

Aus dem deutschen Rheumaforschungszentrum

DISSERTATION

**Klonierung, Expression und initiale
Charakterisierung vom humanen TIM3**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
Universitätsmedizin Berlin

von
Frau Shengtao Zhang
aus Hongan, Provinz Hubei, China

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. O. Liesenfeld
2. PD. Dr. K. Erb
3. PD. Dr. med. T. Kamradt

Datum der Promotion: 13.09.04

Inhaltverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 6 |
| 1.1. T-Zellen | 6 |
| 1.2. Aktivierung und Differenzierung naiver Th-Zellen | 7 |
| 1.3. Identifizierung unterschiedlicher Th-Subpopulationen | 10 |
| 1.4. Rolle der Th-Zellen in der Pathogenese der Autoimmunerkrankungen und Allergien | 10 |
| 1.5. Das TIM3-Molekül | 12 |
| 1.6. Ziel der Arbeit | 14 |
| 2. Material | 15 |
| 2.1. Bakterienstämme und Zelllinien | 15 |
| 2.2. Mäuse und Gewebe von Menschen | 15 |
| 2.3. Oligonukleotide | 15 |
| 2.4. Plasmide | 16 |
| 2.5. Antikörper | 17 |
| 2.6. Puffer | 19 |
| 2.7. Medien | 22 |
| 2.8. Enzyme | 23 |
| 2.9. Peptide | 24 |
| 2.10. Zytokine | 24 |
| 2.11. Reaktionskits | 24 |
| 2.12. Chemikalien | 25 |
| 2.13. Geräte | 27 |
| 2.14. Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien | 28 |
| 3. Methoden | 29 |
| 3.1. Ex vivo Gewinnung von dendritischen Zellen | 29 |
| 3.1.1. Isolierung von mononukleären Zellen (PBMC) aus humanem Vollblut | 29 |
| 3.1.2. Anreicherung der Monocyten über Adhärenz | 29 |
| 3.1.3. Erzeugung von dendritischen Zellen aus Monocyten | 29 |
| 3.2. Isolierung der Gesamt-RNA aus dendritischen Zellen | 30 |
| 3.3. cDNA Präparation | 30 |
| 3.4. Agarosegelelektrophorese | 31 |
| 3.5. Klonierung der hTIM3 cDNA mit Topo TA Klonierungskit | 32 |
| 3.5.1. Amplifikation der hTIM3 cDNA | 32 |
| 3.5.2. Topo Klonierungsreaktion | 33 |
| 3.5.3. Transformation | 33 |
| 3.5.4. Blau-Weiß Selektion | 34 |
| 3.5.5. Analyse von positiven Kolonien | 34 |
| 3.5.6. Sequenzierung | 35 |
| 3.6. Subklonierung in die Expressionsvektoren | 35 |
| 3.6.1. Plasmid-PCR | 35 |
| 3.6.2. Restriktionsverdau der hTIM3-cDNA und der Plasmidvektor pQE100S und pIRES2EGFP | 36 |
| 3.6.3. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen | 37 |
| 3.6.4. Ligation der DNA-Fragmente | 37 |
| 3.6.5. Transformation in TOP10 und BL21 | 37 |
| 3.6.6. PCR-Screening nach positiven Kolonien | 38 |
| 3.6.7. Isolierung von Plasmid-DNA | 38 |
| 3.7. Prokaryontische Expression der extrazellulären Region vom humanen TIM3 | 38 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.7.1. | Kultivierung in BL21 (DE3) | 38 |
| 3.7.2. | Optimierung der rekombinanten hTIM3-Proteinexpression | 39 |
| 3.7.3. | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 39 |
| 3.7.4. | Western Blot-Analyse der Expression | 40 |
| 3.7.5. | Die Bestimmung der rekombinanten hTIM3-Protein-Löslichkeit | 41 |
| 3.7.6. | Affinitätsreinigung an Nickel-Agarose | 41 |
| 3.7.7. | Bestimmung der Proteinkonzentration | 42 |
| 3.8. | Eukaryontische Expression von der komplett kodierenden Region | 42 |
| 3.8.1. | Transiente Transfektion | 42 |
| 3.8.2. | FACS-Analyse der Transfektanten | 42 |
| 3.8.3. | Western Blot-Analyse der Transfektanten | 43 |
| 3.8.4. | Herstellung der stabilen Transfektion | 43 |
| 3.9. | Zellkultur und Zellzahlbestimmung | 44 |
| 3.10. | Einfrieren und Auftauen von Zellen | 44 |
| 3.11. | Durchfluscytometrie | 45 |
| 3.12. | Immunisierung der <i>BALB/c</i> Mäuse | 46 |
| 3.13. | Serumgewinnung und Bestimmung der spezifischen Immunantwort | 46 |
| 3.14. | ELISA | 47 |
| 3.15. | Kultivierung der Myelomzellen | 47 |
| 3.16. | Gewinnung von Feeder-Zellen aus dem Thymus | 47 |
| 3.17. | Fusion | 48 |
| 3.18. | Selektion | 49 |
| 3.19. | Screening | 49 |
| 3.20. | Subklonierung der Hybridome | 49 |
| 3.21. | Kultivierung der Hybridome | 50 |
| 3.22. | Antikörper-Isotypisierung | 50 |
| 4. | Ergebnisse | 51 |
| 4.1. | Generierung der DC | 51 |
| 4.2. | Klonierung der hTIM3-cDNA in pCR2.1 Vektor | 51 |
| 4.3. | Struktur des hTIM3-codierenden Gens | 53 |
| 4.4. | Amino-säure Sequenz des hTIM3 | 54 |
| 4.5. | Expression des hTIM3-Proteins in BL21 | 54 |
| 4.5.1. | Subklonierung der hTIM3-cDNA in den Vektor pQE100S | 54 |
| 4.5.2. | Optimierung der Expression | 55 |
| 4.5.3. | Western Blot-Analyse der Expression | 56 |
| 4.5.4. | Aufreinigung des rekombinanten Proteins | 57 |
| 4.6. | Expression des hTIM3-Proteins in eukaryontischen Zellen | 58 |
| 4.6.1. | Untersuchung der transfizierten Zellen durch EGFP-Koexpression | 58 |
| 4.6.2. | Untersuchung der transfizierten Zellen mit polyklonalen Antikörper des immunisierten Kaninchens | 60 |
| 4.6.3. | Stabile Transfektion | 62 |
| 4.7. | Immunisierung der <i>BALB/c</i> -Mäuse und Bestimmung des spezifischen Serumtiters | 63 |
| 4.8. | Fusion und Screening | 65 |
| 4.9. | Isotyp-Bestimmung | 66 |
| 5. | Diskussion | 67 |
| 5.1. | Identifikation vom humanen TIM3 | 67 |
| 5.2. | Expression des hTIM3-Proteins in <i>E. coli</i> | 68 |
| 5.3. | Expression des hTIM3-Proteins in eukaryontischen Zellen | 68 |
| 5.4. | Vergleich der IgG-Antwort gegen hTIM3 in den Mäusen nach verschiedenen Immunisierungsprotokollen | 69 |

| | |
|---|----|
| 5.5. Generierung der monoklonalen Antikörper | 70 |
| 5.6. Ausblick | 71 |
| 6. Zusammenfassung | 72 |
| 7. Referenzen: | 74 |
| 8. Abkürzungen | 83 |
| 9. Eidesstattliche Erklärung | 86 |
| 10. Danksagung | 87 |

1. Einleitung

1.1. T-Zellen

T-Zellen können durch T-Zell-Antigenrezeptor (T-cell receptor, TCR) in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Eine exprimiert $\alpha:\beta$ - und die andere $\gamma:\delta$ -Rezeptoren. Beide Rezeptoren sind mit einem Satz von fünf Polypeptiden, dem CD3-Komplex, assoziiert, die den T-Zell-Rezeptorkomplex ausmachen (CD3-TCR-Komplex). Ungefähr 85-95% der T-Zellen besitzen $\alpha:\beta$ -Rezeptoren und bis zu 15% $\gamma:\delta$ -Rezeptoren. Die $\alpha:\beta$ -T-Zellen können weiter in zwei verschiedene, nicht überlappende Populationen unterteilt werden: Eine, die CD4 exprimiert und hauptsächlich Immunantworten erzeugen hilft, nennt man T-Helferzellen (Th). Eine andere Gruppe, die CD8 exprimiert und verantwortlich für die Zerstörung infizierter Zellen ist, nennt man zytotoxische T-Zellen (Tc). Die TCRs können Antigene erkennen, wenn sie in einem MHC (major histocompatibility complex)/Peptide-Komplex präsentiert werden. Es gibt zwei Hauptklassen von MHC-Molekülen, die man MHC-I und MHC-II bezeichnet. Die Tc-Zellen erkennen an MHC-I-Moleküle gebundene Antigene. Auf diese Weise können Virus-infizierte Zellen erkannt werden. Die Th-Zellen interagieren mit an MHC-II-Moleküle gebundenen Antigenen. Die $\gamma:\delta$ -T-Zellen tragen weder den CD4- noch den CD8-Marker und sind hauptsächlich nicht-MHC-beschränkt.

Es gibt viele verschiedene Th-Zellen, die jeweils zu den unterschiedlichen Krankheitserregern passen. Kommen die Th-Zellen mit dem Antigen in Kontakt, so wird ihre weitere Differenzierung stimuliert. Durch ihre Zytokinproduktion spielen Th-Zellen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort bei Infektionskrankheiten, Allergien und Autoimmunerkrankungen. Anhand ihrer Zytokinmuster können Th-Zellen in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden (Mosmann, et al., 1986, Mosmann, et al, 1989). Eine vereinfachte Einteilung in Th1- und Th2-Zellen hat sich als nützlich zum Verständnis physiologischer und pathologischer Immunantworten erwiesen. Diese beiden Untertypen wurden auch für humane Th-Zellen gefunden (Romagnani, 1991). Th1-Zellen produzieren überwiegend IL-2, IFN- γ und TNF- β . Die wichtigste Funktion von Th1-Zellen ist die zellvermittelte Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene wie Viren, Bakterien. Sie sind aber auch mit Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ (delayed-type hypersensitivity reactions, DTH) und Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, systemischer

Lupus erythematoses (SLE), Multiple Sklerose, Insulinabhängiger Diabetes mellitus (IDDM) usw. assoziiert. Auf der anderen Seite setzen Th2-Zellen vor allem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 frei und stimulieren B-Zellen zur Proliferation und zur Antikörperproduktion (IgE eingeschlossen). Die Hauptfunktion von Th2-Zellen ist die Immunabwehr gegen extrazelluläre Pathogene wie Parasiten. Sie sind mit allergischen Erkrankungen wie Asthma und Allergien assoziiert (Abbas, et al., 1996; Cher, et al., 1987; Infante Duarte, et al., 1999; Kuchroo, et al., 1995; Mosmann, et al., 1989; Sher, et al., 1992). Th1- und Th2-Zellen können in ihrer Entwicklung die klonale Expansion und Funktion gegenseitig inhibieren (Murphy, et al., 2002).

Es gibt noch funktionell unterschiedliche Populationen von Th-Zellen, die andere als die typischen Th1- oder Th2-Zytokinkombinationen exprimieren, diese werden als Th0 (Firestein, et al., 1989), Th3 (Chen, et al., 1994) oder Tr1 (Groux, et al., 1997) bezeichnet. Kurze Stimulation führt zur Entwicklung von Th0-Zellen, die sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine freisetzen können. Es ist noch unklar, ob die Th-Zellen bei ihrer Differenzierung ein Zwischenstadium Th0 durchlaufen, ob es sich bei den Th0-Zellen um eine stabil differenzierte Population oder um verschiedene Subpopulationen handelt (Abbas, et al., 1996; Firestein, et al., 1989; Löhning, et al., 1999). Th3- und Tr1-Zellen wurden als regulatorische T-Zellen bezeichnet. Th3-Zellen schütten vor allem TGF- β aus und sollen die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen verhindern (Chen, et al., 1994). Tr1-Zellen, gekennzeichnet durch die Produktion von IL-10 und IL-5, haben immunsupprimierende Funktion (Groux, et al., 1997).

1.2. Aktivierung und Differenzierung naiver Th-Zellen

Für eine Aktivierung und Expansion von naiven Th-Zellen sind mehrere Signale, die die Th-Zellen durch die professionellen antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cell, APC) erhalten müssen, notwendig. Th-Zellen haben an ihrer Oberfläche Rezeptoren, die ihnen das Erkennen verschiedener MHC/Peptid-Komplexe ermöglichen. Hat eine naive antigenspezifische Th-Zelle einen MHC/Peptid-Komplex erkannt, benötigt sie ein zweites, costimulatorisches Signal, das durch die Bindung des von derselben APC exprimierten B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) Moleküls mit dem CD28-Molekül, das sich auf der Th-Zelle befindet, vermittelt wird (Abb.1). Zur vollständigen Aktivierung der CD4⁺ Th-Zelle ist B7 als wichtigstes Costimulationssignal essentiell. Korezeptoren der APC wie B7-1 und B7-2 stehen in Wechselwirkung mit entsprechenden Rezeptoren der T-Zelle wie CD28 (Lenschow, et al.,

1996). IL-2, das von der aktivierten CD4⁺ Th-Zelle sezerniert wird, wirkt als autokriner Wachstumsfaktor auf die Zelle selbst, beeinflusst aber auch B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK).

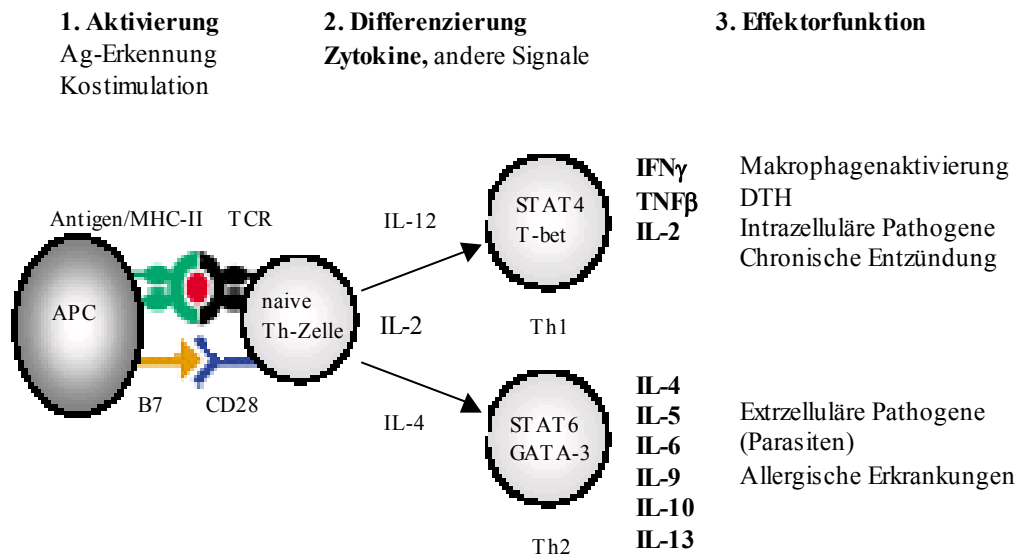


Abb. 1: Aktivierung und Differenzierung naiver Th-Zellen Nach der Aktivierung durch Antigenerkennung und kostimulatorische Signale, die von den antigenpräsentierenden Zellen vermittelt werden, kann eine Th-Zelle sich in eine Th1- oder Th2-Zelle differenzieren. Entscheidend dafür sind die Zytokine, die während der Aktivierung vorhanden sind sowie die Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren (z.B. T-bet für Th1 und GATA-3 für Th2).

Nach Aktivierung durch Antigenerkennung und costimulatorische Signale, die von den antigenpräsentierenden Zellen vermittelt werden, findet die Differenzierung dieser Zellen zu einer Th1- oder Th2-Zelle statt. Dieser Schritt beeinflusst das Ergebnis einer adaptiven Immunantwort stark. Welche Th-Antwort sich ausbildet, ist offensichtlich von mehreren Faktoren abhängig. Im Detail ist es noch nicht bekannt, was letztlich die Differenzierung auslöst (Murphy und Reiner, 2002).

Die Zytokine, die während der Aktivierung vorhanden sind, spielen eine entscheidende Rolle bei der Th1- und Th2-Differenzierung. In vitro-Experimente haben gezeigt, dass IL-12, IFN- γ und im Menschen auch IFN- α , das in den frühen Phasen einer Immunreaktion gegen intrazelluläre Pathogene von aktivierten Makrophagen, dendritischen Zellen (dendritic cell, DC) und NK-Zellen ausgeschüttet wird, eine Differenzierung zu Th1-Zellen bewirkt (Hsieh, et al., 1993; Seder, et al., 1993; Macatonia, et al., 1995; Heufler, et al., 1996). Dagegen fördert

IL-4 die Produktion der Th2-Zellen. Es ist nicht ganz klar, woher das IL-4 in dieser frühen Phase einer Immunantwort stammt, noch bevor sich IL-4-freisetzende CD4-T-Zellen entwickelt haben. (Le Gros, et al., 1990 ; Seder, et al., 1992; Sher, et al, 1992 ; Swain, et al., 1990). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass IL-12 durch Aktivierung des STAT4-Signaltransduktionswegs Th1-Differenzierung induziert (Akira, 1999 ; Jacobson, et al., 1995; Kaplan, et al., 1996; Rogge, et al., 1998), während IL-4 durch Aktivierung des STAT6-Signaltransduktionswegs zur Polarisierung der Th2-Zellen führt (Akira, 1999 ; Hou, et al., 1994).

Es ist auch denkbar, dass andere Zytokine in der Lage sein sollten, die Bedingungen der T-Zell-Aktivierung zu verändern und das Verhältnis zwischen den beiden Typen von CD4-T-Zellen zu beeinflussen. Das von APC freigesetzte IL-6 kann durch Induktion der IL-4-Produktion in CD4⁺-T-Zellen naive Th-Zellen zu Th2-Zellen differenzieren (Rincon, et al., 1997). TGF- β scheint die Vermehrung und die Effektorfunktionen von Th1-Zellen zu verhindern, während IL-10 ihre Reaktionen auf das Antigen blockiert. Entsprechend inhibiert IFN- γ offensichtlich Wachstum und Effektorfunktionen der Th2-Zellen (Badaro, et al., 1990; Salgamme, et al., 1992).

In den letzten Jahren wurden einige Transkriptionsfaktoren wie T-bet, GATA-3 und c-Maf als kritische regulatorische Faktoren für Th1 und Th2-Differenzierung identifiziert. Th1-spezifischer Transkriptionsfaktor T-bet induziert IL-12R β 2- und IFN- γ -Expression während Th1-Polarisierung und inhibiert Th2-Polarisierung (Mullen, et al., 2001; Szabo, et al., 2000; Afkarian, et al., 2002), während GATA-3 und c-Maf selektiv auf Th2-Zellen exprimiert wird und die Th2-Zytokinexpression reguliert. GATA-3 spielt eine wichtige Rolle für IL-4-, IL-5- und IL-13-Expression. C-Maf ist für IL-4-Expression notwendig, aber beeinflusst nicht die Expression von IL-5 und IL-13 (Ho, et al., 1996; Kim, et al., 1999; Zhang, et al., 1999; Zheng, et al., 1997).

Welche zusätzlichen Signale bei der Th1/Th2-Polarisierung noch entscheidend sein könnten, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Dabei scheinen die Stärke der Peptid-MHC-Liganden und der APC-Typ eine große Rolle zu spielen. Peptide, die in hoher Dichte auf APC präsentiert werden, induzieren bevorzugt Th1-Antworten, während die Präsentation in geringer Dichte eine Th2-Antwort hervorruft (Murphy und Reiner, 2002). Weiterhin

aktivieren Antigene auf dendritischen Zellen CD4⁺-Zellen stärker als B-Zellen und Makrophagen (Croft, et al., 1992).

1.3. Identifizierung unterschiedlicher Th-Subpopulationen

Obwohl die Zytokinproduktion und Effektorfunktion der Th-Subpopulationen schon viel bekannt ist, weiß man noch relativ wenig über die Oberflächemoleküle, die unterschiedlich auf den Th1- oder Th2-Zellen stabil exprimiert werden und auf lebenden Zellen detektierbar sind. Als neue Zielmoleküle von immunmodulatorischen Therapiestrategien von Autoimmunerkrankungen könnten solche Oberflächenmoleküle benutzt werden, um unerwünschte Immunreaktionen zu kontrollieren. In den letzten Jahren wurden die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 als humane Th1-, CCR3, CCR4, CXCR4 und CCR8 als Th2-spezifische Oberflächenmoleküle beschrieben (Loetscher, et al., 1998; Bonecchi, et al., 1998; Sallusto, et al., 1998). Bislang konnten diese Beobachtungen aber nicht bestätigt werden. CCR5 wird außer auf Th1-Zellen auch von CD4⁺- und CD8⁺-Makrophagen und Langerhans-Zellen exprimiert (Zaitseva, et al., 1998). CXCR3 wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen exprimiert (Loetscher, et al., 1996). Das Molekül T1/ST2, das präferentiell auf Th2-Zellen exprimiert wird und für die Funktion dieser Zellen von Bedeutung ist, könnte ein Ansatzpunkt für eine immunmodulatorische Therapie sein (Coyle, et al., 1999; Löhning, et al., 1998; Löhning, et al., 1999; Xu, et al., 1998; Meisel, et al., 2001).

1.4. Rolle der Th-Zellen in der Pathogenese der Autoimmunerkrankungen und Allergien

Eine Autoimmunerkrankung beruht auf einer Immunreaktion gegen körpereigene Antigene. Man weiß nicht, wodurch eine Autoimmunreaktion ausgelöst wird. Autoimmunkrankheiten können durch Autoantikörper oder durch autoimmun wirkende T-Zellen verursacht werden. In den meisten Fällen spielen autoreaktive CD4⁺-T-Zellen eine kritische Rolle (Kamradt und Mitchison, 2001).

Die experimentell autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein Mausmodell für die multiple Sklerose. Die Krankheit wird von Th1-Zellen hervorgerufen, die für Myelinantigene spezifisch sind. Eine Immunisierung mit MBP (myelin basic protein) allein kann zur Erkrankung führen. Klonierte MBP-spezifische Th1-Zellen können die Krankheit auf gesunde

Empfänger übertragen, sofern diese das geeignete MHC-Allel besitzen. Auch bei der multiplen Sklerose hat man gefunden, dass MBP-spezifische Th-Zellen an der Pathogenese beteiligt sind (Martin, et al., 1992; Steinman, et al., 1996; Zamvil, et al., 1990). Bis heute ist noch nicht bewiesen, dass diese Zellen tatsächlich für die Demyelinisierung verantwortlich sind.

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische entzündliche Erkrankung, die sich vor allem an der Gelenkinnenhaut (Synovia) manifestiert und zur Erosion, Fehlstellung und Destruktion führt. Bei der T-Zellinfiltration der Synovia handelt es sich vorwiegend um aktivierte CD4⁺ Th-Zellen (Cush, et al., 1988). Im Synovialgewebe und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten wurden überwiegend Th1-Zytokine besonders IFN- γ gefunden (Dolhain, et al., 1996; Park, et al., 2001; Canete, et al., 2000).

Der insulinabhängige Diabetes mellitus (IDDM) ist eine chronische, durch autoreaktive Th-Zellen vermittelte Erkrankung, welche eine Inflammation und Zerstörung der Insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas zur Folge hat. Die autoreaktive Th-Zell-Antwort ist beim IDDM gegen die Antigene GAD (glutamic acid decarboxylase) gerichtet. Die Experimente am NOD-Mausmodell haben gezeigt, dass die T-Zellen aus NOD-Mäusen während der Antwort gegen dieses Protein eine große Menge von IFN- γ produzieren (Kaufmann, et al., 1993; Tisch, et al., 1993). Die Behandlungen mit anti-IFN- γ -Antikörper können die Entwicklung des Diabetes in den NOD-Mäusen verhindern (Campbell, et al., 1991; Debray-Sachs, et al., 1991). Die weiteren Untersuchungen im NOD-Mausmodell haben gezeigt, dass die insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas selektiv durch spezifische T-Zellen zerstört werden. Die infiltrierenden Lymphozyten weisen dabei eine anhaltende Th1-Zytokinproduktion auf (Delovitch, et al., 1997). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Th1-Zellen von großer Bedeutung für die Entwicklung des Diabetes in der NOD-Maus sowohl in der frühen als auch in der späten Phase ist.

Eine besonders schwer verlaufende Autoimmunerkrankung ist der systemische Lupus erythematoses (SLE), bei welchem Autoantikörper gegen Zellkernbestandteile und die Doppelstrang-DNA gebildet werden. Eine Th1/Th2-Zytokin-Inbalance mit überwiegender Th1-Zellen in den peripheren Th-Zellen von SLE-Patienten mit der Lupus-Nephritis wurde beobachtet (Akahoshi, et al., 1999). Die MRL/lpr-Maus ist ein Modell für SLE und entwickelt spontan SLE-ähnliche Erkrankung. Die Untersuchungen im MRL/lpr-Modell haben gezeigt,

dass Th1-Zellen und das von Th1-Zellen freigesetzte IFN- γ von wichtiger Bedeutung für die Pathogenese der SLE-ähnliche Erkrankung im MRL/lpr-Mausstamm ist (Takahashi, et al., 1996; Balomenos, et al., 1998; Lawson, et al., 2000; Shiozawa, et al. 2004).

Während man bei Autoimmunerkrankungen also überwiegend eine Th1-Antwort findet, kann auch eine überschießende Th2-Reaktion bei Allergien z.B. Asthma beobachtet werden (Lukacs, et al., 2000; McIntire, et al., 2001). Bei Patienten mit Asthma geht eine Prädominanz von Th2-Zellen mit Freisetzung von IL-4 und IL-5 einher, was die B-Lymphozyten zur Produktion von Immunglobulin-E anregt und in der Lunge zu der typischen eosinophilen Entzündung führt (Brutsche, Frey, 2002). Im Mausmodell wurde auch gefunden, dass die Aktivierung von Mastzellen und Th2-Antworten durch Antigen-Stimulierung hervorgerufen wird (McIntire, et al., 2001).

Die Ursachen für Autoimmunerkrankungen sind trotz intensiver Forschung noch nicht bekannt. Die Untersuchungen der Th-Zell-Differenzierung bei Autoimmunerkrankungen dienen nicht nur dazu, die Pathogenese dieser Krankheiten zu verstehen, sondern möglicherweise auch einige neue Zielmoleküle für die immunmodulatorische Therapie zu identifizieren, um eine gestörte Th1/Th2-Zytokin-Balance wiederherzustellen. Es erscheint jedoch möglich und ist in Modellsystemen auch bereits gelungen, die einzelnen CD4-T-Zellen durch Antigen oder Zytokine zu manipulieren, (Badaro, et al., 1990; Constant, et al., 1995; Hosken, et al., 1995; Pfeiffer, et al., 1991; Powrie, et al., 1993; Lawson, et al., 2000).

1.5. Das TIM3-Molekül

Nach der Aktivierung differenzieren CD4-T-Zellen zu Th1- oder Th2-Zellen, die sich durch ihre Funktion und Zytokinmuster, aber nicht einfach durch stabil exprimierte Oberflächlichenmarker unterscheiden lassen. Um Gene zu finden, die exklusiv in Th1- oder Th2-Zellen exprimiert werden, wurden OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid spezifische, differenzierte Th1- und Th2-Linien aus DO11.10 TCR-transgenen CD4⁺ Zellen generiert und verwendet, um eine PCR-gestützte „Differential Display Analyse“ durchzuführen (Löhning et al., 1998). Eines der Gene, welches im Zuge dieser Analyse spezifisch in Th1-Zellen exprimiert wird, ist tim3. Um Th1-spezifische Oberflächenproteine zu identifizieren, hat eine andere Arbeitsgruppe die Ratten mit Th1-Zell-Klonen immunisiert, und zwei monoklonale Antikörper gegen ein Oberflächenprotein nur auf Th1-Zellen aber nicht auf Th2-Zellen generiert. Dieses Protein

wurde als TIM3 (T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule 3) identifiziert (Monney, et al., 2002; Sanchez-Fueyo, et al., 2003). Weitere genetische und genomische Analysen zeigten, dass dieses Gen zur TIM-Genfamilie gehört. Das wurde sowohl in der Maus als auch im Menschen gefunden. Da die Proteine dieser Genfamilie auf T-Zellen exprimiert werden, eine Immunoglobulin V-ähnliche Domäne und eine Mucin-ähnliche Domäne enthalten, wurden sie TIM genannt. Das erste TIM-Gen, TIM1, wurde ursprünglich als KIM1 (kidney injury molecule 1) und HAVCR (hepatitis A virus cellular receptor) identifiziert (Feigelsstock, et al., 1998; Feigelsstock, et al., 1998; Han, et al., 2002; Ichimura, et al., 1998; Kaplan, et al., 1996). Experimente an einem Mausmodell haben gezeigt, dass TIM1 die Expression von Th2-Zytokinen in der frühen Phase fördern könnte. Weiterhin wurde gezeigt, dass TIM1 mRNA in Th2-Zelllinien aber nicht in Th1-Zelllinien exprimiert wurde (McIntire, et al., 2001). Aufgrund dieser Ergebnisse nimmt man an, dass TIM-Proteine von großer Bedeutung für die Th-Zell-Differenzierung, Th-Zell-Effektorfunktion und Autoimmunerkrankungen, Allergie und Asthma sind (McIntire, et al., 2001; Monney, et al., 2002).

Bis heute weiß man noch nicht viel über die Funktion von TIM3. In vivo-Experimente in einem EAE-Mausmodell haben gezeigt, dass die Gabe von Antikörpern gegen TIM3 die Aktivierung und Expansion der Makrophagen erhöhte, die Erkrankung beschleunigte und verschlimmerte (Monney, et al., 2002; Sanchez-Fueyo, et al., 2003). Der Mechanismus, wie der TIM3-spezifische Antikörper in vivo die Aktivierung der Makrophagen und die Interaktion zwischen Zellen vermittelt, ist noch unklar. Eine wahrscheinliche Erklärung ist, dass die Interaktion zwischen TIM3 auf der Oberfläche der Th1-Zellen und seinem potentialen Liganden auf der Oberfläche der Makrophagen zur Aktivierung und klonalen Expansion der Makrophagen führt (Kuchroo, et al., 2003; Sanchez-Fueyo, et al., 2003). Bislang ist allerdings der natürliche Ligand für TIM3 (TIM3L) unbekannt. Um die Funktion von TIM3 und die Interaktion von TIM3-TIM3L weiter zu charakterisieren, wurde ein Fusionsprotein, TIM3-Immunoglobulin (TIM3-Ig) genutzt (Sabatos, et al., 2003; Sanchez-Fueyo, et al., 2003). Der erste Befund ist, dass ein putativer TIM3-Ligand auf CD4⁺-T-Zellen exprimiert wird. Der zweite wesentliche Befund betrifft die Interaktion von TIM3-TIM3L. Die Interaktion von TIM3-TIM3L kann Th1-Immunantwort runterregulieren und spielt eine wichtige Rolle für die Induktion der peripheren Toleranz. Diese Ergebnisse wurden nicht nur in den Mausmodellen, in denen eine Th1-Immunantwort und Toleranz durch PLP (myelin proteolipid protein)-Immunisierung induziert wurde (Sabatos, et al., 2003), sondern auch in

den Mausmodellen der Th1-medierte auto- und alloimmun Antwort wie NOD (nonobese diabetic) und Transplantationstoleranz (Sanchez-Fueyo, et al., 2003) gefunden.

Bisherige Befunde im Mausmodell deuten darauf hin, dass die Bindung von TIM3-TIM3L ein hemmendes Signal für die Regulation der entzündlichen Immunantwort in vivo bietet. Die immunologische Funktion des humanen TIM3 Moleküls bleibt noch unbekannt.

1.6. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das Gen vom humanen TIM3 mittels PCR zu amplifizieren, zu klonieren, die extrazelluläre Region in *E.coli* und komplett kodierende Region in eukaryontischen Zellen zu exprimieren und funktionell zu identifizieren. Des Weiteren sollte die Immunisierung von Mäusen mit dem rekombinanten hTIM3-Protein oder mit stabil transfizierten Zellen durchgeführt werden, um monoklonale Antikörper herzustellen.

2. Material

2.1. Bakterienstämme und Zelllinien

Es wurde der Bakterienstamm *E.coli* BL21 (DE3) (Novagen) eingesetzt. Dieser Stamm ist lysogen für den Bakteriophagen λ DE3 und enthält das Gen für die T7 Polymerase dieses Phagen. Genotyp: F⁻ omp T hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3)

| | |
|--------------------------|--|
| <i>E.coli</i> BL21 (DE3) | Novagen |
| COS-7 | DRFZ |
| CHO-K1 | DRFZ |
| HEK 293 | DRFZ |
| P3 X 63 Ag8.653 | DRFZ, Myelomzelllinie aus der <i>BALB/c</i> Maus: ATCC: P3 X 63 Ag8.653 |

2.2. Mäuse und Gewebe von Menschen

| | |
|----------------------------|------------------------------------|
| BALB/c Mäuse | Versuchstierzucht des BgVV, Berlin |
| humanes Blut (Buffy-coats) | Blutbank, Charite Berlin |

2.3. Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden von der Firma TIB MOLBIOL synthetisiert.

Sequenzprimer:

| | | |
|-------------|-------------------|----------------------------------|
| pCR2.1-TOPO | M13 forward (-20) | 5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3' |
| | M13 reverse | 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' |
| hTIM-3 | forward | 5'-ATG TGT CCC TGA CCA TAG-3' |
| | reverse | 5'-TAA GAG CCA GAG CCA GCC-3' |
| pQE100S | forward | 5'-CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG-3' |

| | |
|-----------------------|---------------------------------------|
| pIRES2-EGFP forward | 5'-AGG CGT GTA CGG TGG GAG-3' |
| reverse | 5'-CGG CTT CGG CCA GTA ACG-3' |
| | |
| βActin Primer forward | 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3' |
| (cDNA-check) reverse | 5'-CTC CTT AAT GTC AAG CAC GAT TTC-3' |

Primer für die humanTim-3-cDNA Synthese

| | |
|---------|---|
| forward | 5'-GTG GAG TAG ACA GTT GGA AGA AGT A-3' |
| reverse | 5'-CAG TCA GGT GAC ACA GCT CAT A-3' |

Primer für hTim-3 Subklonierung (Restriktionsschnittstelle wurde fett geschrieben):

für pIRES2-EGFP:

forward: 5'-TCTA **GCT AGC** AGA CAG TTG GAA GAA GTA-3' (Nhe I, mit 5'NTR)

5'-TCTA **GCT AGC** ATG TTT TCA CAT CTT CCC-3' (Nhe I, mit Startcode)

reverse: 5'-ACCG **CTC GAG** CTA TGG CAT TGC AAA GCG-3' (Xho I)

für pQE100S:

forward:

5'-CATCCG **CAT ATG** ATG TTT TCA CAT CTT CCC-3' (Nde I, mit Signalsequenz)

5'-ACT CCG **CAT ATG** TCA GAA GTG GAA TAC AGA-3' (Nde I, ohne Signalsequenz)

reverse:

5'-GCCA **ATG CAT** TCT GAT GGT TGC TCC AGA-3' (Nsi I)

2.4. Plasmide

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Vektor pQE100S und pIRES2EGFP verwendet. Der Vektor pQE100S expremiert eine klonierte cDNA mit einem Histidinmarker von 6× Histidinresten am N-Terminus und enthält einen lac Z-Promotor sowie eine Ampicillin-Resistenz. Der Vektor pIRES2EGFP enthält einen CMV-Promotor, die Sequenz IRES-GFP, die EGFP-Koexpression gewährleistet, und ein Neomycin-Resistenzgen, das die Selektion von stabil transfizierten Zellen mit Geniticinsulfat (G418) erlaubt (Abb.2).

2.5. Antikörper

Polyklonaler Antikörper des Kaninchens gegen hTIM3

Anhand der Aminosäuresequenz wurden zwei Peptide (s. 2.9) von der Firma Eurogentec S.A. Belgium synthetisiert, an KLH gekoppelt und zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt.

Durchflusszytometrie

Ziege-anti-Kaninchen-IgG

Biosource, wurde an Cy5 gekoppelt und als sekundärer Antikörper eingesetzt.

Ziege-anti-Maus-IgG

Biosource, wurde an Cy5 gekoppelt und als sekundärer Antikörper eingesetzt

Western Blot

Maus-anti-6×His-IgG1

QIAGEN, 100ng/ml, erkennt einen penta-His-Tag, wurde als Primärantikörper eingesetzt (Verdünnung 1: 15000 in TBS-Puffer)

Schaf-anti-Maus-IgG-AP-Konjugat

Sigma, erkennt murine IgG, wurde als Sekundärantikörper eingesetzt (Verdünnung 1:15000 in TBS-Puffer)

Ziege-anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat

Sigma, erkennt Kaninchen IgG, wurde als Sekundärantikörper eingesetzt (Verdünnung 1:2500 TBS-Puffer)

ELISA

Schaf-anti-Maus-IgG

-Peroxidase-Konjugat

Sigma, erkennt murine IgG, wurde als Sekundärantikörper eingesetzt (Verdünnung 1:5000 in PBT-Puffer)

Ziege-anti-Kaninchen-IgG

-Peroxidase-Konjugat

Sigma, erkennt Kaninchen IgG, wurde als Sekundärantikörper eingesetzt (Verdünnung 1:40000 in PBT-Puffer)

Kaninchen-anti-Ziege-IgG

-Peroxidase-Konjugat

Sigma, erkennt Ziege IgG, wurde als Sekundärantikörper eingesetzt (Verdünnung 1:5000 in PBT-Puffer)

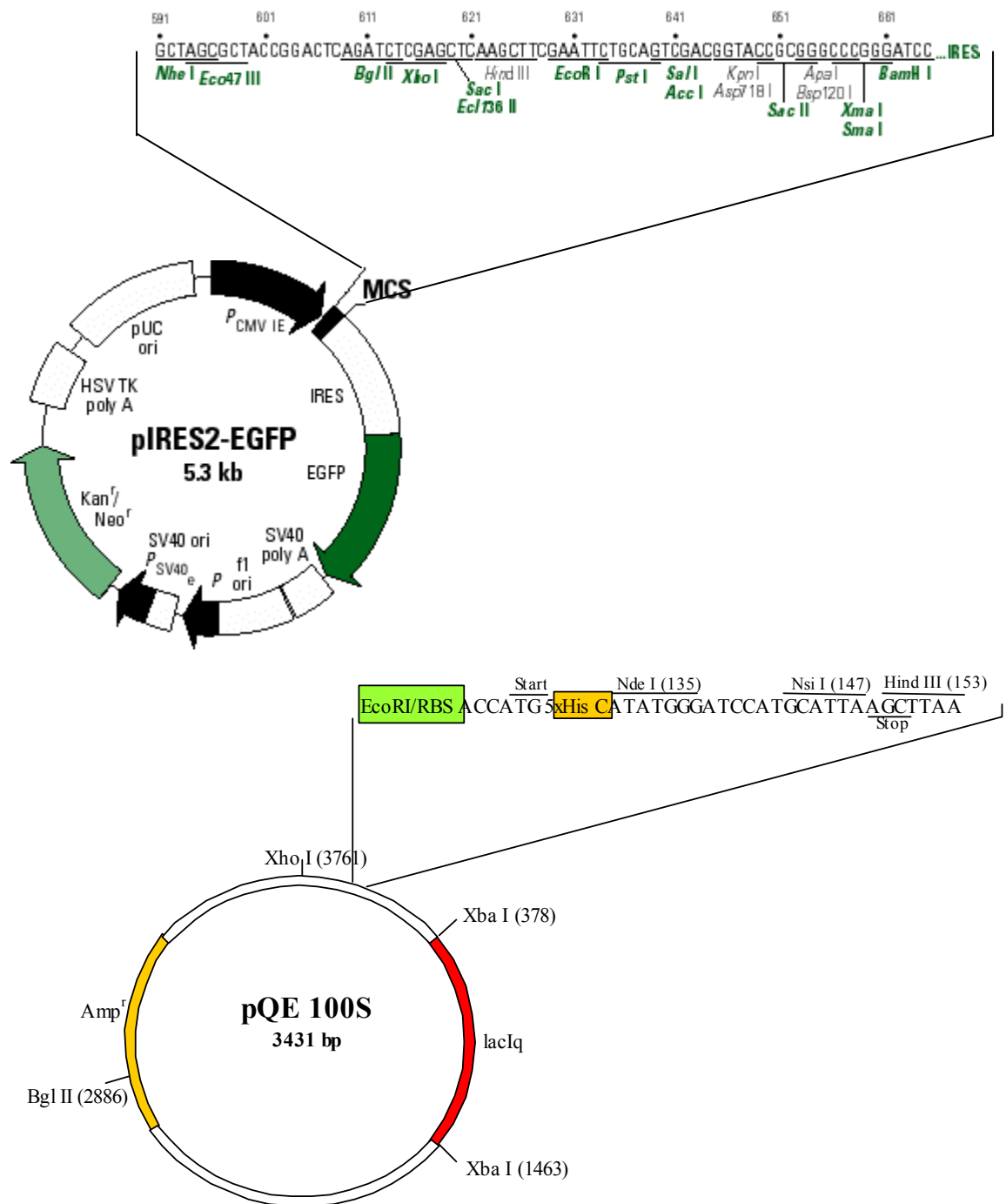


Abb. 2: Schematische Darstellung des Plasmidvektors pIRES2EGFP und pQE100S und Sequenz der multiplen Klonierungsstelle.

2.6. Puffer

| | | |
|---|-------------------|--------------------------------|
| PCR-Puffer (Genexpress, Berlin) | 10× PCR-Puffer | |
| Restriktionsverdau (NewEnglandBiolabs) | 10× EcoR I-Puffer | |
| | 10× H-Puffer | |
| | 10× NEB-Puffer 2 | |
| | 10× BSA | |
| SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese | | |
| 10× Laufpuffer | 30g | Tris |
| | 144g | Glycin |
| | 10g | Natriumdodecylsulfat (SDS) |
| | 1000ml | ddH ₂ O |
| 2× reduzierender Probenpuffer | 0.77g | Dithiothreitol (DTT) |
| | 10ml | 10%SDS |
| | 4ml | 1M Tris |
| | 5ml | Glycerin |
| | 20mg | Bromphenolblau |
| | 25ml | ddH ₂ O, pH 6,8 |
| Färbungslösung | | |
| | 1,25g | Coomassie blue R 250 |
| | 250ml | Methanol |
| | 50ml | Essigsäure |
| | 200ml | ddH ₂ O |
| Entfärbungslösung | | |
| | 430ml | Methanol |
| | 70ml | Essigsäure |
| | 500ml | ddH ₂ O |
| Western Blot | | |
| Blottingpuffer (10×) | 19,3g | Tris |
| | 90g | Glycin |
| | 1000ml | ddH ₂ O, pH 8,1~8,4 |
| Transferpuffer | 100ml | 10× Blottingpuffer |

| | | |
|------------------------------------|-------------|----------------------------------|
| | 200ml | Methanol |
| | 700ml | ddH ₂ O |
| TBS-Puffer | 50ml | 0,2M Tris |
| | 30ml | 5M NaCl |
| | 1000ml | ddH ₂ O, pH 7,5 |
| TBS-Tween | TBS-Puffer | |
| | 0,05% (v/v) | Tween 20 |
| Blockpuffer | TBS-Puffer | |
| | 3% | Rinderserumalbumin (BSA) |
| Inkubationspuffe | TBS-Tween | |
| | 1% | BSA |
| Alkalische Phosphatase-Färbelösung | 1 Tablette | NBT-BCIP |
| | 10ml | ddH ₂ O |
| Agarosegelelektrophorese | | |
| Laufpuffer (50× TAE) | 242g | Tris |
| | 57,1ml | 96% Essigsäure |
| | 100ml | 0,5M EDTA |
| | 1000ml | ddH ₂ O, pH 8 |
| 5× Probenpuffer | 50ml | Glycerin |
| | 1ml | 1M Tris |
| | 1g | Orange G |
| | 100ml | ddH ₂ O, pH 7,5 |
| 6× His-tagged hTIM3 Aufreinigung | | |
| Lysis Puffer | 50mM | NaH ₂ PO ₄ |
| | 300mM | NaCl |
| | 20mM | Imidazol |
| | pH 8,0 | |
| Puffer A | 100mM | NaH ₂ PO ₄ |
| | 10mM | Tris |
| | 6M | GuHCl |
| | pH 8,0 | |
| Puffer B | 100mM | NaH ₂ PO ₄ |

| | | |
|----------|--------|----------------------------------|
| | 10mM | Tris |
| | 8M | Harnstoff |
| | pH 8,0 | |
| Puffer C | 100mM | NaH ₂ PO ₄ |
| | 10mM | Tris |
| | 8M | Harnstoff |
| | pH 6,3 | |
| Puffer D | 100mM | NaH ₂ PO ₄ |
| | 10mM | Tris |
| | 8M | Harnstoff |
| | pH 5,9 | |
| Puffer E | 100mM | NaH ₂ PO ₄ |
| | 10mM | Tris |
| | 8M | Harnstoff |
| | pH 4,5 | |

Durchflusszytometrie

| | | |
|---|--------|----------------------------------|
| Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) | 137mM | NaCl |
| | 2,7mM | KCl |
| | 1,5mM | KH ₂ PO ₄ |
| | 8,1mM | Na ₂ HPO ₄ |
| | pH 7,2 | |

| | |
|----------------------------|--------------------------------------|
| FACS-Puffer (PBS/BSA/Azid) | PBS |
| | 0,5% (w/v) BSA |
| | 0,5% Natriumazid (NaN ₃) |

ELISA

| | |
|-------------------|----------------|
| Bindungspuffer | PBS |
| Blockpuffer | PBS |
| | 0,5% BSA |
| Inkubationspuffer | PBS |
| | 0,5% BSA |
| | 0,05% Tween-20 |
| Waschpuffer | PBS |

| | |
|---|--|
| 3,3',5,5'Tetramethylbenzidin-Puffer (TMB-Puffer) | 0,05% Tween-20 25,7ml 0,2M Na ₂ HPO ₄ 24,3ml 0,1M Zitronensäure 50ml ddH ₂ O pH 5,0 |
| Entwicklungslösung | 1 TMB-Tablette 10ml TMB-Puffer 2µl 30%ige H ₂ O ₂ |
| Stopping Lösung | 12,5% H ₂ SO ₄ |

2.7. Medien

| | |
|--------------------|--|
| Zellkulturmedium: | RPMI-1640 10% Fetales Kälberserum (FCS) 50µM 2-Mercaptoethanol 100U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin |
| Waschmedium | RPMI-1640 5% Kulturmedium |
| Serumfreies Medium | RPMI-1640 50µM 2-Mercaptoethanol 100U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin |
| HAT-Medium | RPMI-1640 20% Fetales Kälberserum (FCS) 50µM 2-Mercaptoethanol HAT-Supplement (1×) 50 U/ml rmIL-6 100U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin |

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| HT-Medium | RPMI-1640 |
| | 20% Fetales Kälberserum (FCS) |
| | 50µM 2-Mercaptoethanol |
| | HAT-Supplement (1×) |
| | 50 U/ml rmIL-6 |
| | 100U/ml Penicillin |
| | 100µg/ml Streptomycin |
| SOC-Medium | 2g Trypton |
| | 0,55g Hefe-Extrakt (yeast extract-B) |
| | 1ml 1M NaCl |
| | 1ml 1M KCl |
| | 1ml 2M MgCl |
| | 1ml 2M glucose |
| | 97ml ddH ₂ O, pH 7,0 |
| LB-Medium | 10g/l Trypton-B (trptone-B) |
| | 5g/l Hefe-Extrakt (yeast extract-B) |
| | 10g/l Natriumchlorid (NaCl) |
| | 100µg/ml Ampicillin |
| Agarplatten | LB-Medium |
| | 15g/l Agar-Agar |
| | 100µg/ml Ampicillin |

2.8. Enzyme

| | |
|---------------------------|---------------------|
| Taq-Polymerase | peqlab |
| T4-DNA-Ligase | peqlab |
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs |
| Reverse Transkriptase | Roche |
| PWO-DNA-Polymerase | peqlab |

2.9. Peptide

Zwei hTIM3 Peptide wurden von der Firma Eurogentec S.A. Belgium synthetisiert, an KLH gekoppelt und zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt.

Peptid I (EP012930): CKP AKV TPA PTL QRDF

Peptid II (EP012931): ELR DSR LAN DLR DSGA

2.10. Zytokine

| | |
|---------------------------------|-------------|
| Recombinant human GM-CSF | TEBU |
| Recombinant human TNF α | Strathmann |
| Recombinant human IL-4 | Strathmann |
| Recombinant mouse IL-6 (rmIL-6) | R&D Systems |

2.11. Reaktionskits

| | |
|---|---|
| BigDye TM Terminator Cycle Sequencing Kit Ready Reaction | ABI PRISM ^R Applied Biosystems |
| BCA Protein Assay Reagent Kit | Pierce |
| Rneasy Mini Kit | Qiagen |
| QIAprep Spin Miniprep kit | Qiagen |
| Qiagen Plasmid Midi kit | Qiagen |
| EndoFree Plasmid Maxi kit | Qiagen |
| QIAquick PCR purification kit | Qiagen |
| QIAquick Gel extraction kit | Qiagen |
| TaqMan Reverse Transcription Reagents | Roche |
| TOPO TA Cloning | Invitrogen |
| Lipofectamine 2000 | Invitrogen |
| Mouse monoclonal Antibody isotyping kit (antibody developed in goat) | Sigma |

2.12. Chemikalien

| | |
|---|----------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid | Biorad |
| Agar-Agar | Roth |
| Agarose | Gibco |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma |
| Ampicillin | Sigma |
| BCIP/NBT | Sigma |
| Brefeldin A | Sigma |
| Bromphenolblau | Sigma |
| Coomassie blue R 250 | Fluka |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma |
| DNTPs | peqlab |
| EDTA | Roth |
| Essigsäure | Roth |
| Ethidiumbromid-Lösung (1%) | AppliChem |
| EtOH absolut | Merck |
| FCS | Sigma |
| FCS | Sigma |
| Ficoll-isopaque | Amersham Biosciences |
| Freund's Adjuvans | Sigma |
| Glycerin | Roth |
| Glycin | Sigma |
| GuHCl | Roth |
| Harnstoff | Sigma |
| HAT-Supplement (50×) | Biochrom AG |
| HT- Supplement (50×) | Biochrom AG |
| Hefe-Extrakt | Sigma |
| 30%ige H ₂ O ₂ | Sigma |
| Imidazol | Sigma |
| Ionomycin | Sigma |
| Isopropyl β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) | Appligene |
| KCl | Roth |

| | |
|---|---------------------|
| KH ₂ PO ₄ | Merck |
| LB-Medium (Kapseln) | BIO 101,CA USA |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma |
| Methanol | Roth |
| MgCl ₂ | Merck |
| Molekulargewichtsstandards (Marker VI+VII) | Roche |
| N,N,N',N' Tetramethylendiamin(TEMED) | Sigma |
| Na ₂ HPO ₄ | Sigma |
| NaCl | Sigma |
| NaH ₂ PO ₄ | Roth |
| Natriumacetat | Sigma |
| Natriumazid (NaN ₃) | Sigma |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Merck |
| Natriumhydroxid | Sigma |
| 50% Ni-NTA-Superflow | Qiagen |
| OligodT's | Roche |
| Orange G | Sigma |
| 50% PEG (Polyethylene Glycol) 1500 | Roche |
| Penicillin | Seromed |
| Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) | Sigma |
| Polyethylenglycol 20000 | Merck |
| Ponceaus S | Sigma |
| Protein standards | Bio-Rad |
| Random Hexamers | Roche |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma |
| RNnase Inhibitor | Roche |
| RPMI 1640 | GibcoBRL/Invitrogen |
| Salzsäure | Sigma |
| Schwefelsäure | Sigma |
| Tablette NBT-BCIP | Sigma |
| 3,3',5,5'Tetramethylbenzidine | Sigma |
| Dihydrochloride | |
| TNF α | Strathmann |

| | |
|--------------------------|-------|
| Tris | Roth |
| Trypanblau Lösung (0,4%) | Sigma |
| Trypton | Sigma |
| Tween 20 | Merck |
| Zitronensäure | Merck |

2.13. Geräte

| | |
|----------------------------------|-----------------------|
| ABI PRISM 310 Genetic Analyzer | Applied Biosystems |
| Agarose-Gelelektrophoresekammer | PeQLab |
| Blottingkammer | Biorad |
| Brutschrank | Heraeus |
| Chromatographie Säule | Biorad |
| Durchfluscytometer FACScan | Becton Dickinson |
| ELISA-Lesegerät, Spectra Max 250 | Molecular Devices |
| ELISA Waschgerät | Nunc Immuno Wash 12 |
| French Press | Aminco |
| Heizblock TCR 100 | Roth |
| PCR-Thermoblock, Gene Amp 2400 | Perkin Elmer |
| Phasenkontrastmikroskop | Zeiss |
| pH-Meter, 766 Calimatic | Knick |
| Photometer, UV-1202 | Shimadzu |
| Pipetten | Gilson |
| Pipettierhilfe | Integra Biosciences |
| Schüttelinkubator, TH 25 | Edmund Bühler |
| SDS-PAG-Elektrophoresekammer | Biorad |
| Sterile Werkbank HeraSafe | Heraeus |
| Ultraschallgerät, Sonoplus HD70 | Bandelin |
| Vortexer | Scientific Industries |
| Zentrifugen | Heraeus |

2.14. Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|--------------------|
| Acrylküvetten | Sarstedt |
| Blott-Papier 300×600mm | Schleicher-Schuell |
| Dialysenschläuche Visking Typ 20/32 | Roth |
| ELISA-Platten | Costar |
| Kanülen, Spritzen | Braun, HSW |
| Kry-Tubes | Nunc |
| Nitrocellulosemembran Optitran 0,45µm | Scheicher-Schuell |
| Petrischalen, Pipetten, Zellkulturflaschen | Corning/Costar |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf |
| RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter (ART) | Fisher Scientific |
| round bottom tubs (1,4ml) | Matrix |
| Zellsieb (70µm) | Falcon |
| Zentrifugenröhrchen, Cellstrainer | Falcon |

3. Methoden

3.1. Ex vivo Gewinnung von dendritischen Zellen

3.1.1. Isolierung von mononukleären Zellen (PBMC) aus humanem Vollblut

Die PBMC wurden aus Blutkonserven (buffy coats) isoliert. Die Isolierung erfolgte 8h nach Entnahme des peripheren Blutes gesunder Blutspender.

15ml Ficoll wurden in ein konisches 50ml Röhrchen gefüllt und mit 30ml einer mit PBS (1:2) verdünnten Blutsuspension vorsichtig überschichtet. Die Phasentrennung erfolgte durch 20 min Zentrifugation bei 1000 g. Die Interphase zwischen Plasma und Ficoll wurde mit einer sterilen Pasteur-Pipette isoliert. Sie enthielt die PBMC, eine Mischung der mononukleären Blutzellen (Monocyten, B- und T-Lymphocyten, NK-Zellen). Um eine Verunreinigung durch Thrombocyten zu minimieren wurde die Fraktion durch Zentrifugation (200 g, 10 min) zweimal in PBS/EDTA (2mM) gewaschen und die Reinheit mikroskopisch kontrolliert.

Die isolierten PBMC wurden in RPMI 1640 Medium supplementiert mit 10% FCS und 100U/ml Penicillin/100µg/ml Streptomycin resuspendiert (2×10^6 Zellen/ml, Ausbeute: ca. $2-3 \times 10^8$ Zellen).

3.1.2. Anreicherung der Monocyten über Adhärenz

Die Anreicherung von Monocyten aus PBMC erfolgte mittels Kunststoff-Adsorption der Monocyten an die Kulturflasche. Die über Ficoll-Gradient isolierten PBMC wurden in komplettem Medium auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und 2 h in 225 cm² Kulturflaschen bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die nicht-adhärenenten Zellen vorsichtig mit einer Pipette zusammen mit dem Medium abgenommen. Die zurückbleibenden adhärenenten Zellen wurden mit vorgewärmtem PBS zweimal gewaschen und weiter in komplettem Medium über Nacht kultiviert.

3.1.3. Erzeugung von dendritischen Zellen aus Monocyten

Die über Nacht kultivierten Monocyten wurden in komplettem Medium mit GM-CSF (50ng/ml) und IL-4 (100ng/ml) 6 Tage und zusätzlich 2 Tage mit TNFα (50ng/ml) kultiviert.

Um die kultivierten dendritischen Zellen (dendritic cell, DC) zu charakterisieren, wurden sie durchfluß-zytometrisch phänotypisiert. Dabei wurden dendritischen Zellen als CD80-, CD86-, CD83-, HLA-DR-positiv und CD14-negativ definiert.

3.2. Isolierung der Gesamt-RNA aus dendritischen Zellen

Eine entscheidende Voraussetzung für den sensitiven Nachweis von Transkripten in der RT-PCR ist die Qualität der RNA sowie ein konsequentes RNasefreies Arbeiten. Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme. Sie sind schwierig zu inaktivieren, und bereits kleinste Mengen sind ausreichend, um RNA zu zerstören. Deshalb wurden bei allen Arbeiten Rnase-freie Handschuhe getragen und sterile Eimal-Kunststoff-Artikel (Pipetten, Reaktionsgefäße, etc.) verwendet. Um die gesamt-RNA von dendritischen Zellen zu isolieren, wurde das 'RNeasy Mini Kit' verwendet. Die Präparation der Gesamt-RNA beruht auf der Bindung und späteren Elution der Ribonukleinsäuren unter spezifischen Pufferbedingungen auf einer speziell entwickelten Säule.

3.3. cDNA Präparation

Für die cDNA Präparation wurde Gesamt-RNA eingesetzt und TaqMan Reverse Transcription Reagentien verwendet. Für einen 20µl Ansatz wurden folgende Komponenten in einem RNase-freien Reaktionsgefäß zusammengegeben:

| | |
|---------------|---|
| 1,2µl (400ng) | Gesamt-RNA |
| 2µl | TaqMan 10× Puffer |
| 4,4µl | MgCl ₂ (25mM) |
| 4µl | dNTPs (25mM) |
| 1µl | Random Hexamer (50µM)/Oligo dT (50µM) (1:1) |
| 0,4µl | RNase Inhibitor (20U/µl) |
| 0,5µl | Reverse Transkriptase (50U/µl) |
| 6,5µl | RNase freies Wasser |
| <hr/> | |
| Σ 20 µl | |

Die RT-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

25 °C 10 min
 48 °C 40 min
 95 °C 5 min
 4 °C ∞

Bevor die fertige cDNA zur Amplifikation der hTIM3 cDNA eingesetzt wurde, wurde ihre Qualität durch eine β -Actin PCR im Thermocycler überprüft (cDNA-check). Für eine 20 μ l Reaktion wurden in der Regel 0,5 μ l der cDNA eingesetzt, und nach der PCR 10 μ l dieser Reaktion gelelektrophoretisch analysiert. Das PCR-Gemisch hatte folgende Zusammensetzung:

| | |
|---------------------|------------------------------------|
| 0,5 μ l | cDNA |
| 2 μ l | 10 \times PCR Puffer |
| 1 μ l | MgCl ₂ (25mM) |
| 0,2 μ l | dNTPs (25mM) |
| 2 μ l | Primer β Act up (10 μ M) |
| 2 μ l | Primer β Act do (10 μ M) |
| 0,5 μ l | Taq Polymerase (5U/ μ l) |
| 11,8 μ l | Bidest |
| <hr/> | |
| Σ 20 μ l | |

Die Reaktionsbedingungen wurden wie folgt gewählt:

95 °C 1 min
 95 °C 1 min
 62 °C 1 min
 72 °C 1 min
 72 °C 10 min
 4 °C ∞

} 32x

3.4. Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse oder Präparation von DNA-Fragmenten wurden diese in Agarosegelen im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Auftrennung von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld beruht auf der Tatsache, dass die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA antiproportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare ist (Meyers, et al., 1976). Nach Zugabe von Ethidiumbromid, welches in GC-Paare der DNA interkaliert, können DNA-Fragmente unter UV-Licht aufgrund der Abgabe von Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden.

Der verwendete Agarosegehalt der Gele richtete sich nach der Größe der zu trennenden Fragmente und variierte zwischen 0,8-1,5 % (w/v). Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten Agarosegele waren alle 1,2%. Es wurde 1,2g Agarose in 100ml 1 x TAE-Puffer bis zur Homogenität aufgekocht und nach dem Abkühlen auf 50-60 °C 5 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl) zugegeben. Anschließend wurde das Gel in eine Gelkammer mit Gelkamm gegossen. DNA-Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer versetzt und zur Elektrophorese in die geformten Geltaschen gegeben. Als Standard zum Größenvergleich wurde Marker VI eingesetzt. Die angelegte Spannung während der Elektrophorese betrug je nach der Größe der Gelkammer bzw. des Gels 80-120V.

3.5. Klonierung der hTIM3 cDNA mit Topo TA Klonierungskit

Zur Ligation von PCR-Fragmenten in einen Vektor wurde die TA-Überhang-Methode verwendet. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass die Taq-DNA-Polymerase während der Elongation an die 3'-Termini der PCR-Produkte zusätzliche Adenosine anhängt. Dieses macht es möglich, dieses PCR-Produkt direkt in einen linearisierten klonenden Vektor mit einzelner, Überhang 3'-T zu klonen. In dieser Arbeit wurde das TA-Cloning-Kit (Invitrogen) verwendet. Der Klonierungsprozeß erfolgte nach den Protokollangaben des Herstellers.

3.5.1. Amplifikation der hTIM3 cDNA

Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis, et al., 1987) wurde von der hergestellten cDNA ausgehend (s.3.3) die für hTIM3 kodierende cDNA amplifiziert. Folgender 50µl Reaktionsansatz wurde auf Eis in ein 200µl Reaktionsgefäß pipettiert:

| | |
|---------|--|
| 1,5µl | cDNA |
| 5µl | 10× PCR Puffer |
| 3µl | MgCl ₂ (25mM) |
| 0,5µl | dNTPs (25mM) |
| 2µl | Primer 5' (10pmol/µl) |
| 2µl | Primer 3' (10pmol/µl) |
| 1µl | Taq (5U/µl)/PWO(1U/µl)-DNA-Polymerasegemisch (3:1) |
| 35µl | Bidest |
| <hr/> | |
| Σ 50 µl | |

Am PCR-Thermoblock wurde folgendes Programm verwendet:

| | | |
|-------|---------|-------|
| 94 °C | 5 min | } 35x |
| 94 °C | 1 min | |
| 60 °C | 1 min | |
| 72 °C | 1,5 min | |
| 72 °C | 10 min | |
| 4 °C | ∞ | |

Nach der PCR wurden 10µl dieser Reaktion gelelektrophoretisch analysiert.

3.5.2. Topo Klonierungsreaktion

Nach der PCR wurde Klonierungsreaktion sofort fortgesetzt. Für einen 6µl Ansatz wurde das Reaktionsgemisch wie folgt zusammengesetzt:

| | |
|--------|----------------------|
| 0,5µl | frisches PCR-Produkt |
| 1µl | Salzlösung |
| 1µl | Topo-Vektor |
| 3,5µl | Bidest |
| <hr/> | |
| Σ 6 µl | |

Die Reaktion wurde vorsichtig gemischt und bei der Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert, und anschließend auf Eis gesetzt.

3.5.3. Transformation

Die Transformation erfolgt mit den chemisch kompetenten Bakterien *E.coli* (TOP10). 50µl Aliquots der chemisch kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Zu den kompetenten Zellen wurden 2µl von der Reaktion vorsichtig pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C durchgeführt. Nach dem Hitzeschock wurde der Ansatz sofort auf Eis überführt und für 2-5 min auf Eis inkubiert, mit 250µl Raumtemperatur SOC-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt (200 rpm).

125µl von der Suspension der transformierten Zellen wurden dann auf einem vorgewärmten Agarplatten mit 50µg/ml Ampicillin und 40mg/ml X-gal ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.5.4. Blau-Weiß Selektion

Durch die Transformation werden Plasmide in kompetente *E. coli*-Zellen übertragen. Da der verwendete Vektor pCR2.1-TOPO das Gen für β -Lactamase enthält, können nur solche Bakterien auf Ampicillin-Agarplatten anwachsen, die das Plasmid aufgenommen haben. Da das Reportergen für β -Galaktosidase (*lacZ*) die multiple Klonierungsstelle (MCS) enthält, kann mittels der sogenannten Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal enthaltenen Agarplatten überprüft werden. Die Aufnahme eines intakten Plasmids führt zu einer Ampicillin-Resistenz der Zellen und zur Spaltung des farblosen Substrates X-Gal in das blaue Produkt. Der Einbau von Inserts in die MCS zerstört das Leseraster des LacZ Gens. Die mit dem Insert transformierten Bakterienkolonien bleiben in Anwesenheit von X-Gal farblos.

3.5.5. Analyse von positiven Kolonien

Um die positiv transformierten Bakterienzellen zu identifizieren, wurden 10 weiße Kolonien, die auf den Agarplatten gewachsen waren mit sterilen Spitzen gepickt und in 3ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler (200rpm) kultiviert. Anschließend erfolgt die Plasmidisolierung mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit gemäß den Protokollangaben des Herstellers. Die Methode basiert auf einer Lyse der Bakterien unter alkalischen Bedingungen (Birnboim, 1983).

Nach der Isolierung wurde die Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym EcoR I verdaut. Dazu wurden jeweils 20 μ l der isolierten Plasmid-DNA wie folgt eingesetzt:

| | |
|---------------------|---------------|
| 10 μ l | Plasmid |
| 2 μ l | EcoR I-Puffer |
| 1 μ l | EcoR I |
| 7 μ l | Bidest |
| <hr/> | |
| Σ 20 μ l | |

Die Reaktion wurde bei 37 °C für 1,5 h durchgeführt, und anschließend gelelektrophoretisch analysiert.

3.5.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgt nach der Didesoxy-Methode nach Sanger et al (1977). Es wurde zunächst eine PCR durchgeführt. Um die für hTIM3 kodierende cDNA komplett sequenzieren zu können, wurden 4 verschiedene Primer benötigt (s. 2.3, Sequenzprimer), die in 4 separaten PCR-Ansätzen eingesetzt wurden.

Es wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

| | |
|---------------|-------------------|
| 2µl | Big Dye |
| 3µl | Primer (1pmol/µl) |
| 3,4µl (650ng) | Plasmid-DNA |
| 1,6µl | Bidest |
| <hr/> | |
| Σ 10 µl | |

Am PCR-Thermoblock wurde folgendes Programm verwendet:

| | | |
|-------|--------|-------|
| 96 °C | 10 sec | } 20× |
| 45 °C | 5 sec | |
| 60 °C | 4 min | |
| 4 °C | ∞ | |

Nach der PCR wurden die Proben gefällt, um freie ddNTPs und dNTPs zu entfernen. Dazu wurden die zu sequenzierenden Proben (jeweils 10µl) in ein 500µl Gefäß überführt und nach Zugabe von 80 µl H₂O ,10 µl 3M Natriumacetat (pH 4,6) und 250 µl reinem Ethanol gut gevortext und 20 min bei 10000g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Pipette abgenommen. Zum Waschen des Pellets wurden 350µl 70%iger Ethanol zugegeben und unter gleichen Bedingungen für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde bei 50 °C im Block für 10 min getrocknet und schließlich in 20 µl ddH₂O aufgenommen. Anschließend wurden die Proben in den Sequenzer gestellt.

3.6. Subklonierung in die Expressionsvektoren

3.6.1. Plasmid-PCR

Plasmid-PCR wurde zur Subklonierung und zur Gewinnung von Fragmenten, die zur Herstellung von Hybridisierungssonden verwendet wurden, durchgeführt.

Zur Subklonierung der extrazellulären Region und komplett kodierenden Region der hTIM3-cDNA in den entsprechenden Expressionsvektor pQE100S und pIRES2EGFP wurden Restriktionsschnittstellen mit PCR in die cDNA-Sequenz so eingeführt, dass die cDNAs im Zielvektor im richtigen Leserahmen vorlagen. Die Primer, die zur PCR zur Gewinnung von cDNA-Fragmenten für Hybridisierungssonden verwendet wurden, sind in 2.3 aufgeführt. Die PCR wurde so wie die Amplifikation der hTIM3-cDNA (s.3.5.1) durchgeführt. 5 µl von PCR-Produkte wurden dann gelelektrophoretisch analysiert.

3.6.2. Restriktionsverdau der hTIM3-cDNA und der Plasmidvektor pQE100S und pIRES2EGFP

Die 45 µl PCR-Produkte wurden dann mit dem QIAquick PCR purification kit aufgereinigt. Damit die hTIM3-cDNA in den entsprechenden Plasmidring eingefügt werden konnte, mußten die hTIM3-cDNA und Plasmidvektor pQE100S und pIRES2EGFP durch entsprechende Enzyme aufgeschnitten werden. Es wurden wie folgt angesetzt:

| | | | |
|---------|------------------------------------|---------|--------------------|
| 28 µl | hTIM3-cDNA (extrazelluläre Region) | 10 µl | pQE100S (150ng/µl) |
| 1 µl | Nde I | 1 µl | Nde I |
| 5 µl | H-Buffer (10×) | 5 µl | H-Buffer (10×) |
| 15 µl | Bidest | 33 µl | Bidest |
| Σ 49 µl | | Σ 49 µl | |

Beide Ansätze wurden bei 37 °C für 2 h inkubiert, und anschließend 1 µl Nsi I dazu pipettiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

| | | | |
|---------|--|---------|------------------|
| 28 µl | hTIM3-cDNA(komplett kodierende Region) | 10 µl | pIRES2EGFP |
| 1 µl | Nhe I | 1 µl | Nhe I |
| 1 µl | Xho I | 1 µl | Xho I |
| 5 µl | BSA (10×) | 5 µl | BSA (10×) |
| 5 µl | NEBuffer 2 (10×) | 5 µl | NEBuffer 2 (10×) |
| 10 µl | Bidest | 28 µl | Bidest |
| Σ 50 µl | | Σ 50 µl | |

Beide Ansätze wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Um den Erfolg des Restriktionsverdaus zu überprüfen, wurden die DNA über ein Agarosegel aufgetrennt und wie 3.6.3 beschrieben aus dem Gel extrahiert.

3.6.3. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach Auftrennung der DNA durch Gelelektrophorese in einem Agarose-Gel wurde das gewünschte Fragment mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit.

3.6.4. Ligation der DNA-Fragmente

Die aufgereinigte cDNA und der Vektor wurden dann mittels DNA-Ligase verknüpft. Für eine gute Ausbeute an intakten Konstrukten sollte das Verhältnis von Vektor zu Insert ca. 1:3~5(mol/mol) betragen. Es wurden zwei Ansätze für zwei verschiedene Vektoren erstellt:

| | |
|---------------------|--|
| 1 μ l | Ligasepuffer (10 \times) |
| 1 μ l | Ligase |
| 1 μ l | pIRES2EGFP |
| 7 μ l | hTIM3-cDNA(komplett kodierende Region) |
| <hr/> | |
| Σ 10 μ l | |

| | |
|---------------------|------------------------------------|
| 1 μ l | Ligasepuffer (10 \times) |
| 1 μ l | Ligase |
| 2 μ l | pQE100S |
| 6 μ l | hTIM3-cDNA (extrazelluläre Region) |
| <hr/> | |
| Σ 10 μ l | |

Beide Ansätze wurden bei RT für 30min inkubiert. Als Kontrolle wurden zwei Ansätze (positiv und negativ) mitgeführt, der statt cDNA unverdauter Vektor oder nur Wasser enthielt.

3.6.5. Transformation in TOP10 und BL21

Die Transformation wurde so ähnlich wie in 3.4.3 geschrieben durchgeführt. Für pIRES2EGFP-hTIM3 und pQE100S-hTIM3 wurden die unterschiedliche chemisch kompetente Bakterien *E.coli* TOP10 und BL21(DE3) genommen. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde jeweils der gesamte Ligationsansatz von 10 μ l zu den kompetenten Zellen pipettiert. Der Transformationsansatz wurde für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 $^{\circ}$ C durchgeführt. Nach dem

Hitzeschock wurde der Ansatz sofort auf Eis überführt und für 2-5 min auf Eis inkubiert, mit 200µl Raumtemperatur SOC-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt (200rpm).

200 µl von der transformierten Zellen wurden dann auf einem vorgewärmten Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin (für pIRES2EGFP-hTIM3) oder 100 µg/ml Ampicillin (für pQE100S-hTIM3) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.6.6. PCR-Screening nach positiven Kolonien

Mit einer PCR mit den Insert-spezifischen Primern lässt sich die Transformation nachweisen. Kolonien wurden von den Kulturplatten isoliert und in 20 µl PCR Ansatz zugegeben. Die PCR wurde so wie in 3.6.1 (Plasmid PCR) beschrieben mit entsprechenden Primern durchgeführt.

3.6.7. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmidisolierung wurde ähnlich wie in 3.5.5 beschrieben durchgeführt. Die PCR-positiven Kolonien wurden weiter in 3 ml Medium mit Kanamycin oder Ampicillin über Nacht kultiviert. Nach der Isolierung wurde die Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (s. 3.6.2) verdaut, gelelektrophoretisch analysiert und anschließend sequenziert (s. 2.3, Sequenzprimer und 3.5.6 Sequenzierung).

Die Gewinnung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Midi kit bzw. EndoFree Plasmid Maxi kit.

3.7. Prokaryontische Expression der extrazellulären Region vom humanen TIM3

3.7.1. Kultivierung in BL21 (DE3)

Um eine Langzeitlagerung der mit dem Plasmid pQE100S-hTIM3 transformierten *E.coli*-Zellsuspension zu ermöglichen, wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 750 µl der Zellsuspension mit 750 µl sterilem Glycerin/LB-Medium (3:2 v/v) in

Kryokonservierungsröhrchen gegeben, vermischt und kurz in flüssigen Stickstoff überführt, und dann bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Von diesen Glycerinkulturen ausgehend wurden Übernachtskulturen für die Proteinexpression hergestellt. Dazu wurde mit einer sterilen Impföse in die gefrorene Glycerinkultur gestochen und eine kleine Menge der Zellsuspension in LB-Medium/Amp überführt. Die Kultur wurde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Schüttler (200 rpm) inkubiert.

3.7.2. Optimierung der rekombinanten hTIM3-Proteinexpression

Sowohl für die Expression als auch für die anschließende Aufreinigung des exprimierten Proteins wurde nach Anleitung des Kits QiaExpressionist der Firma Qiagen verfahren. Um die Expression des hTIM3-His-Fusionsproteins zu optimieren, wurde eine 100 ml Kultur aus einer 2 ml Übernachtskultur in LB-Medium angeimpft, bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Schüttler (200 rpm) kultiviert, bis sie eine $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,6$ erreicht hatte und anschließend durch die Zugabe von verschiedenen IPTG-Konzentrationen (0,5 mM, 1 mM, 2 mM) induziert. Jede Stunde wurde eine Probe von 1 ml aus der Kultur entnommen, zentrifugiert und zur $100\text{ }\mu\text{l}$ $2\times$ reduzierenden Probenpuffer resuspendiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren bis SDS-PAGE-Analyse. Die Expression wurde im SDS-PAGE (s. 3.7.3) überprüft.

Um das rekombinante Protein in größerem Maßstab herzustellen, wurde eine Einzelkolonie des *E.coli*-Stammes BL21 (DE3), die das Plasmid pQE100S-hTIM3 trug, für eine Vorkultur in 25 ml LB-Medium/Amp bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht angezogen. 1000 ml LB-Medium/Amp wurden mit 25 ml Vorkultur angeimpft und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,6$ wachsen gelassen. Anschließend wurde die Expression mit 0,5 mM IPTG induziert und für 3 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde entweder gleich weiter verarbeitet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

3.7.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Die Polyacrylamid-Gele wurde wie folgt gegossen:

| | 15% Trenngel (20 ml) | 5% Sammelgel (6 ml) |
|-------------------------|----------------------|---------------------|
| H ₂ O | 4,6 | 4,1 |
| 30% acrylamide mix | 10 | 1,0 |
| 1,5 M Tris (pH 8,8) | 5,0 | --- |
| 1,0 M Tris (pH 6,8) | --- | 0,75 |
| 10% SDS | 0,2 | 0,06 |
| 10% ammonium persulfate | 0,2 | 0,06 |
| TEMED | 0,008 | 0,006 |

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:10 mit 2× reduzierenden Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und abgekühlt, anschließend aufgetragen.

Der Gellauf wurde im Elektrophoresepuffer bei 15 mA durchgeführt. Nachdem die Proben in das Trenngel eingewandert waren, wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht. Der Gellauf wurde gestoppt, nachdem der Farbmarker das Gel verlassen hatte. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue-Lösung.

Als Marker diente ein Low Molecular Weight Marker, der sich aus den Proteinen Phosphorylase B (97,4 kDa), Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45,0 kDa), Carboanhydrase (31,0 kDa), Trypsininhibitor (21,5 kDa) und Lysozym (14,4 kDa) zusammengesetzte.

3.7.4. Western Blot-Analyse der Expression

Für den Western Blot wurde eine Proteinfraction über ein 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Nacht auf eine Nitrocellulosemembran mit Transferpuffer im Tankverfahren bei 30 Volt und 4 °C geblottet. Der erfolgreiche Transfer wurde mittels Ponceau S-Färbung kontrolliert und die Markerbanden markiert. Die Membran wurde für 1 h bei RT in TBS/ 3% BSA abgesättigt und anschließend mit dem ersten Antikörper (mouse anti-His-IgG1) 1 µg für 1 h bei RT in 10ml TBS/Tween/ 1% BSA inkubiert. Danach wurde 3× 10 min mit TBS/Tween gewaschen und eine weitere Stunde mit 1 µg anti-mouse-IgG-AP in 10ml TBS/Tween/ 1% BSA bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wie oben wurden die immunreaktiven Proteine mit BCIP/NBT in 10 ml H₂O angefärbt.

3.7.5. Die Bestimmung der rekombinanten hTIM3-Protein-Löslichkeit

Vor Beginn der Reinigung ist es notwendig zu bestimmen, ob das rekombinante hTIM3-Protein löslich im Zytoplasma oder cytoplasmatisch in Einschlußkörperchen („inclusion bodies“) vorliegt. Das Zellpellet aus 100 ml Kultur 3 h nach der 0,5 mM IPTG-Induktion wurde auf Eis aufgetaut und in 10 ml Lysispuffer unter nicht denaturierenden Bedingungen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 3× mit French Press bei 4 °C bei einem Druck von 1000 bar aufgeschlossen. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 10,000 × g und 4 °C wurde der Überstand (löslicher Proteinextrakt) in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, und das Pellet (unlöslicher Proteinextrakt) in 10 ml Lysispuffer resuspendiert. Die anschließende SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse wurde so wie 3.7.3 und 3.7.4 beschrieben durchgeführt.

3.7.6. Affinitätsreinigung an Nickel-Agarose

Durch die Subklonierung der extrazellulären Region der humanen TIM3-cDNA in den pQE100S-Vektor trägt das rekombinante Protein eine 6×His-Sequenz am N-Terminus. Die Affinität der 6×His-Sequenz zu Ni²⁺-Ionen wurde zur Aufreinigung des exprimierten Proteins mittels der Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-Agarose genutzt (Crowe, et al., 1994). Da das gesuchte Protein nach der Expression in Einschlußkörperchen vorlag, wurde in denaturierenden Medien gearbeitet. Das Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in 5 ml Puffer A pro Gramm Pelletmasse resuspendiert. Die Proteine wurden durch 60 min Rühren bei RT gelöst, unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 30 min bei 10000 × g und RT entfernt. Vor dem Probenauftrag wurde die 5 ml umfassende Nickel-NTA-Säule mit Puffer A äquilibriert. Die Proteine wurden über einen UV-Durchflussdetektor bei einer Extinktion von 280 nm bestimmt. Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule geladen. Nicht spezifisch gebundenes Protein wurde durch Waschen mit Puffer A, B, C entfernt, es wurde jedesmal so lange gewaschen, bis die Extinktion wieder den Anfangswert erreicht hatte. Die Elution der 6×His markierten Proteine erfolgte durch Absenken des pH mit Puffer D und Puffer E. Während die Extinktion bei 280 nm anzusteigen begann und bis auf den Anfangswert abfiel (Proteinpeak), wurde das eluierte Protein aufgefangen und anschließend über Nacht gegen PBS dialysiert. Die Säule wurde durch Waschen mit 0,2%iger Essigsäure, 30% Glycerin, H₂O und 20% Ethanol je 10 min regeneriert.

Während der Aufreinigung wurden von den einzelnen Fraktionen Proben genommen, die zur Analyse von SDS-PAGE und Western Blot aufgetragen wurden (s. 3.7.3 und 3.7.4).

3.7.7. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit, gemäß den Angaben des Herstellers. Die Absorption bei 562 nm wurde gemessen, als Standard wurde BSA in PBS eingesetzt.

3.8. Eukaryontische Expression von der komplett kodierenden Region

3.8.1. Transiente Transfektion

Die Transfektion erfolgte mit LipofectamineTM-Reagenz der Firma Invitrogen. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 6-Well-Platten in einer Konzentration von $2-4 \times 10^5$ Zellen pro Well mit antibiotikafreiem Medium ausgesät, so dass sie am nächsten Tag 50-70% konfluent waren. Für die Transfektion wurden folgende Reaktionsansätze vorbereitet:

Röhrchen 1: 4 µg DNA in 250 µl serumfreiem Medium

Röhrchen 2: 10 µl LipofectamineTM-Reagenz in 250 µl serumfreiem Medium

Nach der vorsichtigen Mischung wurde das Röhrchen 2 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden DNA und LipofectamineTM vorsichtig gemischt und bei RT für 20 min inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, und nach Zugabe von 2 ml antibiotikafreiem Medium weiter bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die DNA-LipofektamineTM-Ansätze tropfenweise auf die Zellen gegeben und weiter bei 37 °C für 24 h inkubiert, und danach im FACS analysiert.

3.8.2. FACS-Analyse der Transfektanten

FACS-Analyse der Transfektanten beruht auf dem Nachweis von der Expression des Markergens EGFP und hTIM3-Expression auf der Oberfläche. Hierzu wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung

abgelöst, in ein 5 ml-FACS-Röhrchen überführt und 200 g 6 min bei 4 °C zentrifugiert. Nachdem das Pellet mit PBS/BSA/Azid gewaschen und erneut zentrifugiert wurde, wurde es in 200 µl PBS/BSA/Azid zur FACS-Analyse resuspendiert.

Um die hTIM3-Expression auf der Zelloberfläche zu identifizieren, wurde ein polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen zwei hTIM3-Peptide verwendet. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit dem Kaninchenserum im Verhältnis 1: 50 auf Eis für 15 min inkubiert und einmal mit PBS/BSA/Azid gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem cy5-konjugierten sekundären Antikörper anti-Kaninchen-IgGs im Verhältnis 1:200 auf Eis für 15 min inkubiert, und nach einmaligem Waschen in 200 µl PBS/BSA/Azid zur FACS-Analyse resuspendiert. Als Negativkontrolle wurden die mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen verwendet (mock).

Die Auswertung der FACS-Daten wurde mit Hilfe der „Cellquest Research Software“ (Becton Dickinson) durchgeführt.

3.8.3. Western Blot-Analyse der Transfektanten

Mittels Western Blot wurde das hTIM3-Protein in transfizierten Zellen mit dem Kaninchen-Antiserum nachgewiesen. Dafür wurden die Kulturflaschen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 2× reduzierenden Probenpuffer aufgenommen (50 µl Zellen in 200 µl Puffer). Das Zelllysate wurde bei 13000 rpm für 15 min abzentrifugiert und der klare Überstand für SDS-PAGE weiterverwendet (s. 3.7.3). Die getrennten Proteine wurden weiter so wie 3.7.4 gearbeitet. Als Negativkontrolle wurden die mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen verwendet (mock). Das Kaninchen-Antiserum (1:2000) diente als erster Antikörper und Ziege-anti-Kaninchen-IgG-AP(1:25000) als sekundärer Antikörper.

3.8.4. Herstellung der stabilen Transfektion

Einen Tag nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen von 6-Well-Platten im Verhältnis 1:10 in Kulturflasche überführt, am nächsten Tag erfolgte die Selektion stabil transfizierter Klone. Dazu wurde dem Kulturmedium 1 mg/ml G-418 zugesetzt. Nach etwa einer Woche wurden die Zellen, die hoch EGFP exprimierten, durch FACS isoliert und mit Selektionsmedium (1 mg/ml G-418) in Kultur fortgesetzt. Nach 2-3 Sortierungen und 4-6

Wochen Kultivierung mit Selektionsmedium wurden die Zellen, die in Experimenten eingesetzt werden sollten, in Kulturflaschen ohne G-418 vermehrt und geerntet. Die Passage erfolgte daraufhin alle 3 bis 4 Tage im Verhältnis 1:10.

3.9. Zellkultur und Zellzahlbestimmung

Bei der Zellkultur müssen verschiedene Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden. Alle Arbeiten müssen unter sterilen Bedingungen ausgeführt werden; sämtliche Geräte, Medien und Puffer, die mit Zellen in direkte Berührung kommen, wurden daher bei 180 °C hitzesterilisiert, autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Handhabung der Zellen (Ausplattieren, Ernährung, Passagieren) erfolgte ausschließlich an einer sterilen Werkbank, die regelmäßig mit 70%igem Ethanol desinfiziert wurde.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen 1: 10 mit Trypanblau gemischt. Lebende Zellen können den Farbstoff aktiv ausschließen, abgestorbene Zellen dagegen erscheinen blau. Auf diese Weise können tote Zellen bei der Zählung ausgeschlossen werden. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zählkammer besteht aus 4 großen Quadraten, die in jeweils 16 kleinere Quadrate unterteilt sind. Unter dem Mikroskop wurden 2 große Quadrate ausgezählt, der Gesamtwert gemittelt und die Zahl der lebenden Zellen nach folgender Formel bestimmt: $\text{Zellzahl/ml} = n \times 10 \times 10^4$, wobei n die Anzahl der Zellen in einem großen Quadrat bildet und 10 den Verdünnungsfaktor darstellt.

Adhärenz wachsende COS-7, HEK 293 und CHO Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert und alle 3 bis 4 Tage nach Ablösen mit Trypsin/EDTA-Lösung im Verhältnis 1: 10 in neue Zellkulturflaschen überführt.

3.10. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden aus den Kulturflaschen mit Trypsin/EDTA abgelöst und für 6 min bei 200 g bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in FCS mit 10% (v/v) DMSO ($5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen/ml) aufgenommen und die Zellsuspension in Cryovials überführt. Die Zellen wurden zunächst auf –80 °C heruntergekühlt und nach 24-48 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Um die Zelllinien zu rekultivieren, wurden die tiefgefrorene Zellen bei 37 °C schnell aufgetaut. Das vollständige Auftauen der Zellen ist hierbei zu vermeiden, um die toxische

Wirkung des Einfriermediums so gering wie möglich zu halten. Nach dem Auftauen muß das nun toxische DMSO schonend entfernt werden. Die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, einmal abzentrifugiert und in einer Kulturflasche im entsprechenden Kulturmedium ausplattiert.

3.11. Durchfluscytometrie

Die Durchfluscytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben bestimmte Eigensheepten von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Im Durchfluscytometer werden die Zellen einer Einzelzellsuspension wie auf einer Perlenkette einzeln aneinandergereiht durch einen Laserstrahl geführt und so zur Eigenfluoreszenz angeregt. Das resultierende Fluoreszenz- und Streulicht wird von verschiedenen Lichtdetektoren aufgefangen und nach Intensität und Farbe getrennt und vom Computer registriert. So wird für jede einzelne gemessene Zelle eine charakteristische Kombination von optischen Eigensheepten aufgezeichnet. Vom Computer können diese Eigensheepten dargestellt werden und erlauben so eine Auswertung mit Hilfe der „Cellquest Research Software“ (Becton Dickinson).

Jede der aufgezeichneten optischen Eigensheepten (Steu- und Fluoreszenzlicht) steht für eine bestimmte Charakteristik der gemessenen Zelle. Während der Messung werden die folgenden Parameter am FACScan eingestellt:

| Parameter | Messgröße |
|-----------------------------|----------------------------------|
| Vorwärtsstreulicht | Größe der Zelle |
| Seitwärtssteulicht | Granularität, Struktur der Zelle |
| Anregungswellenlänge: 488nm | |
| Fluoreszenz 1: 515-545 nm | FITC |
| Fluoreszenz 2: 563-607 nm | PE |
| Fluoreszenz 3: 620-660 nm | PE-Cy5, PerCP etc. |

3.12. Immunisierung der *BALB/c* Mäuse

Für die Immunisierung der *BALB/c* Mäuse wurde das rekombinante ausgefallene, in Zitronensäure aufgelöste hTIM3-Protein und die stabile transfizierte CHO-K1 Zellen verwendet.

Zur primären Immunisierung der Mäuse mit rekombinantem hTIM3-Protein wurde 300 µg Protein in 200 µl PBS (unlöslich) oder Zitronensäure (löslich) mit dem gleichen Volumen Freund's komplettem Adjuvans (CFA) gemischt, mittels Ultraschall zur Emulsion hergestellt. Danach wurde den Mäusen je 100 µl der Emulsion subkutan auf jede Seite der Schwanzbasis injiziert (150 µg pro Maus). Das Boost wurde zweimal im Abstand von 3 Wochen mit Freund's inkomplettem Adjuvans (IFA) so wie oben beschrieben durchgeführt. Zum finalen Boost wurde die gleiche Dose des Proteins ohne Adjuvans zwei Tage vor Fusion den Mäusen intraperitoneal injiziert.

Den *BALB/c* Mäusen wurden viermal im Abstand von 3 Wochen mit 2×10^7 Zellen, die in 500 µl PBS resuspendiert wurden, intraperitoneal injiziert. Das finale Boost erfolgte zwei Tage vor Fusion durch zwei anschließende intraperitoneale Injektionen in zwei Tagen.

3.13. Serumgewinnung und Bestimmung der spezifischen Immunantwort

Um eine spezifische Immunantwort gegen hTIM3 zu detektieren, wurden Blutproben von immunisierten Mäusen gewonnen. Die Mäuse wurden für kurze Zeit mit Rotlicht bestrahlt und anschließend wurde die Schwanzvene in der Nähe der Schwanzbasis vorsichtig angeritzt. Zwischen 3-5 Tropfen Blut wurden entnommen, 2 h bei RT zur Gerinnung stengelassen und anschließend 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde in 2,0 ml Reaktionsgefäße gefüllt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Bestimmung der spezifischen Immunantwort gegen hTIM3 wurden ELISA (s. 3.14) und FACS-Analyse mit den transfizierten Zellen so wie 3.8.2 beschrieben mit dem Kaninchen-Antiserum und den gewonnenen Mausseren durchgeführt.

3.14. ELISA

Zur Bestimmung des spezifischen Serumtiters gegen das in *E.coli* exprimierte hTIM3-Protein wurde ELISA durchgeführt. Dazu wurden zum einen die polyklonale Antikörper des Kaninchens und zum anderen die Seren der mit dem rekombinanten Protein immunisierten Mäuse verwendet.

96-Muldenplatten für ELISA wurden mit 50 µl Proteinlösung (1 µg/ml in PBS) auspipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert, anschließend einmal mit Waschpuffer (PBS/0,05% Tween-20) gewaschen. Die Platten wurden mit 100 µl Blockpuffer (PBS/0,5%BSA) 1 h bei RT inkubiert und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit 100 µl Serum (verdünnt in PBS/BSA/Tween) in Verdünnungen 1:100 bis 1:409600 und die letzte Reihe mit PBS 1 h bei RT inkubiert, weiterhin wurden viermal mit Waschpuffer gewaschen. Der in PBS/BSA/Tween verdünnte, peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper anti-Kaninchen-IgG (1:40000) oder anti-Maus-IgG (1:5000) wurde 100 µl pro Well zugesetzt und 1h bei RT inkubiert, danach wurde sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. 100 µl frisch hergestellte Substratlösung (1 TMB-Tablette in 10ml TMB-Puffer plus 2µl 30%ige H₂O₂) wurde dazugegeben und 5 bis 20 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl 12,5%iger H₂SO₄ wurde die Reaktion abgestoppt, und erfolgte ein Farbumschlag von blau zu gelb. Die Extinktion wurde in einem ELISA-Meßgerät bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.15. Kultivierung der Myelomzellen

7 Tage vor der Fusion wurden die Myelomzellen P3 X 63 Ag8.653 aufgetaut und im Zellkulturmedium kultiviert. Bei der Expansion wurden nur die suspendierten Zellen kultiviert, um die Adhärenz der Myelomzellen zu minimieren. Am Tag der Fusion sollen sich die Zellen in der log-Phase befinden. Die Zellen sollten eine Konzentration von 5×10^5 nie überschreiten. Für jede Fusion wurden ca. 2×10^8 Zellen vorbereitet.

3.16. Gewinnung von Feeder-Zellen aus dem Thymus

Am Tag der Fusion wurden Thymuszellen von drei naiven *BALB/c* Mäusen (jeweils gleiches Geschlecht wie die immunisierte Maus) als Feeder-Zellen präpariert. Dazu wurden die Mäuse durch cervikale Dislokation getötet. Der Thymus wurde entnommen, in ein Sieb überführt

und mit Hilfe eines Stempels zerrieben. Die Zellsuspension wurde bei $200\text{ g } 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 6 min zentrifugiert, die Zellen in HAT-Medium resuspendiert und gezählt.

3.17. Fusion

Zwei Tage nach der letzten Injektion wurden die Mäuse durch cervikale Dislokation getötet. Die Milz wie für den Thymus beschrieben unter sterilen Bedingungen präpariert (s. 3.16). Die gewonnenen Milzzellen wurden in serumfreiem Medium resuspendiert, gezählt, mit den in serumfreiem Medium resuspendierten Myelomzellen im Verhältnis 3:1 gemischt und anschließend bei $200\text{ g } 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 6 min zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit vorgewärmtem serumfreiem Medium gewaschen. Danach wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Zellpellet durch vorsichtiges Klopfen gegen das Falconröhrchen resuspendiert.

Die PEG-Fusion wurde wie folgt durchgeführt:

- 3 min im Wasserbad inkubieren
- Zugabe von 1 ml PEG ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) bei einem Zeitraum von genau 1 min. Das Falconröhrchen dabei die ganze Zeit vorsichtig bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ schwenken
- 45 sec ohne Schwenken im Wasserbad stehen lassen
- Zugabe von serumfreiem Medium ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) unter Schwenken 1 ml in 30 sec, 2 ml in 30 sec, 3 ml in 30 sec
- Langsam auf 50 ml auffüllen

Anschließend wurde die Zellsuspension für 6 min bei 500 g und RT zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das 50ml Falconröhrchen vorsichtig ohne das Zellpellet aufzulösen mit 50 ml serumfreiem Medium ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) aufgefüllt, das Pellet durch vorsichtiges Schwenken Zellschicht für Zellschicht resuspendiert und einmal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen so wie im oberen Vorgang in HAT-Medium ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) resuspendiert.

Die Fusionszellen und Feeder-Zellen wurden gemischt, auf ein Volumen von ca. 1000 ml gebracht, $200\text{ }\mu\text{l}$ / Mulde in ca. 50 96-Muldenplatten ausplattiert und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 inkubiert.

3.18. Selektion

Zur Entfernung nicht gewünschter Fusionsprodukte (Myelom/Myelom) sowie nicht fusionierter Myelomzellen wurde eine Positivselektion durchgeführt. Da die Myelomzellen einen Enzymdefekt in der **Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT)** besitzen und den Aminopterin-Block des DNA-Hauptsyntheseweges durch den Einbau von supplementiertem Hypoxantin und Thymidin nicht umgehen können, werden die im Selektionsmedium kultivierten unerwünschten Myelomzellen sterben. Überleben können nur die Hybridome, die eine intakte HGPRT durch Fusion mit einer Milzzelle erhalten haben.

3.19. Screening

Die ersten Kolonien tauchten nach 4-7 Tagen auf. Am Tag 9 wurden 150 µl Medium abgenommen und 200 µl HAT-Medium zugefügt. Hybridome wurden getestet, wenn die Kolonien mindestens 1/3 des Bodens der jeweiligen Mulde ausgefüllt hatten.

Die 200 µl Kulturüberstände (100 µl für Negativkontrolle und 100 µl für Antigen) wurden abgenommen und in ELISA oder FACS auf Antigenspezifität untersucht (s. 3.13). Dazu dienen das Antiserum des immunisierten Kaninchens als Positiv- und die mit PBS ohne Antigen beschichtete Mulden als Negativ-Kontrolle. Zum FACS-Spezifitätstest wurden die mit leeren Vektoren transfizierten HEK- oder CHO-Zellen als Negativkontrolle benutzt.

3.20. Subklonierung der Hybridome

Die positiven Klone wurden weiter in 48-Muldenplatten expandiert und mittels Grenzverdünnung subkloniert. Durch Grenzverdünnung wurden die Zellen auf eine Konzentration zwischen 10 Zellen/ml und 0,1 Zellen/ml gebracht und auf 96-Muldenplatten ausplattiert. Auf diese Weise erhält man nach zweimaliger Subklonierung mit hoher Wahrscheinlichkeit einen aus einer Zelle hervorgegangenen Zellklon, der einen monoklonalen Antikörper produziert (Coller und Coller, 1983). Die Antikörperproduktion der Klone wird mittels ELISA kontrolliert.

3.21. Kultivierung der Hybridome

Da die frisch fusionierten Hybridome sehr labil sind und besonders während der Selektion und Subklonierung unter unphysiologischen Bedingungen kultiviert werden, stellen sie besonders hohe Anforderungen an die Kulturbedingungen. Dazu gehören die Zugabe von 20% FCS und IL-6 und Einsatz von Thymuszellen zum Kulturmedium.

Die positiven Klone wurden stufenweise an „normale“ Kulturbedingungen adaptiert:

Adaption der Klone von einer 96-Muldenplatte mit HAT-Medium und Feeder-Zellen auf eine 48-Muldenplatte mit HT-Medium ohne Feeder-Zellen, erste Subklonierung auf 96-Muldenplatten ohne Feeder-Zellen.

Adaption der Klone von einer 96-Muldenplatte mit HT-Medium auf eine 48-Muldenplatte. Das komplette Medium wird verwendet, welches nur 10% FCS und 5 U/ml IL-6 enthält. Zweite Subklonierung auf 96-Muldenplatten.

Adaption der Klone an kleine Kulturflaschen ohne IL-6.

3.22. Antikörper-Isotypisierung

Zur Typisierung der Antikörper wurde ein Isotyp-Bestimmungs kit eingesetzt. Dieser ermöglichte eine schnelle und sensitive Bestimmung der Isotyp muriner monoklonaler Antikörper (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA). Ein indirekter ELISA wurde so ähnlich wie 3.14 geschrieben durchgeführt. Die Kulturüberstände aus dem positiven Klon dienten als erster Antikörper, die Ziege-anti-Maus Antikörper (1:1000 in PBS/BSA/Tween verdünnt) als zweiter Antikörper. Als Nachweis-Antikörper wurden die Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Ziege Antikörper (1:5000 in PBS/BSA/Tween verdünnt) verwendet. Der Antikörper-Isotyp konnte dann nach der Messung am ELISA-Meßgerät bestimmt werden.

4. Ergebnisse

4.1. Generierung der DC

In einer in dieser Arbeitsgruppe angefertigten Dissertationsarbeit am Mausmodell (Bender, 2003) wurde gezeigt, dass TIM3 auf murinen dendritischen Zellen stark exprimiert wird. Wegen niedriger Zellzahl der dendritischen Zellen im peripheren Blut ist es schwierig, diesen Zellen direkt aus dem Blut zu isolieren. Die Differenzierung aus Monozyten mittels GM-CSF und IL-4 in vitro (Romani, et al., 1994; Zhou, et al. 1996) machte es möglich, dendritische Zellen zu generieren. Die so gewonnenen DC exprimierten HLA-DR, CD83 sowie auch die costimulatorischen Moleküle CD86 und CD80, aber kein CD14 (Abb.3).

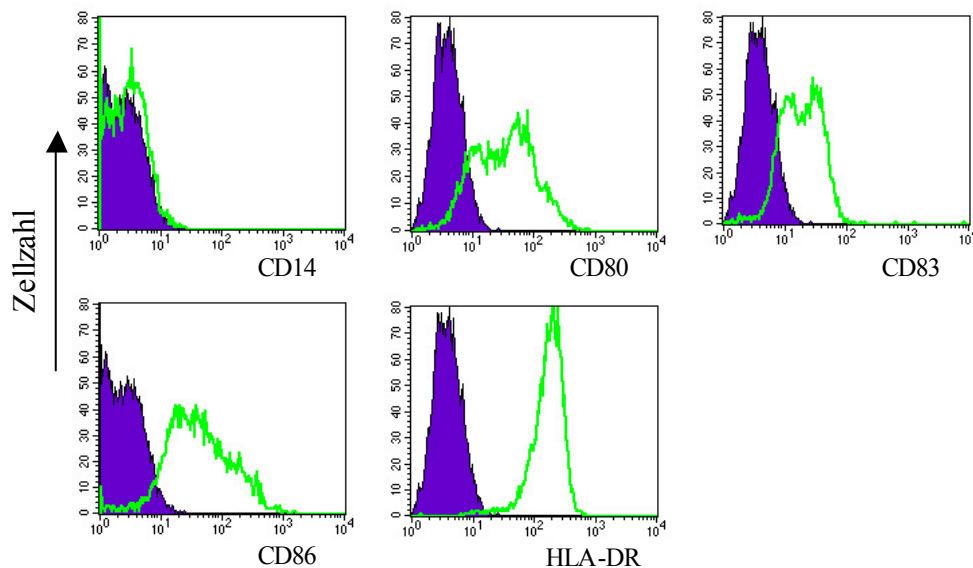


Abb. 3: FACS-Analyse der DC Die über Ficoll-Gradient isolierten PBMC wurden in Vollmedium auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und 2h in Kulturflaschen bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert und Monocyten wurden über Adhärenz angereichert. Die übernacht kultivierten Monocyten wurden mit GM-CSF und IL-4 6 Tage und zusätzlich 2 Tage mit $\text{TNF}\alpha$ kultiviert. Die generierten DC wurden durch FACS phänotypisiert. Dabei wurden DC als CD80-, CD86-, CD83-, HLA-DR-positiv und CD14-negativ definiert. blau: ungefärbte Zellen; grün: gefärbte Zellen.

4.2. Klonierung der hTIM3-cDNA in pCR2.1 Vektor

Zur Amplifizierung der hTIM3-cDNA wurden auch humane PBMC sowie HMC-1 (humane Mastzelllinie) (Daten nicht gezeigt) ausprobiert, doch nur aus den in vitro generierten DC konnte eine erfolgreiche Amplifikation für hTIM3-cDNA erreicht werden (Abb.4). Die

amplifizierte cDNA wurde wie in Kapitel 3.5 beschrieben in den Vektor pCR2.1 kloniert. Es wurden 10 Klone gepickt und auf den Einbau des korrekten Inserts untersucht. Der hier verwendete pCR2.1-Vektor bot in seiner multiplen Klonierungsstelle eine Auswahl an Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme, die zum Ausschneiden des einklonierten Inserts verwendet werden konnten. Dazu wurden Plasmidpräparationen durchgeführt und anschließend mit EcoR I verdaut. In Abb.5 sind DNA Fragmente der erwarteten Größe von 1088bp (1070+18bp) bei den Klonen 7, 8, 9 und 10 zu sehen. Die Klone 1, 2, 3, 4, 5 und 6 zeigten keine Merkmale eines Restriktionsverdaus. Die Sequenzierung von zwei positiven Klonen wurde anschließend durchgeführt. Der Sequenzvergleich erfolgte auf der Internetseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Das Sequenzierungsergebnis war identisch mit AF450242.

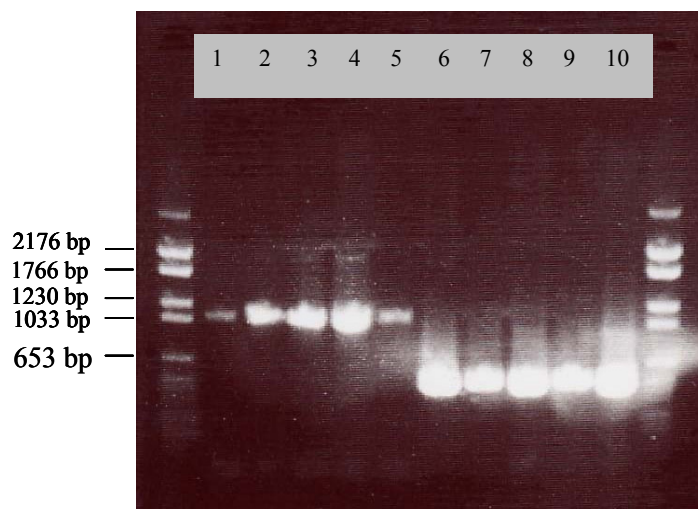


Abb. 4 Amplifikation der hTIM3-spezifischen cDNA Die Amplifikation erfolgte im 50 µl-Ansatz mit den hTIM3-spezifischen Primern ausgehend von 1,5µl cDNA. In Bahn 1-5 wurden jeweils 10 µl des PCR-Produkts pipettiert. Bahn 6-10 zeigen den β-Actin-Check der jeweiligen cDNA. An den äußeren Seiten des Gels war Marker VI aufgetragen.

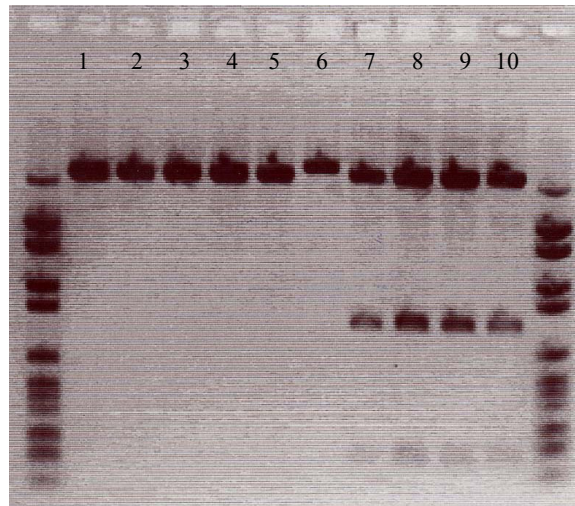


Abb. 5 Restriktionsverdau der Minipräparationen von pCR2.1-hTIM3 Die amplifizierte cDNA wurde in den Vektor pCR2.1 kloniert. Nach der Transformation wurden 10 Klone gepickt, Plasmid isoliert und mit EcoR I verdaut. An den äußeren Seiten des Gels war Marker VI aufgetragen.

4.3. Struktur des hTIM3-codierenden Gens

Durch Vergleich mit einer genomischen Datenbank konnte die Struktur des hTIM3-codierenden Gens bestimmt werden (Abb.6). Es besteht aus 7 Exons und 6 Introns. Die hTIM3-transkribierende Region setzt sich aus den Exons 1-7 zusammen, und kodiert für Signalpeptid, IgV-Domäne, Mucin-Domäne, Transmembrane Region (TM) und Zytoplasmische Region.

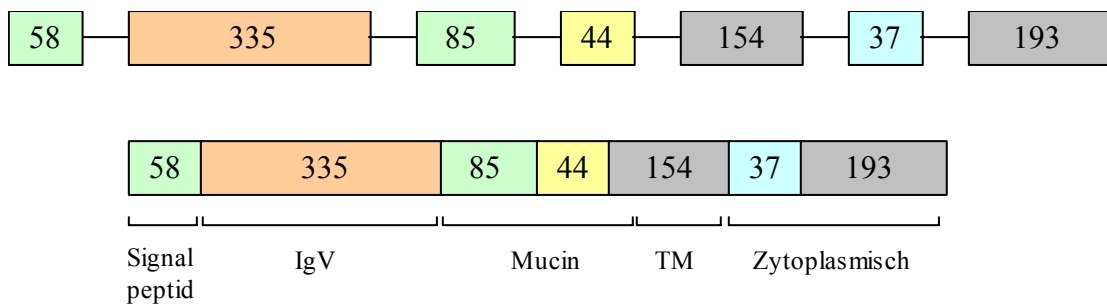


Abb. 6: Struktur des hTIM3-codierenden Gen Es besteht aus 7 Exons und 6 Introns. Die hTIM3-transkribierende Region setzt sich aus den Exons 1-7 zusammen, und kodiert für Signalpeptid, IgV-Domäne, Mucin Domäne, Transmembrane Region (TM) und Zytoplasmische Region. Die Zahlen in den Kästchen geben die Anzahl der Nucleotide für das jeweilige Exon an.

4.4. Amino-säure Sequenz des hTIM3

Die abgeleitete Amino-säure Sequenz des hTIM3 wurde in Abb.7 gezeigt. Der Vergleich mit murinem TIM3 ergab, dass 63% Amino-säure Sequenz identisch zwischen hTIM3 und mTIM3, und 77% identisch im cytoplasmatischen Bereich (Monney, et al., 2002) sind. Aus dem offenen Leserahmen (ORF) von 903bp lässt sich für die extrazelluläre Domäne eine Größe von 19,8 kDa, für den komplett kodierende Bereich eine Größe von 30,9 kDa ausrechnen.

| | |
|--|----------------|
| Atgttttcacatcttcccttggactgtgtctctgctgctgctgctgctactacttacaagg | Signal |
| M F S H L P F D C V L L L L L L L L L L T R | Peptid |
| tcctcagaagtggaaatacagagcggaggctcggatcagaatgcctatctgcccctgcttctac | |
| S S E V E Y R A E V G Q N A Y L P C F Y | |
| acccagccgccccagggaaacctcgtgcccgctgctgctggggcaaaggagcctgtctctgtg | |
| T P A A P G N L V P V C W G K G A C P V | |
| tttgaatgtggcaacgtgggtgctcaggactgatgaaagggatgtgaattattggacatcc | |
| F E C G N V V L R T D E R D V N Y W T S | IgV Domäne |
| agatactggctaaatggggatttccgcaaaggagatgtgtccctgaccatagagaatgtg | |
| R Y W L N G S L T I E N V D F R K G D V | |
| actctagcagacagtgatctactgctgcccggatccaaatcccaggcataatgaatgat | |
| T L A D S G I Y C C R I Q I P G I M N D | |
| gaaaaatttaacctgaagttgggtcatcaaaccagccaagggtcaccctgcaccgactctg | |
| E K F N L K L V I K P A K V T P A P T L | |
| cagagacttctcactgagccttcccaaggatgcttaccaccaggggacatggcccagca | |
| Q R D F T A A F P R M L T T R G H G P A | Mucin Domäne |
| gagacacagacactggggagcctccctgatataaatctaacacaaatatccacattggcc | |
| E T Q T L G S L P D I N L T Q I S T L A | |
| aatgagttacgggactctagattggccaatgacttaacgggactctggagcaaccatcaga | |
| N E L R D S R L A N D L R D S G A T I R | |
| ataggcactcatatcggagcagggatctgtgctgggctggctctgctcttattcttccggc | |
| I G I Y I G A G I C A G L A L A L I F G | Transmembran |
| gctttaaatttcaaatggatattctcatagcaagagaagatacagaatttaagcctcatc | Region |
| A L I F K W Y S H S K E K I Q N L S L I | |
| tctttggccaacctccctccctcaggattggcaaatgcagtagcagaggggaattcgctca | |
| S L A N L P P S G L A N A V A E G I R S | Zytoplasmische |
| gaagaaaacatctataccattgaagagaacgtatatgaagtggaggagcccaatgagtat | Region |
| E E N I Y T I E E N V Y E V E E P N E Y | |
| tattgctatgtcagcagcagcagcaaccctcacaacctttgggttgctgctttgcaatg | |
| Y C Y V S S R Q Q P S Q P L G C R F A M | |
| ccatag | |
| P - | |

Abb. 7: Die abgeleitete Amino-säure Sequenz des hTIM3 Die unterschiedliche Farben kennzeichnen die verschiedene Domänen: Signalpeptid (rot), IgV-Domäne (gelb), Mucin- Domäne (grün), transmembrane Region (blau) und zytoplasmatische region (rosa).

4.5. Expression des hTIM3-Proteins in BL21

4.5.1. Subklonierung der hTIM3-cDNA in den Vektor pQE100S

Zur Subklonierung der extrazellulären Region der hTIM3-cDNA in den Vektor pQE100S wurden zusätzliche Restriktionsschnittstellen an die Primersequenz angefügt. Um die Expressionseffizienz der zwei Produkte mit und ohne Signalsequenz zu vergleichen, wurden zwei verschiedene Primer für den N-terminalen Bereich generiert. Der Primer für den N-terminalen Bereich begann mit der Nde I-Schnittstelle, der erste gefolgt vom Startcodon ATG und 15 weiteren Basen, die den Anfang des Signalpeptides des hTIM3 repräsentieren, der zweite gefolgt von 18 Basen, die den Anfang der IgV-Region repräsentieren. Der C-terminale Primer enthielt Nsi I-Schnittstelle und 18 letzten Basen der Mucin-Domäne (s. Abb.7 und 2.3). Beide PCR-Produkte waren jeweils 612bp und 549bp.

PCR wurde so wie 3.5.1 beschrieben mit pCR2.1-hTIM3 durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen (Nde I und Nsi I) geschnitten und in den mit denselben Restriktionsschnittstellen ausgestatteten pQE100S-Vektor kloniert. Nach der Transformation der Ligationsansätze in den *E.coli*-Stamm BL21 wurden positive Klone mit PCR selektiert und anschließend sequenziert.

4.5.2. Optimierung der Expression

Um die Expression des rekombinanten Proteins zu optimieren, wurde jeweils eine Einzelkolonie mit Signalsequenz und ohne Signalsequenz über Nacht angesetzt und 2 ml dieser Vorkultur in 100 ml LB-Medium bis zu einer $OD_{600nm} = 0,6$ wachsen gelassen. Die Induktion erfolgte mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen (0,5mM, 1mM, 2mM). Die SDS-PAGE-Analyse unter denaturierenden Bedingungen zeigte ein Molekulargewicht von ca. 23kDa vom exprimierten Fusionsprotein in pQE100S-hTIM3 ohne Signalsequenz an. Im Vergleich dazu ist eine theoretische Größe von ca. 19,8 kDa auszurechnen. Das Molekulargewicht vom rekombinanten Protein kann durch SDS-PAGE nur annähernd bestimmt werden. Da das Hinzufügen oder Ersetzen von Aminosäure die Proteinbanden verändern kann, ist das Molekulargewicht einige kDa höher als die erwartete Größe (Crowe, et al., 1995). Die Untersuchung der Experimente in Abhängigkeit von der Zeit ergab, dass nach 3 h das gesuchte Protein am höchsten exprimiert wurde, und keine große Unterschiede zwischen verschiedenen IPTG-Konzentrationen auftraten (Abb.8 a). Im Vergleich dazu zeigte die Proteinexpression in pQE100S-hTIM3 mit Signalsequenz ganz niedrig an (Abb.8 b), und war nur mit Western Blot nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

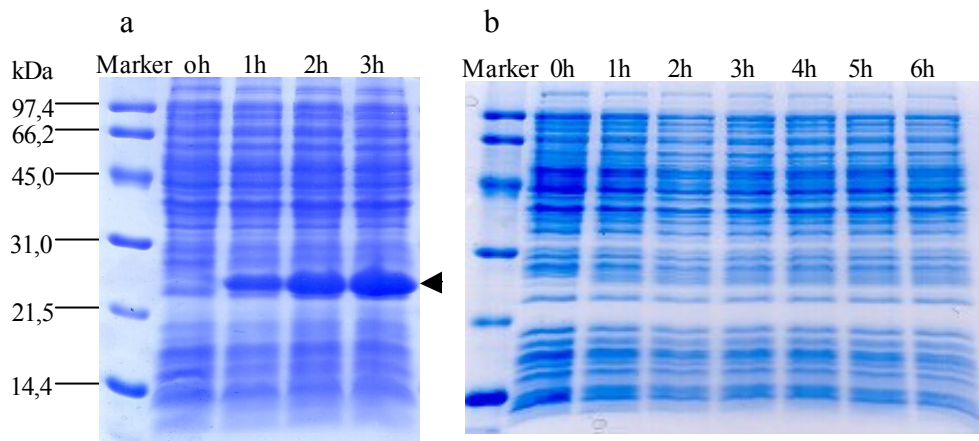


Abb. 8: Die Zeitabhängigkeit der extrazellulären Genexpression der hTIM3 Das extrazelluläre Gen mit Signalsequenz oder ohne Signalsequenz war durch PCR amplifiziert, in den pQE100S-Vektor kloniert und in den *E.coli*-Stamm BL21 transformiert. Expression wurde mit IPTG induziert. Die Proben von verschiedenen Zeitpunkten wurden auf 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Coomassie Brilliant Blue-Lösung gefärbt. (a) Die extrazelluläre Genexpression ohne Signalsequenz. (b) Die extrazelluläre Genexpression mit Signalsequenz. Ein Low Molecular Weight Marker wurde benutzt.

4.5.3. Western Blot-Analyse der Expression

Zur Kontrolle, ob das gesuchte Protein unter den oben angegebenen Bedingungen exprimiert wurde, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurde die Proteinfraction nach der Expression über SDS-PAGE aufgetrennt. Als spezifischer gegen die N-terminale Histidinsequenz gerichteter Antikörper diente mouse anti-His-IgG1. Die Proteinfraction vor der IPTG-Induktion diente als Negativkontrolle. In Abb.9 sieht man die positive Bänder nach der Induktion (Pfeil). Bei der Negativkontrolle, die Proteinfraction vor der Induktion, konnten keine Signale detektiert werden.

Marker 0h 3h lös. unlös.

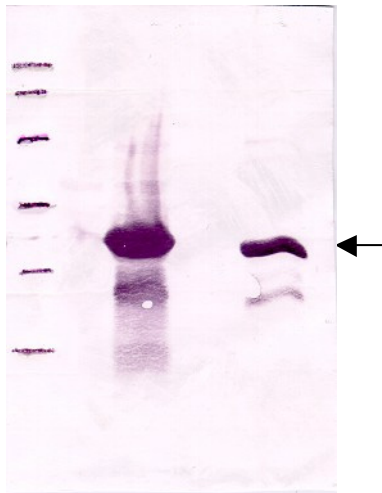


Abb. 9: Western Blot-Analyse der Expression Die Proteinfraction wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem mouse anti-His-IgG1, spezifischer Antikörper gegen Fusionsprotein, inkubiert. 0h: vor der Induktion; 3h: 3 h nach der Induktion; lös.: löslicher Proteinextrakt nach dem Zellaufschluß unter nicht denaturierenden Bedingungen; unlös.: unlöslicher Proteinextrakt nach dem Zellaufschluß unter nicht denaturierenden Bedingungen. Ein Low Molecular Weight Marker wurde benutzt.

4.5.4. Aufreinigung des rekombinanten Proteins

Da das rekombinante Protein eine 6×His-Sequenz am N-Terminus trägt, wurde die Affinität der 6×His-Sequenz zu Ni^{2+} -Ionen zur Aufreinigung des exprimierten Proteins an Ni-Agarose genutzt. Es bestehen zwei Möglichkeiten ein Protein auf diese Weise zu reinigen: Falls das zu reinigende Protein sich nach dem Zellaufschluss in der löslichen Phase befindet, ist das Protein unter nicht denaturierenden Bedingungen zu reinigen. Sollte das Protein membrangebunden oder in Einschlußkörperchen vorliegen, kann man unter denaturierenden Bedingungen arbeiten.

Zur Bestimmung der rekombinanten hTIM3-Proteinlöslichkeit wurde das Zellpellet nach der Induktion unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand (löslicher Proteinextrakt) und das Pellet (unlöslicher Proteinextrakt) über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Western Blot analysiert. Wie aus Abb.9 ersichtlich, befand sich das Fusionsprotein im unlöslichen Proteinextrakt. Im löslichen Proteinextrakt konnte kein Fusionsprotein detektiert werden.

Da das gesuchte Protein in Einschlußkörperchen nach der Expression vorlag, wurde in denaturierenden Medien gearbeitet. Die über Nacht nach der Expression tiefgefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in Puffer A (enthält GuHCl) aufgenommen und nach dem Auflösen die nicht löslichen Bestandteile abzentrifugiert. Nach Einfüllen in Nickel-NTA-Säule wurden durch Zugabe von Waschpuffer A, B und C zuerst unspezifisch gebundene Fremdproteine entfernt und später das gesuchte Protein von Puffer D und E eluiert. Anschließend wurde das

eluierte Protein über Nacht gegen PBS dialysiert. Nach der Dialysierung wurde das Protein ausgefällt und die Hälfte in 0,5 M Zitronensäure gelöst und sofort bei -20°C tiefgefroren. Während der Aufreinigung wurden von den einzelnen Reinigungsschritten Proben genommen und auf einem 15%igem SDS-Acrylamidgel analysiert (Abb.10). Als Kontrolle wurden die Proben vor und nach der Expression (Abb.10 0h, 3h) aufgetragen. Der klare Überstand nach dem Zellaufschluß und der nicht an Nickel-Agarose gebundene Durchlauf sind in die Spuren lysate und flow aufgetrennt. Spur A, B, C zeigen Waschschrte mit Puffer A, B, C. Spur D, E zeigen die Proteine, die von der Säule eluiert wurden. In Spur E ist eine dicke Proteinband mit der zu erwartenden Größe von ca. 23 kDa zu sehen. Um die aufgereinigten Proteine als 6×His markierte Fusionsproteine darzustellen, wurde ein parallel aufgetragenes SDS-Acrylamidgel weiterhin im Western Blot analysiert (Daten nicht gezeigt). Die Ausbeute betrug 18,7 mg pro 1000 ml Kulturmedium.

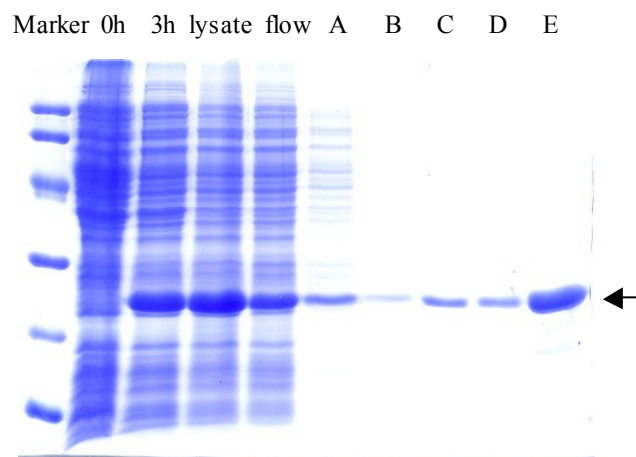


Abb. 10: SDS-PAGE Analyse von den einzelnen Reinigungsschritten des rekombinanten hTIM3-Proteins 0h : vor der Induktion; 3h: 3 h nach der Induktion; lysate: klarer Überstand; flow: Durchlauf; A,B,C: Waschschrte mit Puffer A, B, C; D,E: Eluat D,E. Ein Low Molecular Weight Marker wurde benutzt.

4.6. Expression des hTIM3-Proteins in eukaryontischen Zellen

4.6.1. Untersuchung der transfizierten Zellen durch EGFP-Koexpression

Zunächst wurden COS-7 Zellen mit dem Plasmid pIRES2EGFP, dem hTIM3 tragenden Plasmid pIRES2EGFP-hTIM3 transfiziert. Um die hTIM3-Genexpression zu vergleichen,

wurde hTIM3-cDNA mit 5'NTR (5' nontranslated region) mit einer Länge von 87bp in den Vektor pIRES2EGFP subkloniert und parallel die Zellen transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde durch Detektion von EGFP mittels FACS-Analyse abgeschätzt. Die FACS-Analyse zeigte die einheitliche EGFP-Expression von verschiedenen Plasmiden. Abb. 11 zeigt die EGFP-Fluoreszenzintensität der transfizierten COS-7 Zellen 24 h nach der Transfektion mit pIRES2EGFP-hTIM3. Anhand der FACS-Analyse wurden die Transfektionsraten mit der Software CELLQuest quantifiziert. Die Resultate einer dieser Transfektionen, bei der die Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 1 dargestellt. Es zeigt sich, dass eine Zellkonzentration von 3×10^5 Zellen pro Well in Bezug auf Transfektionsrate mit verschiedenen Plasmiden am günstigsten war und auch kein offensichtlicher Unterschied zwischen Plasmiden pIRES2EGFP-hTIM3 und pIRES2EGFP-hTIM3-5'NTR beobachtet wurde.

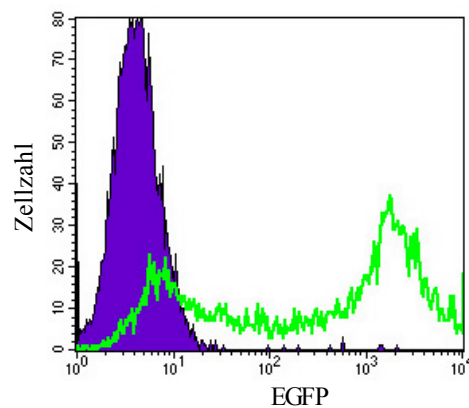


Abb. 11: FACS-Analyse der transfizierten Zellen durch EGFP-Koexpression COS-7 Zellen wurden mit dem Plasmid pIRES2EGFP-hTIM3 transfiziert und 24 h nach der Transfektion analysiert. blau: untransfizierte Zellen; grün: transfizierte Zellen.

Tabelle 1: Transfektionsraten (%) mit verschiedenen Plasmiden in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl

| Zellzahl | pIRES2EGFP | pIRES2EGFP-hTIM3 | pIRES2EGFP-hTIM3-5'NTR |
|-----------------|------------|------------------|------------------------|
| 2×10^5 | 62,33 | 66,28 | 69,31 |
| 3×10^5 | 64,60 | 70,66 | 70,96 |
| 4×10^5 | 62,04 | 67,41 | 63,91 |

Anschließend wurden verschiedene Zelltypen (COS-7, CHO-K1 und HEK 293) auf ihre Eignung als exprimierende Zelllinie untersucht. In transient transfizierten COS-7, CHO-K1 und HEK 293 Zellen mit dem Plasmid pIRES2EGFP-hTIM3 wurden die Transfektionsraten durch EGFP-Koexpression festgestellt. Im Vergleich zu CHO-K1 und HEK 293 Zellen wiesen COS-7 Zellen eine relativ höhere Transfektionsrate auf (Abb.12), danach konnten stabile Klone nicht erzeugt werden.

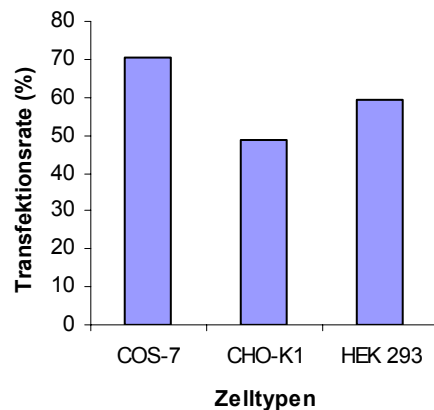


Abb. 12: Vergleich der Transfektionsrate von verschiedenen Zelltypen COS-7, CHO-K1 und HEK 293 Zellen wurden mit dem Plasmid pIRES2EGFP-hTIM3 transfiziert, 24 h nach der Transfektion analysiert und die Transfektionsraten durch EGFP-Koexpression festgestellt.

4.6.2. Untersuchung der transfizierten Zellen mit polyklonalen Antikörper des immunisierten Kaninchens

Um hTIM3-Expression in transfizierten Zellen nachzuweisen, wurden Oberflächenfärbung und Western Blot durchgeführt. Zur Antikörpergewinnung wurden zwei Peptide (s. 2.9) aus der extrazellulären Domäne des humanen TIM3 synthetisiert, an KLH gekoppelt und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Zur FACS-Analyse wurden die Zellen zunächst mit polyklonalen Antikörpern des immunisierten Kaninchens in einer Verdünnung von 1: 50 inkubiert und nach dem Waschen mit dem Cy5-konjugierten sekundären Antikörper anti-Kaninchen-IgG gefärbt. Als Negativkontrolle wurden die mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen verwendet (mock). Wie aus Abb. 13 ersichtlich, exprimierten die mit pIRES2EGFP-hTIM3 transfizierten COS-7 Zellen(COS-7 hTIM3) hTIM3-Protein auf der Zelloberfläche. Die mit pIRES2EGFP transfizierten Zellen(COS-7 mock) wiesen keine hTIM3-Expression auf. Die Höhe der hTIM3-Expression war mit der EGFP-Expression korreliert. Dies zeigt, dass die transfizierten Zellen in der Lage sind, ein funktionelles hTIM3-Protein zu

exprimieren. Das gleiche Ergebnis wurde auch in anderen Zelltypen (CHO-K1, HEK 293) nachgewiesen.

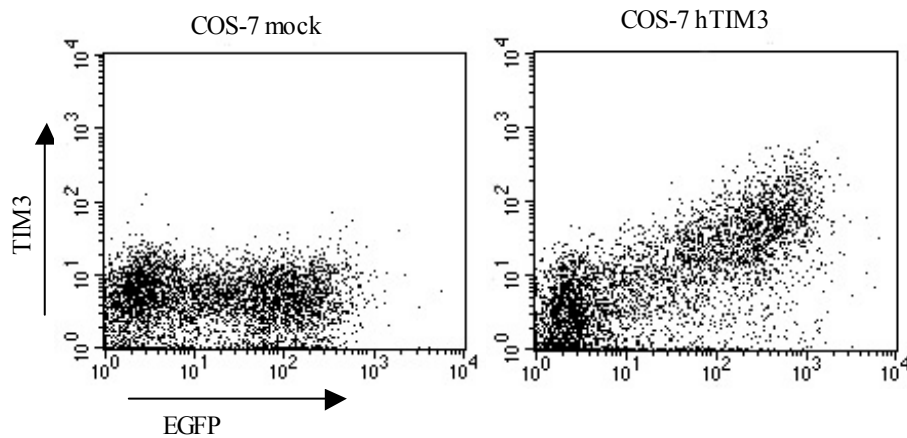


Abb. 13: hTIM3-Expression auf der Zelloberfläche der Transfektanten COS-7
Zellen wurden mit leeren Vektoren (COS-7 mock) und hTIM3 tragenden Vektoren (COS-7 hTIM3) transfiziert, mit polyklonalen Antikörper des immunisierten Kaninchens gegen hTIM3 inkubiert und anschließend mit anti-Kaninchen-IgG-Cy5 gefärbt.

Die Transfektanten wurden weiter mit polyklonalen Antikörper des Kaninchens mittels Western Blot getestet. Das Zelllysate wurde über SDS-PAGE aufgetrennt. Als spezifisch gegen hTIM3 gerichtete Antikörper diente polyklonale Antikörper des Kaninchens. Als Negativkontrolle wurden auch die mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen verwendet. Das Ergebnis des Western Blots ergab, dass ein ca. 40 kDa großes Protein (Pfeil) von den mit hTIM3-Gen tragenden Vektoren transfizierten Zellen mit polyklonalen Antikörper des immunisierten Kaninchens reagierte und größer als theoretisch ausgerechnete Größe von ca. 30,9 kDa war (Abb. 14). Dies ist sehr wahrscheinlich auf eine Glycosylierung des Expressionsproteins zurückzuführen.

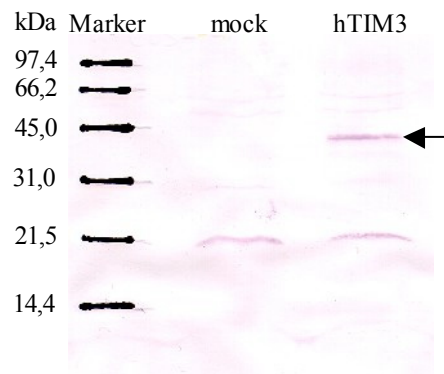


Abb. 14: Western Blot-Analyse der Transfektanten COS-7 Zellen wurden mit leeren Vektoren (mock) und hTIM3-Gen tragenden Vektoren (hTIM3) transfiziert. Das Zellysate wurde über SDS-PAGE aufgetrennt. Eine ca. 40 kDa großes Protein von den mit hTIM3-Gen tragenden Vektoren transfizierten Zellen reagierte mit polyklonalen Antikörpern des Kaninchens gegen hTIM3.

4.6.3. Stabile Transfektion

Um langfristige und reproduzierbare Untersuchungen durchführen zu können, wurde eine stabile Transfektion der CHO- und HEK 293-Zellen vorgenommen. Die transfizierten Zellen wurden mit Selektionsmedium (1 mg/ml G418) kultiviert. Da die Höhe der hTIM3-Expression mit EGFP-Expression korreliert ist, wurde die FACS-Sortierung auf EGFP-Koexpression durchgeführt. Nach 2-3mal Sortierungen blieben die Zellen über 90% EGFP-positiv (Abb.15). Die stabilen Transfektanten wurden im Medium ohne G418 vermehrt, geerntet und zu weiteren Untersuchungen benutzt. In stabil hTIM3 exprimierenden CHO-K1 und HEK 293-Zellen konnte die hTIM3-Expression auf der Zelloberfläche mit den polyklonalen Antikörper des Kaninchens mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden (s. 3.8.2).

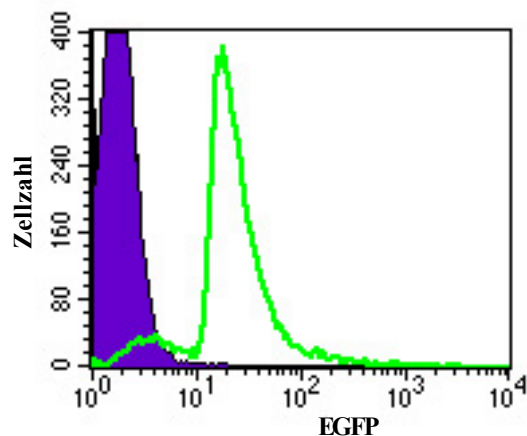


Abb. 15: FACS-Analyse der stabil transfizierten CHO-K1 Zellen durch EGFP-Koexpression Die transfizierten CHO-K1 Zellen wurden mit Selektionsmedium (1 mg/ml G418) kultiviert und auf EGFP-Koexpression durch FACS sortiert. Nach 2-3 Sortierungen blieben die Zellen über 90% EGFP-positiv. blau: untransfizierte Zellen; grün: stabil transfizierte Zellen.

4.7. Immunisierung der *BALB/c*-Mäuse und Bestimmung des spezifischen Serumtiters

Zur Erzeugung der Hybridomzelllinie wurden drei verschiedene Immunisierungsprotokolle durchgeführt. Dazu wurden die *BALB/c*-Mäuse mit dem löslichen und dem unlöslichen rekombinanten hTIM3-Protein, mit stabil transfizierten CHO-K1 Zellen immunisiert. Im Abstand von 3 Wochen wurden die Mäuse zweimal geboostet. Nach dem letzten Boost wurde den Mäusen Blut entnommen und der spezifische Antikörpertiter des Serums mittels ELISA und FACS-Analyse bestimmt.

Es wurde hier ein indirekter ELISA verwendet. Für die Beschichtung der ELISA-Platten wurde 50 µl der Lösung des rekombinanten Proteins (1 µg/ml in PBS) eingesetzt. Als Primärantikörper wurde das Serum (verdünnt in PBS/BSA/Tween) in unterschiedlicher Konzentration genutzt. Als positive Kontrolle wurden die polyklonale Antikörper des Kaninchens benutzt, als Negativkontrolle das normale Mausserum (NMS). Der Sekundärantikörper (Schaf-anti-Maus-IgG- und Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat) erlaubte den spezifischen Nachweis von Maus oder Kaninchen IgG. Wie Abb. 16 zeigt, wurde ein hoher hTIM3-spezifischer IgG-Titer im Serum der immunisierten Mäuse detektiert. Im Vergleich dazu wurde nur ein sehr geringes IgG-Antikörpersignal im Serum einer nicht immunisierten Maus erhalten.

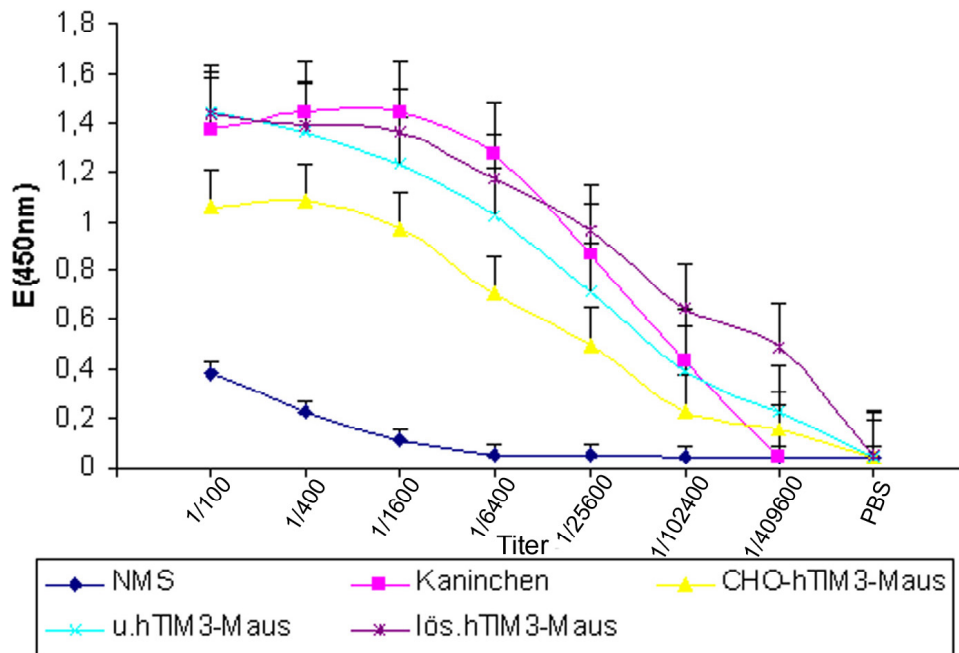


Abb. 16: ELISA zur Bestimmung des hTIM3-spezifischen Antikörpertiters im verdünnten Serum der immunisierten Mäuse Die ELISA-Platten wurden mit 50 μ l der Lösung des rekombinanten Proteins (1 μ g/ml in PBS) beschichtet. Als Primärantikörper wurde das Serum (verdünnt in PBS/BSA/Tween) in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. NMS: normales Mausserum; Kaninchen: das Serum des immunisierten Kaninchens; CHO-hTIM3-Maus: das Serum der mit den stabil transfizierten CHO-K1 Zellen immunisierten Maus; u. hTIM3-Maus: das Serum der mit dem unlöslichen hTIM3-Protein immunisierten Maus; lös. hTIM3-Maus: das Serum der mit dem löslichen hTIM3-Protein immunisierten Maus.

Weiterhin wurden die Seren von den immunisierten Mäusen zur FACS-Analyse eingesetzt. Das Serum wurde im Verhältnis 1: 5 in PBS/BSA/Azid verdünnt, zu den transfizierten Zellen zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Die weitere Schritte wurden so wie in 3.7.2 beschrieben durchgeführt. Als negative und positive Kontrolle wurde das Serum von einem normalen Maus und vom immunisierten Kaninchen verwendet. Als sekundärer Antikörper wurden anti-mouse-IgG-Cy5 und anti-Kaninchen-IgG-Cy5 eingesetzt. Abb. 17 zeigt deutlich, dass ein spezifischer gegen hTIM3 gerichteter IgG-Antikörpertiter im Serum der mit dem unlöslichen hTIM3-Protein immunisierten Maus nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich dazu wiesen die Seren der mit dem löslichen hTIM3-Protein und mit den stabil transfizierten CHO-K1 Zellen immunisierten Mäuse nur geringe hTIM3-spezifische IgG-Titer auf.

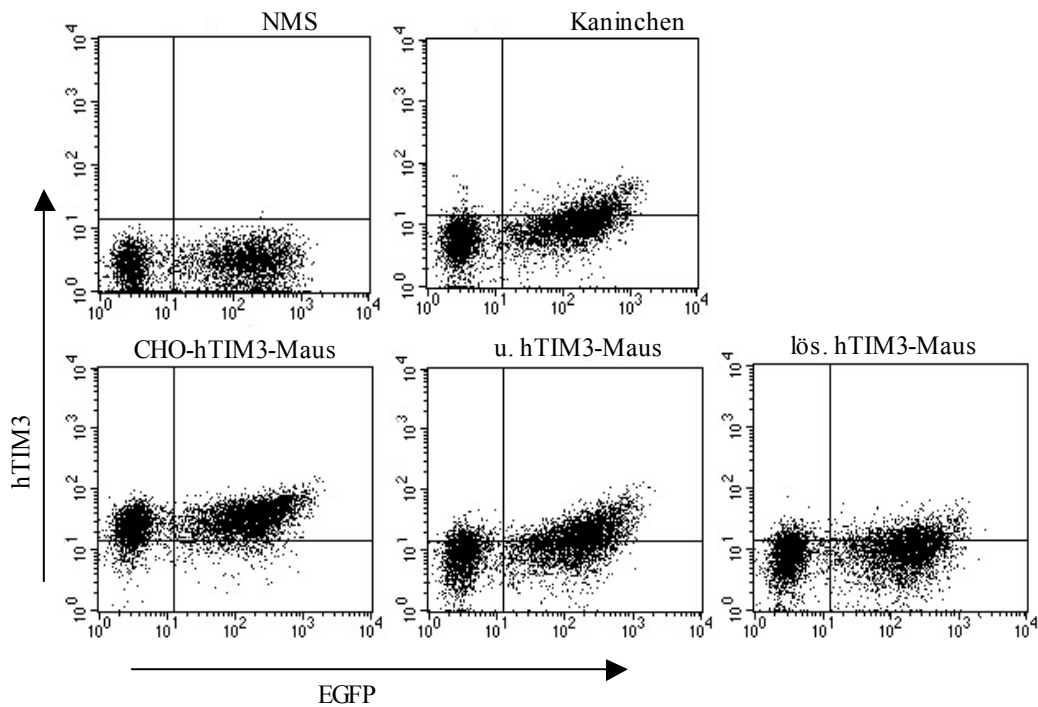


Abb.17: FACS-Analyse zum Nachweis für hTIM3-spezifische IgG im Serum der immunisierten Mäuse Die Mäuse wurden mit dem löslichen oder unlöslichen rekombinanten hTIM3-Protein, oder mit stabil transfizierten CHO-K1 Zellen immunisiert. Nach dem letzten Boost wurde den Mäusen Blut entnommen und die hTIM3-spezifische IgG des Serums mittels FACS-Analyse bestimmt. Die stabil hTIM3-exprimierten HEK 293 Zellen wurden zur Färbung benutzt. NMS: normales Mause Serum; Kaninchen: das Serum des immunisierten Kaninchens; CHO-hTIM3-Maus: das Serum der mit den stabil transfizierten CHO-K1 Zellen immunisierten Maus; u. hTIM3-Maus: das Serum der mit dem unlöslichen hTIM3-Protein immunisierten Maus; lös. hTIM3-Maus: das Serum der mit dem löslichen hTIM3-Protein immunisierten Maus.

4.8. Fusion und Screening

Die Milzzellen der erfolgreich immunisierten Mäuse wurden mit Myelomzellen zur Fusion gebracht. Zur Selektion der relevanten Hybridome wurden 3913 vereinzelte Klone einem Spezifitätstest unterzogen. Die Fusionsausbeute betrug bei 6 unterschiedlichen Fusionen 10-31%. Zum Spezifitätstest wurden ELISA- und FACS-Analyse vorgenommen. Im ELISA zeigten 33 Klone Affinität zum löslichen TIM3 und wurden weiter subkloniert. Davon zeigte nur der Klon 28H12 von einer mit dem unlöslichen hTIM3-Protein immunisierten Maus ein stärkeres Signal nach der Subklonierung und wurde weiter bearbeitet (Abb. 18). Im FACS konnte kein Antikörpersignal von den ausgewählten Klonen, das gegen hTIM3 auf der Zelloberfläche gerichtet war, beobachtet werden.

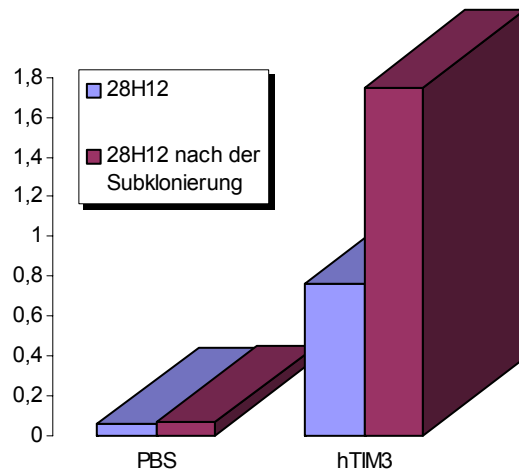


Abb. 18 ELISA-Screening Die ELISA-Platten wurden mit 50 μ l der Lösung des hTIM3-Proteins (1 μ g/ml in PBS) und PBS ohne Protein beschichtet. Der Klon 28H12 zeigte nach der Subklonierung ein stärkeres Antikörpersignal. Die Y-Achse zeigt die Extinktionswerte bei der Wellenlänge von 450 nm.

4.9. Isotyp-Bestimmung

Die Bestimmung der Klasse und Subklasse eines Antikörpers diente der Auswahl der Aufreinigungsmethode sowie der Optimierung des Testverfahrens. Der Isotyp des Antikörpers 28H12 wurde mit den Kulturüberständen mittels ELISA durchgeführt (s. 3.22 Antikörper-Isotypisierung). Der Antikörper 28H12 konnte dem Isotyp IgG2a zugeordnet werden (Abb. 19).

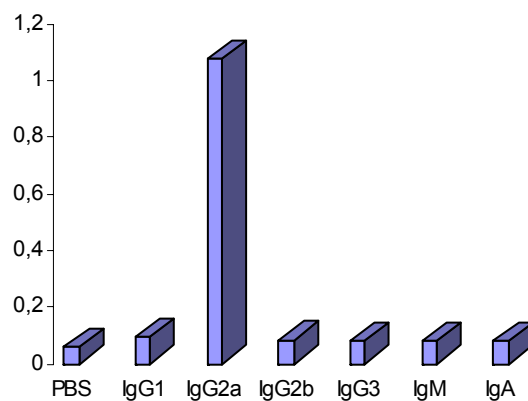


Abb. 19 Isotyp-Bestimmung Der Isotyp des Antikörpers 28H12 wurde nach der Subklonierung mit den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Y-Achse zeigt die Extinktionswerte bei der Wellenlänge von 450 nm.

5. Diskussion

Wegen der zentralen Bedeutung von Th1- und Th2-Zellen für die Regulation von Autoimmunerkrankungen, Allergien und Infektionskrankheiten sind in den letzten Jahren zunehmend die Unterschiede in der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle zwischen beiden Typen zum Gegenstand der Forschung geworden, um möglicherweise neue Zielmoleküle für die immunmodulatorische Therapie zu identifizieren. Dazu wurde ein neues Molekül, TIM3, das bevorzugt auf Th1-Zellen exprimiert wird, identifiziert (Monney, et al., 2002; Sanchez-Fueyo, et al., 2003). Bis heute weiß man noch nicht viel über die Funktion von TIM3. Die bislang publizierten Untersuchungen wiesen darauf hin, dass das TIM3-Protein von großer Bedeutung für Th-Zell-Effektorfunktion und Autoimmunerkrankungen ist (McIntire, et al., 2001; Monney, et al., 2002; Sabatos, et al., 2003). Die immunologische Funktion des humanen TIM3-Moleküls bleibt noch unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde das humane TIM3-Gen aus dendritischen Zellen isoliert und das rekombinante Protein in *E. coli* und in eukaryontischen Zellen exprimiert. Das Weiteren sollte die Immunisierung der Mäuse mit dem rekombinanten Protein vorgenommen werden, um die Hybridomzelllinie zu erzeugen.

5.1. Identifikation vom humanen TIM3

Das murine TIM3-Gen konnte aus einem Th1-Klon (Monney, et al., 2002) und Concanavalin-A-aktivierten Milzzellen (Sabatos, et al., 2003) isoliert werden. Unabhängig davon wurde es in einer differential display Analyse als Th1-spezifisch exprimiert gefunden (Löhning et al., 1998). In dieser Arbeit wurde die cDNA des hTIM3 ausgehend von dendritischen Zellen amplifiziert, nachdem die hohe TIM3-Expression auf murinen DC in einer in dieser Arbeitsgruppe angefertigten Dissertationsarbeit (Bender, 2003) beobachtet wurde. Zur Amplifizierung der hTIM3-cDNA wurden auch humane PBMC und eine Mastzelllinie benutzt, es konnte aber keine erfolgreiche Amplifikation erreicht werden. Die aus den Concanavalin-A-aktivierten Milzzellen isolierte Isoform, sTIM3 (lösliche Form von TIM3) genannt (Sabatos, et al., 2003), wurde nicht in diesen humanen Zellen beobachtet und ist bisher beim Menschen noch nicht nachgewiesen worden. Es ist bislang auch nicht klar, warum TIM3 auf murinen dendritischen Zellen stark exprimiert wird.

5.2. Expression des hTIM3-Proteins in *E. coli*

Zur Herstellung des monoklonalen Antikörpers wurde der extrazelluläre Teil des Proteins im prokaryontischen Expressionssystem in *E. coli* überexprimiert und über eine N-terminale Extension von sechs Histidinen chromatographisch an einer Ni-NTA-Matrix gereinigt. Da die Sekretion eines Fusionsproteins in den periplasmatischen Raum durch ein N-terminales Signalpeptid die geeignete Faltung des Proteins und die Bildung von Disulfidbrücken ermöglichen kann, wurde zunächst die Expression mit der Signalsequenz durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Expression nur in sehr geringer Menge möglich war (Abb. 8b). Dies ist möglicherweise auf die Signalsequenz von TIM3 zurückzuführen, da die Proteinsekretion mit eigenem Signalpeptid durch wachsende Zellen verhindert werden kann (Bowden, et al., 1990). Der spätere Versuch, das Fusionsprotein ohne Signalsequenz zu exprimieren, gelang sehr gut und führte zur Expression großer Mengen des Fusionsproteins (Abb. 8a). Da es jedoch als unlösliches Protein exprimiert wurde, das in Einschlußkörperchen („inclusion bodies“) nach der Expression vorlag, wurde es deshalb in denaturierenden Medien gereinigt. Eine Rückfaltung der unter denaturierenden Bedingungen gelösten „inclusion bodies“ erschien nicht aussichtsreich. Das durch Dialyse wieder ausgefallene Protein wurde deshalb teilweise in 0,5 M Zitronensäure gelöst. Die Antigenspezifität von sowohl löslichem als auch unlöslichem rekombinanten hTIM3-Protein konnte durch ELISA mit Antiserum gegen hTIM3 nachgewiesen werden. Doch es wäre für die Immunisierung von Vorteil, wenn man in ausreichendem Maße natives Protein erhalten könnte, und dies ist im Hinblick auf die Expression in *E. coli* nur durch ein eukaryontisches Expressionssystem zu erreichen.

5.3. Expression des hTIM3-Proteins in eukaryontischen Zellen

Der Vorteil eines in eukaryontischen Zellen exprimierten rekombinanten Proteins gegenüber eines in *E. coli* exprimierten Proteins besteht darin, dass das Protein auf ähnliche Art und Weise wie in humanen Zellen glycosyliert wird (König, et al., 1989). Weiterhin entschied ich mich für die Expression der komplett kodierenden Region vom hTIM3 in Säugetierzellen. Dafür wurden verschiedenen Zelltypen (COS-7, CHO-K1, HEK-293) auf ihre Eignung als exprimierende Zelllinie untersucht. In transient transfizierten COS-7-, CHO-K1-, HEK-293-Zellen konnte die Transgenexpression durch EGFP-Koexpression mittels FACS-Analyse festgestellt werden (Abb. 11). Das hTIM3-Protein wurde mittels Western Blot und

Oberflächenfärbung mit Antiserum gegen hTIM3 nachgewiesen (Abb.13 und Abb.14). Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass das auf Zelloberfläche der transfizierten Zellen exprimierte hTIM3-Protein große Ähnlichkeit zum auf humanen Zellen exprimierten Protein hat.

Da die Modifizierung der 5'NTR (5' nontranslated region) die Expression des Proteins regulieren kann (Xu, et al., 2002), wurde hTIM3-cDNA mit einer 5'NTR von 87bp in den Vektor pIRES2EGFP subkloniert und parallel die Zellen transfiziert. Wie in Tabelle 1 dargestellt, wurde kein offensichtlicher Expressionsunterschied zwischen den Plasmiden pIRES2EGFP-hTIM3 und pIRES2EGFP-hTIM3-5'NTR beobachtet.

Es wurden CHO-K1 und HEK-293 Zellen zur stabilen Transfektion verwendet. Da die Höhe der hTIM3-Expression mit der EGFP-Expression korreliert ist (Abb.13), wurden nur hoch EGFP-exprimierende Zellen isoliert und weiter kultiviert. Das hatte den Vorteil, dass 10-20% der Zellen während der Kultivierung ohne Selektionsdruck ihre Plasmide verloren und direkt als Negativkontrolle verwendet werden konnten. Das ist besonders günstig für die Detektion des Antikörpers gegen hTIM3 (Abb. 17) und kann weiter zum Screening der monoklonalen Antikörper gegen hTIM3 benutzt werden.

5.4. Vergleich der IgG-Antwort gegen hTIM3 in den Mäusen nach verschiedenen Immunisierungsprotokollen

Zur Erzeugung der Hybridomzelllinie wurden die Mäuse mit dem löslichen und unlöslichen rekombinanten hTIM3-Protein und mit stabil transfizierten CHO-K1 Zellen immunisiert. Nach dem letzten Boost konnte im ELISA ein hoher hTIM3-spezifischer IgG-Titer im Serum der immunisierten Mäuse nachgewiesen werden (Abb. 16). Aber wie die FACS-Analyse in Abb.17 deutlich zeigt, konnte ein spezifischer gegen hTIM3 gerichteter IgG-Antikörpertiter nur im Serum der mit dem unlöslichen hTIM3-Protein immunisierten Maus nachgewiesen werden. Ein wahrscheinlicher Grund dafür ist, dass der ELISA empfindlicher als die FACS-Analyse ist. Möglicherweise besitzt das unlösliche hTIM3-Protein eine stärkere Immunogenität als die lösliche und die auf der Zelloberfläche exprimierte Form. Alternativ könnte es sich auch um eine Trypsinierung des hTIM3 auf den transfizierten CHO-K1 Zellen wegen relativ längerer Inkubationszeit mit Trypsin handeln. Der Versuch, die transfizierten Zellen durch PBS/EDTA (2mM) ohne Trypsin aus Kulturflasche abzulösen, steigerte erheblich die Frequenz der TIM3-positiven Zellen in der FACS-Analyse. TIM3-Antigen auf den transfizierten CHO-K1 Zellen könnte deshalb nach der Trypsinverdauung teilweise

verloren gegangen sein. Normalerweise besitzt das TIM3-Molekül auf der Zelloberfläche mehr natürliche Epitope als das unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigte Protein. Ein monoklonaler Antikörper gegen murines TIM3 wurde durch Immunisierung mit Th1-Zelllinien generiert (Monney, et al., 2002). Experimente zur Kinetik der TIM3-Expression muriner DO11.10 Th1- und Th2-Zelllinien zeigten, dass nach drei Stimulationsrunden die Rate TIM3-positiver Th1-Zellen am höchsten ist (60-90%) (Monney, et al., 2002; Sanchez-Fueyo, et al., 2003). In transfizierten Zellen sind ca. 80% der EGFP-positiven Zellen TIM3-positiv (Abb. 13). Das bedeutet, dass die Immunisierung mit stabilen Transfektanten besser funktionieren könnte. Aber die beobachtete relativ schwache Immunantwort gegen hTIM3 nach der Immunisierung kann auch auf die hohe Homologie mit dem murinen TIM3 zurückzuführen sein, deshalb sollte die Immunisierung mit hTIM3 in der TIM3^{-/-}-Maus eine relativ starke Immunantwort induzieren.

5.5. Generierung der monoklonalen Antikörper

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eines monoklonalen gegen hTIM3 gerichteten Antikörpers. Trotz vieler Immunisierungsprotokolle stellte die Herstellung vom Antikörper einen schwierigen Prozeß dar. Viele Faktoren wie physikalische Eigenschaften des Antigens, Auswahl der Tiere und Adjuvantien, Fusionsausbeute und Selektionssystem scheinen eine Rolle zu spielen.

Bei der Entwicklung des monoklonalen Antikörpers spielt das Selektionssystem die wichtigste Rolle. Zum Screening der Klone in dieser Arbeit standen zwei unterschiedliche Antigenformen zur Auswahl, nämlich das lösliche Protein und das auf der Zelloberfläche exprimierte TIM3-Molekül. Da das auf ELISA basierende Selektionssystem empfindlich ist, lassen sich damit viele gewünschte Antikörper detektieren. Aber das unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigte Protein besitzt andere Strukturmerkmale als das TIM3-Molekül auf der Zelloberfläche und konnte nicht alle TIM3-Epitope erfassen. Das FACS-Screening ist in der Regel optimal, aber wegen niedriger Antikörperkonzentration in den Überständen könnten die gewünschten Antikörper übersehen werden. Aus den oben angeführten Gründen wurden zwei Selektionssysteme ausgewählt. Ein im ELISA generierter monoklonaler Antikörper reagierte aber nicht auf hTIM3 auf der Zelloberfläche. Um das hTIM3-Molekül auf lebenden Zellen detektieren zu können, soll weiterhin ein monoklonaler Antikörper generiert werden. Der gegen das lösliche hTIM3-Protein gerichtete monoklonale Antikörper 28H12 könnte weiter zur Untersuchung der löslichen Form von TIM3 benutzt werden.

5.6. Ausblick

Die bisherigen Ergebnisse der Forschung im Mausmodell zeigten, dass TIM3-Protein von großer Bedeutung für die Th-Zell-Effektorfunktion und Autoimmunerkrankungen ist. Es ist von Interesse, die funktionelle Bedeutung und therapeutische Wirksamkeit vom humanen TIM3 zu untersuchen. Die rekombinante Herstellung des hTIM3 ermöglicht die Produktion der monoklonalen Antikörper. Als nächstes soll bestimmt werden, welche Zellen TIM3 exprimieren, ob TIM3 mit der Produktion bestimmter Zytokine assoziiert ist, ob TIM3 bei Th1-dominierten Erkrankungen vermehrt exprimiert wird und welche funktionelle Bedeutung das humane TIM3 hat.

Hier interessiert uns auch die Frage, welche Zellen den humanen TIM3-Liganden exprimieren und wie man die Interaktion von TIM3-TIM3L manipulieren kann. Die Charakterisierung dieses Liganden ist von großer Bedeutung für das genauere Verständnis der physiologischen Funktionen von TIM3 und für die rationale therapeutische Immunmodulation. Ein Fusionsprotein, TIM3-Immunglobulin (TIM3-Ig) soll in eukaryontischen Zellen exprimiert werden und für die Färbung der den TIM3-Liganden tragenden Zellen genutzt werden.

6. Zusammenfassung

Die Zytokinproduktion von Th-Zellen ist von entscheidender Bedeutung für den Verlauf von Infektionskrankheiten, Allergien und Autoimmunkrankheiten. Seit 1986 werden Th-Zellen abhängig von ihrer Zytokinproduktion in die Untertypen Th1 und Th2 eingeteilt. Bislang wurden noch keine stabile „Marker“, die unterschiedlich auf der Oberfläche der Th1- oder Th2-Zellen exprimiert werden, identifiziert. Als Ziele therapeutischer Immunmodulation könnten solche Oberflächenmoleküle dienen, die funktionell relevant für die jeweilige Th-Subpopulation sind. In den letzten Jahren wurde ein neues Molekül, TIM3, bevorzugt auf Th1-Zellen exprimiert und von Bedeutung für die Funktion dieser Zellen ist, identifiziert. Das TIM3 ist mit KIM1 (kidney injury molecule 1), HAVCR (hepatitis A virus cellular receptor) und TIM2 assoziiert. Sie gehören zusammen zur TIM-Genfamilie und werden auf dem murinen Chromosom 11 bzw. dem humanen Chromosom 5 (5q32.2) lokalisiert. Bis heute ist die Funktion von TIM3 unklar. Die Experimente im Mausmodell haben gezeigt, dass TIM3 bevorzugt in aktivierten Th1-Zellen exprimiert und ein negatives Signal für Th1 mediierten Immunantwort bietet. Die immunologische Funktion des humanen TIM3 Moleküls ist noch unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die hTIM3-cDNA zu klonieren, zu exprimieren und die Mäuse mit dem rekombinanten Protein zu immunisieren, um monoklonale Antikörper herzustellen. Das hTIM3-Gen wurde mittels PCR amplifiziert und in *E.coli* kloniert. Die Sequenzanalyse des Gens ergab einen offenen Leserahmen von 903 bp, besteht aus 7 Exons und 6 Introns. Aus dem ORF lässt sich für die extrazelluläre Domäne eine Größe von 19,8 kDa vorhersagen, für den komplett kodierende Bereich eine Größe von 30,9 kDa.

Die rekombinante Expression des extrazellulären Teils als Fusionsproteine mit einer N-terminalen Extension von sechs Histidinen in *E. coli* wurde in großen Mengen hergestellt, führte aber zur Bildung von Einschlusskörperchen. Das Protein wurde deshalb in denaturierenden Medien aufgereinigt, nach der Dialysierung gegen PBS wieder ausgefallen und zum Teil in Zitronensäure gelöst. Durch Western Blot-Analyse mit Antikörper gegen His-Tag konnte das rekombinante Protein (ca. 23 kDa) nachgewiesen werden.

Die rekombinante Herstellung der komplett kodierenden Region wurde in eukaryontischen Zellen durchgeführt. Mittels Western Blot- und FACS-Analyse mit Antiserum gegen zwei Peptid aus der extrazellulären Domäne des hTIM3 wurde gezeigt, dass das auf Zelloberfläche

der transfizierten Zellen exprimierte hTIM3-Protein große Ähnlichkeit zum auf humanen Zellen exprimierten Protein hat. Mittels Western Blot konnte für das rekombinante hTIM3 ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa bestimmt werden. Weiter wurden stabil hTIM3-exprimierte CHO-K1- und HEK-293-Zelllinien unter Selektionsdruck mit G418 und durch FACS-Sortierung auf EGFP-Koexpression erzeugt.

Um monoklonale Antikörper herzustellen, wurden die Mäuse mit dem löslichen und unlöslichen rekombinanten hTIM3-Protein, mit stabil transfizierten CHO-K1 Zellen immunisiert. Nach der Immunisierung wurde ein spezifisch gegen hTIM3 gerichteter unterschiedlicher Antikörpertiter im Serum der immunisierten Mäuse beobachtet. Im ELISA wurde ein hoher hTIM3-spezifischer IgG-Titer im Serum der immunisierten Mäusen detektiert. Mittels FACS-Analyse konnte nur ein starkes IgG-Antikörpersignal gegen hTIM3 im Serum der mit dem unlöslichen hTIM3-Protein immunisierten Maus nachgewiesen werden. Die Milzzellen der immunisierten Mäuse wurden dann mit Myelomzellen zur Fusion gebracht. Ein monoklonaler Antikörper vom Klon 28H12 wurde im ELISA-Selektionssystem generiert, aber reagierte nicht auf das hTIM3-Molekül auf der Zelloberfläche. Der gegen das lösliche hTIM3-Protein gerichtete monoklonale Antikörper 28H12 könnte weiter zur Untersuchung der löslichen Form von TIM3 benutzt werden.

7. Referenzen:

- Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793
- Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, S.T.L., Purphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 3: 549-57
- Akahoshi, M., Nakashima, H., Tanaka, Y., Kohsaka, T., Nagano, S., Ohgami, E., Arinobu, Y., Yamaoka, K., Niino, H., Shinozaki, M., Hirakata, H., Horiuchi, T., Otsuka, T., Niho, Y., (1999). Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42: 1644-48
- Akira, S.. (1999). Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 17: 138-46
- Annunziato, F., Cosmi, L., Galli, G., Beltrame, C., Romagnani, P., Manetti, R., Romagnani, S., Maggi, E., (1999). Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 65: 691-9
- Badaro, R., Falcoff, E., Badaro, F.S., Carvalho, E.M., Pedral-Sampaio, D., Barral, A., Carvalho, J.S., Barral-Netto, M., Brandeley, M., Silva, L., Bina, J.C., Teixeira, R., Falcoff, R., Rocha, H., Ho, J.L., Johnson, W.D.Jr. (1990). Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon γ . *N. Engl. J. Med.* 322: 16-21
- Balomenos D, Rumold R, Theofilopoulos AN., (1998). Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J Clin Invest* 101:364-371
- Bender, O., (2003). Untersuchungen zur Expression des TIM-3 Moleküls auf murinen T-Helfer-Zellen. Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin. August 2003
- Birnboim, H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100: 243-55
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper

- cells (TH1s) and TH2s. *J. Exp. Med.* 187: 129-34
- Bowden, G.A., Georgiou, G., (1990). Folding and aggregation of beta-lactamase in the periplasma space of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265: 16760-6
- Brutsche, M.H., Frey, U., (2002). Pathogenese und Diagnostik des Asthma bronchiale. *Schweiz Med. Forum Nr. 198*. Mai 2002
- Campbell, IL., Kay, TW., Oxbrow, L., Harrison, LC., (1991). Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice. *J Clin Invest.* 87(2):739-42
- Chen, Y., Kuchroo, V.K., Lnobe, J.L., Hafler, D.A., Weiner, H.L., (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 265: 1237-40
- Cher, D., Mosmann, T., (1987). Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. *J. Immunol.* 138: 3688-94
- Coller, H.A., Coller, B.S., (1983). Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. *Meth. Enzymol.* 121: 412-17
- Constant, S.L., Pfeiffer, C., Pasqualini, T., Bottomly, K. (1995). Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4 T cells. *J. Exp. Med.* 182: 1591-96
- Coyle, A., Loyd, J.C., Tian, J., Nguyen, T., Eriksson, C., Wang, L., Ottoson, P., Persson, P., Delaney, T., Lehar, S., Lin, S., Piosson, L., Meisel, C., Kamradt, T., Bjerke, T., Levinson, D., Gutierrez-Ramos, J.C. (1999). Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J. Exp. Med.* 190: 895-902
- Canete, JD., Martinez, SE., Farres, J., Sanmarti, R., Blay, M., Gomez, A., Salvador, G., Munoz-Gomez, J., (2000). Differential Th1/Th2 cytokine patterns in chronic arthritis: interferon gamma is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis compared with seronegative spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis* 59: 263-68
- Croft, M., Dunnean, DD., Swain, SL., (1992). Response of naïve antigen-specific CD4+ T cells in vitro: characteristics and antigenpresenting cell requirement. *J. Exp. Med.* 176: 1431

- Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stuber, D. and Henco, K. (1994). 6×His-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* 31: 371-87
- Crowe J, Masone BS, Ribbe J., (1995). One –step purification of recombinant proteins with the 6×His tag and Ni-NTA resin. *Mol Biotechnol.* 4(3): 247-258
- Cush, JJ., Lipsky, PE., (1988). Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31: 1230-38
- Debray-Sachs, M., Carnaud, C., Boitard, C., Cohen, H., Gresser, I., Bedossa, P., Bach, JF., (1991). Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma. *J Autoimmun.* 4(2):237-48
- Delovitch, T:L: Singh, B. (1997). The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 7: 727-38
- Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., Daniel, C.K., D’Elios, M.M., Zancuoghi, G., Vinante, F., Pizzolo, G., Romagnani, S. (1995). Preferential expression of CD30 by human CD4+ T cells producing Th2-type cytokines. *Faseb J.* 9: 81-6
- Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM. (1996) Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39(12): 1961-9
- Feigelstock, D., Thompson, P., Mattoo, P., Kaplan, G.G., (1998). Polymorphisms of the hepatitis A virus cellular receptor 1 in African green monkey kidney cells result in antigenic variants that do not react with protective monoclonal antibody 190/4. *J. Virol.* 72: 6218-22
- Feigelstock, D., Thompson, P., Mattoo, P., Zhang, Y., Kaplan, G.G., (1998). The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J.Virol.* 72: 6621-28
- Firestein, G.S., Roeder, W.D., Laxer, J.A., Townsend, K.S., Weaver, C.T., Hom, J.T., Linton, J., Torbett, B.E., Glasebrook, A.L. (1989). A new murine CD4+ cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J. Immunol.* 143: 518-25
- Groux, H., O’Garra A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., Vries, J.E.de, Roncarolo, M.G., (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 389: 737-42

- Han, W.K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R., Bonventre, J.V., (2002). Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 62: 237-44
- Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R.M., Romani, N., Schuler, G. (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates Thelper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur. J. Immunol.* 26: 659-68
- Ho, I.C., Hodge, M.R., Rooney, J.W., Glimcher, H.L. (1996). The protooncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85: 973-83
- Hosken, N.A., Shibuya, K., Heath, A.W., Murphy, K.M., O'Garra, A. (1995). The effect of antigen dose on CD4⁺ T helper cell phenotype development in a T cell receptor- $\alpha\beta$ -transgenic model. *J. Exp. Med.* 182: 1579-84
- Hou, J., Schindler, U., Henzel, W.J., Ho, T.C., Brasseur, M., McKnight, S.L. (1994). An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 265: 1701-06
- Hsieh, C.-S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., Murphy, K.M. (1993) Development of TH1 CD4⁺ T cells Through IL-12 Produced by Listeria-Induced Macrophages. *Science* 260: 547-49
- Ichimura, T. et al. (1998). Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J. Biol. Chem.* 273: 4135-42
- Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E., Murphy, K.M. (1995). Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J. Exp. Med.* 181: 1755-62
- Kamradt, T., Mitchison, N.A. (2001). *Advances in Immunology: tolerance and autoimmunity.* N. Engl. J. Med. 344: 655-64
- Kaplan, G., Totsuka, A., Thompson, P., Akatsuka, T., Moritsugu, Y., Feinstone, SM., (1996). Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* 15: 4282-96
- Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T., Grusby, M.J. (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382: 174-77
- Kaufmann, DL., Clare-Salzler, M., Tian, J., Forsthuber, T., ting, GS., Robinson, P., Atkinson,

- MA., Sercarz, EE., Tobin, AJ., (1993). Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature*. 366: 69-72
- Kim, J.I., Ho, I.C., Grusby, M.J., Glimcher, L.H. (1999). The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 10: 745-51
- König R, Ashwell G, Hanover JA., (1989). Overexpression and biosynthesis of CD4 in Chinese hamster ovary cells: Coamplification using the multiple drug resistance gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9188-9192
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, H., Glimcher, L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules differentially activate the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80: 707-18
- Kuchroo, V.K., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., Freeman, G.J., (2003). The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 454-62
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Lawson BR, Prud'homme GJ, Chang Y, Gardner HA, Kuan J, Kono DH, Theofilopoulos AN., (2000). Treatment of murine lupus with cDNA encoding IFN- γ R/Fc. *J Clin Invest* 106:207-215
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D., Paul, W.E. (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4) –producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J. Exp. Med.* 172: 921-29
- Lenschow, D.J., et al. (1996). CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity* 5: 285-93
- Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, SA., Piali, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B., (1996). Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184: 963-69
- Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C., Dayer, J. M. (1998). CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391: 344-45
- Löhning, M., Grogan, J.L.; Coyle, A.J., Meisel, C., Yazdanbakhsh, M., Gutierrez-Ramos, J.C., Radbruch, A., Kamradt, T. (1999). Expression of T1/ST2 is enhanced on CD4+ T cells from schistosome egg-induced granulomas: Analysis of T helper cell cytokine

- co-expression ex vivo. *J. Immunol.* 162: 3882-89
- Löhning, M., Stroehmann, A., Coyle, A.J., Grogan, J.L., Lin, S., Gutierrez-Ramos, J.C., Levinson, D., Radbruch, A., Kamradt, T. (1998). T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of IL-4, IL-5 and IL-10, and important for Th2 effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 6930-35
- Lukacs, N.W., Tekkanat, K.K., (2000). Role of chemokines in asthmatic airway inflammation. *Immunol Rev.* 177:21-30
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wyszocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naïve CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 154: 5071-79
- Martin, R., McFarland, H.F., McFarlin, D.E. (1992). Immunological Aspects of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 153-87
- McIntire, J.J., Umetsu, S.E., Akbari, O. Potter, M., Kuchroo, V.K., Barsh, G.S., Freeman, G.H., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H. (2001). Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nature Immunol.* 2: 1109-16
- Meisel, C., Bonhagen, K., Löhning, M., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Radbruch, A., Kamradt, T., (2001). Regulation and funktion of T1/ST2 expression on CD4⁺ T Cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. *J Immunol.* 166(5): 3143-50
- Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P., Falkow, S., (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127(3): 1529-37
- Monney, L., Sabatos, C.A., Gaglia, J.L. & Kuchroo, V.K. (2002). Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415: 536-541
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-2357
- Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:

- Mullen, A.C., High, F.A., Hutchins, A.S., Lee, H.W., Villarino, A.V., Livingston, D.M., Kung, A.L., Cereb, N., Yao, T.P., Yang, S.Y., Reiner, S.L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292: 1907-10
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50
- Murphy, K.M., Reiner, S.L., (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 933-44
- Park, SH., Min, DJ., Cho, ML., Kim, WU., Youn, J., Park, W., Cho, CS., Kim, HY., (2001). Shift toward T helper 1 cytokines by type II collagen-reactive T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 44: 561-69.
- Pfeiffer, C., Murray, J., Madri, J., Bottomly, K. (1991). Selective Activation of TH1- and TH2-like Cells in vivo – Response to Human Collagen IV. *Immunol. Rev.* 123: 65-84
- Powrie, F., Coffman, R.L., (1993). Cytokine regulation of T cell function: potential for therapeutic intervention. *Immunol. Today* 14: 270-74
- Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., Flavell, R.A. (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. *J. Exp.Med.* 185: 461-70
- Rogge, L., D'Ambrosio, D., Biffi, M., Penna, G., Minetti, L.J., Presky, D.H., Adorini, L., Sinigaglia, F. (1998). The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type 1 IFNs. *J. Immunol.* 161: 6567-74
- Romagnani, S. (1991). Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol. Today* 12: 256.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180(1): 83-93
- Sabatos, C.A., Chakravarti, S., Cha, E., Schubart, A., Sanchez-Fueyo, A., Zheng, X.X., Coyle, A.J., Strom, T.B., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., (2003). Tim-3/Tim-3-Ligand interaction regulates Th1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 4 (11): 1102-10
- Salgamme, P., Yamamura, M., Bloom, B.R., Modlin, R.L. (1992). Evidence for functional subsets of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in human disease – lymphokine patterns in leprosy.

Chem. Immunol. 54: 44-59

- Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C.R., Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187: 875-83
- Sanchez-Fueyo, A., Tian, J., Picarella, D., Domenig, C., Zheng, X.X., Sabatos, C.A., Manlongat, N., Bender, O., Kamradt, T., Kuchroo, V.K., Gutierrez-Ramos, J., Coyle, A.J., Strom, T.B., (2003). Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat. Immunol.* 4 (11): 1093-101
- Sanger F., Nicklen, S., Coulson, AR. (1997). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74: 5463-7
- Schulze-Koops, H., Lipsky, PE., Kavanaugh, AF., Davis, LS., (1995). Elevated Th1 or Th0-like cytokine mRNA in peripheral circulation of patients with rheumatic arthritis. Modulation by treatment with anti-ICAM-1 correlates with clinical benefit. *J. Immunol.* 155: 5029-37
- Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., Paul, W.E. (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10188-92
- Seder, R.A., Paul, W.E., Davis, M.M., FASEKAS DE ST., Groth, B. (1992) The Presence of Interleukin-4 during in vitro Priming Determines the Lymphokine-Producing Potential of CD4+ T Cells from T Cell Receptor Transgenic Mice. *J. Exper. Med.* 176: 1091-98
- Sher, A. & Coffman, R. L. (1992). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 385-409
- Shiozawa, F., Kasama, T., Yajima, N., Odai, T., Isozaki, T., Matsunawa, M., Yoda, Y., Negishi, M., Ide, H., Adachi, M., (2004). Enhanced expression of interferon-inducible protein 10 associated with Th1 profiles of chemokine receptor in autoimmune pulmonary inflammation of MRL/lpr mice. *Arthritis Res Ther.* 6(1): R78-R86
- Steinman, L. (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell.* 85: 299-302
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145: 3796-806
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X. FATHMAN, C.G., GLIMCHER, L.H. (2000). A

- novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655-69
- Takahashi S, Fossati L, Iwamoto M, Merino R, Motta R, Kobayakawa T, Izui S., (1996). Imbalance towards Th1 predominance is associated with acceleration of lupus-like autoimmune syndrome in MRL mice. *J Clin Invest* 97:1597-1604
- Tisch, R., Yang, X.D., Singer, S.M., Liblau, R.S., Fugger, L., McDevitt, H.O., (1993). Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature*. 366: 72-5
- Venkataraman, C., Schaefer, G., Schindler, U. (2000) Cutting edge: chandra, a novel four-transmembrane domain protein differentially expressed in helper type 1 lymphocytes. *J. Immunol.* 165: 632-36
- Xu, D., Chan, W.L., Leung, B.P., Huang, F., Wheeler, R., Piedrafita, D., Robinson, H.J., Liew, F.Y. (1998). Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J. Exp. Med.* 187: 787-94
- Xu, H, Montoya, F.U., Wang, Z., Magnuson, N.S. (2002). Combined use of regulatory elements within the cDNA to increase the production of a soluble mouse single-chain antibody, scFv, from tobacco cell suspension cultures. *Protein Expr Purif.* 24(3): 384-394
- Zaitseva, M., Blauvelt, A., Lee, S., Lapham, C.K., Klaus, K., Mostowski, V.H., Manischewitz, J., Golding, H. (1998). Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human langerhans cells and macrophages: Implications for HIV primary infection. *Nat. Med.* 3:1369-75
- Zamvil, S.S., Steinman, L. (1990). The T lymphocyte in experimental allergic encephalitis. *Annu Rev Immunol.* 8: 579-621
- Zhang, D.H., Yang, L., Cohn, L., Parkyn, L., Homer, R., Ray, P., Ray, A. (1999). Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 11: 473
- Zheng, W., Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89: 587-96
- Zhou, L.J., Tedder, T.F. (1996). CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2588-2592

8. Abkürzungen

| | |
|---------------|--|
| Abb | Abbildung |
| Amp | Ampicillin |
| AP | alkalische Phosphatase |
| APC | Antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cell) |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| bidest | entionisiertes Wasser |
| BCIP | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin (bovine serum albumine) |
| bzw | beziehungsweise |
| ca. | etwa |
| CD | Oberflächenantigen (cluster of differentiation) |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CFA | Freund's komplettes Adjuvans (complete Freund's Adjuvant) |
| CHO | Chinese hamster ovary |
| c-Maf | a member of the b-ZIP (basic-region leucine-zipper) protein family |
| CMV | Cytomegalovirus |
| COS-7 | African green monkey kidney |
| CTLA-4 | cytotoxic T lymphocyte antigen 4 |
| Cy5 | Indodicarboocyanine |
| DC | Dendritische Zelle (dendritic cell) |
| d.h. | das heißt |
| DMEM | Doulbecco's MOD EAGLE Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleotide |
| DTT | Dithiothreithol |
| EAE | experimentell autoimmune Enzephalomyelitis |
| <i>E.coli</i> | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFP | enhanced green fluorescent protein |
| ELISA | Enzyme-linked immunoabsorbent assay |
| FACS | Fluorescence activated cell sorter |

| | |
|--------|---|
| FCS | Fetales Kälberserum (fetal calf serum) |
| FITC | Fluoresceinisocyanat |
| FSC | forward scatter |
| GAD | glutamic acid decarboxylase |
| GATA-3 | zinc-finger transcription factor |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor |
| h | Stunde (hour) |
| HEK | human embryonal kidney |
| HGPRT | Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase |
| hTIM3 | humanes TIM3 |
| ICOS | inducible T-cell co-stimulator |
| IDDM | insulin dependent diabetes mellitus |
| IFA | Freund's inkomplettes Adjuvans (incomplete Freund's Adjuvant) |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| IPTG | Isopropyl β -D-Thiogalaktopyranosid |
| IRES | internal ribosome entry site |
| kDa | Kilodalton |
| KLH | Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke (Keyhole Limpet Heamocyanin) |
| LB | Luria-Broth |
| MBP | myelin basic protein |
| MCS | multiple Klonierungsstelle (multi cloning site) |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| min | Minute |
| mRNA | messenger RNA |
| NBT | Nitro Blue Tetrazolium |
| NK | natürliche Killerzellen |
| NOD | nonobese diabetic |
| NTR | nontranslated region |
| OD | optische Dichte |
| ORF | offener Leserahmen (open reading frame) |
| PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cells |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline) |

| | |
|--------------|---|
| PCR | Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction) |
| PE | Phycoerythrin |
| pH | pH-Wert |
| PLP | peptide of myelin proteolipid protein |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| Rnase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion |
| s. | siehe |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| sec | Sekunden |
| SSC | sideward scatter |
| STAT | signal transducer and activator of transcription |
| TAE-Puffer | Tris-Eisessig-EDTA-Puffer |
| Taq | Thermus aquarius |
| T-bet | T-box transcription factor |
| TBS | Tris gepufferte Kochsalzlösung |
| TCR | T Zell Rezeptor |
| TEMED | N,N,N',N' Tetramethylendiamin |
| TGF- β | Transforming Growth Factor β |
| Th | T Helferzelle (T helper) |
| TIM3 | T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule 3 |
| TIM3L | Ligand vom TIM3 |
| TMB | 3,3',5,5'Tetramethylbenzidine Dihydrochloride |
| TNF α | tumor necrosis factor α |
| TRIS | Tris (hydroxymethyl) aminomethan |
| U | Unit, Einheit |
| usw. | und so weiter |
| w/v | Masse-% vom Gesamtvolumen (weight per volume) |
| X-gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid |
| z.B | zum Beispiel |

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Es wurden keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

Berlin, den

Shengtao Zhang

10. Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Kamradt Danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die hervorragende Betreuung und jederzeit gewährte Unterstützung.

Mein Dank geht auch an alle Kollegen der Arbeitsgruppe Kamradt für die einzigartige Arbeitsatmosphäre und die hilfreiche Unterstützung bei dieser Arbeit. Besonders erwähnen möchte ich David Schubert und Tobias Nolden, denen ich mit nervigen Fragen und Wünschen oftmals zusätzliche Arbeit bereitet habe. Mein besonderer Dank geht auch an Caspar Pfueller für die Geduld bei der Korrektur der schriftlichen Arbeit.

Ich bedanke mich auch bei Mark Rosowski und Luzie Reiner-Schramm für hilfreiche Diskussionen und freundschaftliche Hilfe im Labor.

Besonders herzlich Danke ich Heidi Hecker-Kia, Heidi Schliemann, Tuula Geske und Gudrun Steinhauser für ihre technische Unterstützung und unermündliche Freundlichkeit.

Ein großes Dankschön möchte ich auch an allen Kolleginnen und Kollegen des Deutschen Rheumaforschungszentrums, die zur Arbeit beigetragen haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Mann und Sohn für die Unterstützung und Begleitung bei dieser Arbeit Danken.