



Universität Potsdam
Institut für Biochemie und Biologie

Etablierung einer Antigen-spezifischen Aktivierung von B-Lymphozyten *in vitro*

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Biochemie

M. Sc. Sophia Michelchen
Potsdam, 09.06. 2021

Eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

Soweit nicht anders gekennzeichnet, ist dieses Werk unter einem Creative-Commons-Lizenzvertrag Namensnennung 4.0 lizenziert.
Dies gilt nicht für Zitate und Werke, die aufgrund einer anderen Erlaubnis genutzt werden.
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-53027>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-530272>

*The world is still a weird place,
despite my efforts to make clear and perfect sense of it.*

Hunter S. Thompson

Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper sind essenzielle Werkzeuge in der modernen Laboranalytik sowie in der medizinischen Therapie und Diagnostik. Die Herstellung monoklonaler Antikörper ist ein zeit- und arbeitsintensiver Prozess. Herkömmliche Methoden beruhen auf der Immunisierung von Labortieren, die mitunter mehrere Monate in Anspruch nimmt. Anschließend werden die Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten bzw. deren Antikörpergene isoliert und in Screening-Verfahren untersucht, um geeignete Binder zu identifizieren.

Der Transfer der humoralen Immunantwort in eine *in vitro* Umgebung erlaubt eine Verkürzung des Prozesses und umgeht die Notwendigkeit der *in vivo* Immunisierung. Das komplexe Zusammenspiel aller involvierten Immunzellen *in vitro* abzubilden, stellt sich allerdings als schwierig dar. Der Schwerpunkt dieser Arbeit war deshalb die Realisierung einer vereinfachten *In vitro* Immunisierung, die sich auf die Protagonisten der Antikörper-Produktion konzentriert: die B-Lymphozyten. Darüber hinaus sollte eine permanente Zelllinie etabliert werden, die zur Antikörper-Herstellung eingesetzt werden und die Verwendung von Primärzellen ersetzen würde.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein Protokoll zur *In vitro* Immunisierung muriner B-Lymphozyten etabliert. In Vorversuchen wurden die optimalen Konditionen für die Antigen-spezifische Aktivierung gereinigter Milz-B-Lymphozyten aus nicht-immunisierten Mäusen determiniert. Dazu wurde der Einfluss verschiedener Stimuli auf die Produktion unspezifischer und spezifischer Antikörper untersucht. Eine Kombination aus dem Modellantigen VP1 (Hamster Polyomavirus Hüllprotein 1), einem Anti-CD40-Antikörper, Interleukin 4 (IL 4) und Lipopolysaccharid (LPS) oder IL 7 induzierte nachweislich eine Antigen-spezifische Antikörper-Antwort *in vitro*. Als Indikatoren einer erfolgreichen Aktivierung der B-Lymphozyten infolge der *in vitro* Stimulation wurden die rapide Proliferation und die Expression charakteristischer Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche nachgewiesen. In einer Zeitreihe über zehn Tage wurde am zehnten Tag der *In vitro* Immunisierung die verhältnismäßig höchste Konzentration Antigen-spezifischer IgG-Antikörper im Kulturüberstand der stimulierten Zellen nachgewiesen.

Als nächster Schritt sollte eine permanente Zelllinie hergestellt werden, die statt primärer B-Lymphozyten für die zuvor etablierte *In vitro* Immunisierung eingesetzt werden könnte. Zu diesem Zweck wurden retrovirale Vektoren hergestellt, die durch den Transfer verschiedener Onkogene in murine B-Lymphozyten bzw. deren Vorläuferzellen das Proliferationsverhalten der Zellen manipulieren sollen. Es wurden Retroviren mit Doxycyclin-induzierbaren Expressionskassetten mit den Onkogenen *myc*, *Bcl2*, *BclxL* und dem Fusionsgen *NUP98HOXB4* generiert. Eine Testzelllinie wurde erfolgreich mit den hergestellten Retroviren transduziert und die Funktionalität der hergestellten Viren anhand verschiedener Assays belegt. Die transferierten Gene konnten in der Testzelllinie auf DNA-Ebene nachgewiesen oder die Überexpression der entsprechenden Proteine im Western Blot detektiert werden. Es wurden schließlich B-Lymphozyten bzw. unreife Vorläuferzellen derselben mit den generierten Retroviren transduziert und mit Knochenmark-ähnlichen Stromazellen co-kultiviert. Aus keinem der transduzierten Ansätze konnte bisher eine Zelllinie oder eine Langzeit-Kultur etabliert werden.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Effektivität und Übertragbarkeit des zuvor etablierten Protokolls zur *In vitro* Immunisierung muriner B-Lymphozyten anhand verschiedener Antigene gezeigt. Es konnten *in vitro* spezifische IgG-Antworten gegen VP1, *Legionella pneumophila* und das Protein Mip, von dem ein Peptid in das zur Immunisierung eingesetzte VP1 integriert wurde, induziert werden. Die stimulierten B-Lymphozyten wurden durch Fusion mit Myelomzellen in permanente Antikörper-produzierende Zelllinien transformiert. Dabei konnten mehrere Hybridomzelllinien generiert werden, die spezifische IgG-Antikörper gegen VP1 oder Mip produzieren. Die generierten Antikörper konnten sowohl im Western Blot als auch im ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) das entsprechende Antigen spezifisch binden.

Die hier etablierte *In vitro* Immunisierung bietet eine effektive Alternative zu bisherigen Verfahren zur Herstellung spezifischer Antikörper. Sie ersetzt die Immunisierung von Versuchstieren und reduziert den Zeitaufwand erheblich. In Kombination mit der Hybridomtechnologie können die *in vitro* immunisierten Zellen, wie hier demonstriert, zur Generation von Hybridomzelllinien und zur Herstellung monoklonaler Antikörper genutzt werden. Um die Verwendung von Versuchstieren in dieser Methode durch eine adäquate permanente Zelllinie zu ersetzen, muss die genetische Veränderung von B-Lymphozyten und unreifen hämatopoetischen Zellen optimiert werden. Die Ergebnisse bieten eine Basis für eine universelle, Spezies-unabhängige Methodik zur Antikörperherstellung und für die Etablierung einer idealen, tierfreien *In vitro* Immunisierung.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Antikörper: Von Entdeckung und Anwendung	1
1.2 Entstehung und Funktion von Antikörpern im Organismus.....	2
1.2.1 Antikörperstruktur	2
1.2.2 Aktivierung von B-Lymphozyten und Antikörperantwort <i>in vivo</i>	3
1.2.3 Genetische Vielfalt und Subklassenwechsel in der Antikörpersynthese.....	5
1.2.4 Funktion des Antikörpers <i>in vivo</i>	7
1.3 Biotechnologische Methoden zur Herstellung von Antikörpern.....	7
1.3.1 Hybridomtechnologie	7
1.3.2 Antikörper aus transgenen Tieren.....	9
1.3.3 Rekombinante Antikörperherstellung.....	10
1.3.4 Aktuelle Kontroverse.....	13
1.4 <i>In vitro</i> Immunisierung.....	14
2 Zielstellung	16
3 Material & Methoden.....	18
3.1 Materialien.....	18
3.1.1 Versuchstiere	18
3.1.2 Zelllinien.....	18

3.1.3 Plastik- und Einwegmaterialien.....	18
3.1.4 Zellkulturmedien und Seren	19
3.1.5 Chemikalien und Biochemikalien	19
3.1.6 Kommerzielle Reinigungs-, Klonierungs- und Testsysteme	20
3.1.7 Antikörper und Proteinkonjugate	21
3.1.8 Bakterienstämme und Vektoren	22
3.1.9 Enzyme	22
3.1.10 Gerätschaften	22
3.1.11 Software.....	23
3.2 Isolation und Kultivierung von Säugerzellen	23
3.2.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Säugerzellen	23
3.2.2 Reinigung und Kultivierung muriner Milz-B-Lymphozyten	24
3.2.3 <i>In vitro</i> Immunisierung muriner B-Lymphozyten	25
3.2.4 Herstellung von Feederzellen	26
3.2.5 Generierung von Hybridomzellen durch elektrochemische Fusion	26
3.2.5.1 Elektrochemische Fusion muriner B-Lymphozyten	26
3.2.5.2 HAT-Selektion von murinen Hybridomzellen	27
3.2.6 Reinigung und Kultivierung von Knochenmarkszellen	27
3.2.7 Co-Kultur mit OP9-Zellen.....	28
3.3 Charakterisierung von Säugerzellen.....	29
3.3.1 Proliferationsassay	29
3.3.2 Färbung von Oberflächenmarkern und Durchflusszytometrie	29
3.3.3 Fluoreszenzfärbung und Immunhistochemie	31
3.4 Reinigung und Charakterisierung von Antikörpern	31
3.4.1 Nachweis und Charakterisierung spezifischer Antikörper im ELISA.....	31
3.4.2 Affinitätschromatographische Reinigung von IgG-Antikörpern.....	33
3.4.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE und Coomassiefärbung von Proteinen	34
3.4.4 Western Blot und spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern.....	36
3.5 Durchflusszytometrie von <i>L. pneumophila</i>	36
3.6 Herstellung von Plasmidkonstrukten zur Generierung permanenter Zelllinien	37
3.6.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterienzellen.....	37
3.6.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	37
3.6.3 Polymerase-Kettenreaktion	38

3.6.4 TAE-Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	39
3.6.5 Plasmid-Verdau durch Typ II-Endonukleasen	40
3.6.6 Ligation von Plasmidvektor und DNA-Insert	40
3.6.6.1 <i>Blunt end</i> -Ligation	40
3.6.6.2 <i>Gibson-Assembly</i>	41
3.6.7 Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i>	44
3.6.8 Bakterienkolonie-PCR.....	44
3.7 Herstellen von Retroviren und Transduktion	45
3.7.1 Transfektion der Verpackungszelllinie und Virus-Ernte.....	46
3.7.2 qPCR zur Quantifizierung von Retroviren.....	47
3.7.3 Transduktion von Säugerzellen	50
3.7.3.1 Beschichtung mit Retronectin.....	50
3.7.3.2 Transduktion	50
3.7.3.3 Induktion der Genexpression	50
4 Ergebnisse	52
4.1 <i>In vitro</i> Immunisierung.....	52
4.1.1 Charakterisierung der isolierten B-Lymphozyten	52
4.1.2 Einfluss verschiedener Stimuli auf <i>in vitro</i> Antikörperproduktion	52
4.1.3 Produktion spezifischer Antikörper im zeitlichen Verlauf.....	55
4.1.4 Nachweis von Aktivierungsmarkern auf B-Lymphozyten.....	56
4.1.5 Nachweis des IL7-Rezeptors auf B-Lymphozyten.....	57
4.1.6 Proliferation aktivierter B-Lymphozyten	58
4.1.7 Zellzahlen und -vitalität im zeitlichen Verlauf.....	59
4.1.8 Protokoll zur <i>In vitro</i> Immunisierung.....	60
4.2 Immortalisierung von unreifen B-Lymphozyten.....	61
4.2.1 Herstellung der Plasmidkonstrukte.....	61
4.2.1.1 Plasmidverdau.....	61
4.2.1.2 Ligation und Sequenzierung	62
4.2.2 qPCR zur Quantifizierung der retroviralen Vektoren.....	64
4.2.3 Retrovirale Transduktion von Kontrollzellen.....	65
4.2.3.1 Selektion	65
4.2.3.2 Nachweis der Fremdgene <i>NUP98HOXB4</i> und <i>EGFP</i>	66
4.2.3.3 Induktion der Genexpression.....	67

4.2.4 Co-Kultur von LIN ⁻ - und OP9-Zellen.....	68
4.2.5 Retrovirale Transduktion von LIN ⁻ -Zellen.....	70
4.2.5.1 Induktion der EGFP-Expression.....	70
4.2.5.2 Langzeit-Kultivierung transduzierter Zellen	70
4.3 <i>In vitro</i> Immunisierung zur Herstellung monoklonaler Antikörper	71
4.3.1 Antikörperantwort gegen VP1 und elektrochemische Fusion.....	71
4.3.2 Antikörperantwort gegen VP1-Mip und elektrochemische Fusion.....	72
4.3.3 Antikörperantwort gegen <i>L. pneumophila</i>	74
4.3.4 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper	75
4.3.4.1 Monoklonale Antikörper gegen VP1	75
4.3.4.2 Monoklonale Antikörper gegen Mip	77
5 Diskussion.....	79
5.1 Etablierung der <i>In vitro</i> Immunisierung	80
5.1.1 Verwendung von B-Lymphozyten	81
5.1.2 Einfluss verschiedener Stimuli auf <i>in vitro</i> kultivierte B-Lymphozyten	82
5.1.3 Spezifische Antikörperproduktion im zeitlichen Verlauf.....	83
5.2 Charakterisierung der aktivierten B-Lymphozyten	84
5.3 Virale Konstrukte zur Immortalisierung.....	85
5.3.1 Herstellung und Prüfung der retroviralen Konstrukte	86
5.3.2 Transduktion muriner Knochenmarkszellen	87
5.4 <i>In vitro</i> Immunisierung gegen verschiedene Antigene.....	88
5.4.1 Antikörper aus der <i>In vitro</i> Immunisierung	89
5.4.2 <i>In vitro</i> Immunisierung muriner B-Lymphozyten eignet sich zur Herstellung monoklonaler Antikörper	91
5.5 Ausblick.....	92
Anhang.....	94
Literatur	96
Danksagung	107
Eidesstattliche Erklärung.....	108

Tabellenverzeichnis

3.1 Antikörper und Proteinkonjugate	21
3.2 Bakterienstämme und Vektoren	22
3.3 Zellkulturmedien	23
3.4 Zellkulturpuffer	25
3.5 Antikörper zur Sortierung LIN ⁻ -Zellen.....	28
3.6 Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse muriner Milzzellen.....	30
3.7 Puffer zur affinitätschromatographischen Reinigung von Antikörpern über Protein A	33
3.8 Gele der SDS-PAGE	34
3.9 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Western Blot	35
3.10 Mikrobiologische Kulturmedien.....	37
3.11 Q5 [®] -PCR-Reaktionsansatz.....	38
3.12 Q5 [®] -PCR-Ablauf.....	39
3.13 Puffer für TAE-Agarose-Gelelektrophorese	39
3.14 Reaktionsansatz zum Plasmidverdau.....	40
3.15 Reaktionsansatz für <i>blunt end</i> -Ligation.....	41
3.16 Verwendete Gene in Plasmidkonstrukten zur Herstellung permanenter Zelllinien	42
3.17 Reaktionsansatz für Gibson- <i>Assembly</i> mit In-Fusion [®] HD.....	43
3.18 Bakterienkolonie-PCR-Reaktionsansatz	44
3.19 Bakterienkolonie-PCR-Ablauf	45
3.20 DNase-Reaktionsansatz.....	47
3.21 cDNA-Synthese- und qPCR-Reaktionsansatz.....	48
3.22 cDNA-Synthese- und qPCR-Abauf.....	49
4 Konzentration der generierten Retroviren	65
5 Primer für die Herstellung der Plasmide	94

Abbildungsverzeichnis

1.1 Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.....	3
1.2 Aktivierung von B-Lymphozyten.....	4
1.3 Phasen der Hybridomtechnologie.....	8
1.4 Herstellung transgener Mäuse	10
1.5 Phagendisplay	12
3.1 Magnetische Zellsortierung	24
3.2 Nachweis und Charakterisierung spezifischer Antikörper im ELISA.....	32
3.3 Schematische Darstellung des TetOn-Systems	41
3.4 Schematische Darstellung der hergestellten Plasmide	43
3.5 Herstellung von Retroviren und Transduktion	46
3.6 Auswertung der qPCR.....	49
4.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung muriner Milz-B-Lymphozyten.....	53
4.2 Einfluss verschiedener Stimuli auf Antikörperproduktion.....	54
4.3 Spezifische Antikörperproduktion im zeitlichen Verlauf.....	56
4.4 Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern auf <i>in vitro</i> stimulierten B-Lymphozyten	57
4.5 Oberflächenexpression des IL 7-Rezeptors.....	58
4.6 Proliferation aktivierter B-Lymphozyten	58
4.7 Zellzahlen <i>in vitro</i> immunisierter B-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf.....	59
4.8 Lichtmikroskopische Aufnahmen von B-Lymphozyten nach fünf Tagen <i>In vitro</i> Immunisierung.....	60
4.9 Ablauf der <i>In vitro</i> Immunisierung von B-Lymphozyten	60
4.10 Verdau des Plasmids pRetroX	61
4.11 Amplifikation der Gene zur Herstellung retroviraler Vektoren	62
4.12 Kolonie-PCR zum Nachweis der verschiedenen Gene in transformierten Bakterien.	63
4.13 Quantifizierung von Retroviren mittels qPCR	64

4.14 Lichtmikroskopische Aufnahmen von transduzierten NIH/3T3-Zellen.....	66
4.15 Nachweis der Transduktion von NIH/3T3-Zellen mit NUP98HOXB4-RV und EGFP-RV auf genetischer Ebene	66
4.16 Mikroskopische Aufnahmen von NIH/3T3-Zellen transduziert mit EGFP-RV	67
4.17 Nachweis der Transduktion von NIH/3T3-Zellen mit Bcl2-, BclxL- und cmyc-RV..	68
4.18 Co-Kultur von unreifen Knochenmarkszellen mit OP9-Zellen.....	69
4.19 Mikroskopische Aufnahmen von LIN ⁻ -Zellen transduziert mit EGFP-RV verschiedener MOI	69
4.20 Lichtmikroskopische Aufnahmen von LIN ⁻ -Zellen transduziert mit Bcl2-RV	70
4.21 Antikörperantwort gegen VP1	71
4.22 Polyklonale VP1-spezifische IgG-Antikörper.....	72
4.23 Antikörperantwort gegen VP1-Mip.....	73
4.24 Polyklonale Mip-spezifische IgG-Antikörper	73
4.25 Antikörperantwort gegen <i>L. pneumophila</i>	74
4.26 Monoklonale Antikörper gegen VP1	75
4.27 Subklasse der VP1-spezifischen Antikörper	76
4.28 O3G2B5 im Western Blot	76
4.29 Monoklonale Antikörper gegen Mip	77
4.30 O16D3E8 im Western Blot	78
4.31 Nachweis von Legionellen mit O16D3E8-Kulturüberstand	78
5 Vektorkarte der hergestellten Plasmide.....	95

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
Bcl2, BclxL	B cell lymphoma 2 bzw. xL
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	Balanced Salt Solution
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	Komplementäre DNA
CDR	Complementary Determining Regions
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
c_t	Threshold Cycle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EURL ECVAM	Referenzlabor für Alternativen zu Tierversuchen der Europäischen Union
Fab	Antigen Binding Fragment
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
F_c	Crystallizable Fragment
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FKS	Fetales Kälberseum
Flt3-L	Flt3-Ligand
HAT	Hypoxanthin, Azaserin, Thymidin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HOXB4	Homeobox B4
IFNγ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL 7-R	IL 7-Rezeptor
LB	Lysogeny Broth
LIN⁻	Lineage negativ
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	Magnetic Cell Separation
MHC	Major Histocompatibility Complex
Mip	Macrophage Infectivity Potentiator
MOI	Multiplicity of Infection
MoMuLV	Moloney Murines Leukämievirus
NKS	Neonatales Kälberserum
NUP98	Nucleoporin 98
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PEG8000	Polyethylene Glycol 8000
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
POD	Peroxidase
qPCR	Quantitative Real Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAV	Streptavidin
SCF	Stammzellfaktor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung

T_m	Hybridisierungstemperatur
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
VP1	Virushüllprotein 1 des Hamster Polyomavirus

1 Einleitung

1.1 Antikörper: Von Entdeckung und Anwendung

Die erste schriftlich dokumentierte Impfung in Form einer Inokulation datiert aus dem 16. Jahrhundert in China (Needham et al., 2008). Damals wurde ein aus Pockenpusteln gewonnenes Pulver in die Nase der zu impfenden Person geblasen, um vor der schwer ansteckenden und häufig tödlichen Erkrankung zu schützen. Dass der so vermittelte Schutz vor der Pockenkrankheit durch verschiedene Immunzellen und Moleküle von wenigen Nanometern vermittelt wird, die heute gemeinhin als Antikörper bekannt sind, würde noch einige Jahrhunderte unerkannt bleiben. Die schützende Wirkung von Antikörpern, die infolge einer durchgestandenen Krankheit oder nach Kontakt mit infektiösem Material einsetzte, wurde schon früh erfasst und so wurden Antikörper und die ihrer Entstehung zugrunde liegenden Mechanismen seit jeher gesucht und untersucht. Edward Jenner erneuerte die Methode zur Pockenimmunisierung und impfte 1796 erstmals Patienten mit lebenden Erregern der Kuhpocken (Jenner, 1798). Wenngleich noch nicht als solche identifiziert, wurde der erste gezielte therapeutische Einsatz von Antikörpern 1890 von Emil von Behring und Kitasato Shibasaburo durchgeführt. Die beiden Wissenschaftler zeigten, dass an Diphtherie erkrankte Tiere durch eine Injektion mit dem Serum immunisierter Tiere geheilt werden konnten. Darauf basierend entwickelte Behring das Diphtherieheils Serum, ein Serum von gegen Diphtherie immunisierten Pferden, das maßgeblich den Rückgang der zu diesem Zeitpunkt meist tödlich verlaufenden Kinderkrankheit in Deutschland bewirkte (Klein, 2013). Die damit entwickelte passive Immunisierung wurde in den folgenden Jahrzehnten zur Bekämpfung verschiedener Infektionskrankheiten angewandt (z.B. Janeway 1945; Luke et al., 2006). Parallel dazu wurden die heilsamen Serumbestandteile schließlich als Antikörper identifiziert, globuläre Proteine, die bedingt durch ihre strukturelle Varianz hochspezifisch molekulare Strukturen binden, die als Antigen bezeichnet werden (Heidelberger & Kendall, 1936). Die Identifizierung der Lymphozyten als Antikörper-

produzierende Zellen (Fagraeus, 1948) ebnete schließlich den Weg für die gezielte Herstellung von Antikörpern. Mit der 1975 entwickelten Hybridomtechnologie (siehe Abschnitt 1.3.1) hielten monoklonale Antikörper Einzug in Therapie und Diagnostik, deren Spezifität und Modifizierbarkeit neue Anwendungsmöglichkeiten erschlossen. Gekoppelt an Pharmazeutika, Radioisotope oder Toxine können monoklonale Antikörper zur Bekämpfung oder Visualisierung maligner Strukturen im Körper angewandt werden. 1986 wurde erstmals ein monoklonaler Antikörper für den therapeutischen Einsatz am Menschen zugelassen (Sgro, 1995). In der Medizin werden Antikörper heute zur Behandlung von kardiovaskulären, infektiösen, Autoimmun- und Krebserkrankungen eingesetzt (Baselga et al., 2012; Coller et al., 1991; Fernandes, 2018; Jacobson et al., 2009). Im Jahr 2019 umfasste der globale Markt für therapeutische monoklonale Antikörper mehrere Milliarden US-Dollar (Santos-Neto et al., 2021). Darüber hinaus finden sie in der human- und veterinärmedizinischen Diagnostik von Protozoen-, Bakterien- und Virusinfektionen Anwendung (Hirose et al., 1986; Parish et al., 1985; Suzuki et al., 2020) und werden zu analytischen Zwecken eingesetzt, beispielsweise in Schwangerschafts- oder Drogentests oder zur Bestimmung der Wasserqualität. Sie werden außerdem genutzt, um Proteine oder Zellen zu reinigen oder anzufärben und sind essenziell in der modernen Laboranalytik.

1.2 Entstehung und Funktion von Antikörpern im Organismus

1.2.1 Antikörperstruktur

Antikörper sind Glykoproteine, die aufgrund ihrer globulären Struktur auch als Immunglobuline bezeichnet werden. Sie bestehen in der Regel aus zwei schweren (50 kDa) und zwei leichten Proteinketten (25 kDa) (Abb. 1.1). Leichte Ketten haben eine variable (V_L) und eine konstante Domäne ($C_{\lambda/\kappa}$), während sich schwere Ketten aus einer variablen (V_H) und drei konstanten Domänen zusammensetzen (C_{H1-3}). Je eine schwere und eine leichte Kette sind durch kovalente Disulfidbrücken zu einem Heterodimer verknüpft. Zwei dieser Heterodimere sind wiederum durch zwei weitere Disulfidbrücken (*Hinge Region*) zu einem Antikörper der Immunglobulin-Klasse G (IgG) zusammengesetzt.

Der Antikörper besteht aus einem konstanten und zwei variablen Fragmenten. Der F_C -Teil (*Crystallizable Fragment*) bildet den konstanten Teil und besteht aus den konstanten Domänen C_{H2} und C_{H3} der schweren Kette und der *hinge* Region. Der oberhalb der *hinge*

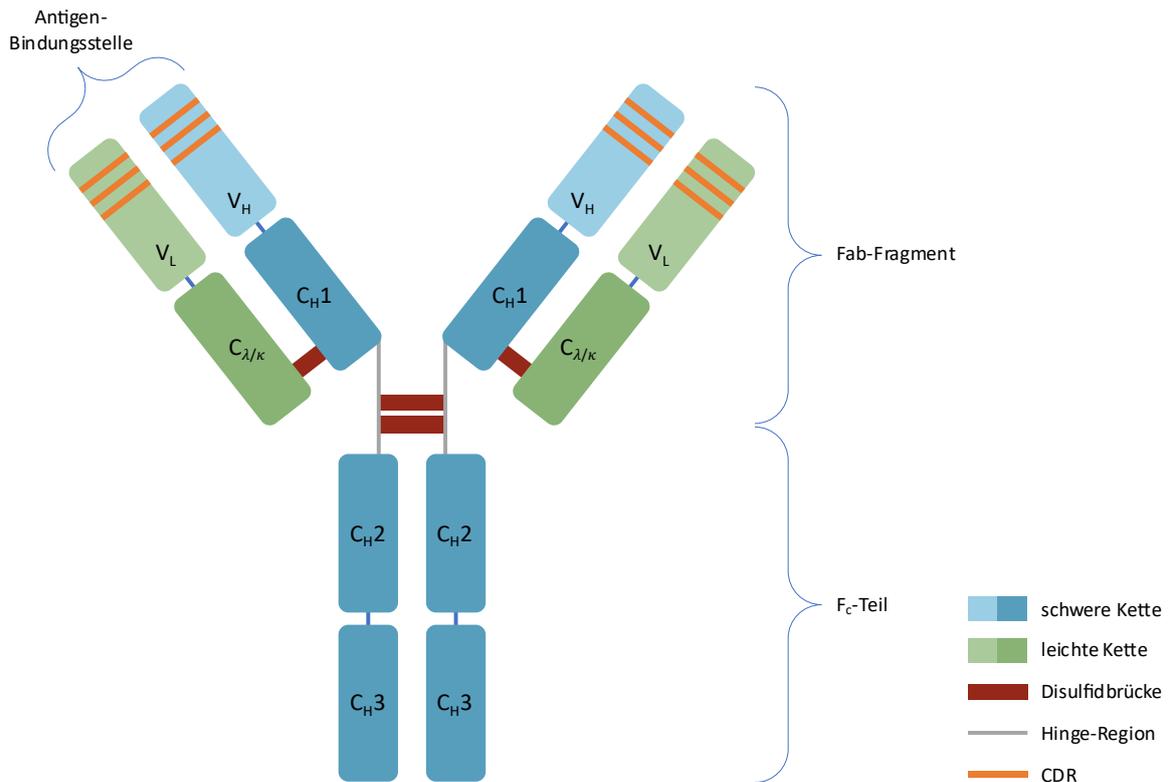


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers. Antikörper bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Darstellung wurde nach Micheel (2003) modifiziert.

Region gelegene Teil der schweren Ketten bildet zusammen mit den leichten Ketten die beiden identischen variablen Fragmente, die als Fab (*Antigen Binding Fragment*) bezeichnet werden. Die variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) bilden zusammen die Antigen-Bindungsstelle, das sogenannte Fv-Fragment (*Variable Fragment*). Diese Domänen bestehen jeweils aus konservierten (*Framework*) und hypervariablen (*Complementary Determining Regions, CDR*) Regionen und ergeben zusammen das Paratop. Die hohe Variabilität in diesen CDRs bedingt schließlich die große Bandbreite von Antikörperspezifitäten (Murphy et al., 2018).

1.2.2 Aktivierung von B-Lymphozyten und Antikörperantwort *in vivo*

Die im Knochenmark gereiften B-Lymphozyten tragen auf ihrer Zelloberfläche einen B-Zell-Rezeptor (BZR), der aus einem Membran-gebundenen Antikörper und einem Co-Rezeptor besteht. Nach abgeschlossener Reifung migrieren B-Lymphozyten in die Lymphknoten oder lymphatischen Organe, wo sie auf Pathogene treffen. Der für jede Zelle

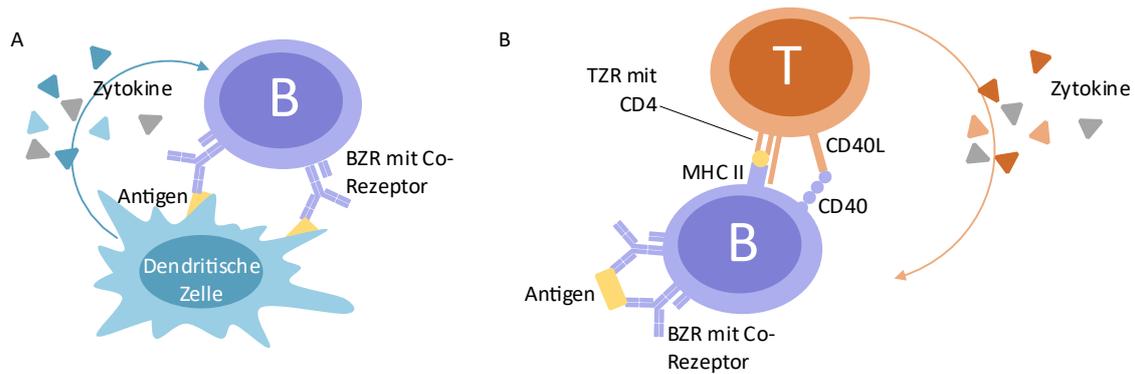


Abb. 1.2: Aktivierung von B-Lymphozyten. Dendritische Zellen übertragen Antigen auf B-Lymphozyten und sezernieren Zytokine (A). B-Lymphozyten präsentieren Antigenfragmente auf einem MHC II-Komplex, der vom T-Zell-Rezeptor (TZR) aktivierter spezifischer T-Lymphozyten erkannt wird. T-Lymphozyten senden Aktivierungssignale in Form von Zytokinen und CD40-Liganden (CD40L) auf ihrer Oberfläche, die mit den CD40-Rezeptoren auf B-Lymphozyten agieren (B). Die Darstellung wurde nach Murphy et al. (2018) modifiziert.

einmalige BZR erkennt und bindet molekulare Strukturen am Pathogen, die man als Antigen bezeichnet. Einige solcher Strukturen lösen bereits durch Quervernetzung mehrerer BZR eine Antikörperantwort in B-Lymphozyten aus, was einen wichtigen Mechanismus in der frühen Immunantwort darstellt. In den meisten Fällen erfordert die effektive Aktivierung der B-Lymphozyten neben der Bindung des BZR zusätzliche Signale. Diese Signale erhalten die B-Lymphozyten von dendritischen Zellen und aktivierten T-Lymphozyten, die mit ihrem T-Zell-Rezeptor die präsentierten Peptide erkennen (Abb. 1.2). B-Lymphozyten binden und internalisieren über den BZR freies oder von dendritischen Zellen aufgenommenes Antigen (Abb. 1.2 A) (Qi et al., 2006). Das Antigen wird intrazellulär abgebaut und in Form einzelner Peptide auf der Zelloberfläche über einen MHCII-Komplex (*Major Histocompatibility Complex*) präsentiert. Das präsentierte Antigenfragment zieht T-Lymphozyten an, die ebenfalls daran binden. Diese wiederum werden selbst durch den Kontakt mit professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, aktiviert und dadurch zu sogenannten T-Helfer-Zellen. Die aktivierten T-Helfer-Zellen binden mit auf ihrer Oberfläche befindlichen Rezeptoren an Rezeptoren der B-Lymphozyten: Der T-Zell-Rezeptor bindet das präsentierte Antigenfragment, der CD40-Ligand (CD40L) bindet den auf den B-Lymphozyten exprimierten CD40-Rezeptor und weitere Rezeptoren befähigen den direkten Zell-Zell-Kontakt (Abb. 1.2 B). Dieser löst in beiden Zelltypen intrazelluläre Signalkaskaden aus und schafft eine räumliche Nähe. Die T-Helfer-Zellen schütten nun Zytokine aus, die im Zusammenspiel mit dem CD40-Signal und der BZR-Bindung die

Proliferation und Differenzierung der B-Lymphozyten bewirken. Auch dendritische Zellen bringen solche aktivierenden Signale hervor, wahrscheinlich in Form von Zytokinen, allerdings sind die genauen Substanzen und Vorgänge noch weitgehend unbekannt (Wan et al., 2008; Wykes & MacPherson, 2000).

Das Zusammenfinden von spezifischen B- und T-Lymphozyten ist entscheidend für die fortlaufende Immunantwort. Der initiale Kontakt findet im lymphatischen Gewebe statt, wo im Organismus zirkulierende Lymphozyten auf Antigen-präsentierende Zellen aus dem Gewebe treffen. Das maßgeblich auf dendritischen Zellen präsentierte Antigen in Kombination mit Botenstoffen und Adhäsionsmolekülen zieht die für das Antigen spezifischen B- und T-Lymphozyten an. Diese bewegen sich durch verschiedene Zonen der Lymphknoten und bilden schließlich sogenannte Keimzentren. Dort findet die massive Proliferation der aktivierten B-Lymphozyten statt, die durch die anwesenden T-Helfer-Zellen und in das Lymphgewebe beförderte Pathogene weiter stimuliert wird. Dabei werden im B-Lymphozyt die Antikörpergene mutiert, sodass verschiedene Variationen des ursprünglichen Konstrukts exprimiert und die mit den günstigsten Bindungseigenschaften bevorzugt selektiert werden (siehe Abschnitt 1.2.3). Die B-Lymphozyten differenzieren schließlich in Antikörper-produzierende Plasmazellen oder in langlebige Gedächtniszellen. Letztere teilen sich nur wenig und produzieren keine Antikörper bis sie bei einer Reinfektion des Organismus mit dem entsprechenden Pathogen selbst zu Plasmazellen differenzieren. Plasmazellen sezernieren große Mengen ihres spezifischen Antikörpers in den Blutkreislauf und migrieren in das Knochenmark oder die Milz.

1.2.3 Genetische Vielfalt und Subklassenwechsel in der Antikörpersynthese

Jeder B-Lymphozyt produziert in der Regel einen bestimmten Antikörper (Nossal, 1959). Im Menschen umfasst das Repertoire aus naiven B-Lymphozyten schätzungsweise 10^{15} verschiedene Antikörper (Briney et al., 2019), deren vollständige genetische Kodierung die Größe des gesamten menschlichen Genoms bei weitem übersteigen würde. Stattdessen beruht die Variabilität der Antikörper auf wenigen verschiedenen Genen, deren unterschiedliche Kombinationen große Diversität erzeugen. Die Gene für die variablen Antikörperregionen bestehen aus drei Gensegmenten: *variable* (V), *diversifying* (D) und *joining* (J)-Segmente. Das Gen für die variable Region der leichten Kette besteht aus einem V- und einem J-Segment, das der schweren Kette aus V-, D- und J-Segment. Von jedem dieser Gensegmente liegen mehrere, verschiedenartige Kopien im Genom vor, die während

der Reifung der B-Lymphozyten im Knochenmark zufällig assembliert werden. Durch die V(D)J-Rekombination können aus wenigen Genen enorm viele verschiedene Genkombinationen hervorgehen. Beim Zusammenfügen der Segmente werden durch Reparaturmechanismen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) einzelne Nukleotide eingefügt oder abgebaut, was zusätzlich zur genetischen Diversität beiträgt. Die V(D)J-Rekombination erfolgt für die Gene der schweren und leichten Kette unabhängig voneinander, sodass auch unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten von schweren und leichten Ketten zur Variabilität des finalen Antikörpers beitragen. Der Antikörper wird im B-Lymphozyt schließlich als Membran-ständiger BZR und als lösliches Molekül produziert.

Trifft ein B-Lymphozyt auf ein Pathogen, kann er über seinen BZR das Pathogen wahrnehmen. Bindet der BZR am Pathogen und wird der B-Lymphozyt aktiviert, durchläuft der Antikörper eine Affinitätsreifung, die intrazellulär von der *Activation Induced Cytidine Deaminase* katalysiert wird (Muramatsu et al., 2000). Dabei werden mit sehr hoher Frequenz Punktmutationen (Griffiths et al., 1984) und DNA-Doppelstrangbrüche in den Genen der variablen Antikörperregion induziert (Bross et al., 2000), die zur Folge haben, dass die Tochtergeneration der mutierten Zelle leicht veränderte Antikörpergene und demnach auch Antikörper mit veränderten Bindungseigenschaften besitzt. Dieser Prozess wird als somatische Hypermutation bezeichnet und findet im Keimzentrum statt. Da die aktivierten B-Lymphozyten sich unentwegt teilen, häufen sich die Mutationen und die Antikörperdiversität nimmt drastisch zu. Die B-Lymphozyten mit nun mutierten BZR konkurrieren um limitierte, essenzielle Ressourcen, wie Botenstoffe, Kontakte zu T-Helferzellen und Antigenkontakt. BZR mit höherer Affinität zum Antigen ermöglichen durch stärkere Bindung die räumliche Nähe zu diesen Ressourcen, B-Lymphozyten mit weniger affinem BZR sterben ab. In der Folge nimmt die durchschnittliche Affinität der Antikörper zum Antigen zu.

Unabhängig von der variablen Antikörperregion wird die Subklasse eines Antikörpers durch seine konstante Region definiert. Jeder B-Lymphozyt produziert zu einem Zeitpunkt nur Antikörper einer Subklasse, die sich im Verlauf der Immunantwort ändern kann (Nossal, 1959). Während der Reifung des Antikörpers werden die assemblierten Gene der variablen Antikörperregion zunächst mit denen der konstanten Region verknüpft, die zuerst im entsprechenden Genlocus liegen, sodass IgM- und IgD-Antikörper exprimiert werden. In Folge der Zellaktivierung werden durch eine Reihe von Enzymen DNA-Doppelstrangbrüche induziert. Ein Teil des Gens wird entfernt und die DNA durch nicht-homologe Verknüpfung (*Non-Homologous End Joining*) mit dem nächsten Gen im Locus verbunden. So entstehen

im Verlauf der Immunreaktion je nach Pathogen IgG-, IgA- und IgE-Antikörper mit derselben variablen Antikörperregion, die vom Subklassenwechsel unberührt bleibt. Die Subklassen interagieren jeweils mit unterschiedlichen Effektorzellen und -molekülen und haben andere immunologische Funktionen, was verschiedene Formen der Pathogenbekämpfung zu verschiedenen Zeitpunkten der Immunantwort ermöglicht.

1.2.4 Funktion des Antikörpers *in vivo*

Antikörper haben im Organismus eine tragende Rolle in der Abwehr extrazellulärer Pathogene. Sie binden an Viren, Parasiten, Bakterien oder deren Toxine und verhindern so deren Eindringen in Zellen, bewirken aber nicht direkt ihre Zerstörung. Antikörper binden mit ihren variablen Regionen an ein Pathogen und umhüllen es, was als Opsonisierung bezeichnet wird. Dabei können ihre konstanten Regionen von Rezeptoren auf Phagozyten erkannt und gebunden werden, die anschließend das Pathogen aufnehmen und abbauen. In Folge der Opsonisierung können Komplementproteine an das Pathogen binden. Diese Proteine bilden einen weiteren Aspekt der humoralen Immunantwort und können direkt zur Lyse des Fremdkörpers führen oder Phagozyten zur Zerstörung anziehen. Antikörper können ebenfalls an infizierte Zellen binden, die Teile des Pathogens auf ihrer Oberfläche präsentieren. Opsonisierte Pathogene oder solche Antikörper-markierten Zellen locken Effektorzellen an, wie natürliche Killerzellen oder Granulozyten. Diese besitzen selbst keine Antigen-spezifität, erkennen aber die konstanten Antikörperregionen. Die Bindung daran erzeugt räumliche Nähe und bewirkt die Freisetzung inflammatorischer und zytotoxischer Proteine, die schließlich zur Zerstörung des Pathogens oder der infizierten Zelle führen.

1.3 Biotechnologische Methoden zur Herstellung von Antikörpern

1.3.1 Hybridomtechnologie

Im Jahr 1973 veröffentlichten Richard Cotton und César Milstein erstmals ihre Methodik zur Fusion Antikörper-produzierender Zellen im Rahmen der Erforschung der Antikörpergene. Kurz darauf folgte die Publikation von Milstein und Georges Köhler (1975) zur Herstellung von unsterblichen Antikörper-produzierenden Zellen, die den Grundstein für die Produktion monoklonaler Antikörper bilden sollte. Die Wissenschaftler fusionierten

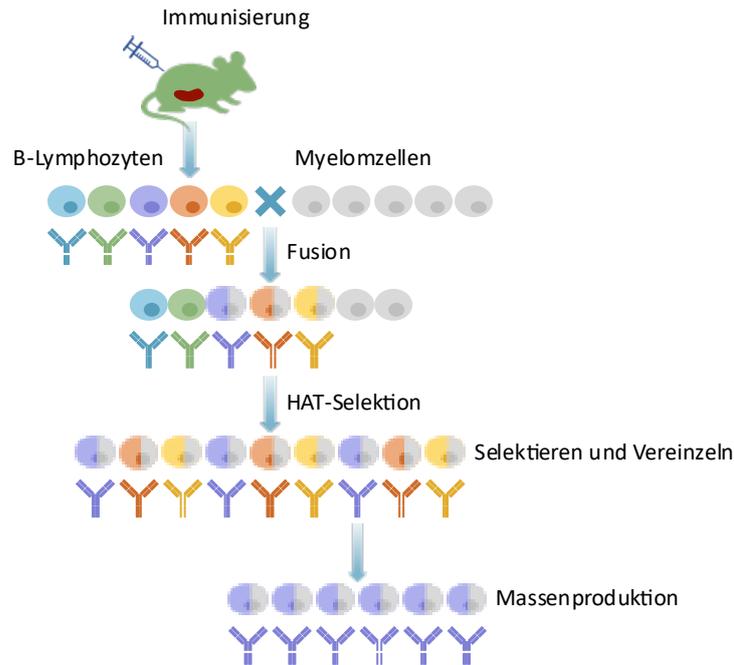


Abb. 1.3: Phasen der Hybridomtechnologie. B-Lymphozyten werden aus einer immunisierten Maus isoliert und mit murinen Myelomzellen fusioniert. In der HAT-Selektion werden Hybridomzellen selektiert, die anschließend auf die Produktion spezifischer Antikörper getestet und gegebenenfalls zu monoklonalen Zelllinien vereinzelt werden. Die Darstellung wurde nach Micheel (2003) modifiziert.

B-Lymphozyten einer immunisierten Maus mit entarteten, immortalen B-Lymphozyten, den Myelomzellen. Aus dieser Fusion gingen schließlich Zellen hervor, die sowohl Antikörper produzieren als auch immortal waren und so die Eigenschaften beider Zelltypen vereinten. Diese Zellen wurden später als Hybridome bezeichnet (Milstein, 1999). Die wesentlichen Schritte der Methode sind bis heute dieselben: Eine Maus wird mit einem Antigen immunisiert, ihre Milz-B-Lymphozyten isoliert und mit Myelomzellen fusioniert (Abb. 1.3). Nach der Fusion liegt ein Gemisch von Hybridomen und unfusionierten B-Lymphozyten und Myelomzellen vor. B-Lymphozyten können *in vitro* nicht langfristig überleben und sterben innerhalb weniger Tage. Myelomzellen unterliegen nicht dem programmierten Zelltod, der Apoptose, sodass eine Selektion der tatsächlichen Hybridome nötig ist.

Für die Fusion mit B-Lymphozyten werden deshalb Myelomzellen eingesetzt, denen die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) fehlt (Shulman et al., 1978). Dieses Enzym ermöglicht die Synthese von wichtigen Nukleinsäurebausteinen, den Purinen, aus Nukleinsäurevorstufen wie Guanin und Hypoxanthin. Seine Abwesenheit hat zur Folge, dass Purine ausschließlich über den *de novo*-Nukleinsäuresyntheseweg produziert werden können. Dieser wiederum wird durch Zugabe von Azaserin oder Aminopterin gehemmt

(Szybalski, 1992), sodass unfusionierte Myelomzellen sterben. Hybridomzellen besitzen die intakte HGPRT ihrer B-Lymphozyten-Vorfahren und können so weiterhin Purine synthetisieren. Aus dieser sogenannten HAT-Selektion (Hypoxanthin, Azaserin, Thymidin) gehen immortale Hybridomzelllinien hervor, von denen nicht alle spezifische Antikörper sezernieren. In der Folge werden Hybridome in limitierender Verdünnung ausgesät und vereinzelt (Freshney et al., 2016). In der lichtmikroskopischen Untersuchung können Einzelklone ausgemacht werden, aus denen Einzelkolonien entstehen, die somit monoklonal sind. Der Nachweis spezifischer Antikörper-Produktion erfolgt im *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und positiv getestete Kolonien werden expandiert und kryokonserviert. Die so hergestellten Antikörper sind korrekt gefaltete und vollständig glykosilierte Proteine mit einmaliger Bindungsspezifität. Im Vergleich zu Antikörpern aus anderen Herstellungsverfahren weisen sie meist höhere Affinitäten auf (Kim et al., 2001). Die Anwendungen monoklonaler Antikörper reicht von diagnostischen Erregernachweisen über hochsensible Immunoassays bis hin zur Krebstherapie und treiben eine milliarden schwere Wirtschaft an (Yang et al., 2019).

Köhler und Milstein erhielten 1984 den Nobelpreis für Medizin für die von ihnen entwickelte Hybridomtechnologie. Bedingt durch die Verfügbarkeit von Myelomzelllinien war die Methodik zu diesem Zeitpunkt nur für die Produktion von Antikörpern aus Nagern geeignet. Inzwischen wurden verschiedene Heteromyelomzelllinien entwickelt, die die Herstellung von Antikörpern aus anderen Spezies wie Kaninchen (Spieker-Polet et al., 1995), Schafen (Flynn et al., 1989), Rindern (Tucker et al., 1987) und auch Menschen (Karpas et al., 2001) erlauben. Die vorangehende Immunisierung des Versuchstiers und der Selektionsprozess im Anschluss an die Fusion machen die Hybridomtechnologie zu einem risikoreichen und arbeitsintensiven Unterfangen. Dennoch ist sie eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Herstellung monoklonaler Antikörper (Parray et al., 2020) und nahezu alle therapeutisch eingesetzten Antikörper haben ihren Ursprung in der Hybridomtechnologie (Zaroff & Tan, 2019).

1.3.2 Antikörper aus transgenen Tieren

1989 wurden erstmals teilweise humane Antikörper in Mäusen produziert (Brüggemann et al., 1989). Die zugrunde liegende Methodik wurde in den folgenden Jahren maßgeblich optimiert, sodass alsbald der erste vollständig humane Antikörper in einem Mausmodell generiert werden konnte (Lonberg et al., 1994). Dazu wurden die humanen Antikörpergene in murine embryonale Stammzellen eingebracht, aus denen transgene Mäuse mit humanen

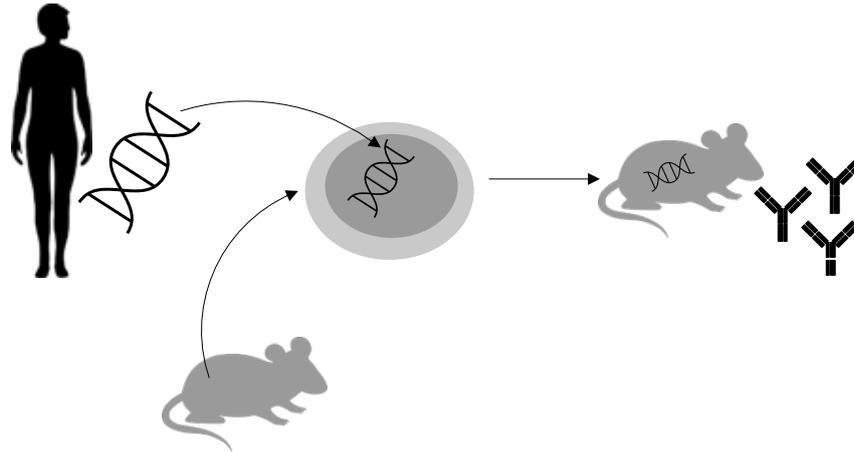


Abb. 1.4: Herstellung transgener Mäuse. Humane Antikörpergene werden in murine embryonale Stammzellen integriert. Aus den veränderten Zellen gehen Mäuse mit humanen Antikörpern hervor.

Antikörpern hervorgingen (Abb. 1.4). Die B-Lymphozyten dieser Mäuse können in der Hybridomtechnologie eingesetzt werden, was die Herstellung Antigen-spezifischer, monoklonaler humaner Antikörper ohne Immunisierung am Menschen erlaubt. Die entstehenden Antikörper durchlaufen in der Maus eine vollständige Affinitätsreifung und rufen beim Einsatz im Menschen kaum Immunreaktionen hervor. Etwa ein Viertel der für humanmedizinische Anwendungen zugelassenen Antikörper stammt aus transgenen Mäusen (Lu et al., 2020). Inzwischen werden auch andere transgene Spezies, wie Kaninchen, Ratten oder Rinder, für die Herstellung humaner Antikörper eingesetzt (Flisikowska et al., 2011; Osborn et al., 2013; Sano et al., 2013). Praktisch ist die Verwendung transgener Tiere limitiert, da die verschiedenen Modelle in der Regel patentrechtlich geschützt sind.

1.3.3 Rekombinante Antikörperherstellung

Bei der rekombinanten Herstellung von Antikörpern werden Antikörpergene amplifiziert, gegebenenfalls modifiziert und schließlich über einen Vektor in ein Expressionssystem integriert. Mit dieser Methodik können neben vollständigen Antikörpern auch kleinere Antikörperfragmente hergestellt werden, wie beispielsweise Fab- oder scFv (*Single Chain Variable fragment*)-Fragmente, die nur aus den variablen Antikörperregionen bestehen. Die Gene werden aus einzelnen oder gemischten Populationen von B-Lymphozyten oder aus Hybridomzellen verschiedener Spezies bezogen. Die Möglichkeit zur Manipulation der Gensequenz erlaubt die gezielte Modifikation des Antikörpers, zum Beispiel zur Verbesserung oder Veränderung von Affinität, Spezifität, Subklasse oder auch Spezies des

Antikörper. *Escherichia coli*-Bakterien kommen aufgrund ihrer einfachen Handhabung und großzügigen Ausbeuten häufig als Expressionssystem zum Einsatz (Ni & Chen, 2009). Der Antikörper bzw. das exprimierte Fragment wird aus dem Kulturüberstand oder dem Periplasma der Bakterien gereinigt (Lauer et al., 2005; Ward, 1993). Rekombinante Antikörper können ebenso in Hefen (Ning et al., 2005), Fadenpilzen (Huynh et al., 2020), Protozoen (Klatt & Konthur, 2012), Insektenzellen (PalMBERGER et al., 2011) oder Säugierzellen (You et al., 2018) exprimiert werden. Bei der Expression in eukaryotischen Zellen werden vollständig gefaltete und glykosilierte Antikörper produziert, die therapeutisch eingesetzt werden können (Jefferis, 2009). Die rekombinante Herstellung von Antikörpern erlaubt die Expression in großem Maßstab bei beständiger Qualität (Chames & Baty, 2000). Als eine bedeutende Form wird im Folgenden das Phagendisplay vorgestellt. Das Prinzip des Phagen-Displays wurde 1985 von George Smith entwickelt und publiziert. Wie andere Display-Systeme basiert es auf der Kopplung eines Phänotyps (Protein oder Peptid) an den dazugehörigen Genotyp (Gen), in diesem Fall innerhalb eines Bakteriophagen. Das System wird zur Untersuchung von Protein-Interaktionen, zur Charakterisierung von Proteinen und zur Herstellung rekombinanter Antikörper angewandt. Für die Antikörper-Herstellung werden Antikörper-Fragmente auf der Oberfläche von Bakteriophagen exponiert, die gleichzeitig die Antikörper-kodierenden Gene in sich tragen (Abb. 1.5).

Dazu wird eine große Bibliothek (Genbank) von Antikörpergenen aus den B-Lymphozyten eines immunisierten oder naiven Spenders generiert. Die entsprechenden Gene werden an die DNA-Sequenz eines Hüllproteins des Bakteriophagen kloniert. Dazu werden häufig filamentöse Phagen mit einzelsträngiger DNA der Familie *Inoviridae* eingesetzt, wie beispielsweise der M13-Phage. Das generierte Fusionsgen wird in einen Phagen-Vektor integriert, der anschließend in Bakterienzellen transformiert wird. Die Bakterienkultur wird mit Helferphagen infiziert, die die Enzyme für Replikation und Verpackung der DNA kodieren (Vieira & Messing, 1987). In den Bakterienzellen werden nun die modifizierten Bakteriophagen produziert, die die funktionalen Antikörper-Fragmente gekoppelt an das Hüllprotein an ihrer Oberfläche präsentieren und die zugehörige genetische Information im Inneren tragen. Dabei trägt jeder rekombinante Phage andere Antikörper-Fragmente, sodass eine Vielfalt verschiedener potenzieller Binder entsteht. Die modifizierten Phagen werden

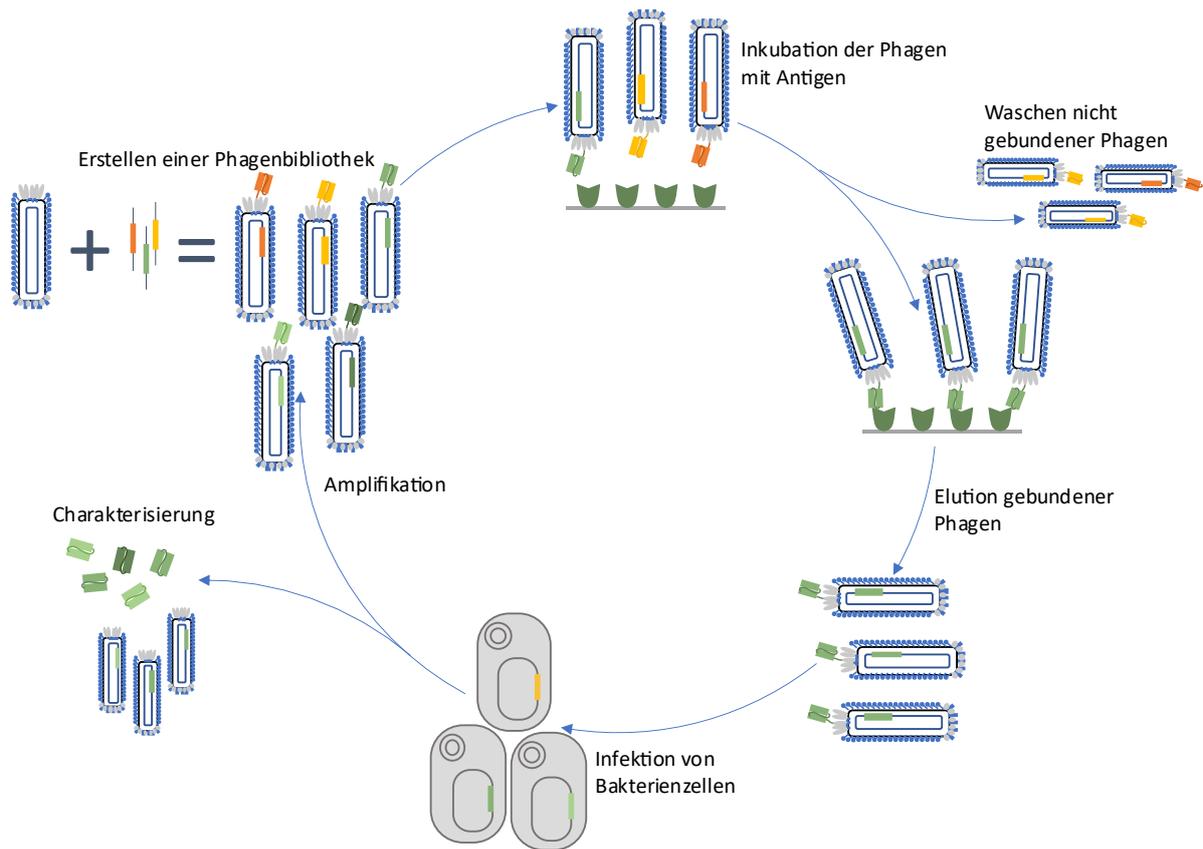


Abb. 1.5: Phagendisplay. Eine Phagenbibliothek wird durch Integration von Antikörpergenen in ein Phagen genom erstellt. Die auf der Phagen-Oberfläche exponierten Antikörperfragmente werden mit dem Antigen inkubiert. Nicht bindende Phagen werden entfernt, bindende in Bakterienzellen amplifiziert. Der Vorgang wird wiederholt. Die Darstellung wurde nach Teixeira und Gonzalez-Pajuelo (2018) modifiziert.

mit dem Antigen von Interesse inkubiert. Nicht-bindende Phagen werden durch Waschen entfernt, gebundene Phagen eluiert. Zur Vervielfältigung der spezifischen Binder werden erneut Bakterien mit den eluierten Phagen und Helferphagen infiziert. Dieser Zyklus aus Amplifikation und Selektion wird mehrfach wiederholt, bevor die selektierten Phagen schließlich charakterisiert werden.

Im Jahr 2018 erhielt Smith den Nobelpreis für die von ihm entwickelte Methode zusammen mit Gregory Winter, der sie so erweiterte, dass sie für die Präsentation und Selektion von Antikörperfragmenten genutzt werden konnte (McCafferty et al., 1990). Das Phagendisplay ermöglicht die Selektion spezifischer Binder aus verschiedenen Spezies in vergleichsweise kurzer Zeit. Außerdem können Binder gegen toxische (Lauer et al., 2005) oder wenig immunogene Substanzen (Chan et al., 2013) generiert werden, die nicht zur effektiven Immunisierung eines lebenden Organismus geeignet sind. Andererseits können einige

Gensequenzen innerhalb einer Genbibliothek toxische Wirkung in bakteriellen Systemen haben, die zu Leseraster- und Deletionsmutationen führen (Krebber et al., 1997). Im Phagendisplay generierte Antikörper zeigen häufig eine geringere Stabilität als glykosilierte Antikörper, die aus der Hybridomtechnologie hervorgehen (Berry, 2005). Um intakte Antikörper zu generieren, muss die DNA der Antikörperfragmente an eine entsprechende Sequenz für die konstanten Antikörperregionen kloniert und in Säugerzellen exprimiert werden. Dieser zeitaufwendige Schritt kann jedoch zu verringerter Antikörperaffinität führen (Steinwand et al., 2014). Bei Antikörpern aus einer naiven Bank ist eventuell eine geringere Affinität zu erwarten als bei solchen, die aus einer Immunbank generiert wurden (Bradbury & Marks, 2004; de Bruin et al., 1999). Der Einsatz von Versuchstieren ist somit nicht immer umgänglich. Die initiale Erstellung einer Antikörpergenbank ist sehr aufwendig und kostenintensiv. Die Größe der Bank ist proportional zur Antikörperaffinität (Perelson & Oster, 1979) und deshalb insbesondere für naive Banken von Bedeutung. So umfassen beispielsweise bedeutende Banken für humane Antikörper, die in den letzten Jahren aufgebaut wurden, die Gene von 30 bis 800 Spendern (Almagro et al., 2019). Die praktische Anwendung bereits publizierter und etablierter Antikörpergenbanken ist in der Regel durch den Patentschutz limitiert.

1.3.4 Aktuelle Kontroverse

Trotz der genannten Schwierigkeiten und Problemstellungen gab das Referenzlabor für Alternativen zu Tierversuchen der Europäischen Union (EURL ECVAM) jüngst eine Stellungnahme ab, die die zukünftige Finanzierung und Publizierung Tier-basierter Antikörperforschung zugunsten des Phagendisplay und anderer *in vitro* Verfahren unterbinden will (European Commission. Joint Research Centre., 2020). Die postulierte Forderung, Antikörper aus Tier-basierten Herstellungsverfahren wie der Hybridomtechnologie ausnahmslos und unmittelbar zu ersetzen, und nicht zuletzt der zweifelhafte Interessenskonflikt der beratenden WissenschaftlerInnen des EURL ECVAM erzeugten in der europäischen wie internationalen Forschergemeinschaft massiven Unmut (González-Fernández et al., 2020; Gorovits et al., 2021; Laustsen et al., 2021; Lutz et al., 2020; Truppo et al., 2020). Die beratende Wissenschaftlerkommission des EURL ECVAM wirbt neben dem Verzicht auf Versuchstiere vor allem mit der besseren Reproduzierbarkeit für das Phagendisplay (Gray et al., 2020). Die Gegenseite argumentiert, Antikörper aus dem Phagendisplay seien von geringerer Affinität und Spezifität und die Methodik selbst für viele mittlere und kleinere Forschungseinrichtungen nicht praktikabel. Während gegenwärtig für

die Herstellung bestmöglicher Antikörper je nach Bedarf und Anwendung alle verfügbaren Methoden ausgeschöpft werden können und sollen, muss ein Fokus der aktuellen und künftigen Antikörperforschung auf der Optimierung bisheriger Verfahren und der Erkundung tierfreundlicher und nachhaltiger Alternativen liegen. Die im folgenden Absatz vorgestellte *In vitro* Immunisierung stellt eine solche Alternative zu konventionellen Methoden der Antikörperherstellung dar.

1.4 *In vitro* Immunisierung

Bei einer *In vitro* Immunisierung wird die im Organismus ablaufende Immunreaktion infolge einer Immunisierung *in vitro* nachgeahmt. Dazu werden alle oder einige der involvierten Immunzellen mit Antigenen und verschiedenen Stimulantien kultiviert, um eine spezifische Antikörperantwort außerhalb des Organismus auszulösen. Bei der Immunisierung eines Versuchstiers unterliegt der Verlauf der Immunantwort einer Vielzahl biologischer Einflussfaktoren und kann schwerlich kontrolliert werden. Die in der Kulturschale induzierte Antikörperantwort kann unter regulierbaren Bedingungen durchgeführt und flexibel gestaltet werden. Gegenüber der konventionellen *in vivo* Immunisierung, die am murinen Modell einen Zeitraum von vier bis zehn Wochen umfasst (Fuller et al., 2001), kann eine *In vitro* Immunisierung innerhalb weniger Tage durchgeführt werden. Die Auslagerung aus dem Organismus ermöglicht den Einsatz von Antigenen, die in der Anwendung am Tier bedenklich sind, wie beispielsweise Toxine, oder solcher, die nur begrenzt verfügbar sind, da für die Immunisierung *in vitro* wesentlich geringere Mengen benötigt werden. Es können ebenfalls Antikörper generiert werden, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, deren Entstehung *in vivo* durch Kontrollmechanismen verhindert wird.

Das Prinzip wurde 1966 erstmals von Mishell und Dutton publiziert, die Splenozyten einer nicht-immunisierten (naiven) Maus mit Schaf-Erythrozyten als Antigen und einem Nährstoffcocktail kultivierten und so *ex vivo* eine Antikörperantwort induzieren konnten. Seitdem wurde die Methode in verschiedenen Ansätzen mit variierenden Erfolgen adaptiert. Eine Vielzahl der publizierten Methoden zur murinen *In vitro* Immunisierung scheiterte darin, spezifische IgG-Antikörper hervorzubringen (de Boer et al., 1987; Treanor et al., 1988; Wohlleben et al., 1996). Die hinreichende Aktivierung Antigen-spezifischer B-Lymphozyten ist dafür essenziell. Da häufig heterogene Gemische von Immunzellen eingesetzt wurden, bedarf es darüber hinaus auch der effektiven Aktivierung und Antigen-

Spezifität von T-Lymphozyten und dendritischen Zellen. Die individuelle Varianz von Spezifität und Aktivität der einzelnen Immunzellpopulationen wiederum führt zu wechselhaften Ergebnissen und schlägt sich in einer geringen Reproduzierbarkeit der jeweiligen Protokolle nieder. Das komplexe Zusammenspiel der Immunzellen während der Antikörperantwort *in vivo* wird bei seiner Abbildung *in vitro* zur Schwierigkeit.

Die von Wand et al. (2011) an der Universität Potsdam erarbeitete Methode sieht die gezielte und schrittweise Aktivierung der involvierten Immunzellen vor. Hier wurden zunächst dendritische Zellen *in vitro* generiert und aktiviert und anschließend für die Differenzierung und Aktivierung von T-Helferzellen eingesetzt. In der Co-Kultur von B-Lymphozyten mit den aktivierten dendritischen Zellen und T-Lymphozyten konnte schließlich die Produktion Antigen-spezifischer Antikörper *in vitro* induziert werden. Die erfolgreiche Aktivierung der einzelnen Zelltypen ist auch hier maßgeblich für die Effizienz der Methode. Das aufwendige Protokoll umfasst eine Vielzahl sensibler Vorgänge und zu kontrollierender Faktoren, was zu schwankenden Resultaten führt. Eine vereinfachte *In vitro* Immunisierung auf der Basis dieser Methodik könnte die Reproduzierbarkeit verbessern und schließlich grundlegend zur Herstellung Antigen-spezifischer, monoklonaler Antikörper genutzt werden. Die *In vitro* Immunisierung ersetzt so die Immunisierung von Versuchstieren und reduziert das Tierleiden im Vergleich zur konventionellen Antikörperherstellung. Sie trägt somit nach der 1959 von Russel und Burch formulierten Strategie *Replace, Reduce, Refine* erheblich zur Verbesserung des Tierwohls bei. Versuchstiere werden dabei dennoch als Quelle für die verwendeten Zellen benötigt. Entsprechende immortale Immunzelllinien könnten die Verwendung von Versuchstieren ersetzen, sodass in einer idealen *In vitro* Immunisierung gänzlich auf den Einsatz von Tieren verzichtet werden könnte. Die vorliegende Arbeit ist ein Schritt auf diesem Weg.

2 Zielstellung

Die Herstellung von Antikörpern beruht in der Regel auf der Immunisierung eines Versuchstiers. Die *In vitro* Immunisierung stellt eine Alternative zu diesem Prozedere dar und verlegt die Immunreaktion aus dem Organismus in die Kulturschale. Die *in vitro* abgebildete Antikörperantwort ist gegenüber der konventionellen *in vivo* Immunisierung zeitsparend und kontrollierbar und ermöglicht die Anwendung besonderer Antigene. Im Organismus resultiert die Antikörperantwort aus einem komplexen Zusammenspiel von dendritischen Zellen, B- und T-Lymphozyten, dessen Abbildung sich *in vitro* schwierig gestaltet. Auf der Grundlage der von Wand et al. (2011) publizierten Herangehensweise sollte in dieser Arbeit eine vereinfachte *In vitro* Immunisierung etabliert werden. Dazu sollten B-Lymphozyten allein, ohne das Zutun anderer Immunzellen, *in vitro* aktiviert werden. Es sollten geeignete Bedingungen erarbeitet werden, die die Aktivierungssignale anderer Zellen hinreichend imitieren, um *in vitro* die effiziente Aktivierung der B-Lymphozyten und die Produktion Antigen-spezifischer Antikörper zu induzieren. Dazu sollte der Einfluss verschiedener Zytokine sowie der Stimulationsdauer untersucht werden. Diese *In vitro* Immunisierung sollte zunächst am Modellantigen VP1 (Virushüllprotein 1 des Hamster Polyomavirus) etabliert werden.

Wenngleich die *in vivo* Immunisierung so umgangen werden kann, wird ein Versuchstier als Quelle für die eingesetzten Zellen benötigt. Um langfristig gänzlich auf den Einsatz von Versuchstieren verzichten zu können, sollte versucht werden, eine Zelllinie für den Einsatz in der *In vitro* Immunisierung zu entwickeln, die somit einen ständigen Zugang zu den benötigten Zellen erlaubt. Dazu bedarf es einer B-Lymphozytenlinie, deren Zellen proliferieren und als Gesamtheit immortal sind, und bei Bedarf *in vitro* in reife B-Lymphozyten mit verschiedenen Spezifitäten differenziert werden können. Zu diesem Zweck sollten unreife B-Lymphozyten durch einen Retrovirus-basierten Transfer von geeigneten Onkogenen immortalisiert werden. Um gleichzeitig die Möglichkeit zur Differenzierung in einen Pool verschiedenartiger B-Lymphozyten sicherzustellen, sollte das

Konstrukt zur Immortalisierung ein- und ausschaltbar sein. Die Transduktion von Säugerzellen und die Funktionalität der hergestellten Retroviren sollten zunächst an einer murinen Zelllinie getestet werden. Schließlich sollten Retroviren an murinen Primärzellen angewandt und die Effizienz der Transduktion untersucht werden. Die generierte Zelllinie sollte charakterisiert und ihre Einsatzmöglichkeiten in der *In vitro* Immunisierung geprüft werden.

Um abschließend die Effizienz des erarbeiteten Protokolls zu beurteilen, sollte die etablierte *In vitro* Immunisierung unter Verwendung der hergestellten Zelllinie auf verschiedene Antigene übertragen werden. Die stimulierten B-Lymphozyten sollten für die Fusion mit Myelomzellen zur Herstellung von Hybridomzelllinien eingesetzt werden. Schließlich sollten monoklonale Antigen-spezifische Antikörper aus dem Kulturüberstand gereinigt und hinsichtlich Spezifität und Funktionalität charakterisiert werden.

3 Material & Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchstiere

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden Mäuse der Inzuchtstämme C57Bl/6j und NMRI verwendet. Alle am Tier vorgenommenen Arbeiten wurden durch qualifiziertes Personal durchgeführt und entsprachen den gesetzlichen Richtlinien des Landesamts für Arbeitsschutz, Verbraucherschutz und Gesundheit des Landes Brandenburg.

3.1.2 Zelllinien

GP2-293	Takara Bio USA, Inc., Mountain View, USA
NIH/3T3	DSMZ, Braunschweig
OP9	ATCC, Manassas, USA
Sp2/0-Ag14	Professur für Immuntechnologie, Potsdam

3.1.3 Plastik- und Einwegmaterialien

So weit nicht anders aufgeführt, waren die verwendeten Plastik- und Einwegmaterialien Standardartikel bezogen von den Firmen Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Greiner Bio-One International GmbH (Essen), Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht) oder TPP AG (Trasadingen, Schweiz).

GenePulser Cuvette	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nunc™ Thermanox™ Plastic Coverslip	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.4 Zellkulturmedien und Seren

DMEM	Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI 1640	Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Neonatales Kälberserum (NKS)	Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.5 Chemikalien und Biochemikalien

Alle nicht im Folgenden aufgeführten Chemikalien und Biochemikalien wurden in analysereiner Qualität von den Unternehmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck Chemikalien GmbH (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
BODIPY™ 558/568 Phalloidin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE)	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Coomassie Brilliant Blue R-250	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Merck Chemikalien GmbH, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
5x DNA Loading Buffer Blue	Meridian Bioscience, Cincinnati, USA
Epredia™ Shandon™ Immu-Mount™	Fisher Scientific U.K. Ltd, Loughborough, Vereinigtes Königreich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Flt3-Ligand (Flt3-L)	PeproTech, Inc., Rocky Hill, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HyperLadder™ 1 kb	Meridian Bioscience, Cincinnati, USA
Interferon γ (IFN γ)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Interleukine (IL) 3, 4, 6, 7, 21	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Lipopolysaccharid (LPS)	Merck Chemikalien GmbH, Darmstadt
Polyethylenglycol 8000 (PEG8000)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PoPro-1 Iodid	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ProSep®-vA Ultra Chromatography Media	Merck Chemikalien GmbH, Darmstadt
Puromycin	Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Retronectin®	Takara Bio USA, Inc., Mountain View, USA
ROTI®Block, 10x	Carl Roth, Karlsruhe
ROTI®Load 1, 4x	Carl Roth, Karlsruhe
Stammzellfaktor (SCF)	PeproTech, Inc., Rocky Hill, USA
Tetramethylbenzidin (TMB)	Carl Roth, Karlsruhe
Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
VP1	Professur für Immuntechnologie, Potsdam

3.1.6 Kommerzielle Reinigungs-, Klonierungs- und Testsysteme

B cell isolation kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
In-Fusion® HD Cloning Kit	Takara Bio USA, Inc., Mountain View, USA
NucleoSpin® DNA RapidLyse	MACHEREY-NAGEL, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL, Düren
NucleoSpin® Plasmid EasyPure	MACHEREY-NAGEL, Düren
NucleoSpin® RNA Virus	MACHEREY-NAGEL, Düren
Retro-X™ qRT-PCR Titration Kit	Takara Bio USA, Inc., Mountain View, USA
Retro-X™ Tet-One™ Inducible Expression System	Takara Bio USA, Inc., Mountain View, USA

3.1.7 Antikörper und Proteinkonjugate

Tab. 3.1: Antikörper und Proteinkonjugate.

Antikörper/Proteinkonjugat	Konjugat	Hersteller
Anti-Biotin	Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Kaninchen-Anti-BclxL	-	Abcam PLC, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Kaninchen-Anti-cMYC	-	Abcam PLC, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Maus-Anti- β -Aktin	-	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Maus-Anti-Bcl2	-	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Maus-Anti-Legionellen	-	Abcam PLC, Cambridge, Vereinigtes Königsreich
P157 (Maus-Anti-VP1)	-	Professur für Immuntechnologie, Potsdam
Ratte-Anti-Maus-CD127	FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Ratte-Anti-Maus-CD40	-	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Schwein-Anti-Kaninchen-Ig	POD	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
SAV	PE	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
SAV	POD	Merck Chemikalien GmbH, Darmstadt
Ziege-Anti-Maus-IgG	PE	Abcam PLC, Cambridge, Vereinigtes Königsreich
Ziege-Anti-Maus-IgG1	Biotin	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Ely, Vereinigtes Königreich
Ziege-Anti-Maus-IgG2a	Biotin	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Ely, Vereinigtes Königreich
Ziege-Anti-Maus-IgG2b	Biotin	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Ely, Vereinigtes Königreich
Ziege-Anti-Maus-IgG3	Biotin	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Ely, Vereinigtes Königreich
Ziege-Anti-Maus-IgG/M	POD	Dianova GmbH, Hamburg

3.1.8 Bakterienstämme und Vektoren

Tab. 3.2: Bakterienstämme und Vektoren.

Bakterienstamm/Vektor	Resistenz	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> HST08 (Stellar™)	-	Takara Bio USA, Inc., Mountain View, USA
<i>Legionella pneumophila</i> (Hitze-inaktiviert)	-	Sifin diagnostics GmbH, Berlin
pBM272-Bcl-XL	Ampicillin	Addgene, Watertown, USA
pEco	Ampicillin	Takara Bio USA, Inc., Mountain View, USA
pEGFP-N3	Kanamycin	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pJet 1.2	Ampicillin	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
pPEP-TEV-cNUP98	Ampicillin	Addgene, Watertown, USA
pRetroX-TetOne-Puro	Ampicillin	Takara Bio USA, Inc., Mountain View, USA
pSFFV-neo-Bcl-2	Ampicillin	Addgene, Watertown, USA
pSG5-HOXB4	Ampicillin	Addgene, Watertown, USA
TetO-FUW-cMYC	Ampicillin	Addgene, Watertown, USA

3.1.9 Enzyme

Alle eingesetzten Enzyme und die entsprechenden Reaktionspuffer wurden von New England Biolabs (Ipswich, USA) oder Takara Bio USA, Inc. (Mountain View, USA) bezogen.

3.1.10 Gerätschaften

BD FACSAria III	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Chromatographiesystem BioLogic LP	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektroporator EPI 2500	Fischer, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop BZ-X800	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Molecular Imager® Gel Doc™ XR	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multiskan FC Microplate Reader	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

3.1.11 Software

BD FACSDiva™	Becton Dickinson, Heidelberg
FlowJo™ v10.6.2	FlowJo LLC, Ashland, USA
Image Lab Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
LP Data View Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SnapGene® Viewer 5.2.5.1	GSL Biotech LLC, Chicago, USA

Tab. 3.3: Zellkulturmedien.

Medium	Zusammensetzung
Vollmedium	RPMI 1640 10 % FKS 2 mM Glutamin 50 µM β-Mercaptoethanol
Einfriermedium	65 % RPMI 1640 20 % FKS 15 % DMSO
DMEM-Vollmedium	DMEM 20 % FKS 2 mM Glutamin 50 µM β-Mercaptoethanol
HAT-Medium	Vollmedium 5,8 µM Azaserin 100 µM Hypoxanthin 16 mM 2-Deoxythymidin

3.2 Isolation und Kultivierung von Säugerzellen

3.2.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Säugerzellen

Die standardmäßige Kultivierung von Säugerzellen erfolgte in Vollmedium (Tab. 3.3) bei 37 °C, unter 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 96 % im Brutschrank. Zur Bestimmung von Zellzahlen wurden 10 µl der Zellsuspension zu gleichen Teilen mit Trypanblau versetzt und in einer Neubauer Zählkammer bei lichtmikroskopischer Betrachtung gezählt.

Zur Kryokonservierung wurden Zellen nach Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C für 10 min in 0,5 ml Vollmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit 0,5 ml Einfriermedium (Tab 3.3) versetzt und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wurde in einer Einfrierbox für 24 h bei -80 °C gelagert und schließlich für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Für die Revitalisierung wurden die Zellen durch Zugabe von 37 °C warmem Vollmedium aufgetaut und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C für 10 min wurde das Zellpellet in Vollmedium resuspendiert und in einem entsprechenden Zellkulturgefäß ausgesät.

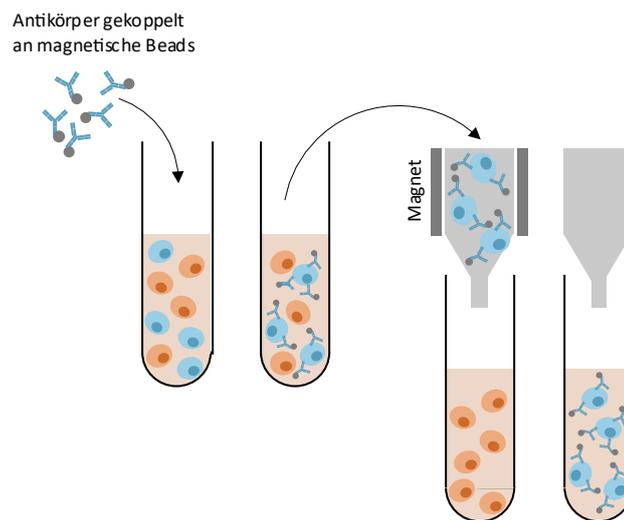


Abb. 3.1: Magnetische Zellsortierung. Magnetische Beads werden über spezifische Antikörper an Zellen gekoppelt. Die Zellsuspension wird in einem Magnetfeld auf eine ferromagnetische Matrix gegeben. Bead-markierte Zellen verbleiben in der Säule, während unmarkierte Zellen hindurch wandern. Wird das Magnetfeld entfernt, können unmarkierte Zellen eluiert werden.

3.2.2 Reinigung und Kultivierung muriner Milz-B-Lymphozyten

Milzen wurden aus naiven 2 bis 6 Monate alten C57Bl/6j-Mäusen entnommen. Die Milzen wurden durch ein 40 µm-Zellsieb gestrichen und in *Magnetic Cell Separation* (MACS)-Puffer (Tab. 3.4) aufgefangen. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt und die Zellzahl bestimmt. Die B-Lymphozyten wurden durch magnetische Zellseparation mit Hilfe einer negativen Antikörperselektion aus der heterogenen Milzzellsuspension isoliert (Abb. 3.1). Dazu wurden Zellen, in diesem Fall alle außer den B-Lymphozyten, mit magnetischen Beads markiert und über eine ferromagnetische Matrix (LS Column) im Magnetfeld separiert. Die Bead-gebundenen Zellen wurden in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten B-

Lymphozyten die Säule passieren konnten. Hierzu wurde das B Cell Isolation Kit (mouse) von Miltenyi Biotec verwendet. Die Anwendung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die B-Lymphozyten wurden in MACS-Puffer aufgefangen und anschließend bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die gereinigten Zellen wurden in Vollmedium resuspendiert und in 24-Well-Platten mit 10⁶ Zellen in 1 ml pro Well bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Tab. 3.4: Zellkulturpuffer.

Puffer	Zusammensetzung
MACS-Puffer (pH 7,4)	10 g BSA 1,17 g EDTA 100 ml 20x PBS ad 2 L A. dest.
FACS-Puffer	10 g BSA 2 ml NaN ₃ (10 %) 100 ml 20x PBS ad 2 L A. dest.
BSS-Puffer (pH 7,4)	125 mM NaCl 5 mM KCl 4 mM CaCl ₂ 2,5 mM MgCl ₂ 5 mM Tris/HCl

3.2.3 *In vitro* Immunisierung muriner B-Lymphozyten

Zur Etablierung der *In vitro* Immunisierung wurde VP1 als Modellantigen eingesetzt. VP1 ist ein Kapsidprotein des Hamster-Polyomavirus (Gedvilaite et al., 2000), bei dem bestimmte Oberflächenstrukturen durch rekombinante Expression verändert werden können, ohne seine Assemblierung zu stören. So kann VP1 als Trägermolekül fungieren, das beispielsweise die Peptidsequenz eines anderen Proteins an seiner Oberfläche exponiert.

Für die *In vitro* Immunisierung wurden 10⁶ naive Maus-B-Lymphozyten je Well auf einer 24 Well-Platte in 1 ml Vollmedium mit VP1 (10 µg/ml) bzw. Hitze-inaktivierten *L. pneumophila* (5 x 10⁴ bis 5 x 10⁶/ml) ausgesät. Verschiedene Kombinationen von Stimuli wurden zu den Zellen gegeben: 2 µg/ml Ratte-anti-Maus-CD40-Antikörper, 10 ng/ml IL 6,

5 ng/ml IL 7, 10 ng/ml IL 21, 10 ng/ml IFN γ (alle murin und rekombinant) und/oder 1 μ g/ml LPS. Kontrollansätze wurden unbehandelt kultiviert. Für den Nachweis einer spezifischen Antikörperproduktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Zellkulturüberstand entnommen. Am fünften Tag der Kultur wurde das verbliebene Kulturmedium je Well auf 500 μ l reduziert. Für die Restimulation wurde den Zellen 1 ml/Well Vollmedium mit VP1 bzw. *L. pneumophila* und den entsprechenden Stimuli hinzugegeben. Außerdem wurde 10 ng/ml rekombinantes, murines IL 4 zu einigen Ansätzen gegeben. Am zehnten Tag der Kultur wurden die Zellen für die Fusion mit Myelomzellen oder für finale Analysen geerntet.

3.2.4 Herstellung von Feederzellen

Während der HAT-Selektion und Reklonierung werden murine Hybridomzellen mit Feederzellen co-kultiviert. Als Feederzellen wurden peritoneale Makrophagen eingesetzt, die durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren und ihre phagozytotische Aktivität Wachstum und Proliferation der frisch fusionierten Zellen begünstigen. Für die Herstellung von Feederzellen wurden NMRI-Mäuse verwendet. Den getöteten Mäusen wurde unter sterilen Bedingungen das Bauchfell aufgeschnitten. Die Bauchdecke wurde mit 70 %igen Ethanol gespült. Mit einer Spritze wurden 5 ml RPMI-Medium in das Abdomen injiziert. Nach vorsichtiger Massage der Bauchdecke wurde das Medium, das nun die Feederzellen enthielt, mit der Spritze abgesaugt und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Der Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die erhaltene Feederzellsuspension wurde mit Vollmedium auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt. Es wurden 9,6 ml der Zellsuspension pro Well-Platte ausgesät, d. h. 100 μ l pro Well auf einer 96-Well-Platte, 400 μ l pro Well auf einer 24-Well-Platte usw. Die Platten wurden vor der Verwendung in Co-Kulturen mindestens 24 h bzw. höchstens 72 h bei 37 °C und 5 % CO $_2$ im Brutschrank kultiviert.

3.2.5 Generierung von Hybridomzellen durch elektrochemische Fusion

3.2.5.1 Elektrochemische Fusion muriner B-Lymphozyten

Zur Generierung von Hybridomzellen wurden die *in vitro* stimulierten Maus-B-Lymphozyten mit Myelomzellen der Linie Sp2/0-Ag14 fusioniert (Holzlöhner & Hanack, 2017; Shulman et al., 1978) (Abb. 1.3). Die B-Lymphozyten aus den unterschiedlichen Stimulationsansätzen wurden separat geerntet, gewaschen und fusioniert. Myelomzellen und stimulierte B-Lymphozyten wurden geerntet, in 10 ml bzw. 3 ml *Balanced Salt Solution* (BSS) (Tab. 3.4) resuspendiert und bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach

Wiederholung des Waschschrattes wurden die Zellen gezählt und vereint, sodass das Verhältnis von Myelomzellen zu B-Lymphozyten 1,5 : 1 betrug. Die gemischte Zellsuspension wurde erneut in BSS gewaschen und schließlich in 100 µl BSS resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl PEG8000 wurde die Suspension in eine Elektroporationsküvette mit einem Durchmesser von 2 mm transferiert. Die Küvette wurde am Elektroporator einem Gleichspannungsimpuls von 650 V und 25 ms ausgesetzt. Der Fusionsansatz verblieb für 3 min bei Raumtemperatur (RT) in der Küvette und wurde schließlich vorsichtig entnommen, um dann tropfenweise in einen Erlenmeyerkolben mit 2 ml HAT-Medium (Tab. 3.3) überführt zu werden. Die Erlenmeyerkolben wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank inkubiert.

3.2.5.2 HAT-Selektion von murinen Hybridomzellen

Für die HAT-Selektion (Szybalski, 1992) wurden die fusionierten Zellen mit 100 µl je Well auf einer 96-Well-Platte mit Feederzellen ausgesät. Nach der Aussaat wurden die Konzentrationen von Hypoxanthin (100 µM), Azaserin (5,8 µM) und Desoxythymidin (16 µM) im Kulturmedium entsprechend eingestellt. Die Zellen wurden für eine Woche bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Nach 7 Tagen wurden die fusionierten Zellen mikroskopisch auf Wachstum und Monoklonalität untersucht. Das Medium wurde gewechselt und durch frisches HAT-Medium ersetzt. Nach weiteren 7 Tagen, d. h. insgesamt 14 Tagen HAT-Selektion, wurden die Kulturüberstände im ELISA auf Antigen-spezifische Antikörper getestet. Zellen, deren Kulturüberstände im ELISA positive Signale lieferten, wurden bei monoklonalem Wachstum auf ein größeres Well-Format erweitert (z. B. 24-Well-Platten) bzw. bei polyklonalem Wachstum verdünnt ausgesät (*Limited Dilution*, Freshney u.a. 2016) bis Monoklone kultiviert werden konnten. Die Kultur erfolgte in Vollmedium auf Feederzellen. Erzielten die Kulturüberstände der monoklonalen Hybridomzellen weiterhin positive Signale im ELISA, wurden die Kulturüberstände zur Antikörper-Gewinnung gesammelt.

3.2.6 Reinigung und Kultivierung von Knochenmarkszellen

Naiven 6 bis 8 Wochen alten C57Bl/6j-Mäusen wurden Femur, Tibia und Pelvis entnommen. Die Knochen wurden von anhaftendem Gewebe befreit und in 25 ml *Phosphate Buffered Saline* (PBS) mit 2 % FKS in einem sterilen Mörser zerstoßen. Durch Auf- und Abpipettieren der entstandenen Suspension wurden Knochenmarkszellen gelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde schließlich über ein Zellsieb von verbliebenen

Knochenfragmenten befreit. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, zwei Mal mit MACS-Puffer gewaschen und schließlich in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert.

Aus der Zellsuspension wurden mittels magnetischer Sortierung ausgereifte Zellen mit spezifischen Markern entfernt, sodass eine Zellpopulation unreifer Vorläuferzellen (*Lineage Negative* = LIN⁻) verblieb. Dazu wurde die Suspension der Knochenmarkszellen mit den in Tab. 3.5 aufgeführten Antikörpern in entsprechender Konzentration für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Anti-Biotin-Microbeads mit der Suspension gemischt und wie zuvor inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml MACS-Puffer wurde die Zellsuspension bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert und wie zuvor beschrieben magnetisch sortiert. Die Sortierung erfolgte nacheinander über zwei Säulen. Die LIN⁻-Zellen wurden in MACS-Puffer aufgefangen und anschließend bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die gereinigten Zellen wurden in Vollmedium mit 6 ng/ml IL 3, 10 ng/ml IL 6, 5 ng/ml IL 7, 25 ng/ml Flt3-L und 50 ng/ml SCF resuspendiert und in einer Zellkulturflasche mit 10⁶ Zellen/ml unter Standardbedingungen kultiviert.

Tab. 3.5: Antikörper zur Sortierung LIN⁻-Zellen.

Antikörper	Konjugat	Arbeits- konzentration	Hersteller
Anti-Maus-B220	Biotin	10 µg/ml	BioLegend, San Diego, USA
Anti-Maus-CD3	Biotin	10 µg/ml	BioLegend, San Diego, USA
Anti-Maus-CD11b	Biotin	10 µg/ml	BioLegend, San Diego, USA
Anti-Maus-Gr-1	Biotin	10 µg/ml	BioLegend, San Diego, USA
Anti-Maus-TER-119	Biotin	10 µg/ml	BioLegend, San Diego, USA

3.2.7 Co-Kultur mit OP9-Zellen

Die OP9-Zelllinie entstammt murinen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark. Sie können *in vitro* dazu genutzt werden, die natürliche Umgebung im Knochenmark nachzuahmen (Nakano et al., 1994). LIN⁻-Zellen wurden deshalb mit OP9-Zellen co-kultiviert. Dazu wurden OP9-Zellen in DMEM-Vollmedium (Tab. 3.3) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert. Die Zellen wurden am Molecular Imager® Gel Doc™

XR für 90 s mit ultraviolettem (UV)-Licht bestrahlt. Nach 24 h wurde das Medium entfernt. Die LIN⁻-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml in Vollmedium mit 6 ng/ml IL 3, 10 ng/ml IL 6, 5 ng/ml IL 7, 25 ng/ml Flt3-L und 50 ng/ml SCF auf den OP9-Zellen ausgesät und nach 7 Tagen auf frische, bestrahlte OP9-Zellen transferiert.

3.3 Charakterisierung von Säugerzellen

3.3.1 Proliferationsassay

Nach erfolgter Aufreinigung wurden die Zellen nach dem Protokoll von Quah et al. (2007) mit CFSE gefärbt. CFSE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der kovalent vor allem an intrazelluläre Lysine bindet. Bei der Zellteilung wird der Farbstoff zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, sodass anhand des abnehmenden Fluoreszenzsignals die Zahl der Zellteilungen nachvollzogen werden kann.

Die Zellen ($\leq 50 \times 10^6$) wurden zunächst in 1 ml PBS mit 5 % FKS resuspendiert. CFSE wurde in einer finalen Konzentration von 1,25 μM zur Zellsuspension gegeben, welche sofort gemischt wurde. Die Suspension wurde für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit 10 ml PBS/5 % FKS gewaschen und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Die in Vollmedium resuspendierten Zellen wurden schließlich ausgesät, gegebenenfalls stimuliert und unter Standardbedingungen kultiviert. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die CFSE-gefärbten Zellen für 10 min mit 1 μM PoPro-1 Iodid bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, um die Unterscheidung lebender von toten Zellen zu ermöglichen. Die Analyse wurde am Attune Flow Cytometer durchgeführt und mit FlowJo™ v10.6.2 ausgewertet.

3.3.2 Färbung von Oberflächenmarkern und Durchflusszytometrie

Die verwendeten Zellen wurden anhand der charakteristischen Oberflächenmarker durchflusszytometrisch analysiert. Nach der Isolation bzw. Zellernte wurden 10^5 Zellen in 500 μl *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)-Puffer (Tab. 3.4) aufgenommen und für 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschschritts wurden die Zellen in 300 μl FACS-Puffer mit entsprechender Kombination von Antikörpern (Tab. 3.6) resuspendiert und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Gegebenenfalls wurden die Zellen erneut gewaschen, in 300 μl FACS-Puffer mit Sekundärantikörper bzw. -farbstoff aufgenommen und wie zuvor inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie

zuvor gewaschen und in 300 µl 1 µM PoPro-1-Iodid in FACS-Puffer resuspendiert, um tote von lebenden Zellen differenzieren zu können. Nach zehnminütiger Inkubation bei 4 °C und im Dunkeln wurde die Zellsuspension am BD FACSAria III analysiert. Zur Auswertung der Daten wurde FlowJo™ v10.6.2 verwendet.

Tab. 3.6: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse muriner Milzzellen.

Antikörper	Konjugat	Arbeits- konzentration	Hersteller
Anti-CD4	PE	20 µg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Anti-CD11c	PE	1,5 µg/ml	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Anti-CD19	FITC	50 µg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-CD21/35	PerCP-Cy5.5	20 µg/ml	BioLegend, San Diego, USA
Anti-CD23	APC	20 µg/ml	BioLegend, San Diego, USA
Anti-CD69	PE	20 µg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Anti-CD80	PE	1,5 µg/ml	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Anti-CD86	FITC	1,5 µg/ml	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Anti-CD127	PE-Vio® 770	1,5 µg/ml	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Anti-CD138	PE	1,5 µg/ml	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Anti-IgD	Biotin	50 µg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-IgG	PE	50 µg/ml	Abcam PLC, Cambridge, Vereinigtes Königsreich
Anti-IgM	PE	20 µg/ml	BioLegend, San Diego, USA

3.3.3 Fluoreszenzfärbung und Immunhistochemie

Zur Fluoreszenzfärbung wurden Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern kultiviert. Je ein Deckglas wurde zwei Mal in 70 %igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in einem Well einer 6 Well-Platte platziert. Das Well wurde zwei Mal mit 2 ml sterilem PBS gespült und anschließend mit 2 ml 50 µg/ml Poly-L-Lysin in PBS befüllt. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde das Well erneut mit 2 ml PBS gespült und über Nacht zur Trocknung bei RT gelagert. OP9- und LIN⁻-Zellen wurden darauf wie in 3.2.7 beschrieben ausgesät und co-kultiviert.

Vor der Fixierung wurden die co-kultivierten Zellen auf der Zellkulturplatte für 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert und der Kulturüberstand entnommen. Zur Fixierung wurde je Deckglas 1 ml 4 % Paraformaldehyd in PBS in das Well gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Das Well wurde zwei Mal vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei RT mit 2 ml 1 % Bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS geblockt.

Zur Färbung von Aktin wurden je Deckglas 2,5 µl BODIPY™ Phalloidin in 100 µl 1 % BSA/PBS verdünnt. Die Lösung wurde vorsichtig auf das Deckglas pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Deckglas wurde im Well mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl einer 300 µM DAPI-Lösung in PBS auf das Deckglas gegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Deckglas wurde mit 1 ml PBS und 1 ml A. dest. gewaschen. Schließlich wurden 200 µl eines Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Anti-Maus-IL 7-Rezeptor (IL 7-R)-Antikörpers (1,5 µg/ml) auf das Deckglas pipettiert und bei RT für 30 min inkubiert. Nach wiederholtem Waschschrift wurde das Deckglas mit einer Pinzette aus der Zellkulturplatte entnommen und mit Immu-Mount™ auf einem Objektträger fixiert. Die Objektträger wurden über Nacht und im Dunkeln bei RT getrocknet und anschließend am Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

3.4 Reinigung und Charakterisierung von Antikörpern

3.4.1 Nachweis und Charakterisierung spezifischer Antikörper im ELISA

Im Verlauf der *In vitro* Immunisierung wurden Kulturüberstände von stimulierten und unstimulierten B-Lymphozyten im ELISA auf spezifische Antikörper untersucht. Ebenso wurden Kulturüberstände von Hybridomzellen und gereinigte monoklonale Antikörper im ELISA charakterisiert. Dazu wurden 96-Well-Platten mit 50 µl/Well einer Antigen-Lösung in PBS (5 µg/ml) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die

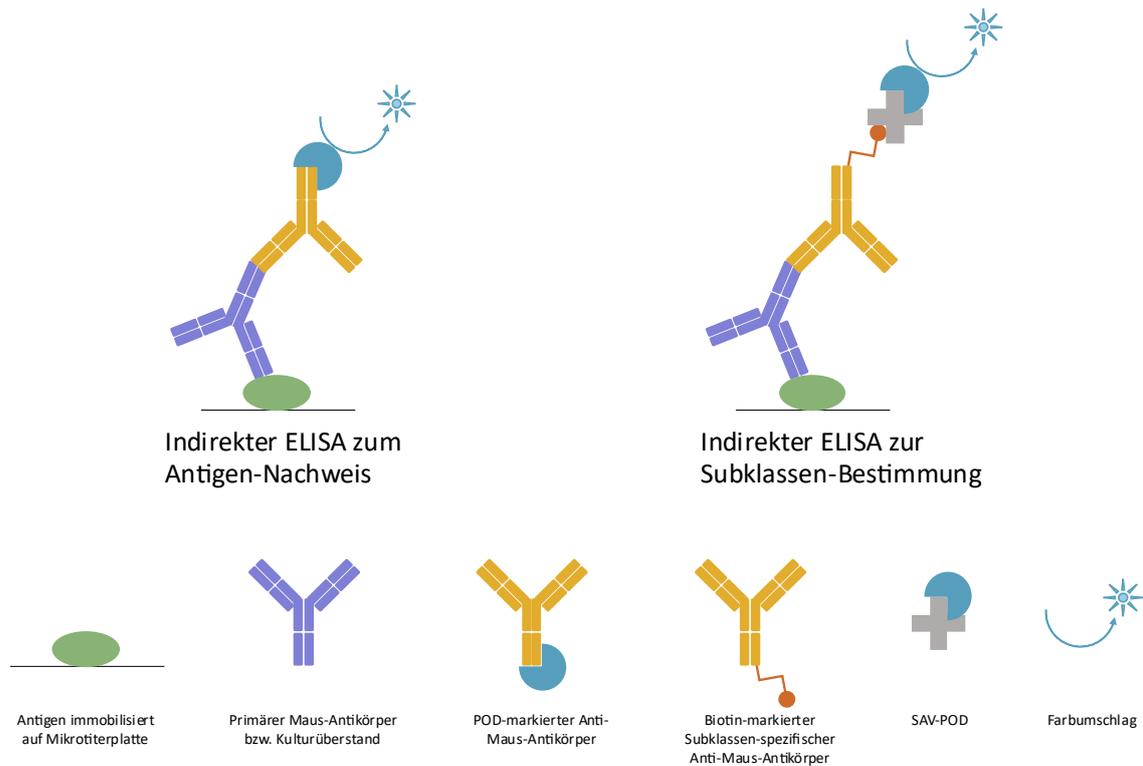


Abb. 3.2: Nachweis und Charakterisierung spezifischer Antikörper im ELISA. A: Antigen-bindende Antikörper werden mit POD-markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen. B: Die Bestimmung der Antikörper-Subklasse erfolgt durch spezifische, Biotin-markierte Sekundärantikörper und den Nachweis mit SAV-POD.

Platte 6 x mit Wasser gewaschen. Um unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wurden die Wells für 1 h bei RT mit 100 μ l/Well PBS/5 % NKS geblockt. Anschließend wurden 50 μ l/Well Kulturüberstand oder Antikörper-Verdünnung aufgetragen und für 45 min bei RT inkubiert. Der Nachweis der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte mit einem Peroxidase (POD)- oder Biotin-markierten Sekundär-Antikörper (Abb. 3.1). Es wurden 50 μ l/Well Nachweisantikörper aufgetragen und für 45 min bei RT inkubiert. Biotin-markierte Antikörper wurden anschließend mit 50 μ l/Well Streptavidin (SAV)-POD für 45 min bei RT inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit Wasser wurden schließlich 50 μ l/Well Substratlösung (0,12 mg/ml TMB in 50 mM Natriumdihydrogenphosphat mit 0,04 % Carbamidperoxid) zugegeben. Die Reaktion wurde mit 50 μ l/Well 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Optische Dichte (OD) wurde bei 450 nm und 620 nm als Referenzwellenlänge am Multiskan FC Microplate Reader gemessen.

3.4.2 Affinitätschromatographische Reinigung von IgG-Antikörpern

Protein A bindet in Abhängigkeit vom vorliegenden pH-Wert den Fc-Teil muriner IgG-Antikörper. Diese Affinität wird zur chromatographischen Reinigung der Antikörper aus dem Zellkulturüberstand genutzt. Dabei wird eine Protein A-Säule mit Kulturüberstand bei einem pH-Wert von 8 beladen, sodass die Antikörper an die Säule binden, während die übrigen Bestandteile des Kulturüberstands hindurchlaufen. Die Immunglobuline können anschließend durch Senken des pH-Wertes eluiert werden.

Tab. 3.7: Puffer zur affinitätschromatographischen Reinigung von Antikörpern über Protein A.

Puffer	Zusammensetzung
Beladungspuffer (pH 8,5)	4 M NaCl, 2 M Glycin in H ₂ O
Waschpuffer (pH 8,5)	Beladungspuffer 1 : 3 in H ₂ O
Elutionspuffer I (pH 5,0)	0,1 M Citrat, HCl in H ₂ O
Elutionspuffer II (pH 3,5)	0,1 M Citrat, HCl in H ₂ O
Reinigungspuffer (pH 2,0)	0,1 M Citrat, HCl in H ₂ O
Aufbewahrungspuffer (pH 5,2)	0,1 M CH ₃ COOH 1 % Benzylalkohol 0,01 % NaN ₃ in H ₂ O
Neutralisationspuffer (pH 9,1)	3,5 M Tris/HCl

Aus der Kultur monoklonaler Hybridome wurden mindestens 500 ml Kulturüberstand für eine Reinigung gesammelt. Der Kulturüberstand wurde zunächst bei 13.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und anschließend über einen Nitrocellulose-Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Der filtrierte Kulturüberstand wurde im Verhältnis von 1 : 3 mit Beladungspuffer dotiert. Nachdem die Protein A-Säule mit 15 ml Waschpuffer äquilibriert wurde, fand die Beladung mit Kulturüberstand durch Gravitationskraft über Nacht bei 4 °C statt.

Die beladene Protein A-Säule wurde an die Chromatographie-basierte Reinigungsanlage für Antikörper bestehend aus Peristaltikpumpe mit angegliedertem Leitfähigkeits- und UV/Vis-Detektor angeschlossen. Die Säule wurde zunächst mit Waschpuffer gespült, um unspezifisch gebundene Proteine und das im Nährmedium enthaltene Phenolrot zu

entfernen. Im Anschluss wurden die gebundenen Antikörper mit einem Durchsatz von 1 ml/min mit Elutionspuffer I (pH 5,0) und Elutionspuffer II (pH 3,5) eluiert. Die Fraktionen wurden separat in 15 ml Röhrchen mit 0,5 ml Neutralisationspuffer aufgefangen. Die Säule wurde abschließend nacheinander mit 10 ml Reinigungspuffer, 15 ml Waschpuffer und 15 ml Aufbewahrungspuffer gespült. Versetzt mit Aufbewahrungspuffer wurde die Säule bei 4 °C gelagert. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tab. 3.7 aufgeführt.

Tab. 3.8: Gele der SDS-PAGE.

Gel	Zusammensetzung
Trenngel (12,5 %)	1,5 ml Trenngelpuffer 4x 1,94 ml H ₂ O 2,5 ml Acrylamid 60 µl APS
Sammelgel (4 %)	0,5 ml Sammelgelpuffer 4x 1,22 ml H ₂ O 0,265 ml Acrylamid 10 µl APS

3.4.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE und Coomassiefärbung von Proteinen

Diskontinuierliche SDS-PAGE

In der diskontinuierlichen SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) werden Proteine anhand ihres Molekulargewichts in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine können durch eine Färbung sichtbar gemacht oder in anschließenden Verfahren, wie dem Western Blot, charakterisiert werden. Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Ulrich Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Zunächst wurde ein 12,5 %iges Trenngel (Tab. 3.8) zwischen zwei Glasplatten einer Gelapparatur (8,5 cm x 8,2 cm x 0,1 cm) gegossen. Das Trenngel wurde mit n-Butanol überschichtet und zur Polymerisation bei RT ruhen gelassen. Anschließend wurde das n-Butanol durch mehrmaliges Spülen mit *Aqua destillata* (A. dest.) entfernt. Ein 4 %iges Sammelgel wurde obenauf gegossen (Tab. 3.8) und ein Probenkamm in das noch flüssige Gel eingesetzt.

Tab. 3.9: Puffer und Lösungen für SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Western Blot.

Puffer	Zusammensetzung
Trenngelpuffer 4x (pH 8,8)	1,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS 0,4 % TEMED
Sammelgelpuffer 4x (pH 6,8)	0,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS 0,4 % TEMED
Laufpuffer 10x (pH 8,3)	0,25 M Tris/HCl 1,92 M Glycin 1 % SDS
Coomassiefärbelösung	20 % Methanol 60 % Wasser 20 % Coomassie Brilliant Blue R-250
TBS 10x (pH 7,6)	0,5 M Tris 1,5 M NaCl ad 1 L A. dest.
Substratlösung	100 µl Diaminobenzidin (40 mg/ml in H ₂ O) 500 µl Tris (1 M, pH 7,5) 25 µl NiCl (80 mg/ml in H ₂ O) 1 µl H ₂ O ₂ 4,5 ml H ₂ O

Nach Polymerisation bei RT wurde das kombinierte SDS-Polyacrylamidgel in eine Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (Tab. 3.9) überführt und der Kamm vorsichtig entfernt. Von den zu untersuchenden Protein-Proben wurden 20 µl mit einer Konzentration von 350 bis 500 µg/ml in PBS hergestellt, mit 4x reduzierendem Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Für Zelllysate wurden 5 x 10⁶ Zellen in 1 ml mit Probenpuffer versetztem PBS durch Ultraschall mit einer Amplitude von 75 % aufgeschlossen und anschließend für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben und ein Proteinstandard wurden in die Geltaschen überführt. Die SDS-PAGE wurde bei 120 V und 40 mA durchgeführt.

3.4.4 Western Blot und spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern

Beim Western Blot nach Renart (Renart et al., 1979) werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Trägermembran übertragen und anschließend spezifisch mit Antikörpern nachgewiesen. Für das angewandte *Semi Dry*-Verfahren wurde eine Nitrocellulose-Membran auf das SDS-Polyacrylamidgel gelegt und von beiden Seiten ein Transferpuffer-getränktes Filterpapier aufgelegt. Der so entstandene Stapel wurde mit der Membran zur Anode in eine Blot-Kassette überführt. Der Western Blot erfolgte bei 1,3 A und 25 V für 7 min.

Die auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisierten Proteine wurden mit spezifischen Primär-Antikörpern und entsprechenden Sekundäantikörpern markiert und nachgewiesen. Zunächst wurden freie Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation mit dem Blockmittel ROTI®Block für 1 h gesättigt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT auf einem Orbitalschüttler. Die Membran wurde im Anschluss 3 x in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-gepufferter Salzlösung (TBS) mit 0,05 % Tween (Tab. 3.9) und 1 x in A. dest. gewaschen. Die entsprechenden Primär-Antikörper (Tab 3.1) wurden nach den Herstellerangaben in Blockmittel verdünnt auf die Membran aufgetragen und für 1 h inkubiert. Der Waschschrift wurde wie zuvor wiederholt. Der POD-markierte Sekundäantikörper wurde ebenfalls im Blockmittel verdünnt und für 1 h auf der Membran inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte der Nachweis gebundener Antikörper durch Zugabe der Clarity™ ECL-Substratlösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser gestoppt und am Molecular Imager® Gel Doc™ XR dokumentiert.

3.5 Durchflusszytometrie von *L. pneumophila*

Für jeden zu untersuchenden Ansatz wurden 2×10^6 Hitze-inaktivierte *L. pneumophila* in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und bei 6.000 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl des zu untersuchenden Kulturüberstands resuspendiert und für 45 min inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend wie zuvor in 500 µl FACS-Puffer gewaschen. Die pelletierten Bakterien wurden in 100 µl FACS-Puffer mit 5 µg/ml PE-markiertem Anti-Maus-IgG-Antikörper resuspendiert und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach einem finalen Waschschrift erfolgte die Analyse der Bakterien am Attune Flow Cytometer. Zur Auswertung der Daten wurde FlowJo™ v10.6.2 verwendet.

3.6 Herstellung von Plasmidkonstrukten zur Generierung permanenter Zelllinien

3.6.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterienzellen

Bakterienzellen wurden in *Lysogeny Broth* (LB)-Nährmedium (Bertani, 1951) oder auf LB-Agarplatten kultiviert (Tab. 3.10). Je nach verwendetem Bakterienstamm und Plasmid wurden Medium oder Agar mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Flüssigkulturen wurden bei 37 °C und 150 – 300 rpm im Schüttelinkubator gehalten, Agarplatten bei 37 °C im Inkubator. Zur Kryokonservierung wurden 500 µl einer Bakteriensuspension in einem Kryoröhrchen mit 500 µl 40 %iger Glycerollösung versetzt und bei -80 °C eingefroren.

Tab. 3.10: Mikrobiologische Kulturmedien.

Medium	Zusammensetzung
LB-Nährmedium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 L A. dest.
LB-Agarplatten	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar ad 1 L A. dest.

3.6.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch chemische Behandlung kann die als Kompetenz bezeichnete Bereitschaft zur Aufnahme freier DNA von *E. coli*-Zellen erhöht werden. Nach dem modifizierten Protokoll von Janni re (1985) wurden 10 ml LB-Nährmedium mit *E. coli*-Zellen des Stammes HST08 (StellarTM) angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 50 ml LB-Nährmedium mit 1 ml der Übernachtkultur versetzt und bis zu einer OD_{600 nm} von 0,6 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die auf 4 °C abgekühlte Bakteriensuspension wurde für 15 min bei 3.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden in eiskalter

100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml einer 100 mM CaCl₂-Lösung mit 10 % Glycerol aufgenommen und aufgeteilt in 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Tab. 3.11: Q5®-PCR-Reaktionsansatz.

Komponenten	Volumen
Q5 Reaktionspuffer 5x	5 µl
dNTP (10 µM)	0,5 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	1,25 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	1,25 µl
DNA (1 µg/µl)	1 µl
Q5 DNA Polymerase	0,25 µl
H ₂ O	ad 25 µl

3.6.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die von Mullis (Saiki et al., 1985) entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt die exponentielle Vervielfältigung doppelsträngiger DNA (dsDNA) *in vitro*. Unter Verwendung Sequenz-spezifischer Oligo-Nukleotide und einer DNA-Polymerase können gezielt Gene oder Genfragmente amplifiziert und schließlich kloniert werden. Mit der hier eingesetzten Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase entstehen dabei dsDNA-Replikat mit glatten Enden, das heißt ohne überhängende DNA-Stränge.

Genomische DNA wurde mit einem kommerziellen Reinigungssystem (NucleoSpin® DNA RapidLyse) aus Zellen isoliert. Als Ausgangsmaterial für die PCR wurden Plasmide (vgl. Tab. 3.16) oder die gereinigte genomische DNA eingesetzt. Die Q5®-PCR wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden in einem 0,2 ml PCR-Röhrchen alle Komponenten (Tab. 3.11) gemischt. Die entsprechenden Primer-Sequenzen sind dem Anhang zu entnehmen. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler, der das in Tab. 3.12 beschriebene PCR-Programm durchführte. Die Amplifikate wurden im Anschluss zur Charakterisierung bzw. Extraktion auf ein Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Agarosegel aufgetragen.

Tab. 3.12: Q5®-PCR-Ablauf.

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	
Denaturierung	98 °C	10 s	31 Zyklen
Hybridisierung	T _m	20 s	
Elongation	72 °C	30 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	2 min	

3.6.4 TAE-Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Amplifizierte oder verdaute DNA-Fragmente wurden zur Analyse oder Präparation in einer Agarose-Gelelektrophorese von anderen Bestandteilen getrennt. Dazu wurde zunächst Agarose durch kurzes Aufkochen in TAE-Puffer (Tab. 3.13) gelöst. Von der 1-3 %igen Agarose-Lösung wurden 50 ml mit 3 µl Ethidiumbromid versetzt, gemischt und in eine 7 cm x 10 cm Gelkammer mit Probenkamm gegossen. Nach vollständiger Aushärtung wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer befüllte Elektrophorese-Kammer überführt und der Kamm entfernt. Die mit Beladungspuffer versetzten DNA-Proben und ein DNA-Größenstandard wurden aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V Gleichstrom für 45 min. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten anschließend unter UV-Licht detektiert und am Molecular Imager® Gel Doc™ XR dokumentiert werden. Die DNA-Fragmente wurden gegebenenfalls mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem kommerziellen Reinigungssystem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up.

Tab. 3.13: Puffer für TAE-Agarose-Gelelektrophorese.

Puffer	Zusammensetzung
TAE-Puffer (pH 8,0)	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA

3.6.5 Plasmid-Verdau durch Typ II-Endonukleasen

Typ II-Endonukleasen erkennen spezifische Sequenzen innerhalb der DNA und schneiden nicht endständig. Der Restriktionsverdau von Plasmiden durch solche Nukleasen wurde in Vorbereitung der gerichteten Ligation von Plasmidvektor und Insert durchgeführt. Die dafür nötigen Komponenten (Tab. 3.14) wurden nach Herstellerangaben in einem 0,2 ml-Röhrchen kombiniert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden im Anschluss zur Charakterisierung bzw. Extraktion auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen.

Tab. 3.14: Reaktionsansatz zum Plasmidverdau.

Komponenten	Volumen
DNA (1 µg/µl)	1 µl
Reaktionspuffer 10x	3 µl
Endonuklease (10 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	ad 30 µl

3.6.6 Ligation von Plasmidvektor und DNA-Insert

Bei der Ligation werden ein oder mehrere dsDNA-Inserts mit dem linear vorliegenden Plasmidvektor enzymatisch über eine Phosphodiesterbindung zusammengefügt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die DNA-Fragmente in die zwei *High Copy* Plasmide pJet und pRetroX-TetOne-Puro integriert.

3.6.6.1 *Blunt end*-Ligation

Die Ligation in das pJet-Plasmid erfolgte nach Herstellerangaben. Die erstellten pJet-Plasmide wurden zur Analyse und Sequenzierung der amplifizierten Nukleotidsequenzen genutzt. Dabei wurden die Inserts mithilfe der eingesetzten T4-DNA-Ligase *blunt*, das heißt mit glattem Ende und unabhängig von einem spezifischen DNA-Überhang, in den Vektor integriert. Die in Tab. 3.15 aufgeführten Komponenten wurden in ein 0,2 ml PCR-Röhrchen pipettiert und im Thermocycler für 30 min bei 22 °C inkubiert.

Tab. 3.15: Reaktionsansatz für *blunt end*-Ligation.

Komponenten	Volumen
Reaktionspuffer 2x	10 µl
gereinigtes PCR-Produkt	1 – 5 µl
pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/µl)	1 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

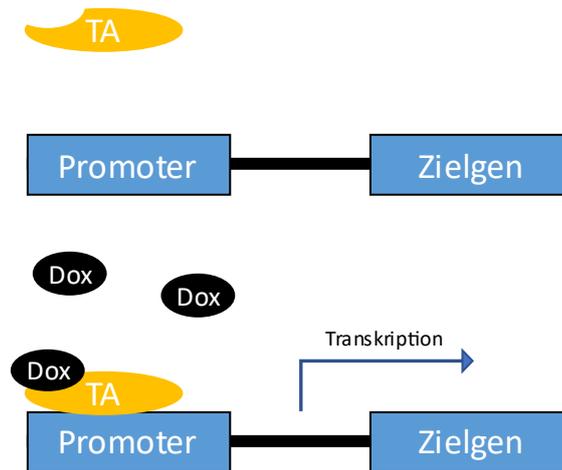


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des TetOn-Systems. In Anwesenheit von Doxycyclin (Dox) bindet das Transaktivatorprotein (TA) an den Promoter und initiiert so die Expression des nachgeschalteten Zielgens.

3.6.6.2 Gibson-Assembly

Das pRetroX-TetOne-Puro-Plasmid ist speziell für die Herstellung retroviraler Vektoren konzipiert und basiert auf dem Genom des Moloney Murinen Leukämievirus (MoMuLV). Es trägt neben einem Puromycin-Resistenzgen zur Selektion in Säugerzellen ein TetOn-System zur kontrollierten Expression des Zielgens. Das TetOn-System (Abb. 3.3) wurde erstmals 1995 von Gossen et al. beschrieben und basiert auf einem dem Zielgen vorgeschalteten TRE3GS-Promotor, der eine repetitive Tet-Operator-Sequenz beinhaltet (Abb. 3.4).

Das konstitutiv exprimierte Transaktivatorprotein kann nach Bindung an Tetrazyklin oder eines seiner Derivate (z.B. Doxycyclin) daran binden und dadurch die Expression des

nachfolgenden Zielgens auslösen. Die Expression des Zielgens wird so in Anwesenheit von Tetracyclin induziert und in seiner Abwesenheit ausgesetzt. Als Zielgene wurden die in Tab. 3.16 aufgeführten, zuvor amplifizierten Gene verwendet.

Tab. 3.16: Verwendete Gene in Plasmidkonstrukten zur Herstellung permanenter Zelllinien.

Gen	Plasmid	Quelle	Funktion
Fusionsgen aus <i>NUP98</i> und <i>HOXB4</i>	pPEP-TEV-cNUP98 pSG5-HOXB4	Ruedl et al., 2008	NUP98: Teil der Kernpore HOXB4: Transkriptionsfaktor
<i>cmyc</i>	TetO-FUW-cMYC	Wolf et al., 2017	Protoonkogen; kodiert für Transkriptionsfaktor cMYC
<i>Bcl2</i>	pSFFV-neo-Bcl-2	Vaux et al., 1988	Protoonkogene der <i>B cell</i> <i>lymphoma</i> -Familie; kodieren für Membranproteine der
<i>BclxL</i>	pBM272-Bcl-XL	Wolf et al., 2017	Mitochondrien mit Apoptose- hemmender Wirkung
<i>EGFP</i>	pEGFP-N3	Zhang et al., 1996	Verstärkt grün fluoreszierendes Protein als Positivkontrolle

Die Ligation in das pRetroX-TetOne-Puro-Plasmid erfolgte in einer isothermalen Assemblierung nach Gibson (2011) mit dem In-Fusion® HD Cloning Kit und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Gibson-*Assembly* müssen die zu verknüpfenden DNA-Fragmente überlappende Sequenzen am 5'- und am 3'-Ende besitzen. Diese wurden durch entsprechend designte Primer in der vorangegangenen PCR erzeugt, sodass an beiden Enden des DNA-Inserts zum Vektor homologe Sequenzen von 15 bp Länge vorlagen. Während der Gibson-*Assembly* spaltet eine T5-Exonuklease 5'-endständige Nukleotide eines DNA-Doppelstrangs ab. Sind an Vektor und Insert dadurch DNA-Überhänge (*Sticky Ends*) entstanden, hybridisieren diese über ihre homologen Sequenzen. Eine DNA-Polymerase ergänzt die hybridisierte dsDNA um fehlende Nukleotide und eine Ligase verknüpft die zwei dsDNA-Fragmente kovalent. Für die Assemblierung wurden die in Tab. 3.17 aufgeführten Komponenten in ein 0,2 ml PCR-Röhrchen pipettiert. Die Reaktion

erfolgte im Thermocycler bei 50 °C für 30 min. Eine vollständige Plasmidkarte ist im Anhang zu finden.

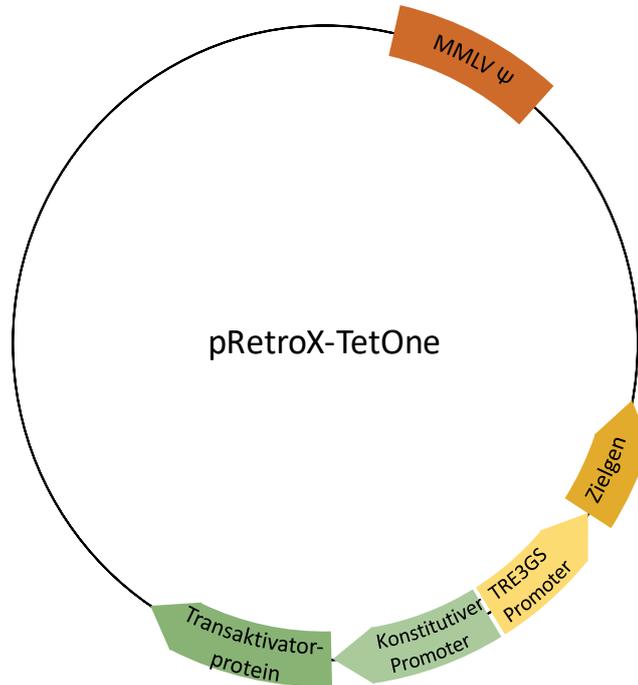


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der hergestellten Plasmide. Das Transaktivatorprotein ermöglicht in Anwesenheit von Doxycyclin die Expression des dem TRE3GS-Promoter nachgeschalteten Zielgens. Das Plasmid trägt außerdem das Signal zur Verpackung der Retroviren (MoMuLVΨ).

Tab. 3.17: Reaktionsansatz für Gibson-Assembly mit In-Fusion® HD.

Komponenten	Volumen bzw. Menge
linearisierter Vektor	70 ng
gereinigtes PCR-Produkt	$\frac{\text{Länge Insert [bp]}}{\text{Länge Vektor [bp]}} * 70 \text{ ng}$
In-Fusion HD Enzym-Mix 5x	2 µl
H ₂ O	ad 10 µl

3.6.7 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Die generierten Plasmide wurden unterstützt durch einen Hitzeschock in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen eingebracht. Dazu wurden 10 ng Ligationsprodukt oder 1 ng gereinigtes Plasmid zu 50 µl Bakteriensuspension gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 1 min bei 42 °C. Die Suspension wurde anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt und in 1 ml LB-Nährmedium überführt. Die *E. coli*-Zellen wurden für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert und anschließend für 5 min bei 3.000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 0,2 ml LB-Nährmedium aufgenommen und auf zwei LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen (180 µl und 20 µl der Bakteriensuspension). Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tab. 3.18: Bakterienkolonie-PCR-Reaktionsansatz.

Komponenten	Volumen
ThermoPol Reaktionspuffer 10x	1 µl
dNTP (10 µM)	0,2 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	0,2 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	0,2 µl
lysierte Bakteriensuspension	3 µl
Taq DNA Polymerase	0,05 µl
H ₂ O	5,35 µl

3.6.8 Bakterienkolonie-PCR

In einer Bakterienkolonie-PCR wurde untersucht, welche der angewachsenen Bakterienkolonien das Plasmid in der Transformation aufgenommen hatten. Von den auf Agarplatten ausgestrichenen *E. coli* wurden je Transformationsansatz 10 bis 15 einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in 50 µl A. dest. resuspendiert. Davon wurden 5 µl in ein 0,2 ml-PCR-Röhrchen überführt und für 5 min bei 99 °C inkubiert. Die dabei freigesetzte Plasmid-DNA wurde als Matrize für die Bakterienkolonie-PCR eingesetzt, die Taq-Polymerase zur Vervielfältigung der Amplicons. Die in Tab. 3.18 aufgeführten Komponenten wurden im PCR-Röhrchen vermischt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler, der das in Tab. 3.19 beschriebene PCR-Programm durchführte. Die

Amplifikate wurden im Anschluss zur Charakterisierung auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen.

Kolonien, deren DNA-Bandenmuster in der Agarosegelelektrophorese dem ligierten Insert entsprach, wurden in 7 ml LB-Nährmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum inokuliert und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Zur Extraktion des Plasmids aus der Bakteriensuspension wurde ein kommerzielles Reinigungssystem (NucleoSpin® Plasmid EasyPure) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Sequenzanalyse wurde von der Firma LGC Genomics GmbH in Berlin durchgeführt. Die Plasmide mit der korrekten Insert-Sequenz wurden für die Herstellung der Retroviren weiterverwendet.

Tab. 3.19: Bakterienkolonie-PCR-Ablauf.

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	28 Zyklen
Hybridisierung	T_m	30 s	
Elongation	68 °C	1 kb/min	
Finale Elongation	68 °C	2 min	

3.7 Herstellen von Retroviren und Transduktion

Für die genetische Veränderung muriner Knochenmarkszellen wurden retrovirale Vektoren eingesetzt. Dabei wurden auf dem MoMuLV basierende Retroviren hergestellt, die auf einem einzelnen Ribonukleinsäure (RNA)-Strang ein vom P_{TRE3GS} Promoter kontrolliertes Zielgen und eine Puromycin-Resistenz kodieren. Retroviren bringen ihr genetisches Material zusammen mit einer reversen Transkriptase in die Zielzelle ein, wo die RNA zunächst in DNA umgeschrieben und schließlich während der Zellteilung in das Zellgenom integriert wird (Temin & Mizutani, 1970). Die Zellen können so dauerhaft genetisch verändert und anhand der Puromycin-Resistenz selektiert werden.

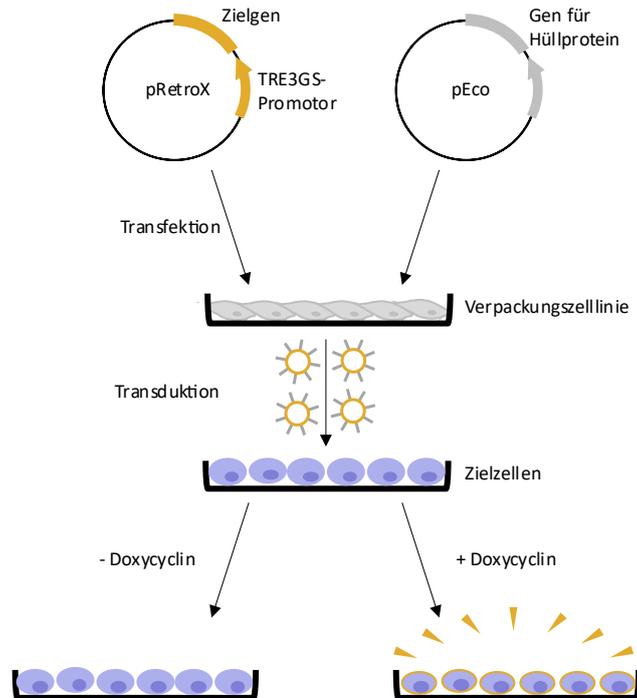


Abb. 3.5: Herstellung von Retroviren und Transduktion. Eine Verpackungszelllinie wird mit Plasmiden, die das Zielprotein und Virushüllproteine kodieren, transfiziert. Die Viren werden in den Kulturüberstand sezerniert, der zur Transduktion der Zielzellen eingesetzt wird. Durch Zugabe von Doxycyclin wird die Genexpression in den Zielzellen induziert. Die Abbildung wurde nach Takara Bio Inc. (2014) modifiziert.

3.7.1 Transfektion der Verpackungszelllinie und Virus-Ernte

Die Herstellung der Retroviren erfolgte mit dem Retro-X™ Tet-One™ Inducible Expression System von Takara Bio USA, Inc. und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die enthaltene Verpackungszelllinie GP2-293 trägt die Gene *gag* und *pol* des MoMuLV, die die Matrix- und Kapsidproteine bzw. die virale Protease, reverse Transkriptase und Integrase kodieren. Auf zwei weiteren Plasmiden wurden das Zielgen (auf pRetroX) und das Gen für das Hüllprotein (*gp70* kodiert auf dem Plasmid pEco) in die Verpackungszelllinie eingebracht (Abb. 3.5). Als Zielgene wurden *cmyc*, *Bcl2*, *BclxL* (*B cell lymphoma 2* bzw. *xL*), *EGFP* (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) sowie ein Fusionsgen aus *NUP98* (*Nucleoporin 98*) und *HOXB4* (*Homeobox B4*) eingesetzt (Tab. 3.16). Erst nach erfolgter Co-Transfektion mit beiden Plasmiden ist die Verpackungszelllinie in der Lage, vollständige und funktionale Virionen zu generieren und in das Kulturmedium zu sezernieren. Die Transfektion erfolgte transient, sodass die Fremd-DNA nach wenigen Tagen abgebaut und die Virus-Produktion eingestellt wurde. Die so hergestellten Virionen tragen das Tetrazyklin-regulierbare Zielgen und ein Puromycin-Resistenzgen auf einem einzelnen

RNA-Strang, der bei der Transduktion zusammen mit den genannten Enzymen in die Zielzelle transferiert wird. Da die für Replikation und Verpackung des Virus nötigen Gene nicht im Virus selbst enthalten sind und somit nicht auf die Zielzelle übertragen werden, sind die entstandenen Viren nicht replikationsfähig. Der Rezeptor des Virus-Hüllproteins (mCAT-1) kommt ausschließlich auf Nagetierzellen vor, sodass ecotrope retrovirale Vektoren entstehen, die ausschließlich murine Zellen infizieren können.

Einen Tag vor der Transfektion wurden 5×10^6 Zellen der Verpackungszelllinie GP2-293 auf einer 100 mm-Zellkulturschale in 10 ml Vollmedium ausgesät und über Nacht kultiviert. Für die Transfektion wurden in einem 1 ml-Röhrchen 15 µg retroviraler Plasmid-DNA und 15 µg des Hüll-Plasmids gp70 mit Xfect-Reaktionspuffer auf ein Volumen von 600 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 9 µl Xfect-Polymer wurde das Röhrchen für 10 s auf einem Vortexmischer geschüttelt und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Das gesamte Volumen wurde anschließend tröpfchenweise auf der GP2-293-Kulturschale verteilt und durch vorsichtiges Schwenken mit dem Kulturmedium vermischt. Die transfizierten Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert, am folgenden Tag wurde das Medium durch frisches Vollmedium ersetzt. Der Kulturüberstand wurde nach 24 h, 48 h oder 72 h weiterer Kultivierung geerntet.

Tab. 3.20: DNase-Reaktionsansatz.

Komponenten	Volumen
RNA-Probe	12,5 µl
DNase I-Puffer (10x)	2,5 µl
DNase I (5 U/µl)	4,0 µl
H ₂ O	ad 25 µl

3.7.2 Real Time-PCR zur Quantifizierung von Retroviren

Die quantitative *Real Time*-PCR (qPCR) basiert auf den Prinzipien der PCR. Auch hier wird dsDNA unter Verwendung einer Polymerase und spezifischer Oligo-Nukleotide exponentiell vervielfältigt. Zusätzlich wird ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, der sich in die synthetisierten DNA-Moleküle einlagert und dabei Fluoreszenz emittiert. Das Fluoreszenzsignal steigt somit mit der Zahl an Amplifikaten und wird photometrisch detektiert, was einen Rückschluss auf die Ausgangsmenge an DNA erlaubt.

Für die Quantifizierung von Retroviren muss nach der von Weis et al. (1992) eingeführten Methode zunächst die virale RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für das Umschreiben in cDNA sowie die qPCR wurde das Retro-X™ qRT-PCR Titration Kit von Takara Bio USA, Inc. eingesetzt, das die Durchführung beider Methoden in einem Schritt erlaubt. Der geerntete Kulturüberstand wurde zunächst für 5 min bei 2.000 x g zentrifugiert, um Zellen und deren Überreste zu entfernen. Die retrovirale RNA wurde mit dem NucleoSpin® RNA Virus Kit aus 150 µl Kulturüberstand extrahiert. Um verbliebene Plasmid-DNA zu entfernen, wurde das erhaltene Eluat mit DNase behandelt. Dazu wurden die in Tab. 3.20 gelisteten Komponenten gemischt und für 30 min bei 37 °C und anschließend für 5 min bei 70 °C inkubiert.

Tab. 3.21: cDNA-Synthese- und qPCR-Reaktionsansatz.

Komponenten	Volumen
RNA-Probe	2 µl
Quant-X Puffer (2x)	12,5 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	0,5 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	0,5 µl
Quant-X Enzym	0,5 µl
Reverse Transkriptase-Mix	0,5 µl
H ₂ O	ad 23 µl

Von den zu untersuchenden Proben und einem RNA-Standard wurden zunächst Verdünnungsreihen angefertigt. Für den RNA-Standard wurden 2 µl der Retro-X RNA-Kontrolle (5×10^8 Kopien/ml) in 18 µl Puffer verdünnt. Der Verdünnung wurden wiederum 2 µl entnommen und in 18 µl Puffer überführt usw., sodass fünf Verdünnungen verschiedener Konzentrationen ($5 \times 10^3 - 5 \times 10^7$ Kopien/ml) vorlagen. Die RNA-Proben wurden unverdünnt und in drei weiteren 1:10-Verdünnungen eingesetzt. Für die cDNA-Synthese und die qPCR wurden die in Tab. 3.21 aufgeführten Komponenten gemischt und auf Eis auf eine 96-Well-PCR-Platte aufgetragen. Die Platte wurde für 2 min bei 2.000 x g und 4 °C zentrifugiert, mit einer Klebefolie abgedeckt und durchliefen im Thermocycler das in Tab. 3.22 beschriebene Programm.

Für die Auswertung wurden die c_t -Werte (*Threshold Cycle*) der Proben mit denen des RNA-Standards verglichen. Der c_t -Wert beziffert den Zyklus, bei dem das gemessene Fluoreszenzsignal signifikant höher als der Geräte-spezifische Hintergrund ist (Abb. 3.6). Je mehr DNA in der Probe vorlag, desto mehr Kopien entstehen während der PCR und desto früher wird dieser Wert überschritten. Zur quantitativen Auswertung wurde die LP Data View Software genutzt.

Tab. 3.22: cDNA-Synthese- und qPCR-Ablauf.

Schritt	Temperatur	Zeit
cDNA-Synthese	42 °C	5 min
Hybridisierung	95 °C	10 s
	95 °C	5 s
	60 °C	30 s
Finale Dissoziation	95 °C	15 s
	60 °C	30 s

40 Zyklen

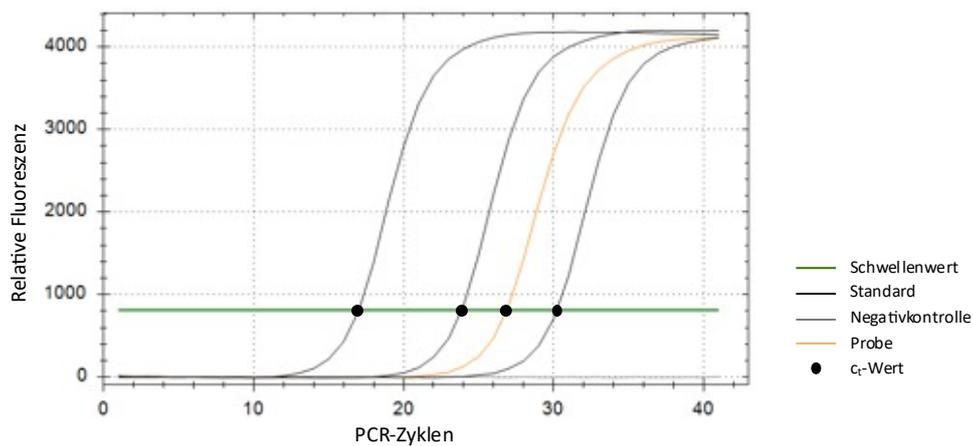


Abb. 3.6: Auswertung der qPCR. Gezeigt ist der beispielhafte Verlauf der Fluoreszenzkurven von Standards, Probe und Kontrolle. Je mehr DNA in der Probe vorlag, desto mehr Kopien entstehen während der PCR und desto früher steigt die Fluoreszenz an. Der Zyklus, bei dem die gemessene Fluoreszenz einen Geräte-spezifischen Schwellenwert (grün) überschreitet, wird als c_t -Wert (●) angegeben.

3.7.3 Transduktion von Säugerzellen

Als Transduktion wird die Infektion von Säugerzellen mit einem retroviralen Vektor bezeichnet, bei der das genetische Material des Virus auf die Zelle übertragen wird. Das hier hergestellte Viruspartikel interagiert dabei mit seinem auf der Wirtszelle befindlichen Rezeptor mCAT-1 (Davey et al., 1997). Um die räumliche Nähe zwischen Virionen und Zielzellen zu fördern, wurde die Transduktion auf mit Fibronectin beschichteten Zellkulturplatten ausgeführt. Retronectin® ist ein rekombinant hergestelltes, humanes Fibronectin-Fragment, das an verschiedenen Domänen Bindestellen sowohl für die Virionen als auch für Säugerzellen besitzt und so durch das räumliche Zusammenführen die Effizienz der Transduktion unterstützen soll.

3.7.3.1 Beschichtung mit Retronectin

Retronectin® wurde mit PBS auf eine Konzentration von 80 µg/ml verdünnt. Auf einer 48 Well-Platte wurden 275 µl in jedes Well pipettiert, sodass bei einer Well-Fläche von 1,1 cm² mit 20 µg/cm² beschichtet wurde. Die beschichtete Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Lösung wurde entfernt, die Wells mit je 250 µl PBS/2 % BSA für 30 min bei RT geblockt und anschließend mit 250 µl/Well PBS gewaschen.

3.7.3.2 Transduktion

Die wie unter Abschnitt 3.2.6 bzw. 3.2.7 beschrieben gereinigten und vorkultivierten LIN⁻-Zellen wurden mit den verschiedenen hergestellten Retroviren transduziert. Als Positivkontrolle wurden Zellen der murinen Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 mitgeführt und ebenfalls transduziert. Die MOI (*Multiplicity Of Infection*) beschreibt dabei die Zahl an Virionen, die rechnerisch pro Zelle eingesetzt werden. Auf der Retronectin-beschichteten 48 Well-Platte wurden 5 x 10⁵ LIN⁻-Zellen bzw. 10⁴ NIH/3T3-Zellen/Well ausgesät. Die hergestellten Virus-Suspensionen wurden mit Vollmedium verdünnt und zu den Zellen gegeben, sodass finale MOIs von 20, 50, 100 und 250 in einem Volumen von 500 µl/Well vorlagen. Die Zellkultur-Platte wurde für 5 min bei 1.200 x g und 30 °C zentrifugiert und anschließend für 48 h im Brutschrank inkubiert.

3.7.3.3 Induktion der Genexpression

Nach erfolgreicher Transduktion und Integration des viralen Erbguts sollten die transduzierten Zellen das Doxycyclin-induzierbare Zielgen und eine Puromycin-Resistenz

stabil in ihr Genom integriert haben. Durch Zugabe von Puromycin können erfolgreich transduzierte Zellen selektiert werden, während nicht-transduzierte Zellen sterben. Die Expression der eingeschleusten Gene kann durch Zugabe von Doxycyclin induziert werden. Transduzierte NIH/3T3-Zellen wurden nach 48 h Inkubation mit den retroviralen Vektoren mit frischem Vollmedium auf 12 Well-Platten erweitert und mit 2 µg/ml Puromycin selektiert. Bei transduzierten LIN⁻-Knochenmarkszellen wurde nach 48 h Inkubation mit den retroviralen Vektoren 350 µl Kulturmedium vorsichtig aus jedem Well entnommen. Das gleiche Volumen an frischem Vollmedium mit verschiedenen Kombinationen von Puromycin (0,5 µg/ml), Doxycyclin (100 ng/ml) und Zytokinen (5 µg/ml IL 7, 25 ng/ml Flt3-L, 50 ng/ml SCF) wurde hinzugegeben. Die Zellen wurden mit und ohne OP9-Zellen kultiviert (siehe Abschnitt 3.2.7). Die Zugabe von frischem Vollmedium gegebenenfalls mit Zytokinen und/oder Puromycin erfolgte für beide Zelltypen alle 3-4 Tage, die Doxycyclin-Zugabe alle 48 oder 72 h.

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* Immunisierung

4.1.1 Charakterisierung der isolierten B-Lymphozyten

Für den Aufbau einer *In vitro* Immunisierung wurden in einer magnetischen Zellsortierung B-Lymphozyten aus der Milz naiver C57Bl/6j-Mäuse isoliert. Zur Prüfung ihrer Reinheit wurden die Zellen mit Anti-CD19-, Anti-CD4- und Anti-CD11c-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die gereinigte Zellpopulation enthielt keine T-Lymphozyten (CD4⁻) oder dendritischen Zellen (CD11c⁻). Der Anteil an CD19⁺-Zellen betrug stets >95 %, sodass von einer reinen B-Lymphozyten-Population ausgegangen wird (Abb. 4.1 A).

Der Phänotyp der isolierten B-Lymphozyten wurde anhand der Oberflächenexpression von IgD, IgM, CD21/CD35 und CD23 in Kombination mit CD19 untersucht. Dabei wurde die Oberflächenexpression von IgM, IgD und CD21/35 auf allen Zellen festgestellt mit zwei verschiedenen Ausprägungen: IgM^{high} IgD⁺ und IgD^{high} IgM⁺. Anhand der weiteren Marker konnten die Zellen phänotypisch als Marginalzonen- (CD19⁺ IgM^{high} IgD⁺ CD23⁻ CD21⁺) und folliculäre B-Lymphozyten (CD19⁺ IgM⁺ IgD^{high} CD23^{high} CD21⁺) identifiziert werden (Kraal, 1992) (Abb. 4.1 B).

4.1.2 Einfluss verschiedener Stimuli auf *in vitro* Antikörperproduktion

Die gereinigten B-Lymphozyten wurden mit verschiedenen Kombinationen aus VP1, Anti-CD40-Antikörpern, IL 2, IL 4, IL 6, IL 7, IL 21, IFN γ und LPS kultiviert. Nach fünf Tagen erfolgte eine Restimulation und nach zwei weiteren Tagen, also insgesamt sieben Tagen *In vitro* Immunisierung, wurden die Kulturüberstände im ELISA auf unspezifische und VP1-spezifische IgM- und IgG-Antikörper-Produktion getestet (Abb. 4.2). In den hier

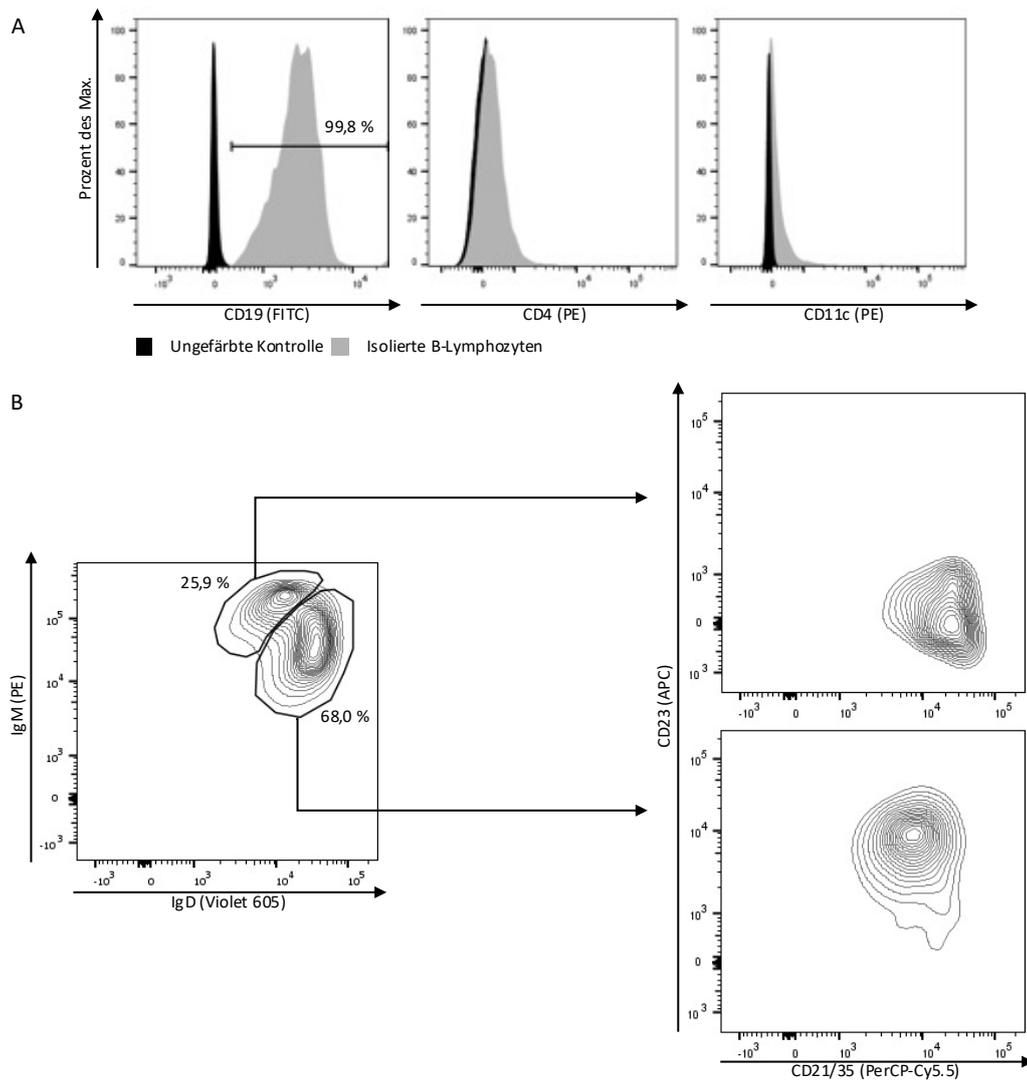
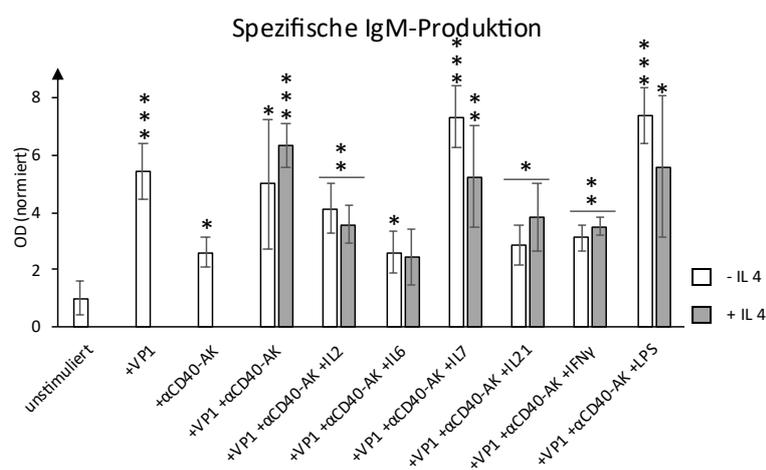
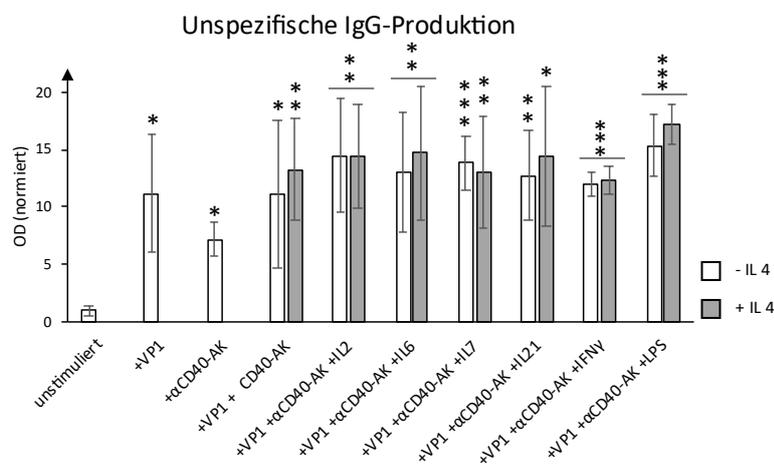
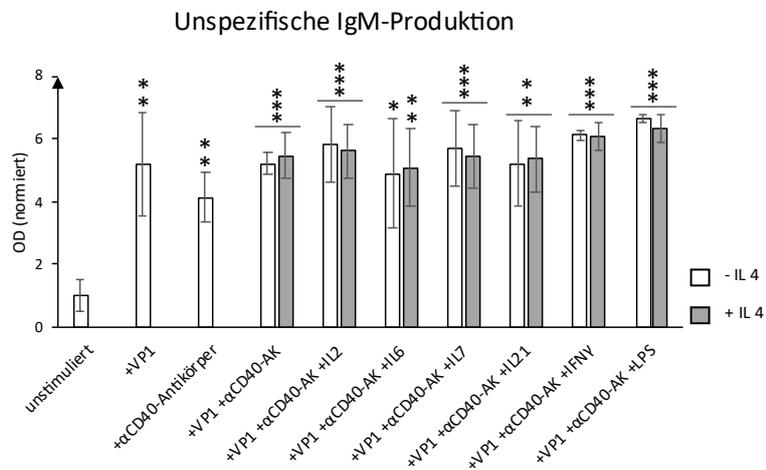


Abb. 4.1: Durchflusszytometrische Charakterisierung muriner Milz-B-Lymphozyten. B-Lymphozyten naiver C57Bl/6j-Mäuse wurden mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Die hier exemplarisch dargestellte Untersuchung zeigt, dass die gereinigte Zellpopulation ausschließlich aus B-Lymphozyten (CD19+) mit einer Reinheit von > 99 % besteht (A). Die Zellen wurden als Marginalzonen- (CD19+ IgM^{high} IgD+ CD23⁻ CD21⁺) und folliculäre B-Lymphozyten (CD19+ IgM+ IgD^{high} CD23^{high} CD21⁺) identifiziert (B).

dargestellten Ergebnissen sind die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessenen OD auf den maximalen OD_{450nm}-Wert im jeweiligen Experiment normiert und als Vielfaches der unstimulierten Kontrolle abgebildet. Die Produktion unspezifischer IgM- und IgG-Antikörper war in allen mit Antigen stimulierten Ansätzen signifikant höher als in unstimulierten Ansätzen. Ansätze, die mit VP1 und Anti-CD40-Antikörpern oder zusätzlich mit IL 7 oder LPS stimuliert worden waren, zeigten die höchste Konzentration VP1-spezifischer IgM-Antikörper infolge der *In vitro* Immunisierung. In denselben Ansätzen

wurde eine leicht erhöhte Konzentration VP1-spezifischer IgG-Antikörper gegenüber dem unstimulierten Kontrollansatz detektiert. Während der Einsatz von IL 4 auf die Produktion spezifischer IgM-Antikörper keinen markanten Einfluss hatte, war die IgG-Produktion in Ansätzen mit IL 4 tendenziell höher als in Ansätzen ohne IL 4.



Spezifische IgG-Produktion

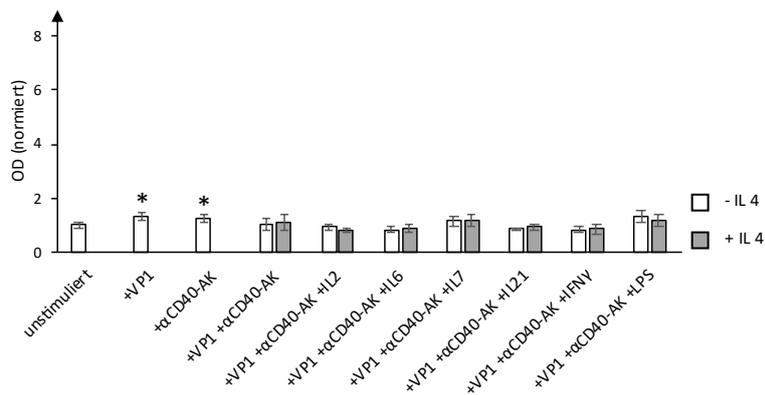


Abb. 4.2: Einfluss verschiedener Stimuli auf Antikörperproduktion. B-Lymphozyten aus naiven Mäusen wurden *in vitro* mit verschiedenen Kombinationen aus dem Antigen VP1, Anti-CD40-Antikörpern, Zytokinen und LPS stimuliert. Nach 5 Tagen erfolgte eine Restimulation und nach weiteren 2 Tagen, also insgesamt 7 Tagen *In vitro* Immunisierung, wurden die Kulturüberstände im ELISA auf unspezifische und VP1-spezifische IgM- und IgG-Antikörper getestet. Die gemessenen OD wurden auf den jeweils gemessenen Maximalwert normiert und als Vielfaches der unstimulierten Kontrolle dargestellt. Die signifikanten Unterschiede beziehen sich auf den unstimulierten Kontrollansatz ($n \geq 3$; $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < =,001$: ***). (AK: Antikörper)

4.1.3 Produktion spezifischer Antikörper im zeitlichen Verlauf

In der Folge wurden die gereinigten B-Lymphozyten zur *In vitro* Immunisierung mit Antigen, Anti-CD40-Antikörpern, IL 4 und IL 7 oder LPS kultiviert. Da die IgG-Antwort zunächst gering ausfiel, wurde in einer Zeitreihe untersucht, ob und wann unter den gegebenen Bedingungen die Produktion VP1-spezifischer IgG Antikörper nachweisbar wird. Dazu wurden bei einer *In vitro* Immunisierung mit VP1 über einen Zeitraum von zehn Tagen täglich die Kulturüberstände im ELISA auf spezifisch gegen das Antigen gerichtete Antikörper getestet (Abb. 4.3). In den hier dargestellten Ergebnissen sind die gemessenen OD_{450nm} auf die mitgeführte Negativkontrolle normiert und als Vielfaches derselben dargestellt. Spezifische IgM-Antikörper waren vom dritten Tag der Kultivierung nachweisbar in Ansätzen, die nur mit dem Antigen oder mit einer Kombination aus Antigen, Anti-CD40-Antikörpern, IL 4 und LPS oder IL 7 stimuliert worden waren. Am zehnten Tag war das IgM-Signal etwa 90 mal höher als das des unstimulierten Ansatzes am selben Tag. Spezifische IgG-Antikörper traten erst nach der Restimulation in denselben Ansätzen auf.

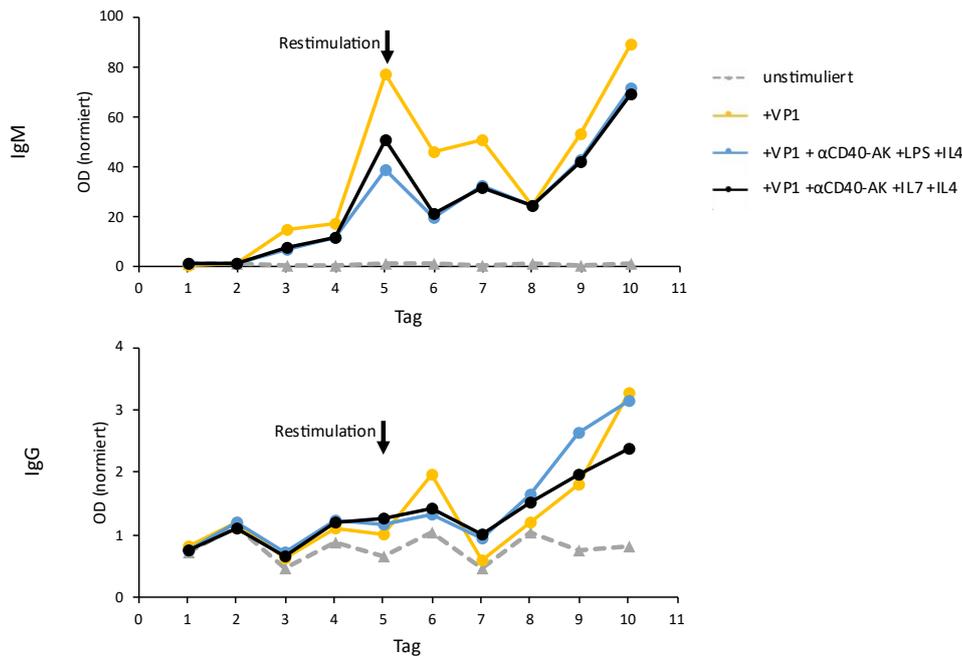


Abb. 4.3: Spezifische Antikörperproduktion im zeitlichen Verlauf. B-Lymphozyten aus naiven Mäusen wurden *in vitro* mit dem Antigen VP1, Anti-CD40-Antikörpern, IL 4 und LPS oder IL 7 stimuliert und nach fünf Tagen restimuliert (↓). Die Kulturüberstände wurden täglich auf VP1-spezifische IgM- und IgG-Antikörper getestet. Ab dem dritten Tag konnten in stimulierten Ansätzen Antigen-spezifische IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Spezifische IgG-Antikörper waren ab dem neunten Tag der *In vitro* Immunisierung nachweisbar. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für eines von drei Experimenten. (AK: Antikörper)

Das stärkste Detektionssignal wurde für beide Antikörperklassen am zehnten Tag der Stimulation gemessen. In stimulierten Ansätzen wurden im Vergleich zu unstimulierten Ansätzen deutlich höhere Signale für spezifische IgM- und IgG-Antikörper gemessen. B-Lymphozyten, die mit dem Antigen allein stimuliert worden waren, zeigten die stärkste Produktion spezifischer Antikörper, während in unstimulierten Ansätzen gleichbleibend niedrige Signale für spezifische Antikörper detektiert wurden.

4.1.4 Nachweis von Aktivierungsmarkern auf B-Lymphozyten

Infolge einer Aktivierung verändert sich die Expression von Oberflächenmarkern auf B-Lymphozyten. Das Expressionsmuster auf der Zelloberfläche wurde deshalb auf *in vitro* immunisierten B-Lymphozyten untersucht. Die Aktivierungsmarker CD69, CD80, CD86, CD138 und IgG wurden angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Stimulierte Zellen zeigten nach zehntägiger *In vitro* Immunisierung eine deutlich erhöhte Expression von CD69, CD80 und CD86 (Abb. 4.4). Ein Teil der B-Lymphozyten exprimerte bereits

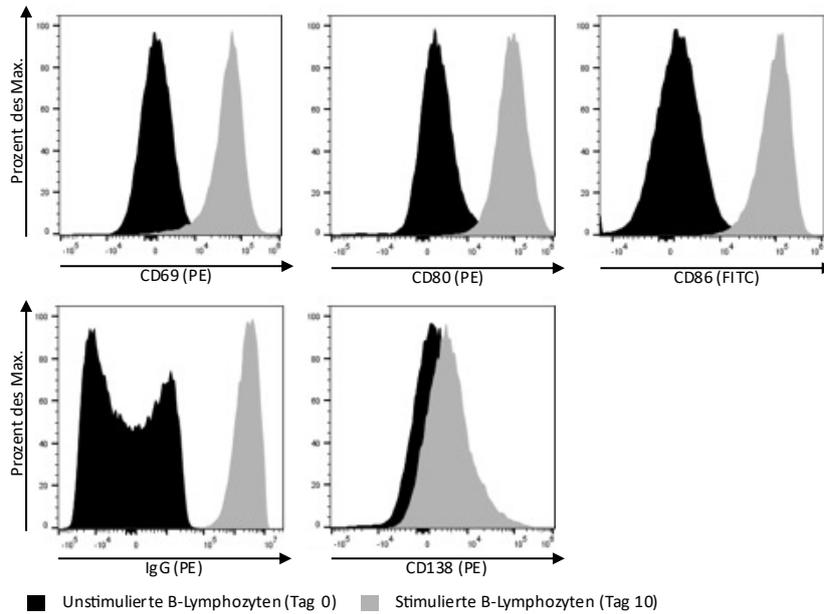


Abb. 4.4: Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern auf *in vitro* stimulierten B-Lymphozyten. Die Zellen wurden mit Anti-Maus-CD69-, Anti-CD80-, Anti-CD86-, Anti-CD138- und Anti-IgG-Antikörpern angefärbt. Die dargestellten Abbildungen sind Färbungen von B-Lymphozyten, die mit VP1, Anti-CD40-Antikörpern, IL 4 und IL 7 stimuliert worden waren. Zellen, die mit LPS statt IL 7 stimuliert worden waren, zeigten ein vergleichbares Expressionsmuster. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen wurde auf stimulierten Zellen eine deutlich erhöhte Expression von CD69, CD80, CD86 und Oberflächen-IgG nachgewiesen. Die Expression des Plasmazellmarkers CD138 nahm nach zehntägiger *In vitro* Immunisierung nur leicht zu.

unmittelbar nach der Isolation aus der Milz IgG auf der Zelloberfläche. Nach erfolgter *In vitro* Immunisierung war die IgG-Expression deutlich erhöht und auf allen Zellen nachweisbar. Die Expression des Plasmazell-Markers CD138 nahm nur leicht zu. Aufgrund der geringen Zellzahlen bzw. der schlechten Zellvitalität konnten die Färbungen der unstimulierten oder mit VP1 allein stimulierten Zellen nicht ausgewertet werden.

4.1.5 Nachweis des IL 7-Rezeptors auf B-Lymphozyten

Der IL 7-R wurde auf gereinigten, unstimulierten und auf *in vitro* immunisierten B-Lymphozyten angefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass weniger als 5 % der gereinigten Milz-B-Lymphozyten den Rezeptor auf der Zelloberfläche trugen (Abb. 4.5). Zellen, die für neun Tage *in vitro* immunisiert und mit IL 7 kultiviert worden waren, waren zu über 41 % IL 7-R-positiv.

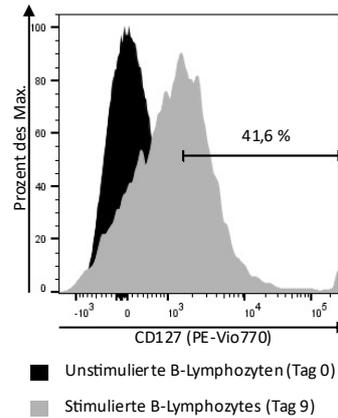


Abb. 4.5: Oberflächenexpression des IL 7-Rezeptors (CD127). *In vitro* stimulierte und unstimulierte B-Lymphozyten wurden mit einem Anti-Maus-CD127-Antikörper angefärbt. Auf unstimulierten Zellen war der Rezeptor nicht nachweisbar. Zellen, die mit VP1, Anti-CD40-Antikörpern, IL 7 und IL 4 stimuliert worden waren, zeigten eine deutlich erhöhte Expression des IL 7-Rezeptors.

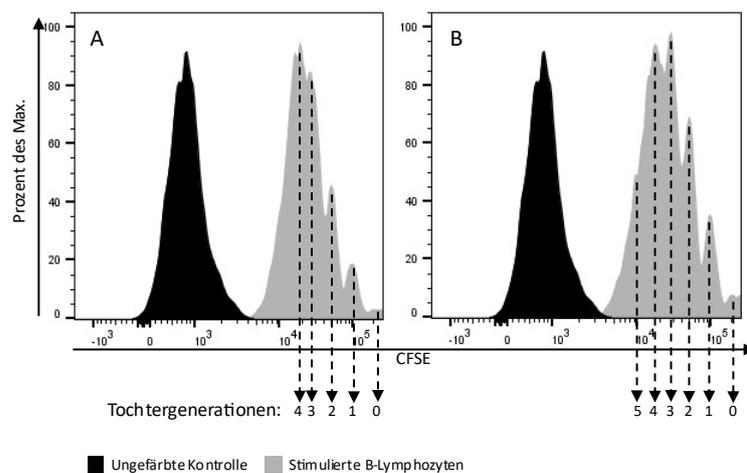


Abb. 4.6: Proliferation aktivierter B-Lymphozyten. Gereinigte B-Lymphozyten wurden mit CFSE gefärbt und für zehn Tage *in vitro* mit VP1, Anti-CD40-Antikörpern, IL 4 und LPS (A) oder IL 7 (B) stimuliert. Die Proliferation ist durch abnehmende Fluoreszenzsignale ersichtlich. In beiden Ansätzen hat sich die Mehrheit der Zellen nach sieben Tagen *in vitro* Immunisierung mindestens dreimal geteilt und vier bzw. fünf Tochtergenerationen (gekennzeichnet durch Pfeile) sind deutlich zu unterscheiden.

4.1.6 Proliferation aktivierter B-Lymphozyten

Um die Proliferation der B-Lymphozyten während der *In vitro* Immunisierung zu untersuchen, wurden Zellen unmittelbar nach der Reinigung mit CFSE gefärbt. Es erfolgte die Stimulation mit VP1, Anti-CD40-Antikörpern und LPS oder IL 7 für fünf Tage und

anschließend eine Restimulation mit den Stimulantien und IL 4 für weitere fünf Tage. Nach sieben Tagen *In vitro* Immunisierung hatte der Großteil der Zellen in den stimulierten Ansätzen mindestens drei Zellteilungen durchlaufen (Abb. 4.6). Vier bzw. fünf Tochtergenerationen konnten anhand der deutlich differenzierbaren Fluoreszenzspitzen identifiziert werden. Aufgrund der geringen Zellzahlen bzw. der schlechten Zellvitalität konnten die Färbungen der unstimulierten oder mit VP1 allein stimulierten Zellen nicht ausgewertet werden.

4.1.7 Zellzahlen und -vitalität im zeitlichen Verlauf

Die Zahlen lebender Zellen in stimulierten und in unstimulierten Ansätzen wurden im zeitlichen Verlauf der *In vitro* Immunisierung erfasst. Stimulierte Zellen proliferierten, sodass die Lebendzellzahlen bis zum achten Tag um mehr als 100 % zunahmten (Abb. 4.7). In der mikroskopischen Betrachtung erschienen stimulierte Zellen größer und deutlich vitaler als unstimulierte (Abb. 4.8). Zellzahl und -vitalität nahmen nach zehn Tagen *In vitro* Immunisierung ab. Bei B-Lymphozyten, die nicht oder nur mit VP1 stimuliert worden waren, wurde anhand morphologischer Veränderungen nach wenigen Tagen *in vitro* Kultivierung eine deutlich verschlechterte Zellvitalität ersichtlich. In diesen Ansätzen wurde keine Zellproliferation festgestellt, sodass am zehnten Tag der Kultivierung keine lebenden Zellen mehr vorhanden waren.

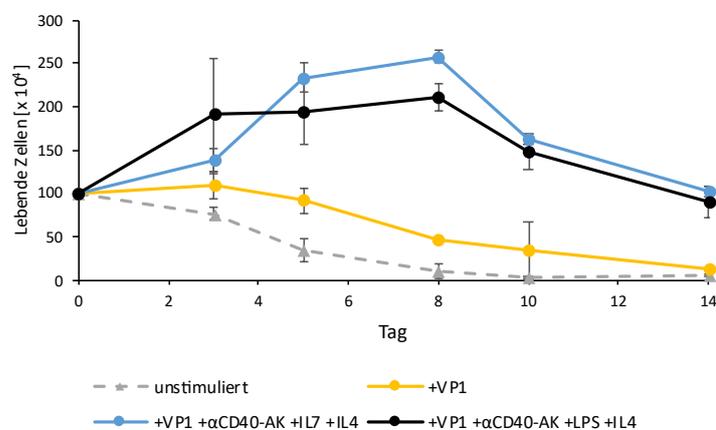


Abb. 4.7: Zellzahlen *in vitro* immunisierter B-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf. In Ansätzen, die nicht (grau) oder mit VP1 allein (gelb) stimuliert worden waren, nahmen die Zellzahlen nicht zu. Zusätzlich mit Anti-CD40-Antikörpern, IL 4 und LPS (schwarz) oder IL 7 (blau) stimulierte Zellen nahmen bis zum 8. Tag über 100 % zu ($n \geq 3$). (AK: Antikörper)

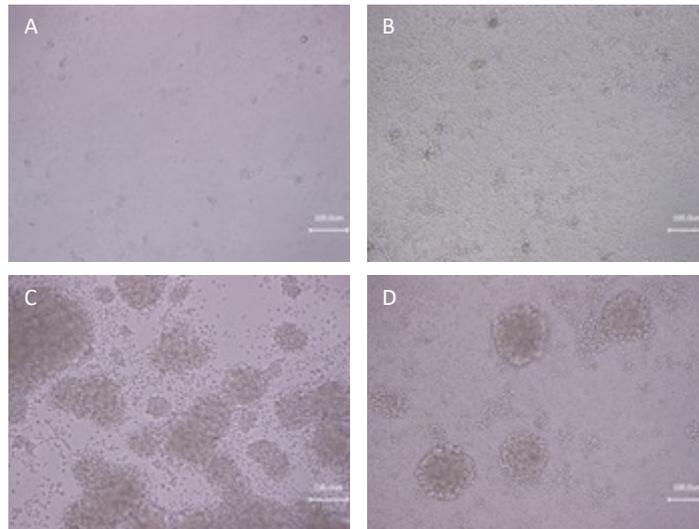


Abb. 4.8: Lichtmikroskopische Aufnahmen von B-Lymphozyten nach fünf Tagen *In vitro* Immunisierung. Im unstimulierten Ansatz (A) sind kaum lebende Zellen zu sehen. Der mit VP1 kultivierte Ansatz (B) zeigt kleine Zellkolonien. *In vitro* mit VP1, Anti-CD40-Antikörpern, IL 4 und LPS (C) bzw. IL 7 (D) stimulierte Ansätze zeigen deutlich sichtbar große Zellkolonien.

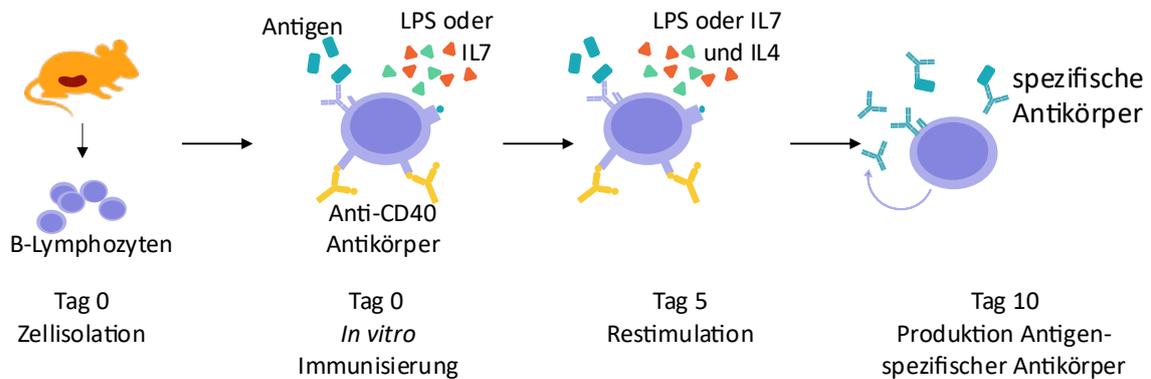


Abb. 4.9: Ablauf der *In vitro* Immunisierung von B-Lymphozyten. Milz-B-Lymphozyten werden aus naiven Mäusen isoliert und mit Antigen und Stimulantien kultiviert. Nach fünf Tagen erfolgt eine Restimulation. Am zehnten Tag der *In vitro* Immunisierung produzieren die B-Lymphozyten Antigen-spezifische IgG-Antikörper.

4.1.8 Protokoll zur *In vitro* Immunisierung

Aus den vorangegangenen Untersuchungen und Beobachtungen wurde das in Abb. 4.9 dargestellte Protokoll zur *In vitro* Immunisierung muriner B-Lymphozyten konzipiert. Milz-B-Lymphozyten werden durch magnetische Sortierung aus naiven Mäusen isoliert und mit dem Antigen, Anti-CD40-Antikörpern, LPS oder IL 7 stimuliert. Nach fünf Tagen erfolgt

eine Restimulation mit denselben Stimulantien und IL 4. Am zehnten Tag der *In vitro* Immunisierung sezernieren die stimulierten B-Lymphozyten Antigen-spezifische IgG-Antikörper.

4.2 Immortalisierung von unreifen B-Lymphozyten

4.2.1 Herstellung der Plasmidkonstrukte

Für die Herstellung einer permanenten Zelllinie, die in der zuvor etablierten *In vitro* Immunisierung statt primärer B-Lymphozyten eingesetzt werden kann, wurden verschiedene retrovirale Vektoren generiert. Dazu wurden zunächst mehrere Plasmidkonstrukte mit unterschiedlichen Onkogenen kloniert.

4.2.1.1 Plasmidverdau

Das Plasmid pRetroX wurde mit den Endonukleasen BamHI und EcoRI verdaut und auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen. Im Gelbild erscheint das unverdaute Plasmid in superspiralisierter Konformation (Sinden, 2012) auf einer geringeren Bandenhöhe (Abb. 4.10). Das verdaute Plasmid erscheint in linearisierter Form auf einer Höhe von ca. 9 kb. Das durch den Verdau mit beiden Enzymen entfernte DNA-Fragment war sehr klein (26 bp), sodass anhand der Bande allein der erfolgreiche Verdau nicht beurteilt werden

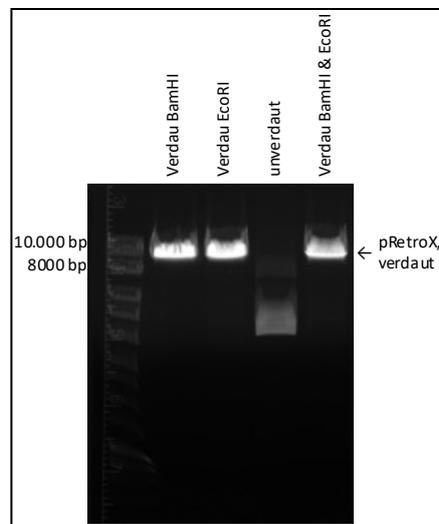


Abb. 4.10: Verdau des Plasmids pRetroX. Das Plasmid wurde einzeln und in Kombination mit den Enzymen BamHI und EcoRI verdaut und auf ein 0,5 %iges TAE-Agarosegel aufgetragen. Die Bande des zweifach verdauten Plasmids (9.437 bp) wurde ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert.

konnte. Im Verdau mit jeweils nur einem Enzym belegte die ersichtliche Linearisierung des Plasmids die Funktionalität der einzelnen Enzyme, sodass auch im Verdau mit beiden Enzymen deren Funktionalität angenommen werden kann. Das aus dem Doppel-Verdau entstandene lineare DNA-Fragment mit einer Länge von 9,4 kb wurde ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert.

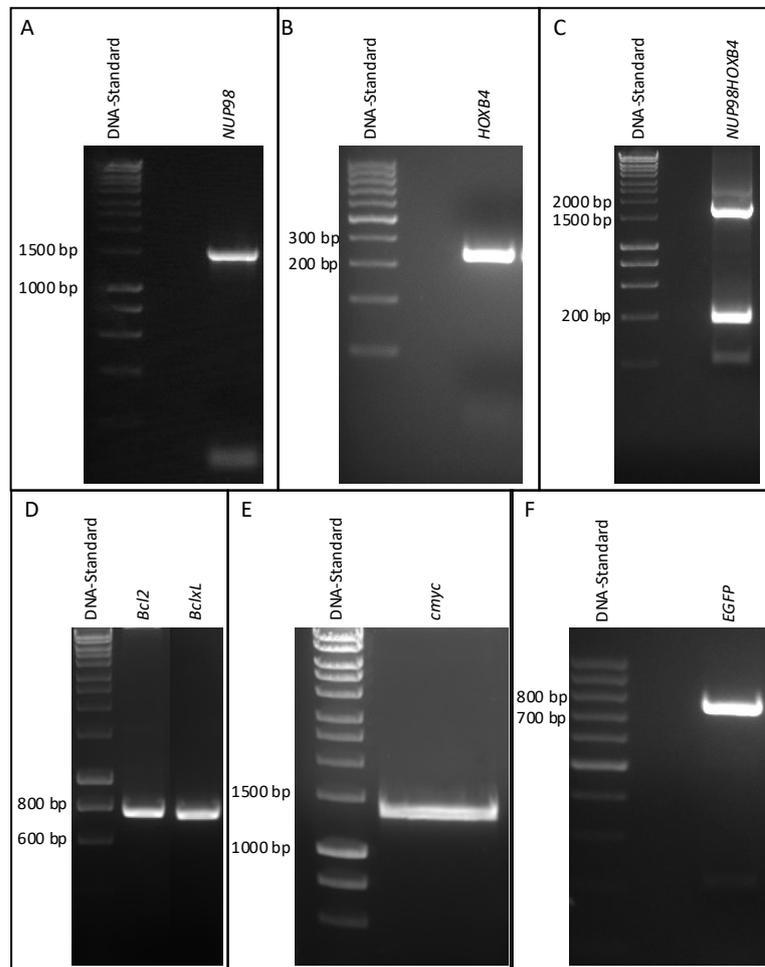


Abb. 4.11: Amplifikation der Gene zur Herstellung retroviraler Vektoren. Fragmente der Gene *NUP98* (1445 bp) (A) und *HOXB4* (300 bp) (B) sowie *Bcl2* (747 bp), *BclxL* (702 bp) (D), *cmyc* (1362 bp) (E) und *EGFP* (720 bp) (F) wurden mittels PCR amplifiziert. Das Fusionsgen *NUP98HOXB4* (1746 bp) (C) wurde in einer PCR mit überlappenden Primern generiert.

4.2.1.2 Ligation und Sequenzierung

Die Zielgene (Tab. 3.16) wurden mittels PCR amplifiziert, auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen (Abb. 4.11) und gereinigt. Aus den Genfragmenten von *NUP98* und *HOXB4* wurde in einer weiteren PCR unter Verwendung von Primern mit homologen Überhängen das Fusionsgen *NUP98HOXB4* von 1,7 kb generiert (Abb. 4.11 C).

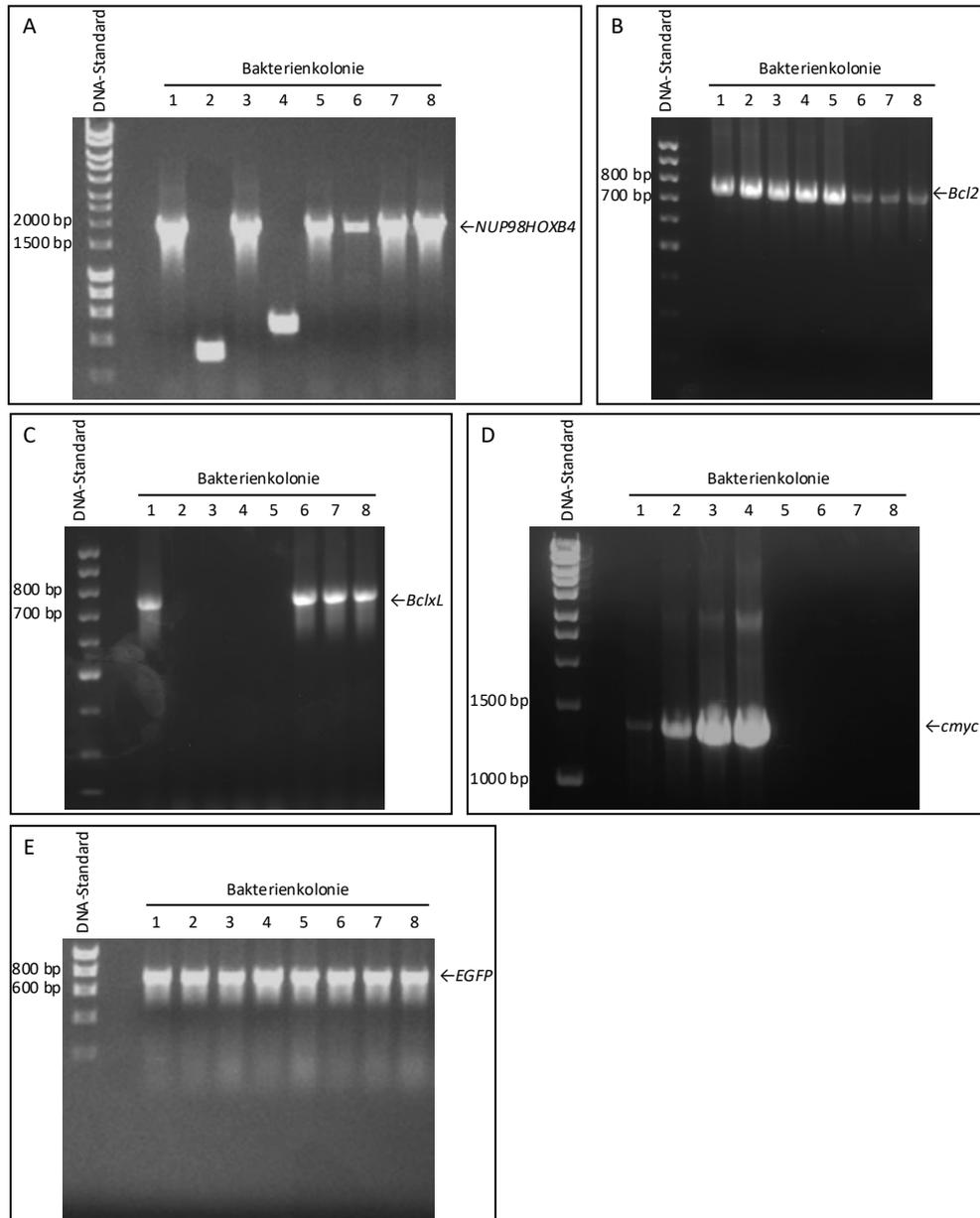


Abb. 4.12: Kolonie-PCR zum Nachweis der verschiedenen Gene in transformierten Bakterien. Bakterien-Kolonien wurden von Agarplatten gepickt und in Wasser bei 99°C erhitzt. Die PCR erfolgte jeweils mit spezifischen Primern. Die Amplifikate wurden auf Agarosegele aufgetragen. Zu erwartende Bandengrößen betragen 1746 bp für *NUP98HOXB4* (A), 747bp für *Bcl2* (B), 702 bp für *BclxL* (C), 1362 bp für *cmyc* (D) und 720 bp für *EGFP* (E).

Die amplifizierte Gene wurden für die genetische Sequenzierung in das pJet-Plasmid und zur Weiterverarbeitung in das pRetroX-Plasmid ligiert. Die Sequenzierung ergab für alle Gene eine 100%ige Übereinstimmung mit der jeweils zu erwartenden Gensequenz. Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit den Zielgen-tragenden pRetroX-Plasmiden transformiert und auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten selektiert. Von den gewachsenen Bakterienkolonien wurden jeweils acht in einer Bakterien-Kolonie-PCR mit Gen-

spezifischen Primern charakterisiert. Für jedes Zielgen konnten mehrere Klone mit dem gewünschten Gen isoliert werden (Abb. 4.12), dessen korrekte Gensequenz abermals in der analytischen Sequenzierung bestätigt wurde. Die entsprechenden Klone wurden kultiviert und die Plasmide aus der Bakteriensuspension extrahiert.

4.2.2 qPCR zur Quantifizierung der retroviralen Vektoren

Die hergestellten Plasmidkonstrukte wurden gemeinsam mit dem für das Hüllprotein kodierende Plasmid pEco in die Verpackungszelllinie GP2-293 eingebracht. Infolge eines Mediumwechsels zur Entfernung von Plasmidrückständen wurde der Kulturüberstand der Verpackungszellen nach 24, 48 und 72 h geerntet. Die darin enthaltenen Retroviren wurden

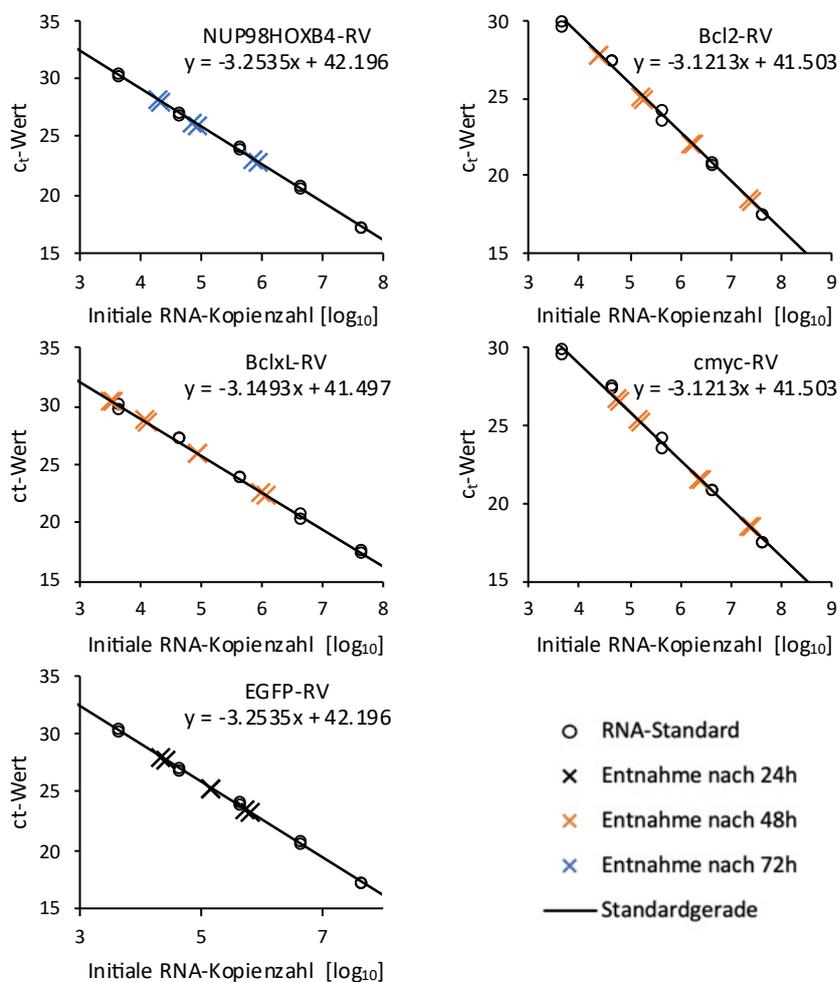


Abb. 4.13: Quantifizierung von Retroviren mittels qPCR. Anhand der gemessenen c_t-Werte des mitgeführten RNA-Standards wurden die dargestellten Geradengleichungen ermittelt. Die c_t-Werte der Proben, die die Retroviren enthalten, sowie deren Verdünnungen (10x, 100x, ggf. 1000x) wurden eingesetzt und die korrespondierende initiale Anzahl an RNA-Kopien errechnet.

in einer qPCR quantifiziert. Die ermittelten c_t -Werte wurden in die durch den mitgeführten RNA-Standard ermittelte Geradengleichung eingesetzt (Abb. 4.13). Die initiale Anzahl von RNA-Kopien in mehreren Verdünnungen der Proben wurde rechnerisch ermittelt, sodass sich unter Berücksichtigung verschiedener Verdünnungsschritte während der Probenaufbereitung die in Tab. 4 aufgeführten Virus-Konzentrationen in den geernteten Kulturüberständen ergaben.

Tab. 4: Konzentration der generierten Retroviren.

Retrovirus	Gen	Entnahme nach Mediumwechsel	Konzentration [Viren/ml]
NUP98HOXB4-RV	Fusionsgen aus <i>NUP98</i> und <i>HOXB4</i>	24 h	$3,0 \times 10^7$
		48 h	$7,9 \times 10^7$
		72 h	$4,2 \times 10^8$
Bcl2-RV	<i>Bcl2</i>	24 h	$6,9 \times 10^{11}$
		48 h	$7,3 \times 10^9$
		72 h	$8,4 \times 10^9$
BclxL-RV	<i>BclxL</i>	24 h	$3,8 \times 10^8$
		48 h	$5,6 \times 10^8$
		72 h	$4,5 \times 10^8$
cmyc-RV	<i>cmyc</i>	24 h	$7,4 \times 10^{11}$
		48 h	$7,5 \times 10^9$
		72 h	$1,5 \times 10^{10}$
EGFP-RV	<i>EGFP</i>	24 h	$5,1 \times 10^8$

4.2.3 Retrovirale Transduktion von Kontrollzellen

4.2.3.1 Selektion

Die Funktionalität der generierten Retroviren wurde zunächst anhand der murinen Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 getestet. NIH/3T3-Zellen wurden mit unterschiedlichen MOI transduziert und durch die Kultivierung mit $2 \mu\text{g/ml}$ Puromycin selektiert. In nicht transduzierten Ansätzen konnten nach viertägiger Selektion bei lichtmikroskopischer Betrachtung keine lebenden Zellen mehr beobachtet werden (Abb. 4.14). Ansätze, die mit

einer MOI von 10 transduziert wurden, zeigten deutlich mehr lebende Zellen und eine höhere Zellkonfluenz als Ansätze, die mit geringerer MOI transduziert wurden.

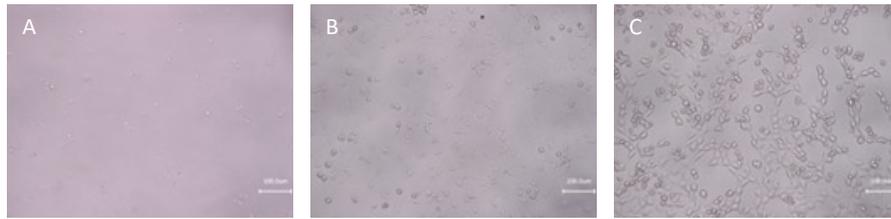


Abb. 4.14: Lichtmikroskopische Aufnahmen von transduzierten NIH/3T3-Zellen. Nach fünftägiger Selektion mit $2 \mu\text{g/ml}$ Puromycin waren im nicht transduzierten Ansatz (A) keine lebenden Zellen zu sehen. Im mit einer MOI von 10 mit BclxL-RV transduzierten Ansatz (C) waren deutlich mehr lebende Zellen zu sehen als im mit MOI 6 transduzierten Ansatz (B). Zellen, die mit anderen RV transduziert wurden, zeigten die gleiche Tendenz.

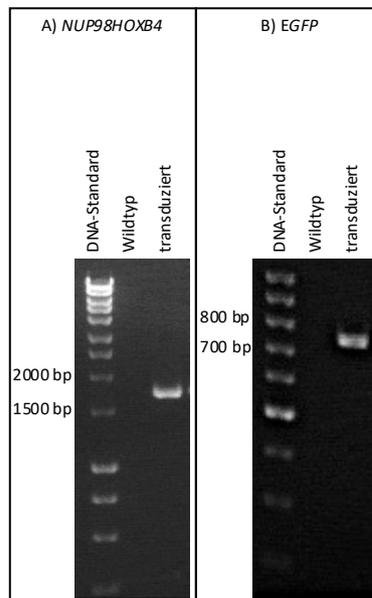


Abb. 4.15: Nachweis der Transduktion von NIH/3T3-Zellen mit NUP98HOXB4-RV (A) und EGFP-RV (B) auf genetischer Ebene. Mittels PCR wurden die Fremdgene *NUP98HOXB4* (1707 bp) (A) und *EGFP* (720 bp) (B) in der aus Wildtyp- bzw. transduzierten Zellen extrahierten DNA nachgewiesen.

4.2.3.2 Nachweis der Fremdgene *NUP98HOXB4* und *EGFP*

Das Fusionsgen *NUP98HOXB4* und *EGFP* kommen im Wildtyp-Genom der NIH/3T3-Zellen nicht vor, sodass eine erfolgreiche Transduktion der Zellen durch den Nachweis der Gene im Zellgenom belegt werden konnte. Dazu wurde mit Gen-spezifischen Primern eine PCR mit der DNA von Wildtyp- und transduzierten Zellen durchgeführt und die Amplifikate auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen (Abb. 4.15). Während die Proben mit der DNA aus

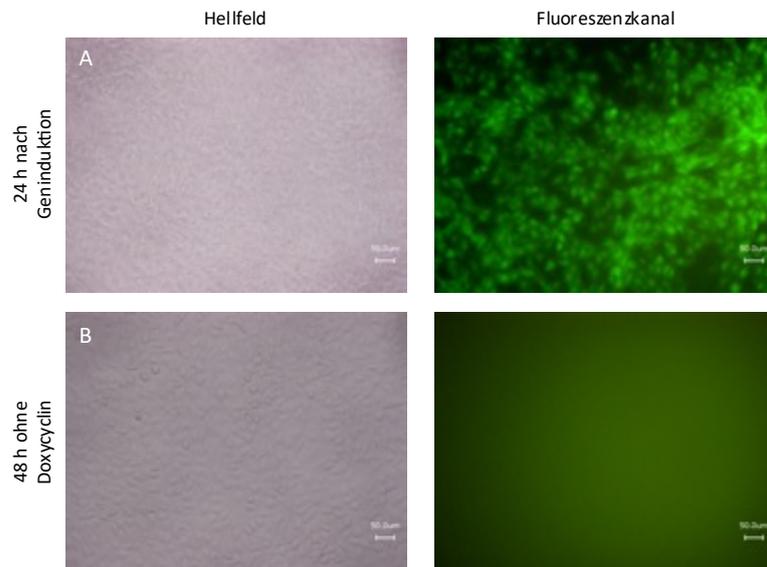


Abb. 4.16: Mikroskopische Aufnahmen von NIH/3T3-Zellen transduziert mit EGFP-RV (MOI 10). A: Die Genexpression wurde durch Zugabe von 100 ng/ml Doxycyclin induziert und 24 h nach der Zugabe am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert (0,1 s Belichtungszeit); B: Nach der Geninduktion wurde das Doxycyclin-haltige Medium entfernt und durch Vollmedium ersetzt. Nach 48 h waren bei mikroskopischer Betrachtung keine EGFP-exprimierenden Zellen zu sehen (0,1 s Belichtungszeit).

Wildtypzellen keinerlei Banden aufwiesen, konnten *EGFP* und *NUP98HOXB4* in den mit EGFP-RV bzw. NUP98HOXB4-RV transduzierten Zellen nachgewiesen werden.

4.2.3.3 Induktion der Genexpression

EGFP

Das durch die Transduktion transferierte Fremdgen unterliegt der Regulation durch den Tetrazyklin-induzierbaren TRE3GS-Promoter. In mit EGFP-RV transduzierten NIH/3T3-Zellen (MOI 10) wurde die Genexpression durch Zugabe von 100 ng/ml Doxycyclin induziert. Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung exprimierten 24 h nach der Zugabe etwa 90 % der Zellen EGFP (Abb. 4.16). Das Medium wurde gewechselt und durch Vollmedium ohne Doxycyclin ersetzt. Nach weiteren 48 h waren keine fluoreszierenden Zellen mehr sichtbar.

Bcl2, BclxL und cmyc

Die Gene *Bcl2*, *BclxL* und *cmyc* kommen im Wildtyp-Genom der NIH/3T3-Zelllinie vor. Zum Nachweis der erfolgten Transduktion wurden Lysate transduzierter Zellen 48 h nach Induktion der Genexpression im Western Blot untersucht. Während kein Bcl2 in Wildtyp-

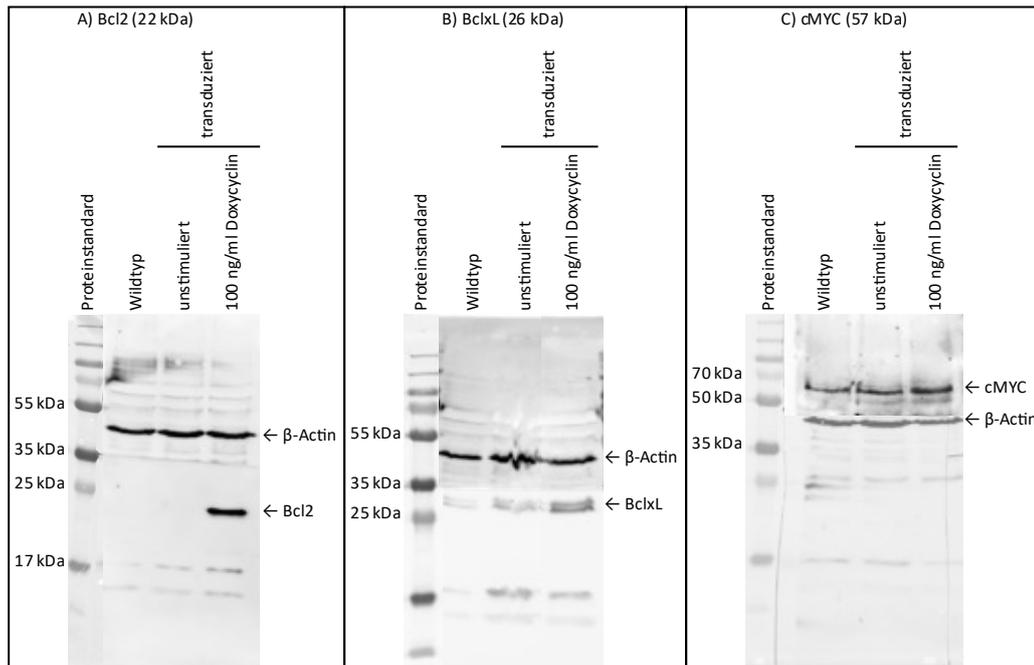


Abb. 4.17: Nachweis der Transduktion von NIH/3T3-Zellen mit Bcl2- (A), BclxL- (B) und cmyc-RV (C). Lysate von transduzierten und Wildtyp-Zellen wurden im Western Blot mit Anti-Bcl2-, Anti-BclxL- oder Anti-cMYC-Antikörpern inkubiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde außerdem β -Actin (42 kDa) mit einem spezifischen Antikörper markiert. Die spezifische Bindung wurde mit POD-markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen.

Lysaten nachweisbar war, wurden für BclxL und cMYC schwache Banden detektiert (Abb. 4.17). In mit Bcl2- oder BclxL-RV transduzierten und induzierten Zellen waren die entsprechenden Proteinbanden deutlich stärker ausgeprägt als in nicht induzierten Zellen. Bei mit cmyc-RV transduzierten Zellen war die Proteinbande der induzierten Zellen nur wenig stärker im Vergleich zu nicht induzierten Zellen.

4.2.4 Co-Kultur von LIN⁻ - und OP9-Zellen

Aus den Knochenmarkszellen naiver Mäuse wurden über magnetische Sortierung LIN⁻ - Zellen isoliert. In Vorbereitung auf die Transduktion wurden die Zellen auf bestrahlten OP9-Zellen ausgesät und mit Zytokinen kultiviert. Die Färbung der fixierten Co-Kultur zeigte eine etwa 8 μ m große, runde Zelle, die sich inmitten der OP9-Zellen angesiedelt hatte (Abb. 4.18). Auf ihrer Oberfläche sind mehrere Cluster des FITC-markierten IL 7-R deutlich sichtbar. Aufgrund der Größe der Zelle und der IL 7-R-Expression könnte es sich hierbei um einen frühen Vorläufer eines B-Lymphozyten handeln.

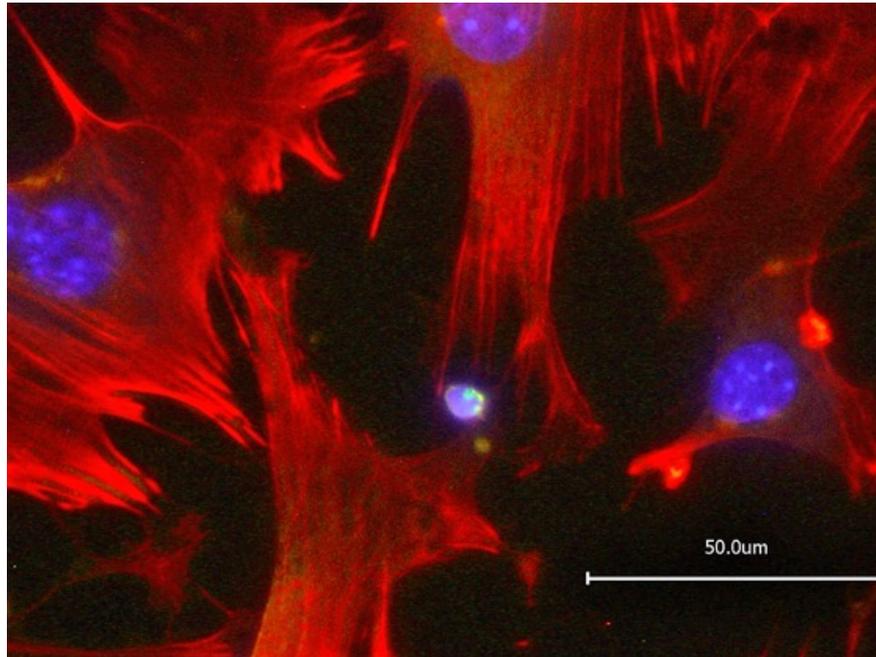


Abb. 4.18: Co-Kultur von unreifen Knochenmarkszellen mit OP9-Zellen. Die Zellen wurden auf Deckgläsern co-kultiviert, fixiert und permeabilisiert und schließlich mit Bodipy-Phalloidin, DAPI und einem FITC-markierten Anti-IL 7-R-Antikörper gefärbt. (Overlay; 0,05 – 0,11 s Belichtungszeit)

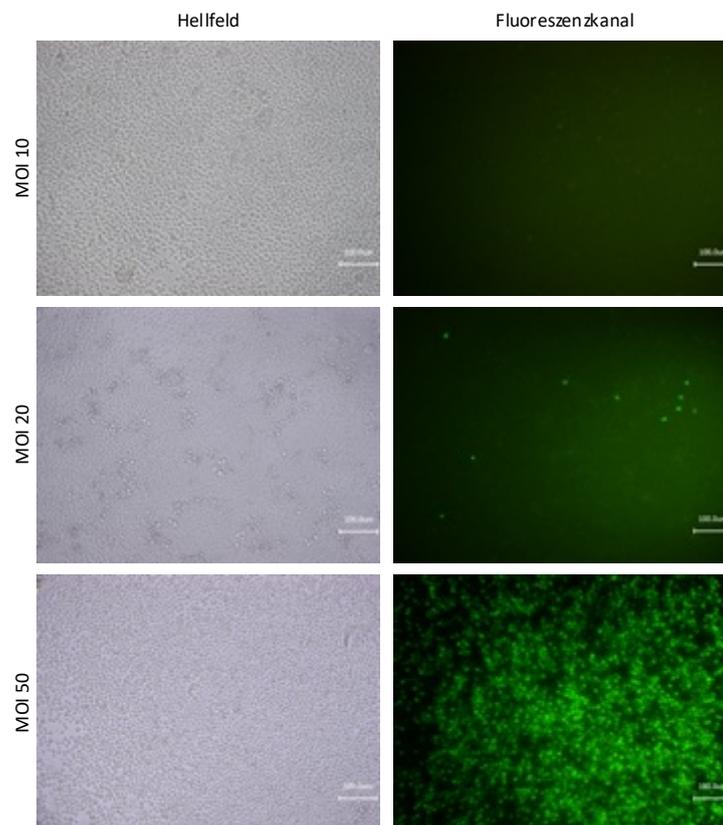


Abb. 4.19: Mikroskopische Aufnahmen von LIN-Zellen transduziert mit EGFP-RV verschiedener MOI. Die Genexpression wurde durch Zugabe von 100 ng/ml Doxycyclin induziert und 24 h nach der Zugabe am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert (0,1 s Belichtungszeit).

4.2.5 Retrovirale Transduktion von LIN⁻-Zellen

4.2.5.1 Induktion der EGFP-Expression

Unreife Knochenmarkszellen (LIN⁻) wurden mit EGFP-RV verschiedener MOI transduziert. Die EGFP-Expression wurde durch Zugabe von Doxycyclin induziert und 24 h danach mikroskopisch inspiziert. Bei einer MOI von 50 exprimieren etwa 70 % der Zellen EGFP (Abb. 4.19). Bei geringeren MOI war nur bei vereinzelt Zellen EGFP-Expression ersichtlich.

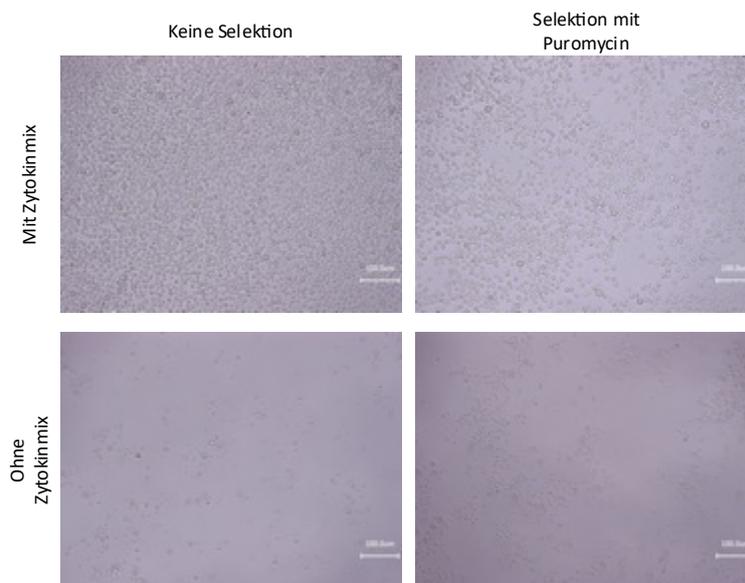


Abb. 4.20: Lichtmikroskopische Aufnahmen von LIN⁻-Zellen transduziert mit Bcl2-RV (MOI 100). Die Genexpression wurde durch Zugabe von 100 ng/ml Doxycyclin induziert. Die Zellen wurden mit oder ohne 0,5 μ g/ml Puromycin bzw. 5 ng/ml IL 7, 25 ng/ml Flt3-L und 50 ng/ml SCF kultiviert. Vier Tage nach der Geninduktion waren in Ansätzen ohne Zytokine keine lebenden Zellen zu sehen. In Ansätzen mit Puromycin waren etwa 50 % weniger lebende Zellen als in nicht-selektierten Ansätzen.

4.2.5.2 Langzeit-Kultivierung transduzierter Zellen

LIN⁻-Zellen wurden mit NUP98HOXB4-, Bcl2-, BclxL- oder cmyc-RV verschiedener MOI (20, 50, 100, 200) transduziert. Die Expression der eingebrachten Gene wurde durch ständige Zugabe von Doxycyclin induziert. In verschiedenen Ansätzen wurden die Zellen außerdem mit oder ohne Zytokine (IL 7, Flt3-L, SCF) und OP9-Zellen kultiviert und/oder mit Puromycin selektiert.

In keinem der transduzierten Ansätze ermöglichte die Induktion der Genexpression allein eine Kultivierung über die Lebensdauer unveränderter Zellen hinaus, sodass bei mikroskopischer Betrachtung nach 3-5 Tagen keine lebenden Zellen zu sehen waren

(Abb. 4.20). Die Zugabe der Zytokine erlaubte eine verlängerte Kultivierung der LIN-Zellen unabhängig von der angewendeten MOI und vom eingesetzten Retrovirus. Über einen Zeitraum von bis zu sechs Wochen konnten die Zellen kultiviert werden, wobei die Zellzahlen zunächst etwa gleich blieben und nach drei Wochen abnahmen. Aus keinem der transduzierten Ansätze konnte bisher eine Zelllinie oder eine Langzeit-Kultur über sechs Wochen hinaus etabliert werden.

4.3 *In vitro* Immunisierung zur Herstellung monoklonaler Antikörper

Das zuvor etablierte Protokoll zur *In vitro* Immunisierung muriner B-Lymphozyten (Abb. 4.9) wurde im Folgenden auf verschiedene Antigen-Typen angewandt. Die stimulierten B-Lymphozyten wurden für die Fusion mit Myelomzellen zur Herstellung monoklonaler Antikörper eingesetzt.

4.3.1 Antikörperantwort gegen VP1 und elektrochemische Fusion

Nach zehntägiger *In vitro* Immunisierung mit VP1 wurde der Kulturüberstand der B-Lymphozyten auf VP1-spezifische IgG-Antikörper getestet (Abb. 4.21). Im Vergleich zum unstimulierten Ansatz wurden in allen mit Antigen stimulierten Ansätzen erhöhte Signale für Antigen-spezifische IgG-Antikörper detektiert.

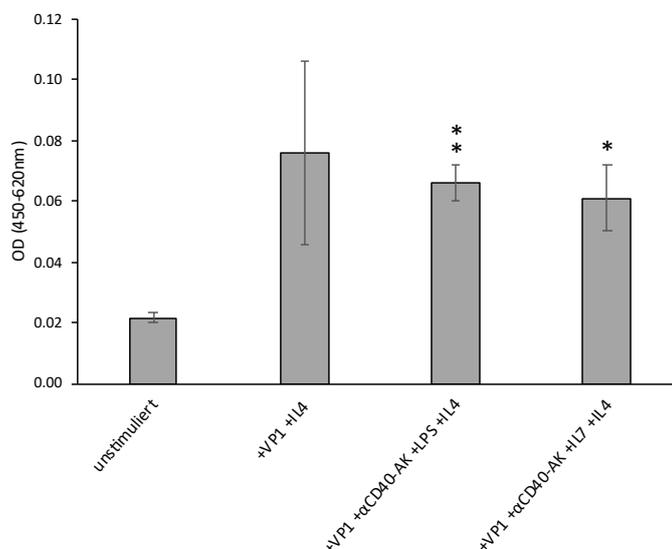


Abb. 4.21: Antikörperantwort gegen VP1. Kulturüberstände *in vitro* immunisierter B-Lymphozyten wurden im ELISA auf VP1-spezifische IgG-Antikörper getestet. Im Vergleich zum unstimulierten Ansatz zeigten die mit LPS oder IL 7 stimulierten Ansätze signifikant höhere Signale (n = 2; p < 0,05: *, p < 0,01: **). (AK: Antikörper)

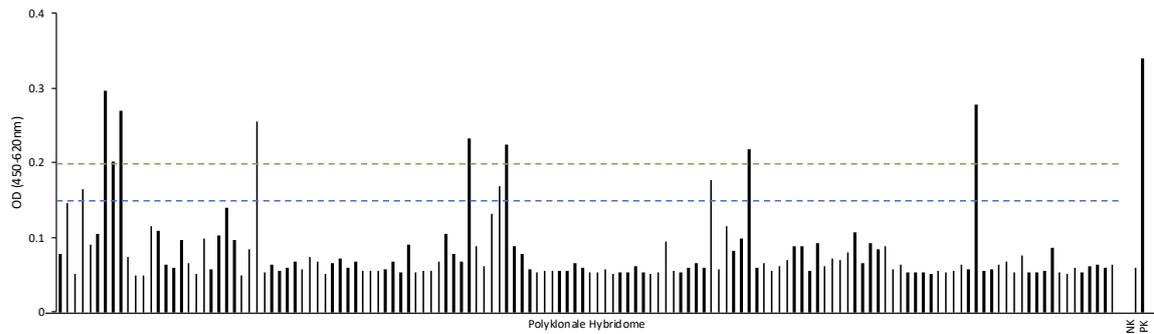


Abb. 4.22: Polyklonale VP1-spezifische IgG-Antikörper. Die Kulturüberstände polyklonaler Hybridome wurden im ELISA auf VP1-spezifische IgG-Antikörper getestet. Als Positivkontrolle (PK) wurde der VP1-spezifische P157 ($5\mu\text{g/ml}$) eingesetzt. Als Negativkontrolle (NK) wurde das Blockmittel PBS/NKS verwendet.

Die B-Lymphozyten aus mit VP1, Anti-CD40-Antikörpern, IL 4 und LPS oder IL 7 stimulierten Ansätzen wurden mit murinen Myelomzellen fusioniert. Es wurden $5,6 \times 10^6$ der immunisierten B-Lymphozyten für die Fusion eingesetzt. Die fusionierten Zellen wurden auf 96 Well-Platten mit Feederzellen ausgesät und nach 14-tägiger HAT-Selektion lichtmikroskopisch untersucht. In 122 der 141 ausgesäten Wells waren Hybridome vorhanden. Drei Wochen nach der Fusion wurden die Kulturüberstände im ELISA auf VP1-spezifische IgG-Antikörper getestet. Dabei zeigten drei der getesteten Wells ein leicht positives Signal ($0,15 < \text{OD}_{450\text{nm}} < 0,2$) und acht ein deutlich positives Signal ($\text{OD}_{450\text{nm}} > 0,2$) (Abb. 4.22). Die Hybridome dieser Wells wurden im weiteren Verlauf rekloniert und erweitert.

4.3.2 Antikörperantwort gegen VP1-Mip und elektrochemische Fusion

Murine B-Lymphozyten wurden mit einem VP1-basierten Carrier-Protein immunisiert (Gedvilaite et al., 2000). Dazu wurde ein modifiziertes VP1-Konstrukt verwendet, das an seiner Oberfläche ein 12 Aminosäuren langes Peptid des Membranproteins Mip (*Macrophage Infectivity Potentiator*) (Helbig et al., 2001) aus *L. pneumophila* trägt. Der Kulturüberstand der so immunisierten Zellen wurde nach 10 Tagen *In vitro* Immunisierung auf spezifische IgG-Antikörper gegen VP1-Mip und Mip getestet (Abb. 4.23). Im Vergleich zum unstimulierten Ansatz wurden in allen mit Antigen stimulierten Ansätzen erhöhte

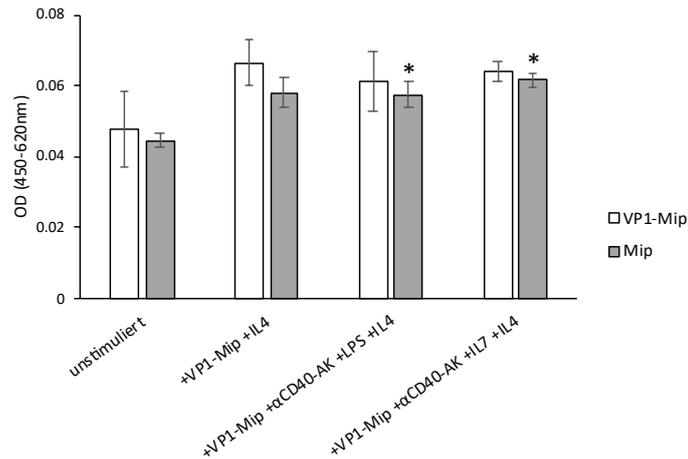


Abb. 4.23: Antikörperantwort gegen VP1-Mip. Kulturüberstände *in vitro* immunisierter B-Lymphozyten wurden im ELISA auf spezifische IgG-Antikörper gegen VP1-Mip und Mip getestet. B-Lymphozyten aus naiven Mäusen wurden wie zuvor *in vitro* immunisiert mit dem Antigen VP1-Mip, das eine Peptidsequenz des Mip-Proteins enthält. Im Vergleich zum unstimulierten Ansatz zeigten stimulierte Ansätze leicht erhöhte Signale, wobei Signale gegen VP1-Mip etwas stärker als gegen Mip allein ausfielen. Die signifikanten Unterschiede beziehen sich auf den unstimulierten Kontrollansatz (n = 2; p < 0,05: *). (AK: Antikörper)

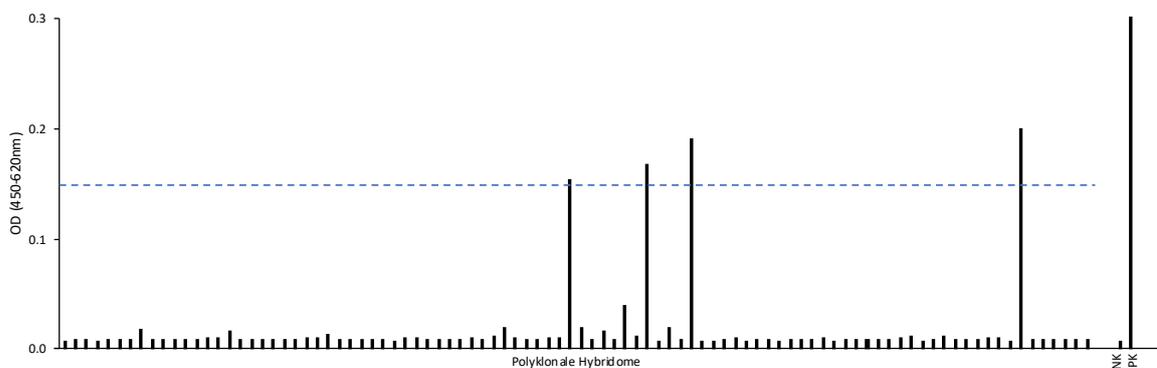


Abb. 4.24: Polyklonale Mip-spezifische IgG-Antikörper. Die Kulturüberstände der Hybridome aus der VP1-Mip-Fusion wurden im ELISA auf Mip-spezifische IgG-Antikörper getestet. Als Positivkontrolle (PK) wurde das Antigen mit SAV-POD nachgewiesen. Als Negativkontrolle (NK) wurde das Blockmittel PBS/NKS statt eines Primärantikörpers eingesetzt.

Signale für spezifische IgG-Antikörper sowohl gegen VP1-Mip als auch gegen Mip detektiert. Dabei war die Signalstärke gegen Mip etwas geringer als gegen VP1-Mip und insgesamt niedrig ($OD_{450nm} < 0,1$).

Im Anschluss an die *In vitro* Immunisierung mit VP1-Mip wurden die mit VP1-Mip, Anti-CD40-Antikörpern, IL 4 und LPS oder IL 7 stimulierten Ansätze mit murinen Myelomzellen fusioniert. Dazu wurden $1,8 \times 10^6$ *in vitro* immunisierte B-Lymphozyten eingesetzt. Die

fusionierten Zellen wurden in Co-Kultur mit Feederzellen auf einer 96 Well-Platte ausgesät. Nach 14-tägiger HAT-Selektion wurden bei lichtmikroskopischer Untersuchung in allen der 94 ausgesäten Wells lebende Hybridomzellen festgestellt. Drei Wochen nach der Fusion wurden die Kulturüberstände im ELISA auf Mip-spezifische IgG-Antikörper getestet. Dabei zeigten vier der getesteten Wells ein leicht positives Signal ($OD_{450nm} > 0,15$) (Abb. 4.24). Die Hybridome dieser vier Wells wurden im weiteren Verlauf rekloniert und erweitert.

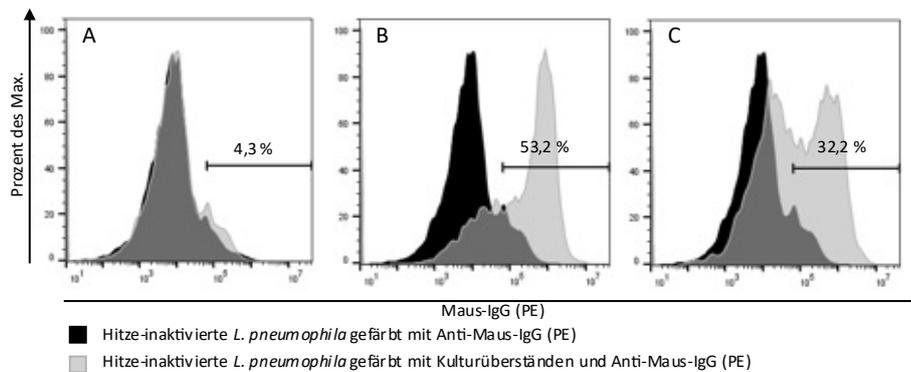


Abb. 4.25: Antikörperantwort gegen *L. pneumophila*. Kulturüberstände *in vitro* immunisierter B-Lymphozyten wurden durchflusszytometrisch auf spezifische IgG-Antikörper getestet. B-Lymphozyten aus naiven Mäusen wurden ohne (A) und mit Hitze-inaktivierten *L. pneumophila* kultiviert, durch Zugabe von Anti-CD40-Antikörpern, IL 4 und LPS (B) oder IL 7 (C) stimuliert. Nach zehn Tagen *In vitro* Immunisierung wurden die Kulturüberstände mit Hitze-inaktivierten *L. pneumophila* inkubiert. Darin enthaltene Antikörper, die Legionellen spezifisch binden, wurden auf der Bakterienoberfläche mit einem PE-markierten Anti-Maus-IgG-Antikörper markiert.

4.3.3 Antikörperantwort gegen *L. pneumophila*

Um VP1-Mip mit Legionellen als Antigen zu vergleichen, wurden murine B-Lymphozyten mit Hitze-inaktivierten *L. pneumophila* kultiviert. Die Kulturüberstände wurden durchflusszytometrisch auf spezifische IgG-Antikörper getestet (Abb. 4.25). Dazu wurden Hitze-inaktivierte *L. pneumophila*-Bakterien mit den Kulturüberständen stimulierter und unstimulierter B-Lymphozyten inkubiert und anschließend mit einem PE-markierten Anti-Maus-IgG-Antikörper gefärbt. Die Kulturüberstände der Ansätze, die mit Antigen, Anti-CD40-Antikörpern, IL 4 und LPS oder IL 7 stimuliert worden waren, konnten in Kombination mit dem Sekundär-Antikörper die Bakterien anfärben. Somit wurden im Kulturüberstand IgG-Antikörper, die *L. pneumophila*-Bakterien spezifisch binden und markieren, nachgewiesen. Mit dem Sekundär-Antikörper allein, Kulturüberständen von nur

mit *L. pneumophila* oder nicht stimulierten Ansätzen konnten die Bakterien nicht angefärbt werden.

4.3.4 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Die *in vitro* gegen VP1 und VP1-Mip immunisierten B-Lymphozyten wurden fünf Tage nach der Restimulation, also nach zehn Tagen *in vitro* Stimulation mit murinen Myelomzellen fusioniert. Die Ausbeute an Hybridomen aus stimulierten B-Lymphozyten war stets sehr hoch. Nach erfolgter HAT-Selektion wurden durch Reklonierung in Kombination mit wiederholten Tests auf spezifische IgG-Antikörper-Produktion mehrere monoklonale, IgG-produzierende Hybridome identifiziert und erweitert. Aus den gesammelten Kulturüberständen wurden Antikörper affinitätschromatographisch gereinigt, die im Folgenden charakterisiert wurden.

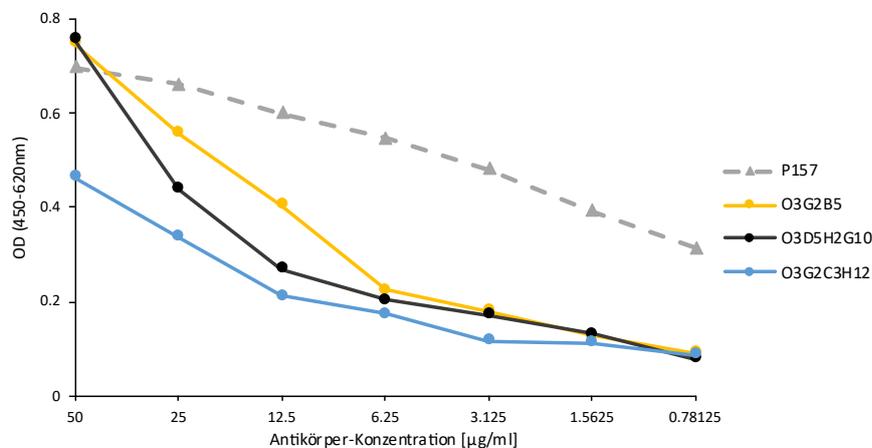


Abb. 4.26: Monoklonale Antikörper gegen VP1. Monoklonale Antikörper wurden aus dem Kulturüberstand gereinigt und im ELISA gegen das eingesetzte Antigen VP1 getestet. Die Antikörper wurden in Konzentrationen von 50 bis 0,78125 µg/ml eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Antikörper O3G2B5, O3D5H2G10, O3G2C3H12 und einen Anti-VP1-Antikörper aus konventioneller *in vivo* Immunisierung (P157). Die Signale des P157 sind in fast allen Konzentrationen höher als die der Antikörper aus der *In vitro* Immunisierung, von denen der Antikörper O3G2B5 die stärksten Signale zeigt.

4.3.4.1 Monoklonale Antikörper gegen VP1

Aus der Fusion von *in vitro* mit VP1 immunisierten B-Lymphozyten gingen die Hybridomzelllinien O3G2B5, O3D5H2G10 und O3G2C3H12 hervor, von denen jeweils 500 ml Kulturüberstand gesammelt und affinitätschromatographisch über eine Protein A-Sepharose-Säule gereinigt wurden. Daraus gingen 6,5 mg, 8,3 mg und 2,9 mg gereinigten

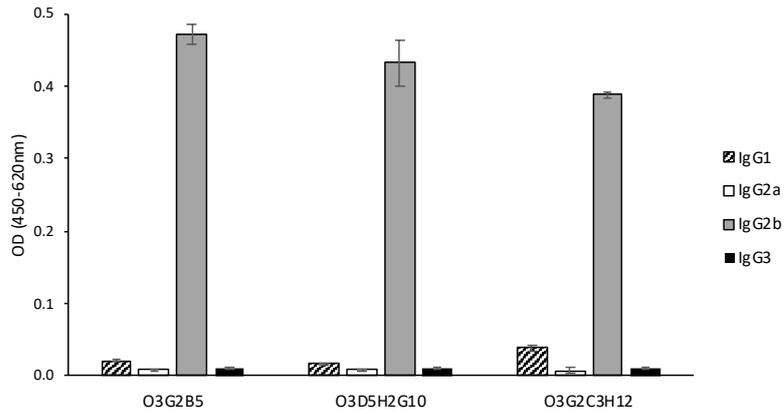


Abb. 4.27: Subklasse der VP1-spezifischen Antikörper. Der Nachweis erfolgte im ELISA über Subklassen-spezifische, Biotin-markierte Antikörper in Kombination mit SAV-konjugierter POD. Alle generierten Anti-VP1-Antikörper wurden als IgG2b-Antikörper identifiziert.

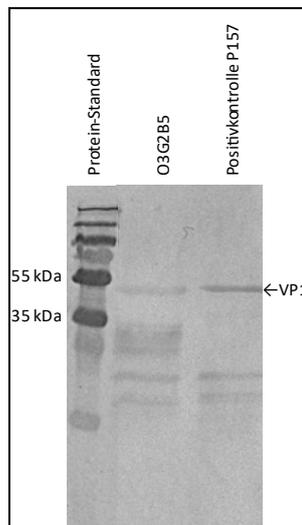


Abb. 4.28: O3G2B5 im Western Blot. Das auf eine Nitrocellulosemembran transferierte Antigen VP1 (15 μg) wurde mit dem gereinigten Antikörper O3G2B5 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. dem Anti-VP1-Antikörper P157 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Die spezifische Bindung der Antikörper wurde mit einem POD-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen.

Antikörpers hervor. Alle gereinigten Antikörper erzielten im ELISA gegen VP1 bei einer Konzentration von 6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine $\text{OD}_{450\text{nm}}$ über 0,2 (Abb. 4.26). Der VP1-spezifische IgG1-Antikörper P157, der mit konventioneller *in vivo* Immunisierung hergestellt wurde, erzielte vergleichsweise in derselben Konzentration eine $\text{OD}_{450\text{nm}}$ von über 0,5. Alle drei Antikörper konnten im Subklassentest als IgG2b-Antikörper identifiziert werden (Abb. 4.27). Der Antikörper O3G2B5 wurde darüber hinaus im Western Blot untersucht und konnte das denaturierte Antigen spezifisch nachweisen (Abb. 4.28).

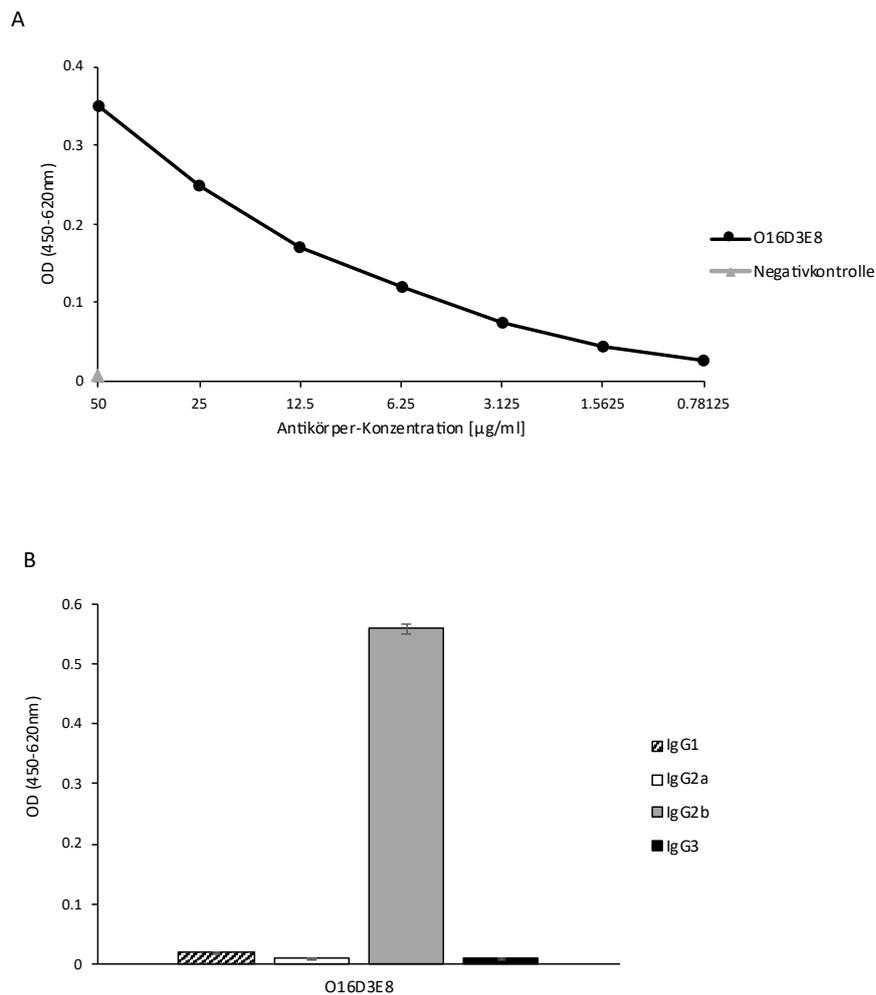


Abb. 4.29: Monoklonale Antikörper gegen Mip. IgG-Antikörper wurden aus dem Kulturüberstand des monoklonalen Hybridoms aus der *In vitro* Immunisierung mit VP1-Mip gereinigt. Der gereinigte Antikörper O16D3E8 wurde als IgG2b-Antikörper identifiziert (B) und im ELISA in Konzentrationen von 50 bis 0,78125 µg/ml gegen rekombinantes Mip getestet (A).

4.3.4.2 Monoklonale Antikörper gegen Mip

Aus der Fusion von *in vitro* mit VP1-Mip immunisierten B-Lymphozyten ging die monoklonale Hybridomzelllinie O16D3E8 hervor, von der 500 ml Kulturüberstand gesammelt wurden. Aus der Affinitätschromatographischen Reinigung über eine Protein A-Sepharose-Säule gingen 5,2 mg des monoklonalen Antikörpers O16D3E8 hervor. Der gereinigte Antikörper wurde im Subklassentest als IgG2b-Antikörper identifiziert (Abb. 4.29 B). Im ELISA gegen das Legionellen-Membranprotein Mip erzielte der

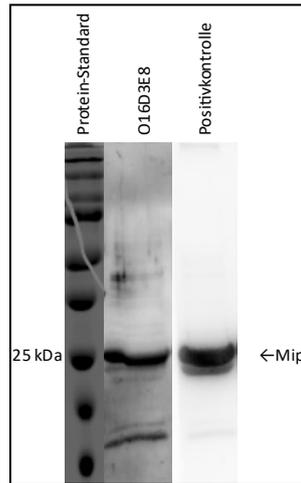


Abb. 4.30: O16D3E8 im Western Blot. Das auf eine Nitrocellulosemembran transferierte Antigen Mip (15 μg) wurde mit dem gereinigten Antikörper O16D3E8 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Die spezifische Bindung der Antikörper wurde mit einem POD-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen. In der Positivkontrolle wurde Mip mit SAV-POD nachgewiesen.

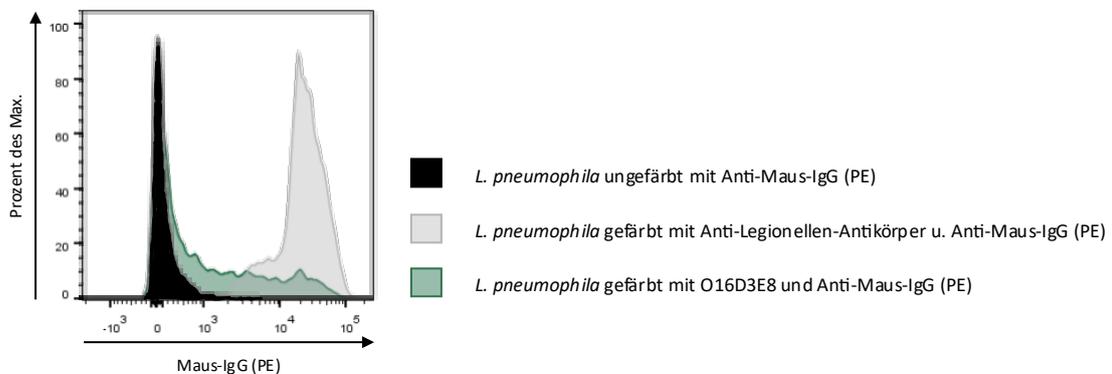


Abb. 4.31: Nachweis von Legionellen mit O16D3E8-Kulturüberstand. Der Kulturüberstand der monoklonalen Hybridomzelllinie O16D3E8 wurde im Durchflusszytometer auf spezifische Bindung an Legionellen getestet. Der Kulturüberstand wurde mit Hitze-inaktivierten *L. pneumophila* inkubiert. Darin enthaltene Antikörper, die Legionellen spezifisch binden, wurden auf der Bakterienoberfläche mit einem PE-markierten Anti-Maus-IgG-Antikörper markiert.

Antikörper in einer Konzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine $\text{OD}_{450\text{nm}} > 0,2$ (Abb 4.29 A). Im Western Blot wurde ebenfalls die spezifische Bindung an die denaturierte Form des Proteins nachgewiesen (Abb. 4.30). Bei dem Versuch, Legionellen selbst mit dem Antikörper zu markieren durch spezifische Bindung an das Membran-ständige Mip, konnte in der durchflusszytometrischen Analyse im Vergleich zu einem kommerziellen, polyklonalen Anti-Legionellen-Antikörper nur ein schwach positives Signal erzielt werden (Abb. 4.31).

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen zur Verbesserung einer murinen *In vitro* Immunisierung zur Herstellung von Antikörpern.

Bei der konventionellen Herstellung von Antikörpern mittels Hybridomtechnologie werden Versuchstiere über einen längeren Zeitraum wiederholt mit einem Antigen und Adjuvantien immunisiert, um eine Immunreaktion auszulösen. Die Tiere werden zur Entnahme der Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten geopfert, die anschließend mit Myelomzellen zu immortalen Hybridomzellen fusioniert werden. Bei einer *In vitro* Immunisierung wird die Antikörper-Antwort außerhalb des Organismus in isolierten Zellen induziert. Das Tierleiden und der Zeitaufwand für die Immunisierung werden dabei erheblich reduziert, die Immunreaktion findet in einem kontrollierbaren Umfeld statt. Im Organismus resultiert die Antikörperantwort aus der Interaktion von dendritischen Zellen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Dieses komplexe Zusammenspiel lässt sich in einem *in vitro* Umfeld nur bedingt nachahmen und kontrollieren.

In dieser Arbeit wurde eine vereinfachte Form der *In vitro* Immunisierung etabliert, bei der B-Lymphozyten ohne das Zutun anderer Immunzellen aktiviert und zur Produktion spezifischer Antikörper angeregt werden. Dazu wurden B-Lymphozyten aus naiven Mäusen isoliert, charakterisiert und unter dem Einfluss verschiedener Stimulantien kultiviert, die die *in vivo* Bedingungen der Antigen-spezifischen Aktivierung imitieren sollten. Die Aktivierung der B-Lymphozyten wurde anhand ihrer Oberflächenmarker und in Proliferationsassays bestätigt. Mit der etablierten Methodik konnte eine spezifische Antikörperantwort gegen das Modellantigen VP1 sowie gegen zwei weitere Antigentypen *in vitro* induziert werden. Aus anschließend durchgeführten Zellfusionen gingen mehrere Hybridomzelllinien hervor, die Antigen-spezifische IgG-Antikörper produzierten.

Versuchstiere sind auch für eine *In vitro* Immunisierung nicht verzichtbar und werden für die Isolation der Immunzellen benötigt. Eine Lymphozyten-Zelllinie, deren Zellen zu Antikörper-produzierenden Zellen herangereift werden können, würde die hier etablierte *In*

in vitro Immunisierung zu einer Methode der Antikörper-Herstellung ergänzen, die gänzlich ohne Versuchstiere auskommt. Für die Herstellung einer solchen Zelllinie wurden virale Konstrukte mit verschiedenen Onkogenen zur Immortalisierung von Lymphozyten generiert. Die Funktionalität der hergestellten Retroviren wurde anhand einer Testzelllinie belegt. Aus der Anwendung an den eigentlichen Zielzellen gingen jedoch bisher keine geeigneten Zelllinien hervor.

5.1 Etablierung der *In vitro* Immunisierung

Die *In vitro* Immunisierung bietet eine Alternative zu bisherigen Herstellungsverfahren monoklonaler Antikörper. Bei der konventionellen Immunisierung *in vivo* kann das Erzielen einer ausreichenden Immunantwort bis zu mehrere Monate in Anspruch nehmen. Die dabei im Tier ablaufende Immunreaktion ist von außen nicht zu regulieren und variiert bei Individuen und Antigenen. Neben der Immunisierung sind auch die Immunreaktion und die wiederholten Blutabnahmen Stress- und Leid-behaftete Prozeduren für das Versuchstier. Das Spektrum anwendbarer Antigene ist limitiert, da einige zu toxisch, andere nicht hinreichend immunogen sind und keine Antikörperantwort gegen körpereigene Antigene induziert werden kann.

Auch das Phagendisplay zur Herstellung monoklonaler Antikörper, bei dem Antikörperfragmente integriert in Phagen selektiert werden, beruht auf der Verwendung von immunisierten oder naiven Versuchstieren. Die Antikörpergene werden für die initiale Erstellung einer Phagenbibliothek benötigt, deren Umfang maßgeblich die Affinität der resultierenden Binder bedingt (Perelson & Oster, 1979). Für naive Banken müssen dementsprechend mehr Versuchstiere eingesetzt, für Immunbanken für jedes Antigen theoretisch erneut Immunisierungen durchgeführt werden (Ledsgaard et al., 2018). Binder aus naiven Banken durchlaufen keine Affinitätsreifung und sind deshalb häufig weniger affin (Bradbury & Marks, 2004; de Bruin et al., 1999). Um schließlich vollständige und stabile Antikörper zu generieren, bedarf es zudem der Expression der entsprechend adaptierten Gene in Säugerzellen, was zeitaufwendig und mitunter mit Einbußen bei der Antikörperaffinität verbunden ist (Steinwand et al., 2014).

Die *In vitro* Immunisierung bietet zu diesen etablierten Methoden eine Alternative, bei der der potenzielle Stress für die Versuchstiere auf ein Minimum reduziert wird. Die *in vitro* immunisierten B-Lymphozyten können schließlich direkt mit Myelomzellen zu Antikörperproduzierenden Hybridomen fusioniert oder als Quelle für Antikörpergene im

Phagendisplay verwendet werden, wie es für humane Zellen bereits gezeigt wurde (Jung et al., 2008; Tong et al., 2019).

5.1.1 Verwendung von B-Lymphozyten

In bisher veröffentlichten Studien zur murinen *In vitro* Immunisierung wurden ausschließlich gemischte Zellpopulationen eingesetzt, wobei bis auf wenige Ausnahmen undifferenzierte Splenozyten verwendet wurden (z.B. Inagaki et al., 2013; Ravi et al., 2007). Kato et al. (2012) und Hanyu et al. (2019) nutzten für ihre Untersuchungen CD8⁻ CD49b⁻ Splenozyten, Wohlleben et al. (1996) nutzten CD90⁻ Splenozyten und Wand et al. (2011) setzten eine Kombination aus *in vitro* differenzierten dendritischen Zellen, gereinigten T- und B-Lymphozyten ein. Viele der vorangegangenen Studien konnten keine IgG-Antikörper oder produktive Hybridomzelllinien hervorbringen (Kim et al., 2001; Treanor et al., 1988; Wohlleben et al., 1996). Für die Induktion einer spezifischen Antikörperantwort *in vitro* ist die effektive und spezifische Aktivierung der B-Lymphozyten unabdingbar. Die Aktivierung der B-Lymphozyten in Abhängigkeit von dendritischen Zellen und T-Lymphozyten setzt voraus, dass diese ebenfalls hinreichend aktiviert und Antigen-spezifisch sind. Variable Zusammensetzungen der Zellpopulationen, ungleiche Aktivierung und Spezifität resultieren in inkonsistenten Ergebnissen und schlechter Reproduzierbarkeit. Um diese unkontrollierbaren Aspekte auszuschließen und eine gezielte und spezifische Aktivierung der B-Lymphozyten zu gewährleisten, wurden für die hier etablierte *In vitro* Immunisierung ausschließlich B-Lymphozyten eingesetzt.

Die Zellen wurden über eine magnetische Sortierung isoliert und die Reinheit durchflusszytometrisch geprüft. Der Anteil an B-Lymphozyten lag stets bei über 95 % und es konnten keine Zellen mit spezifischen Markern von dendritischen Zellen oder T-Lymphozyten detektiert werden, sodass der Einfluss anderer Immunzellen ausgeschlossen werden kann. Die isolierten B-Lymphozyten wurden anhand ihrer Oberflächenmarker als Marginalzonen- (26 %) und folliculäre B-Lymphozyten (68 %) charakterisiert. Die beiden Zelltypen besiedeln unterschiedliche Kompartimente der Milz und sind in der Lage Antikörper zu produzieren. Folliculäre B-Lymphozyten werden in Abhängigkeit von T-Lymphozyten aktiviert und sind wesentlicher Produzent von IgG-Antikörpern in der Milz. Marginalzonen-B-Lymphozyten andererseits reagieren vornehmlich auf T-Zell-unabhängige Antigene und produzieren IgM-Antikörper, können aber ebenfalls durch T-Lymphozyten aktiviert IgG-Antikörper sezernieren (Garraud et al., 2012).

5.1.2 Einfluss verschiedener Stimuli auf *in vitro* kultivierte B-Lymphozyten

Im Organismus werden B-Lymphozyten durch aktivierte T-Lymphozyten und durch den Kontakt zum auf dendritischen Zellen präsentierten Antigen aktiviert. Mit dem T-Zell-Rezeptor erkennen die T-Lymphozyten das auf der Zelloberfläche der B-Lymphozyten präsentierte Peptid, sodass räumliche Nähe zwischen passenden Lymphozyten entsteht. Die T-Lymphozyten senden dann Aktivierungssignale aus, maßgeblich in Form von Zytokinen (IL 4, IL 5, IL 6, IL 10, IFN γ , *Transforming Growth Factor β*) und durch den Kontakt über den auf ihrer Oberfläche exprimierten CD40L (Foy et al., 1993; Murphy et al., 2018). Diese Signale induzieren die Proliferation und Mechanismen zur Antikörperreifung in den B-Lymphozyten.

Diese *in vivo* durch T-Lymphozyten vermittelten Aktivierungssignale sollten durch eine Reihe verschiedener Immunomodulatoren imitiert werden. Die Funktion der dendritischen Zellen sollte durch einen Überschuss an Antigen in der Stimulationskultur ersetzt werden. Neben rekombinanten Zytokinen und einem löslichen Anti-CD40-Antikörper wurde LPS als Stimulus eingesetzt. LPS induziert über Bindung an den *Toll-Like Receptor 4* auf B-Lymphozyten intrazelluläre Mechanismen zur Aktivierung und zum Subklassenwechsel der Antikörper (Stavnezer et al., 2008). Als Modellantigen wurde VP1 verwendet (Gedvilaite et al., 2000).

Die Stimulation der Zellen erfolgte zunächst für insgesamt sieben Tage mit einer Restimulation nach fünf Tagen. In unstimulierten Ansätzen fiel die Antikörperantwort signifikant geringer aus als in Ansätzen mit artifiziellen Aktivierungssignalen. Spezifische IgM-Antikörper konnten vor allem in Stimulationskulturen mit LPS oder IL 7 detektiert werden, während die Produktion spezifischer IgG-Antikörper nach siebentägiger Stimulation in keinem der Ansätze signifikant höher als in der unstimulierten Kontrolle war. Es konnte kein entscheidender Einfluss von IL 4 auf die Produktion spezifischer Antikörper festgestellt werden. IL 4 spielt in der *in vivo* Immunreaktion eine wesentliche Rolle bei der Induktion einer IgG-Antwort und wurde in vielen der bisher publizierten murinen *In vitro* Immunisierungen eingesetzt (Hanyu et al., 2019; Inagaki et al., 2013; Kato et al., 2012). Bei humanen *In vitro* Immunisierungen ist die Ergebnislage für einen nachweislichen Effekt von IL 4 kontrovers. Antigen-spezifische IgG-Antworten wurden sowohl in Anwesenheit von IL 4 induziert (Brams et al., 1993; Tamura et al., 2007) als auch in dessen Abwesenheit (Sanjuan Nandin et al., 2017; Tong et al., 2019). Ait Mebarek et al. (2013) konnten keinen

vorteilhaften Einfluss des Zytokins nachweisen. Ichikawa et al. (1999) kamen zu variierenden Ergebnissen in Abhängigkeit von Antigen und Spender der Zellen.

5.1.3 Spezifische Antikörperproduktion im zeitlichen Verlauf

Die spezifische IgG-Produktion war nach sieben Tagen *In vitro* Immunisierung allenfalls marginal erhöht in Ansätzen, die mit LPS oder IL 7 stimuliert wurden. Im Organismus werden dem erstmaligen Antigenkontakt folgend zunächst nur IgM-Antikörper von aktivierten B-Lymphozyten sezerniert. Der Subklassenwechsel zu IgG- oder anderen Antikörpern erfolgt mit zunehmender Aktivierung der B-Lymphozyten, sodass die IgG-Produktion später einsetzt. Dieser Logik folgend wurde in einer Zeitreihe die Produktion spezifischer IgM- und IgG-Antikörper täglich kontrolliert, um den Verlauf des Subklassenwechsels zu determinieren und zum Zeitpunkt der Fusion eine optimale Ausbeute an IgG-Produzenten in der Kultur vorliegen zu haben.

Während spezifische IgM-Antikörper bereits nach drei Tagen *In vitro* Immunisierung nachweisbar waren, konnten spezifische IgG-Antikörper erst nach neun Tagen detektiert werden. Da die Produktion unspezifischer IgM- und IgG-Antikörper bereits nach sieben Tagen gleichermaßen hoch ausfiel, ist anzunehmen, dass die hier einsetzende spezifische IgG-Produktion tatsächlich aus der Aktivierung Antigen-spezifischer B-Lymphozyten resultiert, in denen der Subklassenwechsel induziert wurde. Auch *in vivo* konnte der Subklassenwechsel in Mäusen bereits sechs bis acht Tage nach der Immunisierung nachgewiesen werden (Jacob et al., 1991). Eine *In vitro* Immunisierung über mindestens neun Tage ist demnach vorteilhaft, um den Anteil an IgG-Produzenten zu erhöhen.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass eine spezifische Antikörperantwort in einer reinen B-Lymphozytenkultur und ebenso der Subklassenwechsel der Antikörper *in vitro* induziert werden können. Einige Antigene sind in der Lage, B-Lymphozyten unabhängig von T-Lymphozyten zu aktivieren. Diese tragen entweder repetitive Epitope auf ihrer Oberfläche (in der Regel Polysaccharide) oder wirken intrinsisch aktivierend auf B-Lymphozyten (Mosier & Subbarao, 1982). In beiden Fällen resultiert diese Aktivierung meist in der Produktion wenig affiner IgM-Antikörper. Da hier eine IgG-Antwort induziert werden konnte, ist anzunehmen, dass die eingesetzten Stimuli die Aktivierungssignale von T-Lymphozyten und dendritischen Zellen hinreichend nachahmen konnten und die hier beobachtete Aktivierung einer T-Zell-abhängigen Aktivierung gleichkommt. Während der *in vivo* Immunreaktion werden B-Lymphozyten auch durch dendritische Zellen aktiviert, die durch das Präsentieren des Antigens auf ihrer Zelloberfläche die Aktivierung der B-

Lymphozyten und die Antikörperreifung induzieren (Wykes et al., 1998). B-Lymphozyten funktionieren selbst als Antigen-präsentierende Zellen und könnten womöglich so gegenseitig zu ihrer Aktivierung beitragen. In diesem Fall muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden, ob Antikörperproduktion und Antigenpräsentation durch unterschiedliche Subklassen von B-Lymphozyten realisiert werden. Ob oder welche Subklassen so funktionieren, ist unklar (Chen & Jensen, 2008; den Haan et al., 2014).

5.2 Charakterisierung der aktivierten B-Lymphozyten

Die Aktivierung der B-Lymphozyten geht mit rapider Proliferation und mit Veränderungen der Morphologie und im Expressionsmuster der Oberflächenmarker einher. Dass aus bisherigen Ansätzen zur murinen *In vitro* Immunisierung häufig keine spezifischen IgG-Antikörper hervorgingen, ist vermutlich auch auf unzureichende Aktivierung der eingesetzten Immunzellen zurückzuführen. Der Nachweis derselben ist deshalb bedeutsam. Die Proliferation der Zellen wurde anhand einer CFSE-Färbung und der Zu- und Abnahme der absoluten Zellzahlen untersucht. Unstimulierte Ansätze oder solche, die nur mit dem Antigen stimuliert wurden, zeigten eine geringe Vitalität und konnten nur wenige Tage kultiviert werden. Wenngleich B-Lymphozyten, die mit Antigen allein kultiviert wurden, nach zehn Tagen spezifische IgG-Signale vergleichbar mit denen aus stimulierten Ansätzen hervorbrachten, war die Vitalität und Zahl der Zellen zu gering, um für die Zellfusion mit Myelomzellen eingesetzt zu werden. In stimulierten Ansätzen proliferierten B-Lymphozyten etwa zehn Tage lang bei abnehmender Zellvitalität ab dem siebten Tag. Diese Beobachtung determinierte somit den Zeitpunkt für die Fusion zur Herstellung von Hybridomzelllinien auf den zehnten Tag der *In vitro* Immunisierung, um bei möglichst guter Zellvitalität gleichzeitig einen hohen Anteil an IgG-produzierenden B-Lymphozyten zu sichern.

Es wurden außerdem die charakteristischen Aktivierungsmarker CD80, CD86 und CD69 (Maddaly et al., 2010; Ziegler et al., 1994) auf der Zelloberfläche der stimulierten B-Lymphozyten nachgewiesen, deren Expression den aktivierten Zustand der Zellen belegt. Die im Organismus final ausgereiften und aktivierten B-Lymphozyten werden als Plasmazellen bezeichnet und tragen den charakteristischen Marker CD138. Die Expression desselben war auf den *in vitro* immunisierten Zellen leicht erhöht. Die eingesetzten Stimuli oder die Dauer der Aktivierung waren demnach nicht ausreichend, um die gesamte Population der B-Lymphozyten in Plasmazellen auszudifferenzieren. Alle B-Lymphozyten trugen nach zehn Tagen *In vitro* Immunisierung einen IgG-BZR auf der Zelloberfläche, was

theoretisch mit dem Wechsel der Antikörper-Subklasse von IgM auf IgG in diesen Zellen gleichzusetzen ist. Da jede Zelle nur eine Subklasse produzieren kann, müssten auch die sezernierten Antikörper der IgG-Subklasse angehören (Gearhart & Cebra, 1981; Nossal, 1959). Die vergleichsweise niedrigen IgG-Signale widersprechen dem. Jüngere Studien zeigen, dass B-Lymphozyten durchaus dazu in der Lage sind, verschiedene Antikörper-Subklassen zeitgleich zu produzieren (Shi et al., 2019). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

Es wurde darüber hinaus die Expression des IL 7-R auf stimulierten B-Lymphozyten untersucht. IL 7 ist im Knochenmark ein wichtiger Stimulus für die frühe Entwicklung von B-Lymphozyten (Corfe & Paige, 2012). Im Anschluss an die Reifung verlieren die Zellen den IL 7-R, der jedoch hier auf IL 7-stimulierten Zellen nachgewiesen wurde. In der Maus migrieren aktivierte B-Lymphozyten wenige Tage nach der Immunisierung ins Knochenmark, um dort zu Plasmazellen auszureifen, und auch in lymphatischen Organen wird IL 7 produziert (Dilosa et al., 1991; Hara et al., 2012). Dennoch wurde ein Einfluss des Zytokins während der Aktivierung und Differenzierung zu Plasmazellen bisher nicht beschrieben.

5.3 Virale Konstrukte zur Immortalisierung

Eine ideale *In vitro* Immunisierung, die auf der Verwendung von Zelllinien statt Primärzellen beruht, würde den völligen Verzicht auf Versuchstiere implizieren. Um Zellen langfristig über ihre natürliche Lebensdauer hinaus kultivieren zu können, das heißt, sie zu immortalisieren, müssen Mechanismen zur Regulation des Zellwachstums und der Proliferation umgangen werden. Durch die übermäßige Expression oder Hemmung bestimmter Gene oder solcher, die wiederum die entsprechenden Gene kontrollieren, tritt auch im Organismus unreguliertes Wachstumsverhalten von Lymphozyten auf, das sich in Form von Leukämien oder Lymphomen manifestieren kann. Für die Immortalisierung *in vitro* werden solche Gene, die als Onkogene bezeichnet werden (Huebner & Todaro, 1969), in die Zellen eingebracht und bewirken durch ihre eigene Überexpression oder indirekt durch die Beeinflussung zelleigener Gene deren Proliferationsverhalten.

Die Immortalisierung reifer B-Lymphozyten aus der Maus wurde bereits mehrfach gezeigt (z.B. Grabstein et al. 1992; Kusam et al., 2004). In diesem Fall produzieren die B-Lymphozyten ausschließlich einen bestimmten Antikörper und sind für eine Immunisierung ungeeignet. Für die hier vorgestellte *In vitro* Immunisierung bedarf es einer permanenten

Zelllinie, die einem früheren Entwicklungsstadium von B-Lymphozyten entstammt und zu B-Lymphozyten mit verschiedenen Spezifitäten ausgereift werden kann. In der Literatur sind eine Reihe von Zelllinien aus B-Lymphozyten-Vorläufern beschrieben, die der Untersuchung von Krankheitsbildern oder Entwicklungsvorgängen dienen (z.B. Doma et al., 2021; Konjaeva et al., 2020). Ihre Herstellung erfolgte durch Virus-basierten Gentransfer verschiedenster Onkogene in unterschiedliche Zellstadien der B-Lymphozyten-Entwicklung. Einige dieser Zelllinien konnten in den Organismus eingesetzt erfolgreich zu normalen Lymphozyten heranreifen (Doma et al., 2021; Lu et al., 1996; Redecke et al., 2013). So weit bekannt, konnte keine dieser Zelllinien *in vitro* reife, funktionale B-Lymphozyten hervorbringen. Die Entwicklung der B-Lymphozyten ist auch *in vivo* ein sensibler Prozess, der vom Zusammenspiel vieler intra- und extrazellulärer Faktoren abhängt und bei geringen Normabweichungen zum Erliegen kommt (Bain et al., 1994; Dengler et al., 2008; Egawa et al., 2001; Lin & Grosschedl, 1995; Lukin et al., 2010; Melchers, 2015).

5.3.1 Herstellung und Prüfung der retroviralen Konstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst fünf Vektoren mit je einem von vier Onkogenen bzw. dem *EGFP*-Gen unter der Kontrolle eines Doxycyclin-induzierbaren Promoters hergestellt. Zur Virusproduktion wurden die entstandenen Plasmide gemeinsam mit einem zweiten Plasmid in eine Verpackungszelllinie gebracht, die die Retroviren in den Kulturüberstand sezernierte. Für alle Konstrukte wurden großzügige Ausbeuten erzielt, die mittels qPCR quantifiziert wurden. Die erfolgreiche Transduktion einer Testzelllinie wurde durch Selektion anhand des retroviral vermittelten Selektionsmarkers nachgewiesen. Für Spezies-fremde Gene wie *EGFP* und *NUP98HOXB4* wurde der Gentransfer auf DNA-Ebene nachgewiesen. Die Expression von EGFP konnte durch Zugabe von Doxycyclin induziert und durch Entfernen desselben ausgeschaltet werden. *Bcl2*, *BclxL* und *cmyc* sind Onkogene, die auch im natürlichen Genom der Maus vorkommen. Die erfolgte Transduktion wurde deshalb indirekt anhand der Überexpression der Proteine im Western Blot nachgewiesen. Der Gentransfer der Viren in die Zellen, die Integration der Fremd-DNA ins Zellgenom und die Funktionalität der transferierten Fremdgene inklusive deren Regulierbarkeit durch Doxycyclin in der Testzelllinie konnten somit gezeigt werden.

5.3.2 Transduktion muriner Knochenmarkszellen

Um hämatopoetische Vorläuferzelllinien herzustellen, wurden unreife Knochenmarkszellen mit den generierten Retroviren behandelt. Es handelt sich dabei um eine heterogene Zellpopulation, die nicht nur B-Lymphozyten-Vorläufer enthält, dafür in größeren Zahlen verfügbar und besser zu kultivieren ist. Für die Kultivierung dieser Zellen *in vitro* wurde die Co-Kultur mit OP9-Zellen etabliert, die die natürliche Umgebung im Knochenmark nachahmen sollen (Nakano et al., 1994). Die Zielzellen wurden mit dem *EGFP*-Kontrollvektor erfolgreich transduziert und exprimierten das *EGFP*-Gen nach Doxycyclin-Gabe ohne nennenswerte Hintergrundexpression in dessen Abwesenheit.

Aus Transduktionen mit Onkogen-tragenden Retroviren gingen keine Zelllinien hervor. Eine Kultivierung über die Lebensdauer unveränderter Zellen hinaus war nur bei zusätzlicher Stimulation mit Zytokinen möglich. Eine solche Zytokin-Abhängigkeit ist auch bei Zelllinien nicht untypisch (Koniaeva et al., 2020; Wolf et al., 2017). Die gewählten Onkogene wurden bereits erfolgreich für die Herstellung solcher Zelllinien eingesetzt (Kawano et al., 2017; Ruedl et al., 2008; Wolf et al., 2017). Es ist deshalb anzunehmen, dass sie in ihren Eigenschaften für die hier angestrebte Verwendung geeignet sind und ihre Überexpression einen nachweisbaren Effekt auf das Verhalten der Zellen zeigen. Wenngleich die Transduktion an Testzellen und mit dem *EGFP*-Vektor erfolgreich war, konnte das genetische Material eventuell nicht vollständig transferiert oder integriert werden. Das *EGFP*-Gen ist im Vergleich zu den verwendeten Onkogenen deutlich kleiner, sodass der Transfer in die Zelle und die Integration der DNA in das Genom womöglich effizienter ablaufen als bei vergleichsweise größeren Genen. Es ist ebenso möglich, dass die Gene in Abhängigkeit von Doxycyclin zu gering oder zu stark exprimiert wurden und so keine oder negative Effekte auf die Zellvitalität oder -proliferation hatten. Die Effizienz der Transduktion muss deshalb untersucht, das Maß der Induktion titriert werden.

In vivo werden die Gene der schweren Antikörperkette im Pro-B-Zellstadium umgelagert, die der leichten Kette anschließend im Prä-B-Zellstadium (Hardy et al., 1991). Eine Pro-B-Zelllinie wäre demnach geeignet, um *in vitro* ein möglichst breites Spektrum von B-Lymphozyten mit verschiedenen Spezifitäten zu erzeugen. Bei Mäusen sind etwa 0,5 % der Knochenmarkszellen solche Pro-B-Zellen (Welner et al., 2005). Im Knochenmark ist das Überleben dieser Zellen abhängig von IL 7 und vom Kontakt zu den sie umgebenden Stromazellen, die in *in vitro* Versuchen durch OP9-Zellen imitiert werden können (Nakano et al., 1994). Sowohl das Überleben solcher frühen Vorläufer von B-Lymphozyten wie auch der Prozess ihrer Differenzierung in fortgeschrittene Entwicklungsstadien sind sehr sensibel

gegenüber Milieuschwankungen. Für die Herstellung und die dauerhafte Kultivierung einer entsprechenden Zelllinie wären deshalb optimale Bedingungen essenziell. Gleichmaßen müssten für die Differenzierung der Pro-B-Zelllinie ideale Bedingungen definiert werden, um zum einen möglichst große Diversität unter den zu generierenden B-Lymphozyten zu erzeugen und zum anderen deren Fortbestehen durch die regulierbare Genexpression zu sichern. Bei der Differenzierung früher Vorläuferzellen in reife, funktionale B-Lymphozyten durchlaufen die Zellen verschiedene Kontrollpunkte, die die Funktionalität der BZR sicherstellen und selbst-reaktive B-Lymphozyten eliminieren sollen (Melchers, 2015). Diese scheinen von solcher Komplexität, dass ihre Abbildung und Überwindung *in vitro* zur Schwierigkeit wird und schließlich immer wieder zur Blockade der B-Lymphozyten-Entwicklung *in vitro* führt (Barker & Verfaillie, 2000; Wolf et al., 2017; Zheng et al., 2020). So konnten beispielsweise Wolf et al. (2017) eine Prä-B-Zelllinie generieren, die *in vitro* in reife B-Lymphozyten differenziert werden konnte. Die entstandenen B-Lymphozyten jedoch befanden sich in einem nicht-reaktiven Ruhezustand und eine Antikörper-Produktion konnte nicht induziert werden. Soweit bekannt liegt demnach bisher keine geeignete B-Lymphozytenlinie vor, die für eine *In vitro* Immunisierung eingesetzt werden könnte.

5.4 *In vitro* Immunisierung gegen verschiedene Antigene

Die *In vitro* Immunisierung muriner B-Lymphozyten wurde anhand des Modellantigens VP1 etabliert. Darüber hinaus wurde die Effektivität des etablierten Protokolls an einem VP1-Konstrukt mit integriertem Fremd-Peptid und dem Bakterienstamm *L. pneumophila* als Antigen demonstriert. VP1 kann als Carrier-Protein genutzt werden, indem in seine oberflächlich exponierten Strukturen Fremd-Peptide integriert werden (Gedvilaite et al., 2000). In diesem Fall wurde ein VP1 mit einem Peptid aus dem Membranprotein Mip (Helbig et al., 2001) aus *L. pneumophila* verwendet (VP1-Mip). *In vitro* mit VP1-Mip immunisierte B-Lymphozyten gaben sowohl gegen VP1-Mip als auch gegen das vollständige Mip-Protein eine signifikante IgG-Antwort, die allerdings insgesamt gering ausfiel. Da für jeden Immunisierungsansatz nur 10^6 Zellen eingesetzt wurden, könnte eine erhöhte Zellzahl womöglich mehr spezifische Antikörper-Produzenten hervorbringen.

Die *In vitro* Immunisierung wurde außerdem mit Hitze-inaktivierten Legionellen als Antigen durchgeführt. Die Kulturüberstände der stimulierten Zellen wurden mit *L. pneumophila* inkubiert und die spezifische Bindung durchflusszytometrisch detektiert. Das Signal von Kulturüberständen aus mit LPS stimulierten Ansätzen war erwartungsgemäß hoch, da

Legionellen in ihrer äußeren Membran ebenfalls LPS tragen (Zähringer et al., 1995) und somit LPS gleichzeitig Stimulus und Antigen war. Aber auch mit IL 7 stimulierte Ansätze produzierten IgG-Antikörper, die Legionellen banden. Nach bisherigem Kenntnisstand wurde eine solche murine *In vitro* Immunisierung mit einem Mikroorganismus als Antigen noch nicht wissenschaftlich publiziert. Lediglich eine Studie, in der humane Zellen verwendet wurden, beschreibt eine *In vitro* Immunisierung mit anschließendem Phagendisplay, bei der ein Antikörper gegen *Propionibacterium acnes* generiert wurde, das auch als Adjuvans eingesetzt wird (Jung et al., 2007, 2008). Insbesondere in Anbetracht der zunehmenden Verbreitung von Antibiotikaresistenzen bei mikrobiellen Krankheitserregern steigt das Interesse an monoklonalen Antikörpern gegen Mikroorganismen als potenzielles Therapeutikum auf diesem Gebiet (Zurawski & McLendon, 2020).

Die *In vitro* Immunisierung erlaubt die Anwendung eines breiten Spektrums an Antigenen. Aus ethischer und praktischer Sicht gibt es zunächst keine Limitationen, was die Verwendung von Antigenen betrifft, die beispielsweise ein Versuchstier schwer erkranken lassen würden. Die Effektivität des etablierten Protokolls wurde für Proteinantigene, VP1-basierte Carrier-Systeme und bakterielle Mikroorganismen exemplarisch gezeigt. Da VP1 als Protein viralen Ursprungs auch adjuvante Effekte auf Immunzellen hat, muss untersucht werden, ob auch gegen andere Proteine spezifische IgG-Antworten induziert werden können. T-Lymphozyten verhindern *in vivo* die Immunreaktion und Antikörperproduktion reifer B-Lymphozyten gegen körpereigene Proteine (Gururajan et al., 2014). Da das hier entwickelte Protokoll auf der ausschließlichen Verwendung von B-Lymphozyten basiert, ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus *in vitro* keine Rolle spielt und so auch die Produktion spezifischer Antikörper gegen körpereigene Proteine möglich sein sollte. Dies bleibt zu verifizieren. Die geringe Zahl der eingesetzten Zellen je Immunisierungsansatz erlaubt theoretisch die Anwendung von bis zu 20 verschiedenen Antigenen an den B-Lymphozyten einer Maus.

5.4.1 Antikörper aus der *In vitro* Immunisierung

Die mit VP1 und VP1-Mip *in vitro* immunisierten B-Lymphozyten wurden mit murinen Myelomzellen fusioniert. In beiden Fusionen war die Ausbeute an lebensfähigen Hybridomen sehr hoch. Möglicherweise wird die Fusionseffizienz durch den aktivierten und proliferativen Zustand der B-Lymphozyten begünstigt. Die Ausbeute an Produzenten spezifischer IgG-Antikörper war jedoch relativ gering. Im Organismus erfolgt die bevorzugte Selektion von B-Lymphozyten mit Antigen-spezifischem BZR durch die

Konkurrenz um essenzielle Ressourcen und Signale, wie Antigenkontakt, Botenstoffe und Kontakte zu T-Helferzellen. In der hier angewandten *In vitro* Immunisierung ist dieser Konkurrenzdruck begrenzt, da allein das Antigen der limitierende Faktor ist und alle anderen Stimuli frei verfügbar sind. Somit ist vermutlich der Selektionsvorteil für Antigen-spezifische B-Lymphozyten geringer. Auch andere Zellen, die weniger spezifisch oder spezifisch für andere Komponenten des Kulturmediums sind, proliferieren, sodass der Anteil Antigen-spezifischer B-Lymphozyten an der Gesamtpopulation im Vergleich zur *in vivo* Situation eventuell geringer ist. Eine Kultivierung in Serum-freien Medium könnte womöglich die Proliferation von B-Lymphozyten anderer Spezifität eindämmen. Ebenso könnte die Immobilisierung des Antigens und der Stimuli auf der Kultivierungsfläche bewirken, dass B-Lymphozyten mit höherer Antigen-Affinität eher in räumlicher Nähe zu den Stimuli verweilen als weniger affine und somit verstärkt proliferieren.

Es entstanden mehrere VP1-spezifische und ein Mip-spezifischer IgG2b-Antikörper, die im ELISA und Western Blot in adäquaten Konzentrationen das jeweilige Antigen spezifisch banden. Im ELISA fiel die Signalintensität der VP1-spezifischen Antikörper aus der *In vitro* Immunisierung geringer aus als die des Anti-VP1-Antikörpers aus konventioneller *in vivo* Immunisierung. Es ist anzunehmen, dass die *in vitro* generierten Antikörper auf Grund der verkürzten Reifungszeit geringere Affinitäten gegenüber dem Antigen aufweisen. Es wurde durchflusszytometrisch untersucht, ob der monoklonale Antikörper aus der *In vitro* Immunisierung mit VP1-Mip auch das vollständige Mip-Protein in der Membran Hitze-inaktivierter Legionellen binden würde. Dabei konnte lediglich ein schwach positives Signal erzielt werden. Es ist möglich, dass durch die Hitze-Inaktivierung der Legionellen das Protein bzw. das Antikörper-Epitop unzugänglich oder verändert wurde. Das Epitop des als Positivkontrolle verwendeten Anti-Legionellen-Antikörpers ist nicht bekannt.

Während der Immunantwort *in vivo* ist die Subklasse der sezernierten Antikörper abhängig vom Antigen und von den Signalen anderer Immunzellen (Murphy et al., 2018). Im Verlauf der Immunreaktion werden IgM-Antikörper als erstes produziert, gefolgt von IgG-Antikörpern (siehe Abschnitt 1.2.3). IgG-Antikörper sind stabiler und von höherer Affinität und Spezifität, da sie bereits einen Reifungsprozess durchlaufen sind. Murine IgG-Antikörper werden wiederum in die Subklassen 1 bis 3 unterteilt, nummeriert nach ihrer Häufigkeit im Serum eines gesunden Organismus. Die Gene für diese Subklassen liegen allerdings in einer anderen Reihenfolge vor, sodass theoretisch zuerst IgG3-Antikörper gefolgt von IgG1 und IgG2 produziert werden können (Valenzuela & Schaub, 2018). Die tatsächlich produzierte IgG-Subklasse wird eher durch das Antigen und die auf den B-

Lymphozyten einwirkenden Signale anderer Zellen bestimmt und weniger durch die genetisch bedingte Ordnung. Es wurde mehrfach beschrieben, dass Polysaccharide eine IgG2-Antwort induzieren (Bergstedt-Lindqvist et al., 1982; McIntyre et al., 1993), sodass die hier hergestellten IgG2b-Antikörper wahrscheinlich aus der Stimulation mit LPS resultieren. IgG2-Antikörper können sowohl aus einer T-Zell-unabhängigen als auch aus T-Zell-abhängiger B-Lymphozyten-Aktivierung resultieren (Szomolanyi-Tsuda et al., 1998; Tongren et al., 2005). Antikörper der Subklasse IgG2 aktivieren *in vivo* das Komplementsystem und induzieren die Phagozytose durch Makrophagen (Diamond & Scharff, 1980; Neuberger & Rajewsky, 1981).

5.4.2 *In vitro* Immunisierung muriner B-Lymphozyten eignet sich zu Herstellung monoklonaler Antikörper

Antikörper sind aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften in vielen Bereichen der Wissenschaft unabhkömmlich. Die Produktion und Gewinnung spezifischer monoklonaler Antikörper für biotechnologische Anwendungen sind deshalb wichtige Prozesse, deren Optimierung und Erweiterung von ständiger Relevanz sind. Die *In vitro* Immunisierung stellt eine Ergänzung zu bisherigen Verfahren dar und bietet Alternativen für einige Problemstellungen.

Die Produktion von IgM-Antikörpern infolge einer T-Zell-unabhängigen Aktivierung von B-Lymphozyten wurde bereits mehrfach in einer *in vitro* Umgebung nachgeahmt (Ait Mebarek et al., 2013; Wohlleben et al., 1996). In einem *in vitro* Setting mit reduzierten Variablen konnten mit der hier entwickelten Methodik verschiedene, monoklonale Antigen-spezifische IgG-Antikörper generiert werden. Es ist nach unserem Kenntnisstand die bisher einzige murine *In vitro* Immunisierung, die ausschließlich mit gereinigten B-Lymphozyten durchgeführt wurde. Die Ergebnisse bestätigen, dass für eine Immunisierung der Antigenkontakt *in vivo* nicht zwingend notwendig ist, da aus der *In vitro* Immunisierung naiver B-Lymphozyten Antigen-spezifische, IgG-produzierende Hybridomzelllinien hervorgingen. Im Vergleich zur konventionellen Immunisierung *in vivo*, bei der bis zu drei Monate vergehen und die Antikörper eine Affinitätsreifung durchlaufen können, verringert sich der Zeitaufwand auf wenige Tage. Innerhalb von zehn Tagen wird der Antikörper-Subklassenwechsel induziert, sodass Antigen-spezifische IgG-Antikörper generiert werden können. Aufgrund der verkürzten Reifung weisen *In vitro* generierte Antikörper unter Umständen eine geringere Affinität auf als Antikörper aus der konventionellen *in vivo* Immunisierung. Für die *In vitro* Immunisierung wird weniger Antigen benötigt und ein

breites Spektrum unterschiedlicher Antigene kann eingesetzt werden. An den B-Lymphozyten einer naiven Maus können Immunisierungen mit mehreren verschiedenen Antigenen durchgeführt werden. So kann die Zahl der benötigten Versuchstiere, die gleichwohl für die Zellisolation benötigt werden, verkleinert werden.

5.5 Ausblick

In der vorgestellten Arbeit wurde eine Methode zur *In vitro* Immunisierung an murinen B-Lymphozyten etabliert. Gereinigte B-Lymphozyten wurden mit verschiedenen Stimulantien und dem Modellantigen VP1 kultiviert, um die optimalen Bedingungen für eine spezifische Immunantwort *in vitro* zu bestimmen. In einer Zeitreihe dieser Stimulation wurde anschließend der Subklassenwechsel von IgM- auf IgG-Antikörper beobachtet und der bestmögliche Zeitpunkt zur Fusion der Zellen mit Myelomzellen determiniert. Mit dieser Methodik wurden *in vitro* spezifische IgG-Antworten gegen VP1, *L. pneumophila* und das Protein Mip, von dem ein Peptid in das zur Immunisierung eingesetzte VP1 integriert wurde, induziert. Es konnten mehrere Hybridomzelllinien generiert werden, die spezifische und funktionale IgG-Antikörper gegen VP1 oder Mip produzieren. Für die Herstellung einer Zelllinie, die statt primärer B-Lymphozyten für diese *In vitro* Immunisierung eingesetzt werden kann, wurden retrovirale Konstrukte mit verschiedenen Onkogenen hergestellt. Die Funktionalität der Viren wurde in verschiedenen Assays belegt, es konnten jedoch bisher keine geeigneten Zelllinien generiert werden.

Die hier etablierte *In vitro* Immunisierung bietet eine Alternative zu bisherigen Verfahren zur Herstellung spezifischer Antikörper. In Kombination mit der Hybridomtechnologie können die *in vitro* immunisierten Zellen, wie hier demonstriert, zur Generation von Antikörper-produzierenden Hybridomzelllinien genutzt werden. Die immunisierten B-Lymphozyten können ebenso als Ausgangsmaterial zur Herstellung einer Antikörper-Genbank für das Phagendisplay eingesetzt werden. Theoretisch sind den zu verwendenden Antigenen dabei keine Limitationen gesetzt. Die Effektivität des Protokolls wurde bereits für verschiedene Antigene gezeigt. Es bleibt zu untersuchen, ob auch gegen andere Antigene, die *in vivo* keine oder nur geringe Immunantworten hervorrufen, wie beispielsweise Haptene oder körpereigene Substanzen, spezifische Antikörper *in vitro* erzeugt werden können. Die Methode könnte eine Alternative bieten für Immunisierungen, die aus ethischer Sicht bedenklich sind, beispielsweise mit toxischen Substanzen oder ebenso an bestimmten Spezies, wie Menschen, Primaten oder anderen höheren Vertebraten.

Soweit ersichtlich sollte das Protokoll auf andere Spezies übertragbar sein und würde somit eine universelle Methodik zur Herstellung spezifischer Antikörper *in vitro* bieten.

Eine Zelllinie eines frühen Entwicklungsstadiums der B-Lymphozyten wäre ein wertvolles Instrument zur Ergänzung dieser *In vitro* Immunisierung. Die Möglichkeit zum ständigen Zugriff auf Zellen, die ausgereift zur Antikörperproduktion angeregt werden können, würde den Verzicht auf Versuchstiere ermöglichen und somit den Weg für ein gänzlich tierfreies Verfahren zur Antikörperherstellung ebnen. Eine solche Zelllinie konnte bisher nicht generiert werden. Die genetische Veränderung hämatopoetischer Zellen gestaltet sich schwierig, insbesondere in frühen Entwicklungsstadien, die sehr sensibel gegenüber intra- und extrazellulären Milieuveränderungen sind. Es muss festgestellt werden, ob andere Kultivierungsbedingungen die Immortalisierung dieser Zellen begünstigen. Die Funktionalität der hergestellten Viren konnte an einer Testzelllinie gezeigt werden. Somit bleibt zu untersuchen, ob die Transduktion hämatopoetischer Zellen unter bisherigen Bedingungen effektiv ist oder ob eine Optimierung der Viren oder der Transduktionsprozedur gegebenenfalls nötig ist. Ebenso muss für die Induktion der Genexpression ein optimales Maß titriert werden.

Die vorgestellte *In vitro* Immunisierung eignet sich zur Herstellung spezifischer, monoklonaler Antikörper. Sie bietet eine effektive Alternative zu anderen konventionellen Methoden und reduziert Zeitaufwand und Tierleid. Die Ergebnisse bieten eine Basis für eine universelle, Spezies-unabhängige Methodik zur Antikörperherstellung und für die Etablierung einer idealen, tierfreien *In vitro* Immunisierung.

Anhang

Tab. 5: Primer für die Herstellung der Plasmide.

Name	5'-3'-Sequenz	Funktion
SM1	GAGGTGGTCTGGATCCCTAGAGCGCGCGGGGGCCTCCAT TG	Amplifikation des <i>HOXB4</i> - Fragments
SM3	CCCCAGGCCCCAGTAGTAAACCCCAATTACGCCGGCGGG GA	
SM2	ACCCTCGTAAAGAATTCGCCACCATGTTTAAACAAATCAT TTGGAACACCCTTTGGG	Amplifikation des <i>NUP98</i> - Fragments
SM4	GTAATTGGGGTTTACTACTGGGGCCTGGGGGGCTCCAAA GC	
SM6	GTAAAGAATTCATGGTGAGCAAGGGC	Amplifikation von <i>EGFP</i>
SM7	TCTGGATCCTTACTTGTACAGCTC	
SM11	TCCTACCCTCGTAAAGAATTCACCGCCATGGCGCAAGCC GGGAGAA	Amplifikation von <i>Bcl2</i>
SM12	CAGGGGAGGTGGTCTGGATCCTCACTTGTGGCCCAGGTA TGCACCC	
SM13	TCCTACCCTCGTAAAGAATTCACCGCCATGTCTCAGAGC AACCGGG	Amplifikation von <i>BclxL</i>
SM14	CAGGGGAGGTGGTCTGGATCCTCACTTCCGACTGAAGAG TGAGCCC	
SM15	ATAAGGAATTCACCGCCATGCCCTCAACGTGAACT	Amplifikation
SM16	TAGACGGATCCTTATGCACCAGAGTTTCGAAGCTGT	von <i>cmyc</i>

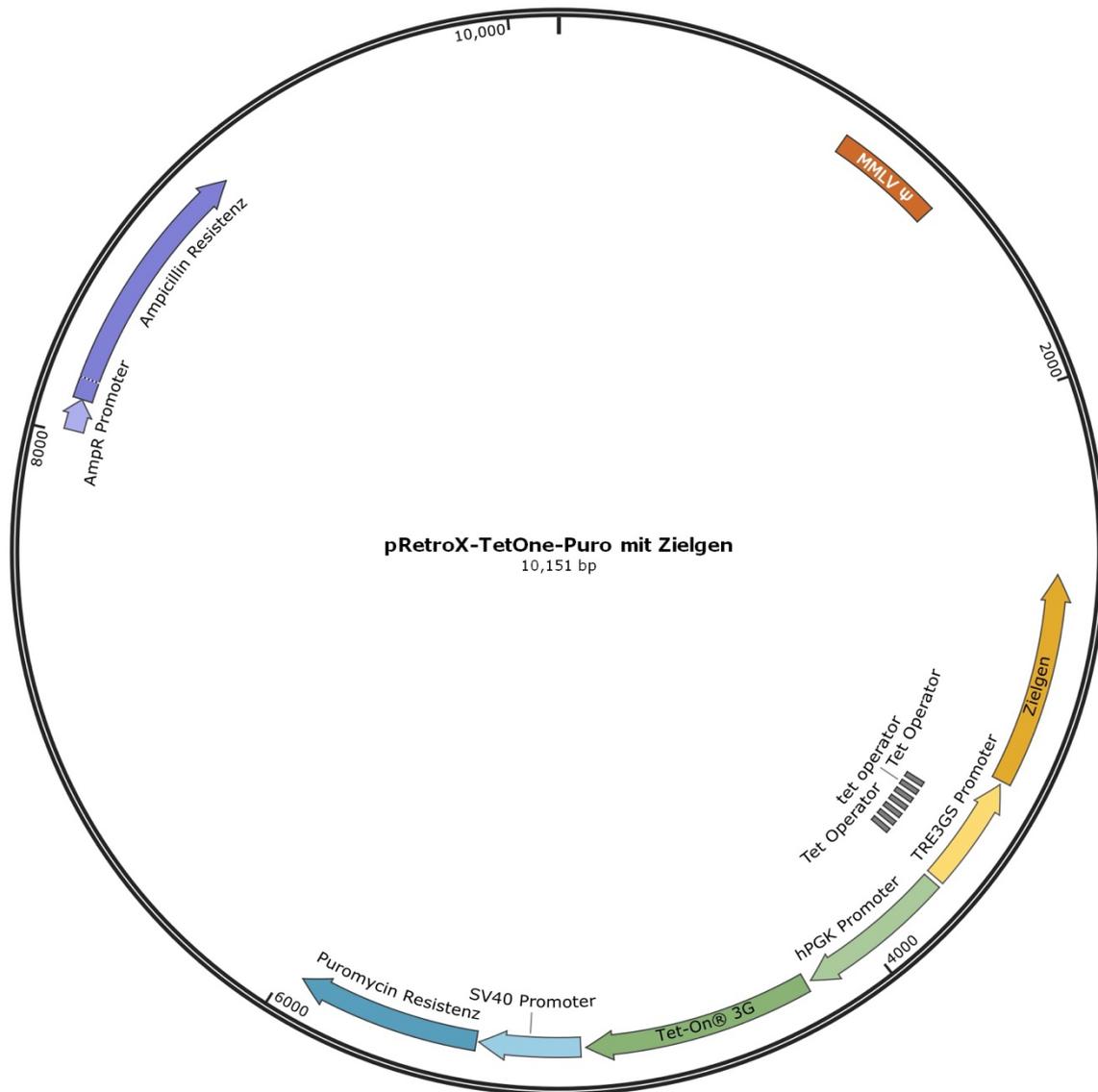


Abb. 5: Vektorkarte der hergestellten Plasmide. Das Plasmid pRetroX-TetOne-Puro trägt neben dem eingesetzten Zielgen die notwendigen Genkassetten für die Amplifizierung in Bakterienzellen, zur Verpackung der Retroviren, für die Selektion in Säugerzellen und für die Doxycyclin-induzierbare Expression des Zielgens.

Literatur

- Ait Mebarek, M., Wijkhuisen, A., Adel-Patient, K., Lamourette, P., Léonetti, M., & Volland, H. (2013). Production of human antibodies by in vitro immunization using a fusion protein containing the transcriptional transactivator of HIV-1. *Journal of Immunological Methods*, 396(1–2), 96–106.
- Almagro, J. C., Pedraza-Escalona, M., Arrieta, H. I., & Pérez-Tapia, S. M. (2019). Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development. *Antibodies* (Basel, Switzerland), 8(3).
- Bain, G., Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., Krop, I., Schlissel, M. S., Feeney, A. J., & van Roon, M. (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell*, 79(5), 885–892.
- Barker, J., & Verfaillie, C. M. (2000). A novel in vitro model of early human adult B lymphopoiesis that allows proliferation of pro-B cells and differentiation to mature B lymphocytes. *Leukemia*, 14(9), 1614–1620.
- Baselga, J., Cortés, J., Kim, S.-B., Im, S.-A., Hegg, R., Im, Y.-H., Roman, L., Pedrini, J. L., Pienkowski, T., Knott, A., Clark, E., Benyunes, M. C., Ross, G., Swain, S. M., & CLEOPATRA Study Group. (2012). Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 366(2), 109–119.
- Behring, E. V., & Shibasaburo, K. (1890). Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Archiv Philipps-Universität Marburg*.
- Bergstedt-Lindqvist, S., Fernandez, C., & Severinson, E. (1982). A Synergistic Polyclonal Response to Dextran Sulphate and Lipopolysaccharide.: Immunoglobulin Secretion and Cell Requirements. *Scandinavian Journal of Immunology*, 15(5), 439–448.
- Berry, J. D. (2005). Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: The antigen scale. *Veterinary Journal* (London, England: 1997), 170(2), 193–211.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293–300.
- Bradbury, A. R. M., & Marks, J. D. (2004). Antibodies from phage antibody libraries. *Journal of Immunological Methods*, 290(1–2), 29–49.
- Brams, P., Royston, I., & Boerner, P. (1993). In vitro priming of human lymphocytes. I. IL-2 and IL-4 requirements. *Human Antibodies and Hybridomas*, 4(2), 47–56.
- Briney, B., Inderbitzin, A., Joyce, C., & Burton, D. R. (2019). Commonality despite exceptional diversity in the baseline human antibody repertoire. *Nature*, 566(7744), 393–397.

- Bross, L., Fukita, Y., McBlane, F., Démollière, C., Rajewsky, K., & Jacobs, H. (2000). DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity*, 13(5), 589–597.
- Brüggemann, M., Caskey, H. M., Teale, C., Waldmann, H., Williams, G. T., Surani, M. A., & Neuberger, M. S. (1989). A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(17), 6709–6713.
- Chames, P., & Baty, D. (2000). Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization. *FEMS Microbiology Letters*, 189(1), 1–8.
- Chan, C. E., Zhao, B. Z., Cazenave-Gassiot, A., Pang, S.-W., Bendt, A. K., Wenk, M. R., MacAry, P. A., & Hanson, B. J. (2013). Novel phage display-derived mycolic acid-specific antibodies with potential for tuberculosis diagnosis. *Journal of Lipid Research*, 54(10), 2924–2932.
- Chen, X., & Jensen, P. E. (2008). The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 56(2), 77–83.
- Coller, B. S., Scudder, L. E., Beer, J., Gold, H. K., Folts, J. D., Cavagnaro, J., Jordan, R., Wagner, C., Iulucci, J., & Knight, D. (1991). Monoclonal antibodies to platelet glycoprotein IIb/IIIa as antithrombotic agents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 614, 193–213.
- Corfe, S. A., & Paige, C. J. (2012). The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation. *Seminars in Immunology*, 24(3), 198–208.
- Cotton, R. G., & Milstein, C. (1973). Letter: Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature*, 244(5410), 42–43.
- Davey, R. A., Hamson, C. A., Healey, J. J., & Cunningham, J. M. (1997). In vitro binding of purified murine ecotropic retrovirus envelope surface protein to its receptor, MCAT-1. *Journal of Virology*, 71(11), 8096–8102.
- de Boer, M., Ossendorp, F. A., Bruning, P. F., & Tager, J. M. (1987). Direct evidence for a primary immune response of murine B-lymphocytes after in vitro immunization of dissociated splenocytes. *Hybridoma*, 6(3), 253–258.
- de Bruin, R., Spelt, K., Mol, J., Koes, R., & Quattrocchio, F. (1999). Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nature Biotechnology*, 17(4), 397–399.
- den Haan, J. M. M., Arens, R., & van Zelm, M. C. (2014). The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology Letters*, 162(2 Pt B), 103–112.
- Dengler, H. S., Baracho, G. V., Omori, S. A., Bruckner, S., Arden, K. C., Castrillon, D. H., DePinho, R. A., & Rickert, R. C. (2008). Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nature Immunology*, 9(12), 1388–1398.
- Diamond, B., & Scharff, M. D. (1980). IgG1 and IgG2b share the Fc receptor on mouse macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 125(2), 631–633.
- Dilosa, R. M., Maeda, K., Masuda, A., Szakal, A. K., & Tew, J. G. (1991). Germinal center B cells and antibody production in the bone marrow. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 146(12), 4071–4077.
- Doma, E., Mayer, I. M., Brandstötter, T., Maurer, B., Grausenburger, R., Menzl, I., Zojer, M., Hoelbl-Kovacic, A., Carlsson, L., Heller, G., Kollmann, K., & Sexl, V. (2021). A robust

- approach for the generation of functional hematopoietic progenitor cell lines to model leukemic transformation. *Blood Advances*, 5(1), 39–53.
- Egawa, T., Kawabata, K., Kawamoto, H., Amada, K., Okamoto, R., Fujii, N., Kishimoto, T., Katsura, Y., & Nagasawa, T. (2001). The Earliest Stages of B Cell Development Require a Chemokine Stromal Cell-Derived Factor/Pre-B Cell Growth-Stimulating Factor. *Immunity*, 15(2), 323–334.
- European Commission. Joint Research Centre. (2020). EURL ECVAM recommendation on non-animal-derived antibodies. Publications Office.
- Fagraeus, A. (1948). Antibody Production in relation to the Development of Plasma Cells. In vivo and in vitro Experiments. *Acta Medica Scandinavica*.
- Fernandes, J. C. (2018). Therapeutic application of antibody fragments in autoimmune diseases: Current state and prospects. *Drug Discovery Today*, 23(12), 1996–2002.
- Flisikowska, T., Thorey, I. S., Offner, S., Ros, F., Lifke, V., Zeitler, B., Rottmann, O., Vincent, A., Zhang, L., Jenkins, S., Niersbach, H., Kind, A. J., Gregory, P. D., Schnieke, A. E., & Platzer, J. (2011). Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. *PloS One*, 6(6), e21045.
- Flynn, J. N., Harkiss, G. D., & Hopkins, J. (1989). Generation of a sheep x mouse heterohybridoma cell line (1C6.3a6T.1D7) and evaluation of its use in the production of ovine monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 121(2), 237–246.
- Foy, T. M., Shepherd, D. M., Durie, F. H., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., & Noelle, R. J. (1993). In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. *The Journal of Experimental Medicine*, 178(5), 1567–1575.
- Freshney, R. I., Capes-Davis, A., Gregory, C., & Przyborski, S. (2016). *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* (Seventh edition). Wiley Blackwell.
- Fuller, S. A., Takahashi, M., & Hurrell, J. G. (2001). Immunization of mice. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 11, Unit11.4.
- Garraud, O., Borhis, G., Badr, G., Degrelle, S., Pozzetto, B., Cognasse, F., & Richard, Y. (2012). Revisiting the B-cell compartment in mouse and humans: More than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond. *BMC Immunology*, 13, 63.
- Gearhart, P. J., & Cebra, J. J. (1981). Most B cells that have switched surface immunoglobulin isotypes generate clones of cells that do not secrete IgM. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 127(3), 1030–1034.
- Gedvilaite, A., Frömmel, C., Sasnauskas, K., Micheel, B., Ozel, M., Behrsing, O., Staniulis, J., Jandrig, B., Scherneck, S., & Ulrich, R. (2000). Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology*, 273(1), 21–35.
- Gibson, D. G. (2011). Enzymatic Assembly of Overlapping DNA Fragments. In *Methods in Enzymology* (Bd. 498, S. 349–361). Elsevier.
- González-Fernández, Á., Bermúdez Silva, F. J., López-Hoyos, M., Cobaleda, C., Montoliu, L., Del Val, M., & Leech, K. (2020). Non-animal-derived monoclonal antibodies are not ready to substitute current hybridoma technology. *Nature Methods*, 17(11), 1069–1070.
- Gorovits, B., Hays, A., Jani, D., Jones, C., King, C., Lundequist, A., Mora, J., Partridge, M., Pathania, D., Ramaswamy, S. S., Rutwijk, D., Shen, H., & Starling, G. (2021). AAPS

- Perspective on the EURL Recommendation on the use of Non-Animal-Derived Antibodies. *The AAPS Journal*, 23(2), 34.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., & Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5218), 1766–1769.
- Grabstein, K. H., Hess, B., Weisser, K. E., Clark, L., Goodwin, R., & Overell, R. W. (1992). Immortalization of murine B cells in vitro with oncogene-containing retroviral vectors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 149(5), 1524–1530.
- Gray, A. C., Bradbury, A., Dübel, S., Knappik, A., Plückthun, A., & Borrebaeck, C. A. K. (2020). Reproducibility: Bypass animals for antibody production. *Nature*, 581(7808), 262.
- Griffiths, G. M., Berek, C., Kaartinen, M., & Milstein, C. (1984). Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl oxazolone. *Nature*, 312(5991), 271–275.
- Gururajan, M., Sindhava, V., & Bondada, S. (2014). B Cell Tolerance in Health and Disease. *Antibodies*, 3(1), 116–129.
- Hanyu, Y., Komeiji, Y., & Kato, M. (2019). Potentiating Antigen-Specific Antibody Production with Peptides Obtained from In Silico Screening for High-Affinity against MHC-II. *Molecules*, 24(16), 2949.
- Hara, T., Shitara, S., Imai, K., Miyachi, H., Kitano, S., Yao, H., Tani-ichi, S., & Ikuta, K. (2012). Identification of IL-7-producing cells in primary and secondary lymphoid organs using IL-7-GFP knock-in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(4), 1577–1584.
- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D., & Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *Journal of Experimental Medicine*, 173(5), 1213–1225.
- Heidelberger, M., & Kendall, F. E. (1936). Quantitative Studies on Antibody Purification: I. The Dissociation of Precipitates formed by Pneumococcus Specific Polysaccharides and Homologous Antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*, 64(2), 161–172.
- Helbig, J. H., Lück, P. C., Steinert, M., Jacobs, E., & Witt, M. (2001). Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. *Letters in Applied Microbiology*, 32(2), 83–88.
- Hirose, H., Matsuda, H., Murata, M., & Sekiya, Y. (1986). Preparation of monoclonal antibodies against Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys. *Nihon Juigaku Zasshi. The Japanese Journal of Veterinary Science*, 48(6), 1263–1266.
- Holzlohner, P., & Hanack, K. (2017). Generation of Murine Monoclonal Antibodies by Hybridoma Technology. *Journal of Visualized Experiments*, 119, 54832.
- Huebner, R. J., & Todaro, G. J. (1969). Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 64(3), 1087–1094.
- Huynh, H. H., Morita, N., Sakamoto, T., Katayama, T., Miyakawa, T., Tanokura, M., Chiba, Y., Shinkura, R., & Maruyama, J. (2020). Functional production of human antibody by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal Biology and Biotechnology*, 7(1), 7.
- Ichikawa, A., Katakura, Y., Teruya, K., Hashizume, S., & Shirahata, S. (1999). In vitro immunization of human peripheral blood lymphocytes: Establishment of B cell lines secreting IgM specific for cholera toxin B subunit from lymphocytes stimulated with IL-2 and IL-4. *Cytotechnology*, 31(1–2), 133–141.

- Inagaki, T., Yoshimi, T., Kobayashi, S., Kawahara, M., & Nagamune, T. (2013). Analysis of cellular phenotype during in vitro immunization of murine splenocytes for generating antigen-specific immunoglobulin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(3), 339–345.
- Jacob, J., Kassir, R., & Kelsoe, G. (1991). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *The Journal of Experimental Medicine*, 173(5), 1165–1175.
- Jacobson, J. M., Kuritzkes, D. R., Godofsky, E., DeJesus, E., Larson, J. A., Weinheimer, S. P., & Lewis, S. T. (2009). Safety, pharmacokinetics, and antiretroviral activity of multiple doses of ibalizumab (formerly TNX-355), an anti-CD4 monoclonal antibody, in human immunodeficiency virus type 1-infected adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 450–457.
- Janeway, C. A. (1945). Use of Concentrated Human Serum gamma-Globulin in the Prevention and Attenuation of Measles. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 21(4), 202–222.
- Janni re, L., Niaudet, B., Pierre, E., & Ehrlich, S. D. (1985). Stable gene amplification in the chromosome of *Bacillus subtilis*. *Gene*, 40(1), 47–55.
- Jefferis, R. (2009). Recombinant antibody therapeutics: The impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(7), 356–362.
- Jenner, E. (1798). *An Inquiry Into the Causes and Effects of the Variole Vaccinae, a Disease Discovered in Some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire and Known by the Name of the cow-pox*. National Library of Medicine.
- Jung, Y. S., Matsumoto, S., Yamashita, M., Tomimatsu, K., Teruya, K., Katakura, Y., & Shirahata, S. (2007). *Propionibacterium acnes* acts as an adjuvant in in vitro immunization of human peripheral blood mononuclear cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(8), 1963–1969.
- Jung, Y. S., Matsumoto, S.-E., Katakura, Y., Yamashita, M., Tomimatsu, K., Kabayama, S., Teruya, K., & Shirahata, S. (2008). Generation of human monoclonal antibodies against *Propionibacterium acnes* by applying the phage display method to human peripheral blood mononuclear cells immunized in vitro. *Cytotechnology*, 57(2), 169–175.
- Karpas, A., Dremucheva, A., & Czepulkowski, B. H. (2001). A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1799–1804.
- Kato, M., Yan, H., Tsuji, N. M., Chiba, T., & Hanyu, Y. (2012). A method for inducing antigen-specific IgG production by in vitro immunization. *Journal of Immunological Methods*, 386(1–2), 60–69.
- Kawano, Y., Petkau, G., Wolf, I., Tornack, J., & Melchers, F. (2017). IL-7 and immobilized Kit-ligand stimulate serum- and stromal cell-free cultures of precursor B-cell lines and clones. *European Journal of Immunology*, 47(1), 206–212.
- Kim, S. H., Chun, J. H., & Park, S. Y. (2001). Characterization of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen (CEA) and expression in *E. coli*. *Hybridoma*, 20(4), 265–272.
- Klatt, S., & Konthur, Z. (2012). Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in *Leishmania tarentolae*. *Microbial Cell Factories*, 11, 97.

- Klein, S. (2013). Zusammenhang zwischen Impfungen und Inzidenz und Mortalität von Infektionskrankheiten: Zeitreihenanalysen mit Meldedaten zu Diphtherie, Pertussis, Poliomyelitis und Tetanus von 1892 bis 2011 in Deutschland (S. 302). Charité - Universitätsmedizin Berlin.
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497.
- Koniaeva, E., Stahlhut, M., Lange, L., Sauer, M. G., Kustikova, O. S., & Schambach, A. (2020). Conditional immortalization of Lymphoid Progenitors via Tetracycline-Regulated LMO2 Expression. *Human Gene Therapy*, 31(3–4), 183–198.
- Kraal, G. (1992). Cells in the Marginal Zone of the Spleen. In *International Review of Cytology* (Bd. 132, S. 31–74). Elsevier.
- Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H. R., & Plückthun, A. (1997). Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *Journal of Immunological Methods*, 201(1), 35–55.
- Kusam, S., Vasanwala, F. H., & Dent, A. L. (2004). Transcriptional repressor BCL-6 immortalizes germinal center-like B cells in the absence of p53 function. *Oncogene*, 23(3), 839–844.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lauer, B., Otleben, I., Jacobsen, H.-J., & Reinard, T. (2005). Production of a single-chain variable fragment antibody against fumonisin B1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 899–904.
- Laustsen, A. H., Greiff, V., Karatt-Vellatt, A., Muyldermans, S., & Jenkins, T. P. (2021). Animal Immunization, in Vitro Display Technologies, and Machine Learning for Antibody Discovery. *Trends in Biotechnology*, S0167779921000615.
- Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J., & Laustsen, A. H. (2018). Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins*, 10(6).
- Lin, H., & Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature*, 376(6537), 263–267.
- Lonberg, N., Taylor, L. D., Harding, F. A., Trounstine, M., Higgins, K. M., Schramm, S. R., Kuo, C. C., Mashayekh, R., Wymore, K., & McCabe, J. G. (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature*, 368(6474), 856–859.
- Lu, L. S., Wang, S. J., & Auerbach, R. (1996). In vitro and in vivo differentiation into B cells, T cells, and myeloid cells of primitive yolk sac hematopoietic precursor cells expanded > 100-fold by coculture with a clonal yolk sac endothelial cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14782–14787.
- Lu, R.-M., Hwang, Y.-C., Liu, I.-J., Lee, C.-C., Tsai, H.-Z., Li, H.-J., & Wu, H.-C. (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1.
- Luke, T. C., Kilbane, E. M., Jackson, J. L., & Hoffman, S. L. (2006). Meta-analysis: Convalescent blood products for Spanish influenza pneumonia: a future H5N1 treatment? *Annals of Internal Medicine*, 145(8), 599–609.

- Lukin, K., Fields, S., Lopez, D., Cherrier, M., Ternyak, K., Ramírez, J., Feeney, A. J., & Hagman, J. (2010). Compound haploinsufficiencies of *Ebf1* and *Runx1* genes impede B cell lineage progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17), 7869–7874.
- Lutz, M., Dudziak, D., Gunzer, M., & Kamradt, T. (2020). Aus Tieren gewonnene Antikörper bleiben unverzichtbar in Forschung und Klinik. *Trillium Immunologie*, 4(4), 250–252.
- Maddaly, R., Pai, G., Balaji, S., Sivaramakrishnan, P., Srinivasan, L., Sunder, S. S., & Paul, S. F. D. (2010). Receptors and signaling mechanisms for B-lymphocyte activation, proliferation and differentiation—Insights from both in vivo and in vitro approaches. *FEBS Letters*, 584(24), 4883–4894.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., & Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301), 552–554.
- McIntyre, T. M., Klinman, D. R., Rothman, P., Lugo, M., Dasch, J. R., Mond, J. J., & Snapper, C. M. (1993). Transforming growth factor beta 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(4), 1031–1037.
- Melchers, F. (2015). Checkpoints that control B cell development. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(6), 2203–2210.
- Micheel, B. (2003). Monoklonale Antikörper: Grundlagen und ihre Bedeutung in Diagnostik und Therapie. In D. Ganten & K. Ruckpaul (Hrsg.), *Grundlagen der Molekularen Medizin* (S. 449–475). Springer Berlin Heidelberg.
- Milstein, C. (1999). The hybridoma revolution: An offshoot of basic research. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 21(11), 966–973.
- Mishell, R. I., & Dutton, R. W. (1966). Immunization of Normal Mouse Spleen Cell Suspensions in vitro. *Science*, 153(3739), 1004–1006.
- Mosier, D. E., & Subbarao, B. (1982). Thymus-independent antigens: Complexity of B-lymphocyte activation revealed. *Immunology Today*, 3(8), 217–222.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., & Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102(5), 553–563.
- Murphy, K. M., Weaver, C., & Janeway, C. (2018). *Janeway Immunologie* (L. Seidler, Übers.; 9. Auflage). Springer Spektrum.
- Nakano, T., Kodama, H., & Honjo, T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5175), 1098–1101.
- Needham, J., Lu, G.-D., Sivin, N., & Needham, J. (2008). *Medicine* (3. print). Cambridge Univ. Press.
- Neuberger, M. S., & Rajewsky, K. (1981). Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *European Journal of Immunology*, 11(12), 1012–1016.
- Ni, Y., & Chen, R. (2009). Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 31(11), 1661–1670.
- Ning, D., Junjian, X., Qing, Z., Sheng, X., Wenyin, C., Guirong, R., & Xunzhang, W. (2005). Production of recombinant humanized anti-HBsAg Fab fragment from *Pichia pastoris* by fermentation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(3), 294–299.

- Nossal, G. J. (1959). Antibody production by single cells. III. The histology of antibody production. *British Journal of Experimental Pathology*, 40, 301–311.
- Osborn, M. J., Ma, B., Avis, S., Binnie, A., Dilley, J., Yang, X., Lindquist, K., Ménoret, S., Iscache, A.-L., Ouisse, L.-H., Rajpal, A., Anegon, I., Neuberger, M. S., Buelow, R., & Brüggemann, M. (2013). High-affinity IgG antibodies develop naturally in Ig-knockout rats carrying germline human IgH/Igκ/Igλ loci bearing the rat CH region. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 190(4), 1481–1490.
- Palmberger, D., Rendić, D., Tauber, P., Krammer, F., Wilson, I. B. H., & Grabherr, R. (2011). Insect cells for antibody production: Evaluation of an efficient alternative. *Journal of Biotechnology*, 153(3–4), 160–166.
- Parish, N. M., Morrison, W. I., & Pearson, T. W. (1985). Identification of an antigen specific to *Trypanosoma congolense* by using monoclonal antibodies. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 134(1), 593–597.
- Parray, H. A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., Ahmed, S., Sharma, C., & Kumar, R. (2020). Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *International Immunopharmacology*, 85, 106639.
- Perelson, A. S., & Oster, G. F. (1979). Theoretical studies of clonal selection: Minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *Journal of Theoretical Biology*, 81(4), 645–670.
- Qi, H., Egen, J. G., Huang, A. Y. C., & Germain, R. N. (2006). Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5780), 1672–1676.
- Quah, B. J. C., Warren, H. S., & Parish, C. R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols*, 2(9), 2049–2056.
- Ravi, M., Sundar, S. S., Kumar, K. K., Parvathi, D., & Paul, S. F. D. (2007). Hybridoma Generation by In Vitro Immunization of Murine Splenocytes with Cytosolic Proteins of Chinese Hamster Ovary (CHO) Mitotic Cells. *Hybridoma*, 26(5), 311–315.
- Redecke, V., Wu, R., Zhou, J., Finkelstein, D., Chaturvedi, V., High, A. A., & Häcker, H. (2013). Hematopoietic progenitor cell lines with myeloid and lymphoid potential. *Nature Methods*, 10(8), 795–803.
- Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(7), 3116–3120.
- Ruedl, C., Khameneh, H. J., & Karjalainen, K. (2008). Manipulation of immune system via immortal bone marrow stem cells. *International Immunology*, 20(9), 1211–1218.
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1992). *The principles of humane experimental technique* (Special ed). UFAW.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350–1354.
- Sanjuan Nandin, I., Fong, C., Deantonio, C., Torreno-Pina, J. A., Pecetta, S., Maldonado, P., Gasparrini, F., Ordovas-Montanes, J., Kazer, S. W., Kjaer, S., Borley, D. W., Nair, U.,

- Coleman, J. A., Lingwood, D., Shalek, A. K., Meffre, E., Poignard, P., Burton, D. R., & Batista, F. D. (2017). Novel in vitro booster vaccination to rapidly generate antigen-specific human monoclonal antibodies. *Journal of Experimental Medicine*, 214(8), 2471–2490.
- Sano, A., Matsushita, H., Wu, H., Jiao, J.-A., Kasinathan, P., Sullivan, E. J., Wang, Z., & Kuroiwa, Y. (2013). Physiological level production of antigen-specific human immunoglobulin in cloned transchromosomal cattle. *PloS One*, 8(10), e78119.
- Santos-Neto, J. F., Oliveira, F. O., Hodel, K. V. S., Fonseca, L. M. S., Badaró, R., & Machado, B. A. S. (2021). Technological Advancements in Monoclonal Antibodies. *The Scientific World Journal*, 2021, 1–19.
- Sgro, C. (1995). Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: Bibliographic review. *Toxicology*, 105(1), 23–29.
- Shi, Z., Zhang, Q., Yan, H., Yang, Y., Wang, P., Zhang, Y., Deng, Z., Yu, M., Zhou, W., Wang, Q., Yang, X., Mo, X., Zhang, C., Huang, J., Dai, H., Sun, B., Zhao, Y., Zhang, L., Yang, Y.-G., & Qiu, X. (2019). More than one antibody of individual B cells revealed by single-cell immune profiling. *Cell Discovery*, 5, 64.
- Shulman, M., Wilde, C. D., & Köhler, G. (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature*, 276(5685), 269–270.
- Sinden, R. R. (2012). *DNA Structure and Function*. Elsevier Science.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4705), 1315–1317.
- Spieker-Polet, H., Sethupathi, P., Yam, P. C., & Knight, K. L. (1995). Rabbit monoclonal antibodies: Generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9348–9352.
- Stavnezer, J., Guikema, J. E. J., & Schrader, C. E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual Review of Immunology*, 26, 261–292.
- Steinwand, M., Droste, P., Frenzel, A., Hust, M., Dübel, S., & Schirrmann, T. (2014). The influence of antibody fragment format on phage display based affinity maturation of IgG. *MAbs*, 6(1), 204–218.
- Suzuki, K., Huits, R., Phadungsombat, J., Tuekprakhon, A., Nakayama, E. E., van den Berg, R., Barbé, B., Cnops, L., Rahim, R., Hasan, A., Iwamoto, H., Leungwutiwong, P., van Esbroeck, M., Rahman, M., & Shioda, T. (2020). Promising application of monoclonal antibody against chikungunya virus E1-antigen across genotypes in immunochromatographic rapid diagnostic tests. *Virology Journal*, 17(1), 90.
- Szomolanyi-Tsuda, E., Le, Q. P., Garcea, R. L., & Welsh, R. M. (1998). T-Cell-independent immunoglobulin G responses in vivo are elicited by live-virus infection but not by immunization with viral proteins or virus-like particles. *Journal of Virology*, 72(8), 6665–6670.
- Szybalski, W. (1992). Roots. Use of theHPRT gene and the HAT selection technique in DNA-mediated transformation of mammalian cells: First steps toward developing hybridoma techniques and gene therapy. *BioEssays*, 14(7), 495–500.
- Takara Bio Inc. (2014). *Retro-X™ Tet-One™ Inducible Expression System User Manual*. USA.
- Tamura, T., Tomimatsu, K., Katakura, Y., Yamashita, M., Matsumoto, S., Aiba, Y., Jung, Y. S., Abe, Y., Fujiki, T., Teruya, K., & Shirahata, S. (2007). Anti-Peptide Antibody Production

- Elicited by in Vitro Immunization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(12), 2871–2875.
- Teixeira, D., & Gonzalez-Pajuelo, M. (2018). Phage Display Technology for Selection of Antibody Fragments. In *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials* (S. 67–88). Elsevier.
- Temin, H. M., & Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226(5252), 1211–1213.
- Tong, Y., Zhong, S., Shan, Z., Yao, W., & Tian, H. (2019). A novel human anti-BAFF neutralizing monoclonal antibody derived from in vitro immunization. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 119, 109430.
- Tongren, J. E., Corran, P. H., Jarra, W., Langhorne, J., & Riley, E. M. (2005). Epitope-Specific Regulation of Immunoglobulin Class Switching in Mice Immunized with Malarial Merozoite Surface Proteins. *Infection and Immunity*, 73(12), 8119–8129.
- Treanor, J., Dolin, R., & Madore, H. P. (1988). Production of a monoclonal antibody against the Snow Mountain agent of gastroenteritis by in vitro immunization of murine spleen cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(10), 3613–3617.
- Truppo, M., Yancopoulos, G., Murphy, A. J., Bradley, A., Green, L., & Lorenz, I. (2020). Non-animal-derived antibodies: Pharma companies respond. *Nature*, 586(7830), 500–500.
- Tucker, E. M., Clarke, S. W., & Méténier, L. (1987). Murine/bovine hybridomas producing monoclonal alloantibodies to bovine red cell antigens. *Animal Genetics*, 18(1), 29–39.
- Valenzuela, N. M., & Schaub, S. (2018). The Biology of IgG Subclasses and Their Clinical Relevance to Transplantation. *Transplantation*, 102(1S), S7–S13.
- Vaux, D. L., Cory, S., & Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189), 440–442.
- Vieira, J., & Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, 153, 3–11.
- Wan, S., Zhou, Z., Duan, B., & Morel, L. (2008). Direct B cell stimulation by dendritic cells in a mouse model of lupus. *Arthritis and Rheumatism*, 58(6), 1741–1750.
- Wand, I., Holzlöhner, P., Neupert, S., Micheel, B., & Heilmann, K. (2011). Cooperation of dendritic cells with naïve lymphocyte populations to induce the generation of antigen-specific antibodies in vitro. *Journal of Biotechnology*, 156(3), 173–181.
- Ward, E. S. (1993). Antibody Engineering Using *Escherichia coli* as Host. In *Advances in Pharmacology* (Bd. 24, S. 1–20). Elsevier.
- Welner, R., Swett, D. J., & Pelsue, S. C. (2005). Age-related loss of bone marrow pre-B- and immature B-lymphocytes in the autoimmune-prone flaky skin mutant mice. *Autoimmunity*, 38(6), 399–408.
- Wohlleben, G., Gray, D., & Schimpl, A. (1996). In vitro immunization of naive mouse B cells: Establishment of IgM secreting hybridomas specific for soluble protein or hapten from B cells cultured on CD40 ligand transfected mouse fibroblasts. *International Immunology*, 8(3), 343–349.
- Wolf, I., Bouquet, C., Naumann, F., & Melchers, F. (2017). Generation of precursor, immature, and mature murine B1-cell lines from c-myc/bcl-xL-overexpressing pre-B1 cells. *European Journal of Immunology*, 47(5), 911–920.

- Wykes, M., & MacPherson, G. (2000). Dendritic cell-B-cell interaction: Dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals. *Immunology*, 100(1), 1–3.
- Wykes, M., Pombo, A., Jenkins, C., & MacPherson, G. G. (1998). Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(3), 1313–1319.
- Yang, O., Qadan, M., & Ierapetritou, M. (2019). Economic Analysis of Batch and Continuous Biopharmaceutical Antibody Production: A Review. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 14, 1–19.
- You, M., Yang, Y., Zhong, C., Chen, F., Wang, X., Jia, T., Chen, Y., Zhou, B., Mi, Q., Zhao, Q., An, Z., Luo, W., & Xia, N. (2018). Efficient mAb production in CHO cells with optimized signal peptide, codon, and UTR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(14), 5953–5964.
- Zähringer, U., Knirel, Y. A., Lindner, B., Helbig, J. H., Sonesson, A., Marre, R., & Rietschel, E. T. (1995). The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): Chemical structure and biological significance. *Progress in Clinical and Biological Research*, 392, 113–139.
- Zaroff, S., & Tan, G. (2019). Hybridoma technology: The preferred method for monoclonal antibody generation for in vivo applications. *BioTechniques*, 67(3), 90–92.
- Zhang, G., Gurtu, V., & Kain, S. R. (1996). An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 227(3), 707–711.
- Zheng, Z., Zhang, L., Cui, X.-L., Yu, X., Hsu, P. J., Lyu, R., Tan, H., Mandal, M., Zhang, M., Sun, H.-L., Sanchez Castillo, A., Peng, J., Clark, M. R., He, C., & Huang, H. (2020). Control of Early B Cell Development by the RNA N6-Methyladenosine Methylation. *Cell Reports*, 31(13), 107819.
- Ziegler, S. F., Ramsdell, F., & Alderson, M. R. (1994). The activation antigen CD69. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 12(5), 456–465.
- Zurawski, D. V., & McLendon, M. K. (2020). Monoclonal Antibodies as an Antibacterial Approach Against Bacterial Pathogens. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(4).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam in der Stiftungsprofessur Immuntechnologie unter Leitung von Prof. Katja Hanack angefertigt. Ich möchte mich herzlich bei Prof. Hanack für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung bedanken, vor allem aber für den immer währenden Optimismus, die Inspiration und Unterstützung, die sie mir jederzeit zuteil werden ließ.

Ich möchte außerdem meinem Mentor Dr. Martin Listek besonders danken, der mir von Beginn an so freundschaftlich mit Rat und Tat zur Seite stand, der auf jede Frage eine Antwort und für jedes Problem drei Lösungen kennt. Ebenso möchte ich einen besonders herzlichen Dank an Prof. Burkhard Micheel richten, für den klugen Rat, die Weisheiten und Geschichten, und die Güte, mit der er mich begleitete. Mein größter Dank gebührt meiner Arbeitsgruppe. Neben dem anregenden wissenschaftlichen Austausch und der schier endlosen Hilfsbereitschaft bereiteten mir vor allem die Herzlichkeit und die inspirierende Atmosphäre in dieser Gemeinschaft eine wunderbare Zeit als Doktorandin. All jenen, die Teil davon sind oder waren, möchte ich meinen tiefsten Dank aussprechen für das Wohlwollen und all die Unterstützung und den guten Kuchen. Auch meinen Bachelorstudenten Niklas und Annette möchte ich herzlich für ihre helfenden Hände danken, meinen Korrektoren Alex und Thomas für die wachen Augen und die emsigen Stunden.

Zu guter Letzt danke ich meinen Freunden, meiner Familie, meinen Eltern, meinem Alex für die Ermutigungen, die Kraft, die Zuversicht, den Rückhalt.

Eidesstatt

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Potsdam, den 09.06.2021

Sophia Michelchen