Paul, D. Franciotta, P. Waters, F. Zipp, R. Hohlfeld, A. Vincent and B. Wildemann (2008). "Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica." Nat Clin Pract Neurol **4**(4): 202-214.

Jarius, S., K. Ruprecht, I. Kleiter, N. Borisow, N. Asgari, K. Pitarokoili, F. Pache, O. Stich, L. A. Beume, M. W. Hummert, C. Trebst, M. Ringelstein, O. Aktas, A. Winkelmann, M. Buttman, A. Schwarz, H. Zimmermann, A. U. Brandt, D. Franciotta, M. Capobianco, J. Kuchling, J. Haas, M. Korporal-Kuhnke, S. T. Lillevang, K. Fechner, K. Schanda, F. Paul, B. Wildemann, M. Reindl and G. in cooperation with the Neuromyelitis Optica Study (2016). "MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 1: Frequency, syndrome specificity, influence of disease activity, long-term course, association with AQP4-IgG, and origin." J Neuroinflammation **13**(1): 279.

Jarius, S. and B. Wildemann (2010). "AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance." Nat Rev Neurol **6**(7): 383-392.

Jones, P. T., P. H. Dear, J. Foote, M. S. Neuberger and G. Winter (1986). "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." Nature **321**(6069): 522-525.

Kappos, L., D. Li, P. A. Calabresi, P. O'Connor, A. Bar-Or, F. Barkhof, M. Yin, D. Leppert, R. Glanzman, J. Tinbergen and S. L. Hauser (2011). "Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial." The Lancet **378**(9805): 1779-1787.

Kitley, J., M. Woodhall, P. Waters, M. I. Leite, E. Devenney, J. Craig, J. Palace and A. Vincent (2012). "Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies in adults with a neuromyelitis optica phenotype." Neurology **79**(12): 1273-1277.

Kivisakk, P., D. J. Mahad, M. K. Callahan, C. Trebst, B. Tucky, T. Wei, L. Wu, E. S. Baekkevold, H. Lassmann, S. M. Staugaitis, J. J. Campbell and R. M. Ransohoff (2003). "Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8389-8394.

Kleiter, I., A. Gahlen, N. Borisow, K. Fischer, K. D. Wernecke, B. Wegner, K. Hellwig, F. Pache, K. Ruprecht, J. Havla, M. Krumbholz, T. Kumpf, O. Aktas, H. P. Hartung, M. Ringelstein, C. Geis, C. Kleinschnitz, A. Berthele, B. Hemmer, K. Angstwurm, J. P. Stellmann, S. Schuster, M. Stangel, F. Lauda, H. Tumani, C. Mayer, L. Zeltner, U. Ziemann, R. Linker, M. Schwab, M. Marziniak, F. Then Bergh, U. Hofstadt-van Oy, O. Neuhaus, A. Winkelmann, W. Marouf, J. Faiss, B. Wildemann, F. Paul, S. Jarius, C. Trebst and G. Neuromyelitis Optica Study (2016). "Neuromyelitis optica: Evaluation of 871 attacks and 1,153 treatment courses." Ann Neurol **79**(2): 206-216.

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

Kottis, V., P. Thibault, D. Mikol, Z. C. Xiao, R. Zhang, P. Dergham and P. E. Braun (2002). "Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth." J Neurochem **82**(6): 1566-1569.

Kremer, D., R. Akkermann, P. Kury and R. Dutta (2019). "Current advancements in promoting remyelination in multiple sclerosis." Mult Scler **25**(1): 7-14.

Kremer, L., M. Mealy, A. Jacob, I. Nakashima, P. Cabre, S. Bigi, F. Paul, S. Jarius, O. Aktas, L. Elson, K. Mutch, M. Levy, Y. Takai, N. Collongues, B. Banwell, K. Fujihara and J. de Seze (2014). "Brainstem manifestations in neuromyelitis optica: a multicenter study of 258 patients." Mult Scler **20**(7): 843-847.

Kuhle, J., C. Pohl, M. Mehling, G. Edan, M. S. Freedman, H. P. Hartung, C. H. Polman, D. H. Miller, X. Montalban, F. Barkhof, L. Bauer, S. Dahms, R. Lindberg, L. Kappos and R. Sandbrink (2007). "Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis." N Engl J Med **356**(4): 371-378.

Kumar, D. R., F. Aslinia, S. H. Yale and J. J. Mazza (2011). "Jean-Martin Charcot: the father of neurology." Clin Med Res **9**(1): 46-49.

Kutzelnigg, A., C. F. Lucchinetti, C. Stadelmann, W. Bruck, H. Rauschka, M. Bergmann, M. Schmidbauer, J. E. Parisi and H. Lassmann (2005). "Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis." Brain **128**(Pt 11): 2705-2712.

Labasque, M., B. Hivert, G. Nogales-Gadea, L. Querol, I. Illa and C. Faivre-Sarrailh (2014). "Specific contactin N-glycans are implicated in neurofascin binding and autoimmune targeting in peripheral neuropathies." J Biol Chem **289**(11): 7907-7918.

Lassmann, H. and M. Bradl (2017). "Multiple sclerosis: experimental models and reality." Acta Neuropathol **133**(2): 223-244.

Lebar, R., C. Lubetzki, C. Vincent, P. Lombrail and J. M. Boutry (1986). "The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane." Clin Exp Immunol **66**(2): 423-434.

Lee, X., Y. Hu, Y. Zhang, Z. Yang, Z. Shao, M. Qiu, B. Pepinsky, R. H. Miller and S. Mi (2011). "Oligodendrocyte differentiation and myelination defects in OMgp null mice." Mol Cell Neurosci **46**(4): 752-761.

Lehmann-Horn, K., S. Z. Wang, S. A. Sagan, S. S. Zamvil and H. C. von Budingen (2016). "B cell repertoire expansion occurs in meningeal ectopic lymphoid tissue." JCI Insight **1**(20): e87234.

Lennon, V. A., T. J. Kryzer, S. J. Pittock, A. S. Verkman and S. R. Hinson (2005). "IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel." J Exp Med **202**(4): 473-477.

Lennon, V. A., D. M. Wingerchuk, T. J. Kryzer, S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti, K. Fujihara, I. Nakashima and B. G. Weinshenker (2004). "A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis." Lancet **364**(9451): 2106-2112.

Lichtmanegger, J., C. Leitzinger, R. Wimmer, S. Schmitt, S. Schulz, Y. Kabiri, C. Eberhagen, T. Rieder, D. Janik, F. Neff, B. K. Straub, P. Schirmacher, A. A. DiSpirito, N. Bandow, B. S. Baral, A. Flatley, E. Kremmer, G. Denk, F. P. Reiter, S. Hohenester, F. Eckardt-Schupp, N. A. Dencher, J. Adamski, V. Sauer, C. Niemietz, H. H. Schmidt, U. Merle, D. N. Gotthardt, G. Kroemer, K. H. Weiss and H. Zischka (2016). "Methanobactin reverses acute liver failure in a rat model of Wilson disease." J Clin Invest **126**(7): 2721-2735.

Lindert, R. B., C. G. Haase, U. Brehm, C. Lington, H. Wekerle and R. Hohlfeld (1999). "Multiple sclerosis: B- and T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein." Brain **122** (Pt 11): 2089-2100.

Lington, C., M. Bradl, H. Lassmann, C. Brunner and K. Vass (1988). "Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein." Am J Pathol **130**(3): 443-454.

Litzenburger, T., R. Fassler, J. Bauer, H. Lassmann, C. Lington, H. Wekerle and A. Iglesias (1998). "B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice." J Exp Med **188**(1): 169-180.

Louveau, A., T. H. Harris and J. Kipnis (2015). "Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege." Trends Immunol **36**(10): 569-577.

Lublin, F. D. and S. C. Reingold (1996). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis." Neurology **46**(4): 907-911.

Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez and H. Lassmann (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." Ann Neurol **47**(6): 707-717.

Lucchinetti, C. F., B. F. Popescu, R. F. Bunyan, N. M. Moll, S. F. Roemer, H. Lassmann, W. Bruck, J. E. Parisi, B. W. Scheithauer, C. Giannini, S. D. Weigand, J. Mandrekar and R. M. Ransohoff (2011). "Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis." N Engl J Med **365**(23): 2188-2197.

Ludwig, R. J., K. Vanhoorelbeke, F. Leyoldt, Z. Kaya, K. Bieber, S. M. McLachlan, L. Komorowski, J. Luo, O. Cabral-Marques, C. M. Hammers, J. M. Lindstrom, P. Lamprecht, A. Fischer, G. Riemekasten, C. Tersteeg, P. Sondermann, B. Rapoport, K. P. Wandinger, C. Probst, A. El Beidaq, E. Schmidt, A. Verkman, R. A. Manz and F. Nimmerjahn (2017). "Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology." *Front Immunol* **8**: 603.

Luessi, F., V. Siffrin and F. Zipp (2012). "Neurodegeneration in multiple sclerosis: novel treatment strategies." *Expert Rev Neurother* **12**(9): 1061-1076; quiz 1077.

Mader, S., V. Gredler, K. Schanda, K. Rostasy, I. Dujmovic, K. Pfaller, A. Lutterotti, S. Jarius, F. Di Pauli, B. Kuenz, R. Ehling, H. Hegen, F. Deisenhammer, F. Aboul-Enein, M. K. Storch, P. Koson, J. Drulovic, W. Kristoferitsch, T. Berger and M. Reindl (2011). "Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders." *J Neuroinflammation* **8**: 184.

Mader, S., T. Kumpfel and E. Meinl (2020). "Novel insights into pathophysiology and therapeutic possibilities reveal further differences between AQP4-IgG- and MOG-IgG-associated diseases." *Curr Opin Neurol* **33**(3): 362-371.

Marti Fernandez, I., C. Macrini, M. Krumbholz, P. J. Hensbergen, A. L. Hipgrave Ederveen, S. Winklmeier, A. Vural, A. Kurne, D. Jenne, F. Kamp, L. A. Gerdes, R. Hohlfeld, M. Wuhrer, T. Kumpfel and E. Meinl (2019). "The Glycosylation Site of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Affects Autoantibody Recognition in a Large Proportion of Patients." *Front Immunol* **10**: 1189.

Matiello, M., J. Schaefer-Klein, D. Sun and B. G. Weinschenker (2013). "Aquaporin 4 expression and tissue susceptibility to neuromyelitis optica." *JAMA Neurol* **70**(9): 1118-1125.

Mayer, M. C., C. Breithaupt, M. Reindl, K. Schanda, K. Rostasy, T. Berger, R. C. Dale, F. Brilot, T. Olsson, D. Jenne, A. K. Probstel, K. Dornmair, H. Wekerle, R. Hohlfeld, B. Banwell, A. Bar-Or and E. Meinl (2013). "Distinction and temporal stability of conformational epitopes on myelin oligodendrocyte glycoprotein recognized by patients with different inflammatory central nervous system diseases." *J Immunol* **191**(7): 3594-3604.

Mayer, M. C. and E. Meinl (2012). "Glycoproteins as targets of autoantibodies in CNS inflammation: MOG and more." *Ther Adv Neurol Disord* **5**(3): 147-159. Copyright © The Author(s), 2012. DOI: 10.1177/1756285611433772

Medawar, P. B. (1948). "Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye." *Br J Exp Pathol* **29**(1): 58-69.

Mikol, D. D., M. J. Alexakos, C. A. Bayley, R. S. Lemons, M. M. Le Beau and K. Stefansson (1990). "Structure and chromosomal localization of the gene for the oligodendrocyte-myelin glycoprotein." *J Cell Biol* **111**(6 Pt 1): 2673-2679.

Mikol, D. D., J. R. Gulcher and K. Stefansson (1990). "The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate." J Cell Biol **110**(2): 471-479.

Mikol, D. D. and K. Stefansson (1988). "A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes." J Cell Biol **106**(4): 1273-1279.

Murphy, J. B. and E. Sturm (1923). "Conditions Determining the Transplantability of Tissues in the Brain." J Exp Med **38**(2): 183-197.

Murphy, K. and C. Weaver (2018). Autoimmunität und Transplantation. Janeway Immunologie: 835-911.

Murphy, K. and C. Weaver (2018). Die angeborene Immunität. Janeway Immunologie: 47-93.

Nie, D. Y., Q. H. Ma, J. W. Law, C. P. Chia, N. K. Dhingra, Y. Shimoda, W. L. Yang, N. Gong, Q. W. Chen, G. Xu, Q. D. Hu, P. K. Chow, Y. K. Ng, E. A. Ling, K. Watanabe, T. L. Xu, A. A. Habib, M. Schachner and Z. C. Xiao (2006). "Oligodendrocytes regulate formation of nodes of Ranvier via the recognition molecule OMgp." Neuron Glia Biol **2**(3): 151-164.

Norris, G. E., T. J. Stillman, B. F. Anderson and E. N. Baker (1994). "The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosyl asparaginase from *Flavobacterium meningosepticum*." Structure **2**(11): 1049-1059.

O'Connor, K. C., K. A. McLaughlin, P. L. De Jager, T. Chitnis, E. Bettelli, C. Xu, W. H. Robinson, S. V. Cherry, A. Bar-Or, B. Banwell, H. Fukaura, T. Fukazawa, S. Tenembaum, S. J. Wong, N. P. Tavakoli, Z. Idrissova, V. Viglietta, K. Rostasy, D. Pohl, R. C. Dale, M. Freedman, L. Steinman, G. J. Buckle, V. K. Kuchroo, D. A. Hafler and K. W. Wucherpfennig (2007). "Self-antigen tetramers discriminate between myelin autoantibodies to native or denatured protein." Nat Med **13**(2): 211-217.

Obermeier, B., R. Daneman and R. M. Ransohoff (2013). "Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier." Nat Med **19**(12): 1584-1596.

Obermeier, B., R. Mentele, J. Malotka, J. Kellermann, T. Kumpfel, H. Wekerle, F. Lottspeich, R. Hohlfeld and K. Dornmair (2008). "Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis." Nat Med **14**(6): 688-693.

Orton, S.-M., B. M. Herrera, I. M. Yee, W. Valdar, S. V. Ramagopalan, A. D. Sadovnick and G. C. Ebers (2006). "Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study." The Lancet Neurology **5**(11): 932-936.

Patrikios, P., C. Stadelmann, A. Kutzelnigg, H. Rauschka, M. Schmidbauer, H. Laursen, P. S. Sorensen, W. Bruck, C. Lucchinetti and H. Lassmann (2006). "Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients." Brain **129**(Pt 12): 3165-3172.

Patsopoulos, N. A., L. F. Barcellos, R. Q. Hintzen, C. Schaefer, C. M. van Duijn, J. A. Noble, T. Raj, Imsgc, Anzgene, P. A. Gourraud, B. E. Stranger, J. Oksenberg, T. Olsson, B. V. Taylor, S. Sawcer, D. A. Hafler, M. Carrington, P. L. De Jager and P. I. de Bakker (2013). "Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects." *PLoS Genet* **9**(11): e1003926.

Pearce, J. M. (2005). "Historical descriptions of multiple sclerosis." *Eur Neurol* **54**(1): 49-53.

Perera, N. C., K. H. Wiesmuller, M. T. Larsen, B. Schacher, P. Eickholz, N. Borregaard and D. E. Jenne (2013). "NSP4 is stored in azurophil granules and released by activated neutrophils as active endoprotease with restricted specificity." *J Immunol* **191**(5): 2700-2707.

Peschl, P., K. Schanda, B. Zeka, K. Given, D. Bohm, K. Ruprecht, A. Saiz, A. Lutterotti, K. Rostasy, R. Hoftberger, T. Berger, W. Macklin, H. Lassmann, M. Bradl, J. L. Bennett and M. Reindl (2017). "Human antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein can cause complement-dependent demyelination." *J Neuroinflammation* **14**(1): 208.

Pohl, D., G. Alper, K. Van Haren, A. J. Kornberg, C. F. Lucchinetti, S. Tenenbaum and A. L. Belman (2016). "Acute disseminated encephalomyelitis: Updates on an inflammatory CNS syndrome." *Neurology* **87**(9 Suppl 2): S38-45.

Preisner, A., S. Albrecht, Q. L. Cui, S. Hucke, J. Ghelman, C. Hartmann, M. M. Taketo, J. Antel, L. Klotz and T. Kuhlmann (2015). "Non-steroidal anti-inflammatory drug indometacin enhances endogenous remyelination." *Acta Neuropathol* **130**(2): 247-261.

Probstel, A. K., K. Dornmair, R. Bittner, P. Sperl, D. Jenne, S. Magalhaes, A. Villalobos, C. Breithaupt, R. Weissert, U. Jacob, M. Krumbholz, T. Kuempfel, A. Blaschek, W. Stark, J. Gartner, D. Pohl, K. Rostasy, F. Weber, I. Forne, M. Khademi, T. Olsson, F. Brilot, E. Tantsis, R. C. Dale, H. Wekerle, R. Hohlfeld, B. Banwell, A. Bar-Or, E. Meinl and T. Derfuss (2011). "Antibodies to MOG are transient in childhood acute disseminated encephalomyelitis." *Neurology* **77**(6): 580-588.

Probstel, A. K. and S. L. Hauser (2018). "Multiple Sclerosis: B Cells Take Center Stage." *J Neuroophthalmol* **38**(2): 251-258.

Probstel, A. K., G. Rudolf, K. Dornmair, N. Collongues, J. B. Chanson, N. S. Sanderson, R. L. Lindberg, L. Kappos, J. de Seze and T. Derfuss (2015). "Anti-MOG antibodies are present in a subgroup of patients with a neuromyelitis optica phenotype." *J Neuroinflammation* **12**: 46.

Probstel, A. K., N. S. Sanderson and T. Derfuss (2015). "B Cells and Autoantibodies in Multiple Sclerosis." *Int J Mol Sci* **16**(7): 16576-16592.

Ramanujam, R., A. K. Hedstrom, A. Manouchehrinia, L. Alfredsson, T. Olsson, M. Bottai and J. Hillert (2015). "Effect of Smoking Cessation on Multiple Sclerosis Prognosis." *JAMA Neurol* **72**(10): 1117-1123.

Ransohoff, R. M. and B. Engelhardt (2012). "The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system." Nat Rev Immunol **12**(9): 623-635.

Ransohoff, R. M., P. Kivisakk and G. Kidd (2003). "Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system." Nat Rev Immunol **3**(7): 569-581.

Reeves, P. J., N. Callewaert, R. Contreras and H. G. Khorana (2002). "Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13419-13424.

Reich, D. S., C. F. Lucchinetti and P. A. Calabresi (2018). "Multiple Sclerosis." N Engl J Med **378**(2): 169-180.

Reindl, M., C. Linington, U. Brehm, R. Egg, E. Dilitz, F. Deisenhammer, W. Poewe and T. Berger (1999). "Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study." Brain **122** (Pt 11): 2047-2056.

Reindl, M., K. Schanda, M. Woodhall, F. Tea, S. Ramanathan, J. Sagen, J. P. Fryer, J. Mills, B. Teegen, S. Mindorf, N. Ritter, U. Krummrei, W. Stocker, J. Eggert, E. P. Flanagan, M. Ramberger, H. Hegen, K. Rostasy, T. Berger, M. I. Leite, J. Palace, S. R. Irani, R. C. Dale, C. Probst, M. Probst, F. Brilot, S. J. Pittock and P. Waters (2020). "International multicenter examination of MOG antibody assays." Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm **7**(2).

Reynolds, R. and R. Hardy (1997). "Oligodendroglial progenitors labeled with the O4 antibody persist in the adult rat cerebral cortex in vivo." Journal of Neuroscience Research **47**(5): 455-470.

Rioux, J. D. and A. K. Abbas (2005). "Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease." Nature **435**(7042): 584-589.

Roemer, S. F., J. E. Parisi, V. A. Lennon, E. E. Benarroch, H. Lassmann, W. Bruck, R. N. Mandler, B. G. Weinshenker, S. J. Pittock, D. M. Wingerchuk and C. F. Lucchinetti (2007). "Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis." Brain **130**(Pt 5): 1194-1205.

Sabatino, J. J., Jr., A. K. Probstel and S. S. Zamvil (2019). "B cells in autoimmune and neurodegenerative central nervous system diseases." Nat Rev Neurosci **20**(12): 728-745.

Schachner, M., S. K. Kim and R. Zehnle (1981). "Developmental expression in central and peripheral nervous system of oligodendrocyte cell surface antigens (O antigens) recognized by monoclonal antibodies." Developmental Biology **83**(2): 328-338.

Schattling, B., J. B. Engler, C. Volkmann, N. Rothammer, M. S. Woo, M. Petersen, I. Winkler, M. Kaufmann, S. C. Rosenkranz, A. Fejtova, U. Thomas, A. Bose, S. Bauer, S. Trager, K. K. Miller, W. Bruck, K. E. Duncan, G. Salinas, P. Soba, E. D. Gundelfinger, D.

Merkler and M. A. Friese (2019). "Bassoon proteinopathy drives neurodegeneration in multiple sclerosis." Nat Neurosci **22**(6): 887-896.

Shirai, Y. (1921). "Transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals." Japn Med World **1**: 15.

Siegenthaler, J. A., F. Sohet and R. Daneman (2013). "'Sealing off the CNS': cellular and molecular regulation of blood-brain barrierogenesis." Curr Opin Neurobiol **23**(6): 1057-1064.

Simons, I. M., J. Mohrluder, R. Feederle, E. Kremmer, T. Zobel, J. Dobner, N. Bleffert, S. Hoffmann and D. Willbold (2019). "The highly GABARAP specific rat monoclonal antibody 8H5 visualizes GABARAP in immunofluorescence imaging at endogenous levels." Sci Rep **9**(1): 526.

Sinmaz, N., T. Nguyen, F. Tea, R. C. Dale and F. Brilot (2016). "Mapping autoantigen epitopes: molecular insights into autoantibody-associated disorders of the nervous system." J Neuroinflammation **13**(1): 219.

Soltys, J., Y. Liu, A. Ritchie, S. Wemlinger, K. Schaller, H. Schumann, G. P. Owens and J. L. Bennett (2019). "Membrane assembly of aquaporin-4 autoantibodies regulates classical complement activation in neuromyelitis optica." J Clin Invest **129**(5): 2000-2013.

Sorensen, A., K. Moffat, C. Thomson and S. C. Barnett (2008). "Astrocytes, but not olfactory ensheathing cells or Schwann cells, promote myelination of CNS axons in vitro." Glia **56**(7): 750-763.

Spadaro, M., L. A. Gerdes, M. Krumbholz, B. Ertl-Wagner, F. S. Thaler, E. Schuh, I. Metz, A. Blaschek, A. Dick, W. Bruck, R. Hohlfeld, E. Meinl and T. Kumpfel (2016). "Autoantibodies to MOG in a distinct subgroup of adult multiple sclerosis." Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm **3**(5): e257.

Spadaro, M. and E. Meinl (2016). "Detection of Autoantibodies Against Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Multiple Sclerosis and Related Diseases." Methods Mol Biol **1304**: 99-104.

Spadaro, M., S. Winklmeier, E. Beltran, C. Macrini, R. Hoftberger, E. Schuh, F. S. Thaler, L. A. Gerdes, S. Laurent, R. Gerhards, S. Brandle, K. Dornmair, C. Breithaupt, M. Krumbholz, M. Moser, G. Krishnamoorthy, F. Kamp, D. Jenne, R. Hohlfeld, T. Kumpfel, H. Lassmann, N. Kawakami and E. Meinl (2018). "Pathogenicity of human antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein." Ann Neurol **84**(2): 315-328.

Stanley, P., N. Taniguchi and M. Aebi (2015). N-Glycans. Essentials of Glycobiology. rd, A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press: 99-111.

Storch, M. K., S. Piddlesden, M. Haltia, M. Iivanainen, P. Morgan and H. Lassmann (1998). "Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination." Ann Neurol **43**(4): 465-471.

Strohl, W. and L. Strohl (2012). Interactions of human IgGs with non-human systems. Therapeutic antibody engineering. W. Strohl and L. Strohl. Cambridge, Woodhead Publishing: 405-420.

Takatsuki, A., K. Arima and G. Tamura (1971). "Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin." J Antibiot (Tokyo) **24**(4): 215-223.

Takatsuki, A., K. Kawamura, M. Okina, Y. Kodama, T. Ito and G. Tamura (1977). "The Structure of Tunicamycin." Agricultural and Biological Chemistry.

Tengvall, K., J. Huang, C. Hellström, P. Kammer, M. Biström, B. Ayoglu, I. Lima Bomfim, P. Stridh, J. Butt, N. Brenner, A. Michel, K. Lundberg, L. Padyukov, I. E. Lundberg, E. Svenungsson, I. Ernberg, S. Olafsson, A. T. Diltney, J. Hillert, L. Alfredsson, P. Sundström, P. Nilsson, T. Waterboer, T. Olsson and I. Kockum (2019). "Molecular mimicry between Anoctamin 2 and Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 associates with multiple sclerosis risk." Proceedings of the National Academy of Sciences **116**(34): 16955-16960.

Thompson, A. J., S. E. Baranzini, J. Geurts, B. Hemmer and O. Ciccarelli (2018). "Multiple sclerosis." The Lancet **391**(10130): 1622-1636.

Traka, M., J. L. Dupree, B. Popko and D. Karagogeos (2002). "The Neuronal Adhesion Protein TAG-1 Is Expressed by Schwann Cells and Oligodendrocytes and Is Localized to the Juxtaparanodal Region of Myelinated Fibers." The Journal of Neuroscience **22**(8): 3016-3024.

Voshol, H., C. W. van Zuylen, G. Orberger, J. F. Vliegenthart and M. Schachner (1996). "Structure of the HNK-1 carbohydrate epitope on bovine peripheral myelin glycoprotein P0." J Biol Chem **271**(38): 22957-22960.

Vourc'h, P. and C. Andres (2004). "Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp): evolution, structure and function." Brain Res Brain Res Rev **45**(2): 115-124.

Vourc'h, P., T. Moreau, F. Arbion, S. Marouillat-Vedrine, J. P. Muh and C. Andres (2003). "Oligodendrocyte myelin glycoprotein growth inhibition function requires its conserved leucine-rich repeat domain, not its glycosylphosphatidyl-inositol anchor." J Neurochem **85**(4): 889-897.

Wang, K. C., V. Koprivica, J. A. Kim, R. Sivasankaran, Y. Guo, R. L. Neve and Z. He (2002). "Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth." Nature **417**(6892): 941-944.

Wang, L., F. S. Wang and M. E. Gershwin (2015). "Human autoimmune diseases: a comprehensive update." J Intern Med **278**(4): 369-395.

Waters, P., M. Woodhall, K. C. O'Connor, M. Reindl, B. Lang, D. K. Sato, M. Jurynczyk, G. Tackley, J. Rocha, T. Takahashi, T. Misu, I. Nakashima, J. Palace, K. Fujihara, M. I. Leite and A. Vincent (2015). "MOG cell-based assay detects non-MS patients with inflammatory neurological disease." Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm **2**(3): e89.

Weber, M. S., T. Derfuss, I. Metz and W. Bruck (2018). "Defining distinct features of anti-MOG antibody associated central nervous system demyelination." Ther Adv Neurol Disord **11**: 1756286418762083.

Wekerle, H. (1993). "T-cell autoimmunity in the central nervous system." Intervirology **35**(1-4): 95-100.

Wingerchuk, D. M., B. Banwell, J. L. Bennett, P. Cabre, W. Carroll, T. Chitnis, J. de Seze, K. Fujihara, B. Greenberg, A. Jacob, S. Jarius, M. Lana-Peixoto, M. Levy, J. H. Simon, S. Tenenbaum, A. L. Traboulsee, P. Waters, K. E. Wellik, B. G. Weinschenker and N. M. O. D. International Panel for (2015). "International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders." Neurology **85**(2): 177-189.

Winklmeier, S., M. Schluter, M. Spadaro, F. S. Thaler, A. Vural, R. Gerhards, C. Macrini, S. Mader, A. Kurne, B. Inan, R. Karabudak, F. G. Ozbay, G. Esendagli, R. Hohlfeld, T. Kumpfel and E. Meinl (2019). "Identification of circulating MOG-specific B cells in patients with MOG antibodies." Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm **6**(6): 625.

Xiao, B. G., C. Linington and H. Link (1991). "Antibodies to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and controls." Journal of Neuroimmunology **31**(2): 91-96.

Zhao, F., J. Zhang, Y. S. Liu, L. Li and Y. L. He (2011). "Research advances on flotillins." Virology **8**: 479.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungen

Abbildung 2-1 Pathogenese der MS.....	8
Abbildung 2-2 Lokalisation der zentralen Myelinproteine und Myelin-assoziierten neuronalen Proteine	11
Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide pEGFP-hOMGP-TM und pEGFP-hOMGP-GPI	22
Abbildung 3-2: Generierung monoklonaler anti-OMGP Antikörper	26
Abbildung 3-3: Eigenschaften der Hybridom-Überstände	26
Abbildung 3-4: Versuchsaufbau für immunzytochemische Färbungen muriner Oligodendrozyten und OPCs.....	33
Abbildung 3-5: Vergleichende Darstellung der Auswertesysteme für die Evaluierung der OMGP-Reaktivität gegenüber TM- und GPI-verankerten OMGP-Konstrukten	37
Abbildung 4-1 Ausschnitt aus der Absorptionskurve während der Elution von hOMGP	42
Abbildung 4-2: Darstellung des neu hergestellten rekombinanten hOMGP im SDS-Gel	43
Abbildung 4-3: Ergebnisse des zellbasierten Screenings der Hybridom-Überstände	44
Abbildung 4-4: Korrelation zwischen der hOMGP-TM-Reaktivität und der hOMGP-GPI-Reaktivität der Hybridom-Überstände	44
Abbildung 4-5: OMGP-Reaktivität der Hybridom-Überstände in Abhängigkeit von der Art der Immunisierung	45
Abbildung 4-6: Vergleich der OMGP-Reaktivität der neu hergestellten mAK mit der Reaktivität des kommerziellen anti-OMGP Antikörpers MAB1674 im zellbasierten Assay	47
Abbildung 4-7: Vergleich der OMGP-Reaktivität der neu hergestellten mAK mit der Reaktivität des kommerziellen anti-OMGP Antikörpers MAB1674 im ELISA.....	48
Abbildung 4-8: Darstellung des HNK-1 Epitops auf pEGFP-transfizierten Zellen und auf rekombinatem hOMGP	50
Abbildung 4-9: Behandlung pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierter HeLa-Zellen mit Tunicamycin	51
Abbildung 4-10: Effekt einer enzymatischen Deglykosylierung von rekombinatem hOMGP auf die Bindung durch anti-OMGP Antikörper im Streptavidin-ELISA.....	53

Abbildung 4-11: Effekt der enzymatischen Entfernung N-verlinkter Zuckerketten pEGFP-hOMGP-GPI-transfizierter Zellen auf die Reaktivität von anti-OMGP Antikörpern in der Durchflusszytometrie.....	55
Abbildung 4-12: Einzelfärbungen muriner OPCs und Oligodendrozyten mit anti-OMGP Antikörpern	57
Abbildung 4-13: Darstellung der anti-O4/anti-OMGP und anti-MBP/anti-OMGP Doppelfärbungen muriner OPCs und Oligodendrozyten	58
Abbildung 4-14: Ergebnisse der Untersuchungen zur komplement-vermittelten Lyse muriner Oligodendrozyten mit den monoklonalen anti-OMGP Antikörpern 22H6 und 14A9	59
Abbildung 5-1 Darstellung der Aminosäure-Sequenz des zur Immunisierung verwendeten rOMG-Peptids und seiner Abweichungen zur entsprechenden humanen Sequenz	62

7.2 Tabellen

Tabelle 3-1: Geräte.....	17
Tabelle 3-2: Reagenzien, Puffer und Gele	18
Tabelle 3-3: Medien und Lösungen für die Zellkultur	20
Tabelle 3-4: Zelllinien	21
Tabelle 3-5: Plasmide.....	21
Tabelle 3-6: Proteine und Peptide	22
Tabelle 3-7: Kit-Systeme	22
Tabelle 3-8: Antikörper	23
Tabelle 3-9: Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 3-10: Komplement-Assay - Versuchsbedingungen	30
Tabelle 3-11: FACS-Geräteeinstellungen.....	35
Tabelle 4-1: Charakteristika der ausgewählten Hybridom-Überstände	45
Tabelle 5-1 Auswahlkriterien des Screenings der Hybridom-Überstände	63

8 Abkürzungsverzeichnis

ADEM	<u>a</u> kute <u>d</u> isseminierte <u>E</u> nzephalomyelitis
AG	<u>A</u> rbeitsgruppe
ANO2	<u>A</u> noctamin- <u>2</u>
APC	<u>A</u> llophycocyanin
AQP-4	<u>A</u> quaporin- <u>4</u>
AT-EAE	<u>a</u> doptive- <u>t</u> ransfer <u>E</u> A <u>E</u>
BCA	<u>b</u> icin <u>ch</u> oninic <u>a</u> cid
BSA	<u>b</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
CNTF	<u>c</u> iliary <u>n</u> euro <u>t</u> rophic <u>f</u> actor
Cy3	<u>C</u> yaninfarbstoff <u>3</u>
DAPI	<u>4</u> ', <u>6</u> - <u>D</u> iamidin- <u>2</u> - <u>p</u> henyl <u>i</u> ndol
dH ₂ O	<u>d</u> estilliertes <u>H</u> ₂ <u>O</u>
Diff	<u>D</u> ifferenz
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>e</u> agle's <u>m</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
EAE	<u>e</u> xperimentelle <u>a</u> utoimmune <u>E</u> nzephalomyelitis
EBNA	<u>E</u> pstein <u>B</u> arr <u>n</u> uclear <u>a</u> ntigen
EBV	<u>E</u> pstein <u>B</u> arr <u>v</u> irus
EGFP	<u>e</u> nhanced <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
ELISA	<u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay
FACS	<u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting
FCS	<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> sothi <u>c</u> yanat
FSC	<u>f</u> orward <u>s</u> catter
GlcNAc	<u>N</u> -Acetylglucosamin
GnT-I	<u>N</u> -Acetylglucosaminyltransferase I
GPI	<u>G</u> lycosylphosphatidyl <u>i</u> nositol
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HEK	<u>h</u> uman <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney
HeLa	<u>H</u> enrietta <u>L</u> acks Zelllinie
His	<u>h</u> istidine tag
HLA	<u>h</u> umanes <u>L</u> eukozyten- <u>A</u> ntigen
HNK-1	<u>h</u> uman <u>n</u> atural <u>k</u> iller- <u>1</u>
hOMGP	siehe OMGP
HRP	<u>h</u> orseradish <u>p</u> eroxidase
Ig	<u>I</u> mmunoglobulin
LB	<u>l</u> ysogeny <u>b</u> roth
LDS	<u>l</u> ithium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
LRR	<u>l</u> eucin- <u>r</u> ich- <u>r</u> epeat
MAG	<u>M</u> yelin- <u>a</u> ssoziiertes <u>G</u> lykoprotein
mAK	<u>m</u> onoklonale <u>A</u> ntikörper
MBP	<u>M</u> yelin- <u>B</u> asisches <u>P</u> rotein
MFI	<u>m</u> ean <u>f</u> luorescence <u>i</u> ntensity

MOG	<u>Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein</u>
mOMGP	siehe OMGP
MS	<u>Multiple Sklerose</u>
NMOSE	<u>Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen</u>
NT3	<u>Neurotrophin-3</u>
O₂	Sauerstoff
OD	<u>optische Dichte</u>
OMGP	<u>Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein</u> <ul style="list-style-type: none"> ▪ hOMGP = <u>human OMGP</u> ▪ mOMGP = <u>mouse OMGP</u> ▪ rOMGP = <u>rat OMGP</u>
OMGP-GPI	<u>Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein</u> <u>Glycosylphosphatidylinositol</u>
OMGP-TM	<u>Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein transmembran</u>
OPC	<u>oligodendrocyte progenitor cell</u>
PBS	<u>phosphate buffered saline</u>
PDGF(R)	<u>platelet-derived growth factor (receptor)</u>
PEI	<u>Polyethylenimin</u>
PE	<u>Phycocerythrin</u>
PFA	<u>Paraformaldehyd</u>
PI	<u>Propidiumiodid</u>
PLC	<u>Phospholipase C</u>
PLL	<u>poly-L-lysine</u>
PLP	<u>Proteolipid-Protein</u>
PNGase F	<u>peptide:N-glycosidase F</u>
PVDF	<u>Polyvinylidenfluorid</u>
RIPA	<u>radioimmunoprecipitation assay</u>
rOMGP	siehe OMGP
RPM	<u>rounds per minute</u>
RRMS	<u>relapsing-remitting multiple sclerosis</u>
RT	<u>Raumtemperatur</u>
S	<u>Standard</u>
SDS	<u>sodium dodecyl sulfate</u>
SEM	<u>standard error of the mean</u>
SSC	<u>side scatter</u>
T2A	<u>thosaesigna virus 2A</u>
TMB	<u>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin</u>
UDP	<u>Uridindiphosphat</u>
ZNS	<u>Zentrales Nervensystem</u>

9 Publikationsliste

Teile dieser Arbeit sind in folgender Publikation enthalten:

Gerhards R, **Pfeffer LK**, Lorenz J, Starost L, Nowack L, Thaler FS, Schlüter M, Rübsamen H, Macrini C, Winklmeier S, Mader S, Bronge M, Grönlund H, Feederle R, Hsia HE, Lichtenthaler SF, Merl-Pham J, Hauck SN, Kuhlmann T, Bauer IJ, Beltran E, Gerdes LA, Mezydlo A, Bar-Or A, Banwell B, Khademi M, Olsson T, Hohlfeld R, Lassmann H, Kümpfel T, Kawakami N* and Meinl E*. Oligodendrocyte myelin glycoprotein as a novel target for pathogenic autoimmunity in the CNS. *Acta Neuropathologica Communications*. 2020

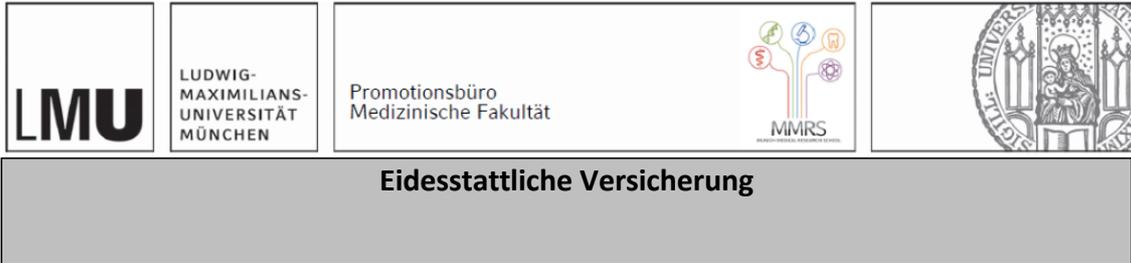
**Diese Autoren trugen gleichermaßen zur Publikation bei*

Weitere Publikationen und Kongressbeiträge:

Pfeffer LK, Schmidt D, Pohl H, Beuschlein F, Bögeholz JL. Intrakranielle Hypertension - und was macht der Blutdruck? *Swiss Medical Forum*. 2020

Dasgupta D, Funnell J, **Pfeffer LK**, Al-Ahmad S, Reddy U, Thorne L, Curtis C, Watkins LD, Toma A. Bolt External Ventricular Drains – a paradigm shift in the management of acute hydrocephalus? Abstract. *11th Meeting of the International Society for Hydrocephalus and Cerebrospinal Fluid Disorders*. 2019

10 Eidesstattliche Versicherung



Pfeffer, Lena Kristina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen das Autoantigen
Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hamburg, 22.05.2021

Ort, Datum

Lena Kristina Pfeffer

Unterschrift Doktorandin

11 Kooperationen

Folgende Versuche wurden in Kooperation durchgeführt:

- Die Isolation und Kultivierung muriner OPCs erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Tanja Kuhlmann am Institut für Neuropathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.
- Die Generierung der Hybridomüberstände, deren Testung im ELISA sowie deren anschließende Subklonierung und Aufreinigung erfolgte durch die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der *Monoclonal Antibody Core Facility* des Helmholtz-Zentrums München (Leiterin: Dr. Regina Feederle).

12 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn **Prof. Edgar Meinl** für die gute Betreuung und die große Unterstützung während der letzten Jahre danken. Die Zeit in seiner Arbeitsgruppe hat meine Faszination für die neuroimmunologische Forschung entfacht und ich hoffe auch in Zukunft auf eine sehr gute Zusammenarbeit. Ebenso danke ich Herrn **Prof. Martin Kerschensteiner** und Herrn **Prof. Reinhard Hohlfeld** für die Möglichkeit der Promotion an ihrem Institut sowie für ihre wertvollen wissenschaftlichen Beiträge zu unserem Projekt in den Institutsseminaren.

Auch unseren **Kollaborationspartnerinnen und -partnern** möchte ich an dieser Stelle herzlich danken. Der Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Frau **Prof. Tanja Kuhlmann** am Institut für Klinische Neuropathologie in Münster war nicht nur für unser Projekt sondern auch für mich persönlich eine große Bereicherung. Von Beginn an fühlte ich mich am Institut willkommen und durfte von der großen Expertise der Arbeitsgruppe profitieren. Vielen Dank an dieser Stelle auch an **Steffi, Julia, Katharina, Laura** und **Luise** für die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft in dieser intensiven Zeit sowie für die schönen und unterhaltsamen Pausen. Zudem danke ich Frau **Dr. Regina Feederle** und Herrn **Andrew Flatley** aus der *Monoclonal Antibody Core Facility* des Helmholtz-Zentrums München für die sehr gute und stets respektvolle Zusammenarbeit!

Von ganzem Herzen danke ich **Ramona**, die mich während des gesamten Projekts betreute, für Ihre große Hilfsbereitschaft, ihre unerschöpfbare Geduld und die positive Energie, die sie überall und zu jeder Zeit verbreitet. Auch bei den anderen Mitgliedern aus meiner **Arbeitsgruppe** und den „**Nachbar-Laboren**“, die leider zu zahlreich sind, um sie einzeln zu nennen, möchte ich mich für den inspirierenden gedanklichen Austausch, aber auch für die schönen Unternehmungen abseits der Arbeit und die entstandenen Freundschaften bedanken. Unserer Technischen Mitarbeiterin **Heike** möchte ich für Ihre große Hilfsbereitschaft danken, wann immer ich Fragen oder Probleme hatte.

Mein besonderer Dank richtet sich an meine Familie, ohne die auch diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre: an meine **Brüder David, Michael** und **Thomas** für ihre Zuverlässigkeit, ihren Humor und die Inspiration, die sie für mich auf so vielerlei Art und Weise darstellen. Und schließlich an **meine Eltern** für Ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung - das kostbarste Geschenk.