

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE
DIREKTORIN: FR. PROF. DR. D. N. MÄNNEL
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Reinigung und funktionelle Charakterisierung eines
rekombinanten Maus-TNF-Inhibitors**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

vorgelegt von
Markus J. Pausch

2011

**AUS DEM INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE
DIREKTORIN: FR. PROF. DR. D. N. MÄNNEL
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Reinigung und funktionelle Charakterisierung eines
rekombinanten Maus-TNF-Inhibitors**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

vorgelegt von
Markus J. Pausch

2011

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Fr. Prof. Dr. D. N. Maennel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. B. Salzberger
Tag der mündlichen Prüfung:	27. Mai 2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.2 Zytokine und deren Rezeptoren.....	1
1.2.1 Zytokine.....	2
1.2.2 Rezeptoren der Zytokine.....	3
1.3 TNF und seine Rezeptoren.....	4
1.3.1 TNF.....	4
1.3.2 TNF-Rezeptoren.....	5
1.3.3 Klinische und therapeutische Aspekte des TNF / TNFR-Systems.....	7
1.3.3.1 TNF in der Therapie.....	7
1.3.3.2 Anti-TNF in der Therapie.....	8
2 Material.....	11
2.1 Chemikalien.....	11
2.2 Puffer und Lösungen.....	12
2.3 Reagenzien.....	14
2.4 Molekulargewichtsstandards.....	14
2.5 Verbrauchsmaterial und Geräte.....	14
2.6 Zelllinien.....	15
3 Methoden.....	16
3.1 Zellbiologische Methoden.....	16
3.1.1 Bedingungen der Zellkultur.....	16
3.1.2 Zellkulturmedien.....	16
3.1.3 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung.....	16
3.1.4 Kultivieren von adhärent wachsenden Zellkulturen.....	16
3.1.5 Kultivieren von Suspensionszellkulturen.....	16
3.1.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	17
3.1.7 Gewinnen von Überstand aus der Zellkultur.....	17
3.1.7.1 Gewinnen von Überstand aus adhärent wachsenden Zellkulturen.....	17
3.1.7.2 Gewinnen von Überstand aus Suspensionszellkulturen.....	17
3.1.8 Transfektion.....	17
3.1.8.1 Transiente Transfektion von Ag8-Zellen.....	18

3.1.8.2 stabile Transfektion von Ag8-Zellen.....	19
3.1.9 TNF-Zytotoxizitätsassay (TNF-Test am L929-Zellkultursystem)	19
3.2 Proteinchemische Methoden.....	20
3.2.1 Proteinanalyse mittels SDS-PAGE.....	20
3.2.2 Western-Blot-Analyse.....	20
3.2.3 Nachweis und Charakterisierung von Proteinen.....	21
3.2.3.1 Coomassiefärbung von Proteinen in Gelen.....	21
3.2.3.2 Immunfärbungen von Proteinblots.....	21
3.2.4 Reinigung des Zellkulturüberstand.....	22
3.2.4.1 Ammoniumsulfat-Fällung.....	22
3.2.5 Quantitative Proteinbestimmung mittels Protein-G.....	22
3.2.6 Dialyse des Eluats.....	22
3.3 Immunologische Methoden.....	22
3.3.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).....	22
3.3.1.1 Allgemeine ELISA-Methoden.....	23
3.3.1.2 Qualifizierung / Quantifizierung der Bindungsfähigkeit von p75TNFR mittels ELISA.....	23
4 Ergebnisse.....	25
4.1 Fusionsprotein.....	25
4.2 Transfektion.....	25
4.3 Reinigung des Fusionsproteins.....	25
4.4 Western Blotts.....	25
4.4.1 Western Blot ungereinigter Überstand.....	25
4.4.2 Anti-p75.....	26
4.4.3 Anti-Fc-Fragment und Anti-p75.....	27
4.5 Proteinkonzentrationsbestimmung über Essay.....	29
4.6 TNF-Zytotoxizitätsassays (TNF-Kill).....	29
4.7 Immunpräzipitation.....	31
4.8 TNF-ELISA-Bindungstest.....	33
5 Diskussion.....	35
5.1 Biologicals und TNF-Antikörper in der klinischen Anwendung.....	35
5.1.1 Infliximab (Remicade®).....	36
5.1.2 Etanercept (Enbrel®).....	36
5.2 Molekulargewicht des Fusionsproteins.....	37

5.3 Antigenstruktur des Proteins und Erkennung durch Antikörper gegen mTNFRp75 und Fc-IgG.....	37
5.5 Erklärungsversuche für das Fehlen der biologischen Wirksamkeit des Proteins.....	38
5.4.1 Sequenzfehler / Mutation im TNF-Bindungsbereich und potentielle Sequenzierung des Fusionsproteins.....	38
5.4.2 Fehlfaltung des Proteins im Bindebereich.....	38
5.4.3 Interaktion zwischen murinen TNFRp75 und humanem TNF.....	39
5.5 Erklärungsversuche für die stärkere toxische Wirkung des Fusionsproteins im Zytotoxizitätsassay.....	39
6 Zusammenfassung.....	40
7 Literaturverzeichnis.....	41
8 Danksagung.....	54

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Vertebraten ist ein komplexes, ineinander greifendes und redundantes System und dient zur Erhaltung der Individualstruktur. Hierzu werden körperfremde Substanzen, wie z. B. Bakterien, Viren oder Parasiten, abgewehrt und veränderte Körperzellen, wie z.B. maligne entartete Zellen, kontinuierlich eliminiert. An diesen Vorgängen sind die Organe des lymphatischen Systems (Knochenmark und Thymus als primäre lymphatische Organe und Lymphknoten, Milz, darmassoziiertes (GALT) und mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT) als sekundäre lymphatische Organe), sowie Zellen (z.B. Leukozyten), Moleküle und Molekülverbände (Immunglobuline, Lymphokine) beteiligt. Bei den körperfremden Substanzen kann es sich um Moleküle oder Organismen (z.B. Bakterien und Viren) handeln. Zu deren Abwehr stehen mehrere Mechanismen zur Verfügung, welche durch das unspezifische und das adaptive Immunsystem ausgelöst werden.

Das unspezifische Abwehrsystem, auch angeborenes Abwehrsystem genannt, stellt für das Individuum einen Schutz in den ersten Tagen einer Erstinfektion dar, bis das adaptive Immunsystem aktiviert geworden ist. In der Frühphase der Infektion bedient sich das angeborene Immunsystem zum einen des Komplementsystems (im Serum und auf Zelloberflächen vorkommende Proteine, welche, ohne Anwesenheit von Antikörpern, in den Organismus eingedrungene Fremdstoffe, inaktivieren können) und zum anderen der Makrophagen. Aktivierte Makrophagen sind befähigt zur Phagozytose des Fremdstoffes und zur Freisetzung von z.B. Interleukin 1 und 6, welche ihrerseits die Sekretion von akut-Phase-Proteinen (v.a. CRP, α_1 -Antitrypsin, Fibrinogen, Haptoglobin und Coeruloplasmin) in der Leber stimulieren. Die akut-Phase-Proteine können das Komplementsystem aktivieren.

Das adaptive, erworbene Abwehrsystem eliminiert spezifisch Antigene, bzw. Zellen, die diese Antigene tragen. Lymphozyten, welche als T- und B-Lymphozyten vorkommen, werden durch Kontakt mit Antigenen spezifisch aktiviert. T-Lymphozyten aktivieren entweder als T-Helferzellen die B-Lymphozyten oder greifen als zytotoxische T-Zellen den körperfremden Erreger direkt oder mit ihm befallene Zellen an und lysieren diese. B-Lymphozyten werden durch den Antigen-Kontakt und durch Co-Stimulation von T-Helferzellen zur Produktion und Sekretion von spezifischen Plasmaproteinen (Antikörper) angeregt. Diese Proteine binden spezifisch an Antigene und opsonieren sie für phagozytierende Zellen und das Komplementsystem (Aktivierung über klassischen Weg), welche dann die Fremdstoffe aus dem Organismus eliminieren (Löffler, 1997; Junqueira, 1996; Abbas, 1997; Janeway, 1997). Sowohl bei dem angeborenen, wie bei dem erworbenen Immunsystem spielen Zytokine als Botenstoffe des Immunsystems eine wichtige Rolle (Abbas, 1996).

1.2 Zytokine und deren Rezeptoren

Bei dem angeborenen Abwehrsystem findet die Produktion und Sekretion der Zytokine zum größten Teil in den mononukleären Phagozyten statt, weshalb diese Zytokine auch Monokine genannt wurden. Die Zytokine, welche im Rahmen des erworbenen Abwehrsystems auftreten, werden vor allem in den T-Lymphozyten gebildet. Deshalb werden sie auch als Lymphokine bezeichnet (Abbas, 1996).

1.2.1 Zytokine

Bereits in den Jahren von 1950 bis 1970 fanden Untersuchungen über Zytokine statt. Im Zentrum der Forschungen stand die Charakterisierung von bestimmten Proteinen. Man fand z.B. die antivirale Wirkung von Interferon (Lindenmann, 1957; Isaacs, 1960) oder die zu Fieber führenden Pyrogene (Petersdorf, 1975; Kenton King, 1957). Darüber hinaus wurden viele Zytokine gereinigt und neutralisierende Antiseren entwickelt. In den folgenden Jahren fand mittels moderner labortechnischer Verfahren, wie z. B. molekulare Klonierung, eine weitere Aufklärung der Zytokine und ihrer Struktur und Eigenschaften statt. Dennoch ist immer noch nicht zur Gänze geklärt, wie wichtig bestimmte biologische Wirkungen von Zytokinen in vivo sind und welche davon notwendig sind, um ganz bestimmte definierte biologische Reaktionen zu erzeugen. Da seit einigen Jahren Zytokine und deren Antagonisten im Rahmen von klinischen Therapien eingesetzt werden, wird es immer wichtiger, prognostische und krankheitsverlaufsmodulierende Auswirkungen dieser Zytokine / Antagonisten zu kennen. Nur dadurch ist eine gezielte, erfolgreiche und möglichst nebenwirkungsarme Beeinflussung der Immunreaktionen möglich (Abbas, 1996).

Betrachtet man die Zytokine, so kommt man zu dem Schluss, dass sie eine heterogene Gruppe von Proteinen und Glykoproteinen sind, welche eine große Variabilität bezüglich Struktur und Wirkung besitzen. Nichts desto weniger lassen sich vier große Bereiche bezüglich der Wirkung und Funktion von Zytokinen abgrenzen (Abbas, 1996).

- Mediatoren des angeborenen Abwehrsystems
- Regulatoren der Aktivierung, des Wachstums und der Differenzierung von Lymphozyten
- Regulatoren des erworbenen Abwehrsystems
- Regulatoren des Wachstums und der Differenzierung von Leukozyten

Zytokine lassen sich nicht nur im Rahmen von pathologischen Prozessen (vor allem Entzündungen) laborchemisch detektieren, sondern kommen auch unter physiologischen Bedingungen vor. Im Rahmen von physiologischen Prozessen sind Zytokine ebenso an der Regulation von Zellen, deren Wachstum und Differenzierung beteiligt. Hierbei können sie vor allem auf das hämatopoetische System sowohl einen inhibitorischen als auch einen stimulierenden Einfluss haben (Kirchner, 1993). Ebenso wie bei der Wirkung und Funktion, lassen sich bei den Zytokinen, bei Wahrung aller Vielfalt, typische Eigenschaften ausmachen, welche allen zu eigen sind. So findet man folgende gemeinsame Eigenschaften (Abbas, 1996; Janeway, 2002):

- Zytokine regulieren die Entzündungsreaktionen und die Immunantwort.
- Die Sekretion von Zytokinen ist ein kurzer, sich selbstlimitierender Vorgang, bei dem in der Regel keine präformierten Zytokine gespeichert werden.
- Zytokine können von verschiedenen Zelltypen produziert und sezerniert werden.
- Zytokine beeinflussen verschiedene Zelltypen (= Pleiotropismus).
- Zytokine können auf ein und dieselbe Zelle unterschiedliche Wirkungen haben.
- Die Wirkung von Zytokinen ist redundant.
- Zytokine können zur Produktion und Sekretion von anderen Zytokinen beitragen.
- Zu Beginn einer Zytokinwirkung muss eine Bindung an einen spezifischen Rezeptor stattfinden. Für gewöhnlich besteht zwischen Zytokin und spezifischem Rezeptor eine sehr hohe Affinität (Dissoziationskonstanten zwischen 10^{-10} und 10^{-12}), so dass schon geringe Konzentrationen von Zytokinen zu einer biologischen Wirkung führen (Tsujimoto, 1986; Reinemer, 2000).
Dabei kann die Wirkung des Zytokins am Rezeptor

- autokrin (Zielzelle ist die Zytokin sezernierende Zelle selbst),
- parakrin (Zielzelle ist in direkter Umgebung der sezernierenden Zelle) oder
- endokrin (Zielzelle ist eine räumlich weit entfernte Zelle) sein.

1.2.2 Rezeptoren der Zytokine

Zytokine erzielen ihre Effekte, indem sie mit einer sehr hohen Affinität an Rezeptoren binden. Dadurch findet eine Signaltransduktion statt. Das extrazelluläre Signal, in Form des vorhandenen Zytokins als Ligand, wird in ein intrazelluläres Signal umgewandelt, indem der Ligand an den Rezeptor bindet und dieser intrazelluläre Reaktionen in Gang setzt. Zytokinrezeptoren sind Transmembranrezeptoren, was bedeutet, dass das Molekül in den meisten Fällen einen extrazellulären, einen transmembranären und einen intrazellulären Anteil hat. Auf Grund von bestimmten Strukturmotiven lassen sich die Zytokinrezeptoren in fünf unterschiedliche Familien einteilen (Abbas, 2000; Janeway, 2002).

➤ **Ig-Superfamilie:**

Diese Rezeptoren besitzen extrazelluläre Immunglobulindomänen. Zu dieser Gruppe gehören die Interleukin-1-Rezeptoren und die Rezeptoren von M-CSF.

➤ **Familie der Rezeptoren für Zytokine und hämatopoetischen Wachstumsfaktor (Zytokinrezeptor-Typ-I):**

Man findet bei diesen Rezeptoren, bevorzugt kurz vor dem transmembranären Teil, eine konservierter Aminosäuresequenz. Diese strenge Abfolge von fünf Aminosäuren besteht aus Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin (WSXWS), wobei das X durch eine beliebige Aminosäure ersetzt werden kann. Diese Rezeptoren binden Zytokine, die vier α -Helix-Stränge besitzen, wie Interleukin (IL) -2 bis -7, sowie IL-9, -11 bis -13, IL-15 GM-CSF und G-CSF. Der IL-6-Rezeptor weist sowohl eine Ig-Domäne wie eine WSXWS-Sequenz auf.

➤ **Familie der Interferon-Rezeptoren (Zytokinrezeptor-Typ-II):**

Bei diesen Rezeptoren fehlt die Aminosäuresequenz WSXWS, wobei man dennoch Sequenzhomologien findet. Liganden, welche an diese Rezeptoren binden sind allen voran die Interferone. Außerdem Interferon-like-molecules sowie Interleukin -19, -20, -22, -24, -26, -28A, 28-B und 29.

➤ **Familie der TNF-Rezeptoren (Zytokinrezeptor-Typ-III):**

In dieser Familie findet man zwei TNF-Rezeptoren, zum einen den TNF-Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 55 kDa (p55TNFR) und zum anderen den TNF-Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 75kDa (p75TNFR). Das gemeinsame Merkmal sind die konservierten cysteinreichen Extrazellulärdomänen (Paul, 1999). Die bindenden Liganden sind Trimere und führen durch das Binden an den Rezeptor zu einer Trimerisierung der Rezeptoren (Janeway, 2002). Der Rezeptorkomplex führt dann zu einer Induktion von Apoptose oder Genexpression.

➤ **Familie der sieben transmembranen Helices:**

Hierbei findet man eine siebenfache, helikale Struktur, welche sich im Transmembran-Anteil des Rezeptors befindet. Die Rezeptoren sind im Zytoplasma an ein heterotrimeres GTP-bindendes Protein gekoppelt. Diese Art von Rezeptoren findet man bei den Chemokinrezeptoren.

1.3 TNF und seine Rezeptoren

Wie bereits oben erwähnt, findet man zwei TNF-Rezeptoren. Bezüglich der Bezeichnung dieser beiden Rezeptoren besteht zurzeit eine uneinheitliche Nomenklatur. Je nach Autor und Literatur, werden unterschiedliche Bezeichnungen für die Rezeptoren verwendet. Der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) wird auch noch als p55/p60 (mouse/human), CD120a, TNFRSF1A oder, wie im Folgenden verwendet, als p55TNFR bezeichnet. Ebenso verhält es sich bei dem TNF-Rezeptor 2 (TNFR2). Er wird auch noch bezeichnet als p75/p80 (mouse/human), CD120b, TNFRSF1B oder p75TNFR. Im Folgenden wird für diesen Rezeptor letztere Bezeichnung, also p75TNFR, verwendet (Byunguk, 1999).

1.3.1 TNF

Der Tumor-Nekrose-Faktor wurde ursprünglich im Serum von Tieren gefunden, welche mit LPS (=Lipopolysacchariden), einem Bestandteil der Zellwand von gram-negativen Bakterien, behandelt wurden. Bei diesen Tieren führte TNF zu einer Nekrose von Tumoren, was namensgebend war (Carswell, 1975). Schon über 80 Jahre früher wurde ein Zusammenhang zwischen Tumornekrose und bakterieller Infektion konstatiert. Vereinzelt kam es bei Patienten mit einem Sarkom zu einer spontanen Tumornekrose, wenn zusätzlich ein Erysipel auftrat (Coley, 1893). In den folgenden Jahren gelang die Klonierung von TNF (Aggarwal, 1985) und die Identifizierung von TNF als das schon bekannte Kachektin (Beutler, 1985). Kachektin ist ein Protein, welches vor allem im Rahmen von malignen Erkrankungen gebildet wird und zu der oft krankheitstypischen Kachexie, daher auch der Name, führt.

Der Genlocus von TNF befindet sich beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (Chr. 6p) (Newin, 1985; Spies, 1986). Exprimiert wird humanes TNF als Trans-Membran-Protein. Es findet die Translation einer Vorläuferform von 233 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 26 kDa, statt, welche post-translational noch modifiziert wird (Stevenson, 1992; Utsumi, 2001).

Mittels proteolytischer Prozessierung des membranständigen TNF entsteht das freizirkulierende humane-TNF, bestehend aus 157 Aminosäuren und mit einem Molekulargewicht von 17 kDa. Die Prozessierung findet vor allem mittels TACE (=TNF-alpha-Cleavage-Enzyme) / ADAM17 statt, einer Metalloproteinase, bestehend aus 824 Aminosäuren (Moss, 1997; Black, 1997). TNF bildet nach der Expression sofort ein Homotrimer aus (Smith, 1987). Das als Homotrimer systemisch zirkulierende TNF ist nur bei pathologischen Zuständen wie akuten oder chronischen inflammatorischen Erkrankungen detektierbar (Wingfield, 1987). Strukturell zeigt es eine pyramidale Form, deren Rezeptorbindungsstelle sich an der Nahtstelle der drei Monomere der Pyramide befindet (Banner, 1993). Dadurch hat es die Möglichkeit, an drei Rezeptoren gleichzeitig zu binden (Abbas, 1996; Wallach, 1999). Die Wirkung von TNF ist charakterisiert durch eine beeindruckende Dualität. Er führt sowohl zu einer Induktion von Wachstum und Reparatur als auch zu einer, oft tödlich endenden Schädigung des Organismus (Wallach, 1999; Tartaglia, 1993). TNF ist sowohl ein Mediator des angeborenen als auch des erworbenen Abwehrsystems. Er stellt den zentralen Mediator bei der akuten Immunreaktion gegen gram-negative Bakterien dar. Medizinisch bedeutsame gram-negativ Bakterien sind unter anderem Neisserien, Pseudomonas, Vibrio, Helicobacter, Haemophilus, Legionella, Treponemen, Enterobakterien und Borrelien (Hof, 2000). Der immunologisch aktive Teil der gram-negativen Bakterien sind die Lipopolysaccharide (= LPS, auch Endotoxin genannt) und stammen aus der Bakterienzellwand. LPS induziert bei Monozyten und anderen Zellen (z.B. T- / B-Lymphozyten, Granzulozyten, Mastzellen) die Produktion von TNF (Männel, 2000).

LPS in niedrigen Konzentrationen führt zu einer Aktivierung von mononukleären Phagozyten. In höheren Konzentrationen beobachtet man Gewebeschädigungen, Verbrauchskoagulopathie

(= DIC = disseminierte intravasale Koagulopathie) und septische Schockzustände, welche letztendlich sehr oft letal enden. TNF stellt einen der wichtigsten Mediatoren der LPS-induzierten Reaktionen dar. Darüber hinaus spielt TNF eine wichtige Rolle bei der immunologischen Reaktion bei Infektionen mit Pilzen, Protozoen, Bakterien, und Viren. So fand man bei HIV (= human immunodeficiency virus) - Infektionen (Aukrust, 1994; Hober, 1996) und bei HCV (Hepatitis C Virus) - Infektionen (Zylberberg, 1999) im Serum der Patienten eine deutlich erhöhte TNF-Konzentration. Ebenso detektierte man bei Patienten mit einer Parvovirose-B19 erhöhte TNF-Konzentrationen, die Einfluss auf die Ausprägung der Symptome und das Out-come der Infektion hatten (Kerr, 2001; Barasch, 2003). Außerdem spielt TNF bei den akuten und chronischen Arthritiden, welche im Rahmen von Parvovirus-B19-Infektionen auftreten können, eine wichtige Rolle (Fu, 2002). Die mittels TNF induzierte immuno-biologische Reaktion ist abhängig von der Konzentration. Liegt eine niedrige Konzentration (ca. 10^{-9} M) von TNF vor, so wirkt es nur am Ort der Produktion, es steht die para- und autokrine Funktion des Mediators im Vordergrund. Es werden Endothelien angeregt, Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, so dass sie systemisch-zirkulierende Leukozyten binden. Darüber hinaus bedingt TNF bei neutrophilen Granulozyten eine erleichterte Adhäsion an die Endothelzellen. Dadurch findet am Ort der Inflammation eine Akkumulation von Entzündungszellen statt. TNF führt ebenso zu einer Aktivierung von Leukozyten und Phagozyten, was wiederum zu einer Anregung der Produktion von Zytokinen (auch TNF selbst) und Chemokinen führt. Schlussendlich hat TNF eine viro-protective Wirkung, indem es zu einer Steigerung der MHC-I-Expression führt und so die Lyse der Viren erleichtert wird. Ist die TNF-Sekretion auf Grund ausreichend starken Stimuli größer (bei septischen Zuständen bis 10^{-7} M), so führt dies zu einer systemischen Wirkung und es steht die endokrine Funktion im Vordergrund. TNF führt dann, ebenso wie Interleukin-1 als endogenes Pyrogen, zu einem Anstieg der Körpertemperatur und es kommt zu fieberhaften Symptomen (Kluger, 1979). TNF und IL-1 führen am Thermoregulationszentrum im Hypothalamus zu einer Hochregulierung des Sollwertes und einer konsekutiv höheren Syntheseleistung von Prostaglandinen (vor allem Prostaglandin E_2 = PGE_2) (Hellon, 1991; Kluger, 1991). Darüber hinaus bewirkt TNF bei Phagozyten und vaskulären Endothelzellen eine Sekretion von IL-1 und IL-6. Außerdem wird eine Aktivierung des Gerinnungssystems und eine Suppression der Mitoserate des hämatopoetischen Systems bewirkt (Jacobsen, 1995). Besteht eine hohe systemische TNF-Konzentration über eine längere Zeit, so führt dies zu einer katabolen Stoffwechsellage und es kommt zur Kachexie, wobei die TNF-induzierte Appetitlosigkeit im Vordergrund steht (Cerami, 1985).

Kommt es im Rahmen einer bakteriellen Infektion mit gram-negativen Erregern zu einem passageren Anstieg der TNF-Konzentration auf über 10^{-7} M, so führt dies zum septischen Schock des Individuums mit hauptsächlich lebensbedrohlichen hypotonen und hyperdynamen Herz-Kreislaufinsuffizienzen, disseminierten intravasalen Koagulopathien (DIC) und Hypoglykämien. Zentrale Mediatoren bei septischen Zuständen sind TNF und IL-1. Trotz intensivmedizinischer Techniken wie Kreislaufüberwachung, maschineller Beatmung und Nierenersatzverfahren sowie hochwirksamer Breitspektrumantibiotika, konnte die hohe Letalität von bis zu 70 % nicht grundlegend gesenkt werden (Riedemann, 2003; Angus, 2001; Martin, 2003; Epidem. Bulletin Nr. 35, 2003).

1.3.2 TNF-Rezeptoren

Es existieren zwei membranständige TNF-Rezeptoren, bei denen es sich um Typ-II-Membran-Proteine handelt. Anfang der 90er Jahre gelang die Klonierung der Rezeptoren (Loetscher, 1990). Die Bezeichnung der Rezeptoren mit p55TNFR und p75TNFR wurde auf Grund des jeweiligen Molekulargewichts gewählt. Der Rezeptor gliedert sich in einen sehr homologen extrazellulären, einen hydrophoben transmembranären und einen sehr variablen

intrazellulären Teil. Man findet bei beiden im extrazellulären Bereich eine cysteinreiche Domäne, welche für die Rezeptoren typisch ist und es besteht eine ca. 30%ige Sequenzhomologie. Bei beiden Rezeptoren stellt man eine hohe Übereinstimmung bezüglich der Bindungsstellen mit dem Liganden fest. An dem zytoplasmatischen Teil des p55TNFR findet man einen Bereich, der „Todesdomäne“ genannt wird. Diese „Death domain“ kann nach Bindung des Liganden an den extrazellulären Teil eine Kaskade von zellulären Proteasen, so genannte Caspasen, auslösen und damit zum programmierten Zelltod (auch Apoptose genannt) führen (Tartaglia, Ayres, 1993; Wallach, 1999;).

Das zytoplasmatische Ende des p75TNFR besitzt keine „Death domain“, sondern weist einen Rezeptoranteil auf, an dem Liganden binden können, welcher als TNF-receptor associated factors (= TRAFs) bezeichnet werden (Rothe, 1994). Bei den TRAFs hat man bisher 6 Typen gefunden, wobei nur TRAF 1 und TRAF 2 an den p75TNFR binden. TRAF 1 ist ein 45 kDa großes Protein und wird fast ausschließlich in Milz- und Lungengewebe exprimiert. TRAF 2 hingegen ist ein ubiquitär vorkommendes Protein mit einem Molekulargewicht von 56 kDa (Rothe, 1994). Bei TRAF 3 findet man eine Interaktion mit CD 40 und dem Epstein-Barr-transforming-Protein LMP 1, bei TRAF 4 eine Interaktion mit CD 40 und LT- β -Rezeptor und TRAF 6 spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von IL-1 (Darnay, 1997). Die Bindung dieses Liganden an den Rezeptor führt dazu, dass der klassische NF κ B-Pathway aktiviert wird (Wajant, 2003). Die TNF-Rezeptoren sind im Organismus weit verbreitet und kommen in fast allen Geweben vor. Einige Zellen exprimieren beide Rezeptorformen, jedoch scheint p55TNFR deutlich häufiger exprimiert zu werden und ist wesentlich weniger auf bestimmte Zelltypen beschränkt, als p75TNFR. Dieser ist vor allem auf immumodulierende Zellen beschränkt und erfährt eine stärkere regulierende Kontrolle bezüglich seiner Expression (Smith, 1990; Dembic, 1990; Ware, 1996). Eine große Zahl von Agenzien sind in der Lage, die Regulation der TNF-Rezeptoren-Expression zu regulieren. IFN- γ führt bei vielen Zelltypen zu einer Hochregulation der TNF-Rezeptoren, wodurch die Anzahl der Rezeptoren ansteigt. Dies scheint auch ein Grund für die beobachteten synergistischen Effekte von TNF und IFN- γ zu sein (Tsujimoto, Yip 1986; Aggarwal, Eessalu 1985). Ruhende T-Lymphozyten exprimieren keine TNF-Rezeptoren, können aber mittels IL-2 dazu stimuliert werden (Owen-Schaub, 1989). Ebenso stellen LPS und hypoxische Zustände adäquate Stimuli dar, um eine Hochregulation von p75TNFR zu induzieren (Seitz, 1998).

Zu den Agenzien, welche zu einer Herunter-Regulation, und damit zu einer Reduktion der Rezeptoren-Anzahl führen, zählen IL-1, IL-6, TGF- β , Retinoide und TNF selbst (Aderka, 1996).

Im Rahmen von immunologischen Abwehrreaktion gegen potentielle Krankheitserreger scheint p55TNFR eine zentrale Rolle einzunehmen. Unter experimentellen Bedingungen zeigten Mäuse, welche nicht in der Lage waren p55TNFR zu exprimieren, keine Reaktion auf LPS-Applikation. Im Vergleich dazu erlitten die Wildtyp-Mäuse einen septischen Schock nach LPS-Applikation. Des weiteren zeigten die defizienten Mäuse eine deutlich höhere Anfälligkeit für die Infektion mit anderen Erregern, wie z.B. *Listeria monocytogenes* (Pfeffer, 1993; Rothe, 1993). Dies bestätigt die Annahme, dass p55TNFR im Rahmen von Abwehrvorgängen gegen Erreger eine zentrale Rolle spielt.

Nimmt man p75TNFR-defiziente Mäuse und vergleicht diese mit dem Wildtyp, so lassen sich keine großen Unterschiede konstatieren. Lediglich ein reduziertes Ansprechen auf TNF und eine geringer Anfälligkeit für Hautnekrose ist auszumachen (Erickson, 1994). Dieselbe Metalloprotease (TACE / ADAM17), welche bei der Prozessierung des membranständigen TNF zur proteolytischen Freisetzung des freien TNF führt, kann zu einer Abspaltung des TNF-Rezeptors von der Zellmembran führen. Die so löslich gewordenen TNF-Rezeptoren können TNF abfangen und so dessen Wirkung neutralisieren (Mohler, 1993). Die proteolytische Freisetzung von p75TNFR kann, bei Makrophagen und T-Zellen mittels TNF und LPS induziert werden (Crowe, 1993; Lantz, 1994).

Das es für den gesamten Organismus und für die einzelne Zelle wichtig ist, den extrazellulären Anteil der TNF-Rezeptoren abzuspalten, wird durch das „Tumor-Nekrosis-Factor Receptor-Associated Periodic Syndrom“ deutlich, welches bei einem Gendefekt auftritt. Auf Grund des Gendefektes kommt es zu einer Mutation im p55TNFR, so dass er nicht mehr abgespalten werden kann. Dadurch erleiden die Patienten rezidivierende febrile und inflammatorische Zustände (Aksentijevich, 2001). Die löslichen extrazellulären Anteile von TNF-Rezeptoren sind sowohl bei gesunden wie auch bei an diversen Krankheiten leidenden Individuen in Serum und Urin zu detektieren. Nähere Ausführungen dazu unter 1.3.3. Durch alternatives Spleißen gibt es neben dem löslichen p75TNFR noch andere Isoformen, deren biologische Relevanz nicht geklärt ist.

1.3.3 Klinische und therapeutische Aspekte des TNF / TNFR-Systems

Bei einer sehr großen Anzahl von Erkrankungen wurde im Serum, in der Synovialflüssigkeit und im Urin von Patienten eine erhöhte Konzentration von sowohl TNF als auch seiner löslichen Rezeptoren, p55TNFR und p75TNFR, gemessen (Bartholdy, 1999). Die beiden löslichen Rezeptoren können bereits in geringer Menge im Gesunden in Serum und Urin detektiert werden. In einer wesentlich höheren Konzentration findet man sie dann bei Patienten, welche an chronischer Polyarthrit (Cope, 1992), septischen Zuständen (Schröder, 1995) oder systemischen Lupus erythematoses (Aderka, 1993) litten. Außerdem konnte bei Patienten mit malignen Neoplasien eine erhöhte TNFR-Konzentration gemessen werden (Aderka, 1991). TNF findet man bei den unterschiedlichsten Infektionskrankheiten, wie HIV-Infektionen und AIDS, bei Meningitiden bakterieller Genese und bei septischen Zuständen im Serum und im Urin. Des Weiteren gehen einige Autoimmunerkrankungen wie chronische Polyarthrit (Feldmann, 1996), Encephalomyelitis disseminata, Morbus Crohn (Noguchi, 1998), Kawasaki-Syndrom und Abstoßungsreaktionen im Rahmen von Transplantationen mit einer erhöhten TNF-Konzentrationen einher (Eigler, 1997). Aber auch nicht-entzündliche Erkrankungen, wie Myocardinfarkte, Herzinsuffizienzen im NYHA-Stadium III und IV (Bozkurt, 2001; Deswal, 1999) und akutes Leber- / Lungenversagen führen zu einem TNF-Anstieg (Eigler, 1997). TNF stellt eine zentrale Steuergröße für lokale und systemische Entzündungsreaktionen dar. Durch neue Erkenntnisse bezüglich der Pathophysiologie von entzündlichen Erkrankungen, der Rolle von TNF und seinen beiden Rezeptoren wurde in den letzten Jahren der Weg für eine Reihe von potentiellen therapeutischen Ansätzen geebnet, von denen heute bereits einige etabliert sind. Dabei entstehen bezüglich TNF zwei große therapeutische Bereiche: Zum einen kann TNF als Therapeutikum im Rahmen von Tumorerkrankungen eingesetzt werden. Zum andern können TNF-Inhibitoren als Immunbiologika („Biologicals“) vor allem bei autoimmun-bedingten Erkrankungen eingesetzt werden.

1.3.3.1 TNF in der Therapie

TNF als Therapeutikum stellt zurzeit noch einen innovativen Therapieansatz in der Tumorthherapie dar und ist immer noch Gegenstand von klinischen Prüfungen. Durch die bekannte und beschriebene Fähigkeit von TNF zur Induktion von apoptotischen Vorgängen und der Interferenz mit der Angiogenese, Zelladhäsion und immunologischer Infiltration des Tumors mit Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, stellt er potentiell ein potentes therapeutisches Instrument dar. Im Tiermodell konnte eine direkte Nekroseaktivität von gereinigtem TNF gegen Tumoren bei in-vivo-Experimenten (Männel, 1986) sowie ein Hemmen des Tumorwachstums bei Mäusen gezeigt werden (Moriya, 1984). Eingesetzt im Rahmen von klinischen Studien wird momentan Tasonerin (Beromun®), ein rekombinanter Tumornekrosefaktor α -1a, bei non-resektablen Weichteilsarkomen in

Kombination mit Melphalan (Aleran®), einem Zytostatikum. Die Applikation findet als sog. isolierte Extremitätenperfusion (isolated limb perfusion; ILP) in sehr hohen Dosen (ca. 200-fache höhere Konzentrationen als im Körperkreislauf) unter Blutleere statt. Therapeutisches Ziel ist die Vermeidung oder zeitlich hinausgezogene Amputation (Eggermont, 1997; Gérain, 1997; Gunterberg, 1997). Eine systemische Applikation von TNF ist momentan noch nicht möglich, da dies durch die starken Nebenwirkungen verhindert wird. Als Nebenwirkungen von TNF wurden folgende beschrieben: Übelkeit, Erbrechen, Fieber, Diarrhöen, Appetitlosigkeit, orthostatische Dysregulation, Leberschäden sowie Thrombozytopenien.

1.3.3.2 Anti-TNF in der Therapie

Zur Therapie mit TNF-Inhibitoren stehen zwei Angriffspunkte zur Verfügung: Zum einen besteht die Möglichkeit, bereits die „Bildung“ von TNF zu verhindern. Hierbei kann die proteolytische Abspaltung von TNF durch die Metalloprotease TACE / ADAM 17 verhindert werden, indem man dieses Protein blockiert. Somit würde kein freies TNF entstehen. Derartige Enzym-Inhibitoren sind derzeit noch Gegenstand von molekularbiologischen Untersuchungen.

Die andere Möglichkeit und schon wesentlich etabliertere Methode ist das bereits abgespaltene lösliche TNF zu binden und so zu neutralisieren (Rankin, 1995). Derartig wirkende Substanzen werden als Immunbiologika oder Biologicals bezeichnet und finden vor allem bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, Psoriasis-Arthritis, Morbus Bechterew und juveniler idiopathischer Arthritis ihre Anwendung.

- Etanercept:

Eines der ersten Biologics, welches in diesem Rahmen in den Entzündungsprozess eingreift, ist der rekombinant hergestellte lösliche TNF- α -Rezeptor Etanercept (Enbrel®). Am 15.02.2001 wurde es für die Therapie der rheumatoiden Arthritis von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA (Food and Drug Administration) zugelassen. Etanercept ist ein dimeres Fusionsprotein aus dem extrazellulären liganden-bindenden Anteil des p75TNFR und dem Fc-Anteil von humanem IgG (Kalden, 2002). Etanercept, bestehend aus 934 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa, bindet mit einer sehr hohen Affinität spezifisch an zirkulierendes TNF, wodurch dieses in seiner biologischen Aktivität gehemmt wird und dadurch die Initiierung, bzw. die Verstärkung der Entzündungsreaktion unterbleibt. Etanercept bindet spezifisch an TNF und verhindert so, dass TNF an den membranständigen Rezeptor bindet und seine biologische Wirkung vermittelt (Kalden, 2002). In klinischen Studien wurde der Wirkstoff sowohl als Monotherapie (Moreland, 1999) als auch in Kombination mit MTX eingesetzt.

Die rheumatoide Arthritis stellt eine Hauptindikation dar. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis werden erhöhte Konzentrationen von TNF und andern Zytokinen, z.B. Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) (Feldmann, 2001; Moreland, 2004), im Serum und in der Synovialflüssigkeit, wo es von synovialen Makrophagen und Lymphozyten produziert wird, gefunden (Feldmann, 1996; Brennan, 1992; Feldmann, 2001). Besonders die erhöhte TNF-Konzentration führt zu Synovitis und zur Gelenkdestruktion. Darüber hinaus induziert TNF die Expression und Sekretion von weiteren Zytokinen, allen voran IL-1 und IL-6 (Feldmann, 2001). Somit kommt TNF im Rahmen der Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis eine zentrale Rolle zu (Brennan, 1992).

In einer dosisabhängigen, multizentrischen, doppelverblindeten Phase-II-Studie konnte in der Verumgruppe mit Etanercept bei Patienten mit therapierefraktärer rheumatoider Arthritis eine signifikante, dosisabhängige Verbesserung des klinischen Zustandes der Patienten und ein signifikantes Absinken der Akut-Phase-Proteine (z.B. CRP) gezeigt werden (Moreland, 1997). Ebenso konnte in anderen Studien die Sicherheit, die gute Verträglichkeit und der

große klinische Benefit (signifikante Reduktion der Aktivität der rheumatoiden Arthritis) von Etanercept im Rahmen der Behandlung der rheumatoiden Arthritis gezeigt werden (Weinblatt, 1999; Moreland, 1999, Kalden, 2002). Besonders bei der frühen rheumatoiden Arthritis zeigte sich unter anderem in der TEMPO-Studie (Trial of Etanercept and Methotrexat with Radiographic Patient Outcome) die Therapie mit Etanercept in Kombination mit einem weiteren Immunsuppressivum, dem Folsäureantagonisten Methotrexat, als sehr sicher und effektiv (Bathon, 2000; Genovese, 2002; Zink, 2005).

Eine weitere Indikation für die Anwendung von Etanercept stellt die Psoriasis-Arthritis dar. Auch hier zeigte sich in mehreren Studien eine signifikante Verbesserung der klinischen Symptome unter Etanercept-Medikation (Mease, 2000).

In der juvenilen idiopathischen Arthritis findet Etanercept eine weitere wichtige Indikation. Im Rahmen des Deutschen Etanercept-Registers für die Behandlung von Kindern mit juveniler idiopathischer Arthritis zeigte sich bei guter Verträglichkeit eine signifikante Beschwerdeverbesserung der Patienten unter Etanercept (Horneff, 2004). Darüber hinaus zeigte sich auch in anderen Studien ein gutes Ansprechen der Symptome unter Etanerceptmedikation (Lovell, 2000; Tynjälä, 2006).

Weitere Indikationen, bei denen Etanercept zum Einsatz kommt, sind der Morbus Bechterew (Davis, 2003; Davis 2002; Calin, 2004).

Des Weiteren wurde eine Wirksamkeit von Etanercept bei Patienten mit Herzinsuffizienz (Bozkurt, 2001) und bei Patienten mit akuten Ischiasbeschwerden (Genevay, 2004) festgestellt.

- Infliximab:

Infliximab (Remicade®) ist ein rekombinant hergestellter chimärer (Maus / Mensch) Antikörper, welcher gegen TNF gerichtet ist. Infliximab ist unter anderem indiziert bei mäßiger bis schwerer rheumatoider Arthritis, welche durch andere DMARD's (Disease modifying anti-rheumatic drugs) nicht therapiert werden können. Infliximab hemmt die biologische Aktivität von TNF, durch die Neutralisierung von freiem und membranständigem TNF und hemmt so die Sekretion von anderen Zytokinen, allen voran von Interleukin-15 (Feldmann, 2001; Kageyama, 2006). In vielen Fällen konnte unter Kombinationstherapie von MTX und Infliximab erreicht werden, dass die radiologischen Anzeichen der rheumatoiden Arthritis stagnierten (Lorenz, 2002). Ebenso konnte in mehreren Studien eine signifikante Schmerzreduktion, sowie eine Verminderung der Morgensteifigkeit der Gelenke und Verbesserung der Lebensqualität unter Infliximabmedikation gezeigt werden (Elliott, 1993; Elliott, 1994; Maini, 1998; Maini, 1999; Lipsky, 2000; Taylor, 2003). Parallel zeigte sich bei Patienten mit rheumatoider Arthritis unter Infliximab eine Verbesserung des Knochenstoffwechsels mit einem Anstieg der Knochenmasse (Vis, 2006; Miheller, 2006).

In der IMPACT-Studie (Infliximab Multinational Psoriatic Arthritis Controlled trial) konnte die Wirkung von Infliximab bei schweren Formen der Psoriasisarthritis, welche auf andere Basismedikamente nicht mehr angesprochen haben, gezeigt werden (Antoni, 2005).

Bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), wie M. Crohn und Colitis ulcerosa, zeigte sich bei Infliximabgabe eine deutliche klinische Verbesserung, wobei bei anderen Therapie, wie Etanercept, sich die Effektivität nicht zeigte (Brown, 2005; Korzenik, 2004). Ebenso wie bei Etanercept wurde auch bei Infliximab eine Symptombesserung bei akuten Ischialgien beobachtet (Karppinen, 2003). Daneben scheint Infliximab noch bei mehreren Erkrankungen einen positiven Effekt zu haben, so wurde bei Patienten mit einer langjährigen atopischen Dermatitis durch Infliximab eine Verbesserung der Symptome erzielt (Cassano, 2006). Ebenso wurde bei Patienten mit COPD (chronisch obstruktiver Lungenerkrankung) ein deutlicher Nutzen der Infliximabtherapie festgestellt (Antoni, 2006).

- Adalimumab:

Adalimumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1. Es findet seinen Einsatz bei rheumatoiden Arthritis (Finckh, 2005), aber auch bei schweren Formen des Morbus Crohn (Hanauer, 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich mit den neuen Biologics eine neue Medikamentengruppe aufgetan hat. Diese erzielten bereits sehr viele Erfolge, besonders im Bereich der Autoimmunerkrankungen. Weitere Untersuchungen und Studien werden wohl auch in Zukunft noch neue Indikationsgebiete aufzeigen.

2 Material

2.1 Chemikalien

2`2-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonsäure(6))(ABTS)	Boehringer Mannheim
ABTS Substrat Puffer	Boehringer Mannheim
Agarose, electrophoresis grade	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid-Bisacrylamid Lösung	Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA)	Boehringer Mannheim
Biotinyl-ε-Aminocaprinsäure-N-Hydroxysuccinimidester	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform	Fluka, Bucha, Schweiz
Coomassie Brilliant Blue R 250	Fluka, Bucha, Schweiz
Dextransulfat (DSS, MG: 36000 – 50000)	ICN Biochemicals, Ohio, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
G 418 (Geneticin)	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	ICN, Meckenheim
Giemsa-Staining Modified	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
IMDM Medium	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
N,N-Dimethylformamid	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Phorbol mystrate acetate (PMA)	Sigma Aldrich, Steinheim
RPMI 1640-Pulvermedium	Sigma Aldrich, Steinheim
SIGMA 104	Sigma Aldrich, Steinheim
TEMED	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA-Lösung	Tecomara, Fernwald
Tween 20	Fluka, Bucha, Schweiz

Tabelle 2.1: Chemikalien und Reagenzien

2.2 Puffer und Lösungen

Beschichtungspuffer für ELISA	50 mM NaHCO ₃ pH 9,2
Bindungspuffer nativ für Proteinreinigung	500 mM NaCl 20 mM Na-Phosphat pH 7,8
Blockierlösung für ELISA	10% Magermilchpulver in PBS
Coomassie-Blau-Lösung	0,25% Coomassie blue R250 in 45% Methanol 10% Essigsäure 45% H ₂ O
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol 10% Essigsäure 50% H ₂ O
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O
Imidazol-Elutionspuffer	500 mM Imidazol in Waschpuffer nativ pH 6,0 für Proteinreinigung
Laemmli-Elektrodenpuffer (5x)	40 mM Tris Base 0,95 M Glycin
PBS	150 mM NaCl 8 mM K ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,3
0,1% PBS-T	0,1% Tween in PBS
Sammelgel-Trispuffer	0,5 Tris-HCl pH 6,8
SDS-Probenpuffer (2x)	20% Glycerin 1,25 Tris-HCl (ph 6,8) 4% SDS 0,02% Bromphenolblau 10% β-Mercaptoethanol

TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,3
TBE-Puffer	89 mM Tris-HCl 89 mM H ₂ BO ₃ 2 mM EDTA pH 8,0
Transferpuffer A – Western Blot	0,3 M Tris Base in 20% Methanol 80% dem. Wasser pH 10,4
Transferpuffer B – Western Blot	25 mM Tris Base in 20% Methanol 80% dem. Wasser pH 10,4
Transferpuffer C – Western Blot	4 mM ε-Amino-n-Caprinsäure in 20% Methanol 80% dem. Wasser pH 7,6
Trenngel-Trispuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
0,5% Triton X-100 Lösung	0,5% Triton X-100 in dem. Wasser
Trypanblau-Lösung	0,15% Trypanblau
Waschpuffer nativ für Proteinreinigung	150 mM NaCl 500 mM NaCl 20 mM Na-Phosphat pH 6,0

Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen

2.3 Reagenzien

Anti-Human IgG1, Fc Fragment Specific, HP6069 (mouse) Biotin Conjugate	EMD Biosciences, San Diego, Kalifornien, USA
Anti-Maus-TNF (V1q, Ratten IgG)	Echtenacher, 1990
Anti-Ratten-IgG-POX	Sigma Aldrich, Steinheim
Streptavidin-POX	Dianova, Hamburg
ECL Western Blot Detection Kit	Energene, Regensburg

Tabelle 2.3: Antikörper und Enzyme

2.4 Molekulargewichtsstandards

SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Broad Range	BioRad, München
Full Range Rainbow recombinant protein molecular weight markers	Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK

Tabelle 2.4: Molekulargewichtsstandards

2.5 Verbrauchsmaterial und Geräte

Begasungsbrutschrank – Cell Safe	Integra Biosciences, Baar, Schweiz
Eppendorfcups (1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Plastik-Pistille	Eppendorf, Hamburg
ELISA Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Gelelektrophoreseapparaturen	BioRad, München
Gewebekulturschalen	Becton-Dickinson, Heidelberg
Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Kryo-Röhrchen	Nunc, Naperville
Laminair Flow HB 2448 – Sterilbank	Heraeus, Hanau
Mikroskop	Olympus, Hamburg
Mikrospin S – 200HR Säulen	Amersham, Braunschweig
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen

Nitrocellulosemembran	Osmonics, Minnetonka, USA
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm Biomax	Kodak, Rochester
Spannungsgerät: Biorad 200/2,0 Constant Voltage	BioRad, München
Waggen:	
Satorius R 160P	Satorius, Göttingen
Satorius L2200S	Satorius, Göttingen
Whatman Filterpapier	Laborcenter, Nürnberg
Zeiss Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Zellkulturflaschen (70, 250, 750 ml)	Falcon, Heidelberg
Zentrifugen:	
Beckmann J2-21 M/E Zentrifuge	
Beckmann L-70 Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Tischzentrifuge	Beckmann, München
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Eppendorf, Hamburg
Zellsieb – Cellstrainer	Falcon, Heidelberg
	Falcon, Heidelberg

Tabelle 2.5: Verbrauchsmaterial und Geräte

2.6 Zelllinien

Ag8-Zellen (Ratten-Myelom-Zelllinie)
RAW 264.7 murine Monozyten-Makrophagen-Zelllinie
L929-Zellen (murine Fibroblastenzelllinie)

Tabelle 2.6: Zelllinien

Alle nicht erwähnten Chemikalien / Reagenzien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen und hatten den Reinheitsgrad p. a..

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Bedingungen der Zellkultur

Zur Verhinderung einer Kontamination der Zellen fanden sämtliche zellbiologischen Arbeiten in einer Sterilbank statt. Die Kultivierung der Zelllinien fand in Zellkulturflaschen mit dem jeweils angegebenen Medium in einem Begasungsbrutschrank (Cell Saver) unter folgenden Bedingungen statt:

Temperatur: 37°C, **CO₂-Gehalt:** 5%, **Luftfeuchtigkeit:** 95%.

3.1.2 Zellkulturmedien

Die Kultivierung sämtlicher Zelllinien fand unter Verwendung folgenden Kulturmediums statt:

RPMI 1640, 10% FCS, (Gentamycin (50 µg / ml)).

3.1.3 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität der Zellen fand der Trypanblau-Ausschlusstest Anwendung. Hierzu wurde die Zellsuspension mit einer Trypanblaulösung verdünnt, in eine Neubauer-Zählkammer übertragen und die lebenden, nicht färbenden Zellen, innerhalb eines Großquadrates (entspricht 16 Kleinquadraten) mikroskopisch ausgezählt. Die Konzentration der vitalen Zellen wurde unter zur Hilfe nahme folgender Formel berechnet:

Zellzahl in 16 Kleinquadraten x Verdünnungsfaktor = Zellzahl x 10⁴ / ml.

3.1.4 Kultur adhärent wachsender Zellen

Die Zellkultur wurde alle drei bis vier Tage geteilt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, bzw. abgeerntet und die Zellen zweimal mit ca. 10 ml PBS gespült. Anschließend wurde in die Zellkulturflasche ca. 2 ml Trypsinlösung geben und das Gefäß 15 – 30 mal langsam geschwenkt. Die Trypsinlösung wurde wieder abgesaugt und nach ca. 2 Minuten Wartezeit mikroskopisch kontrolliert, ob die Zellen durch die Trypsinlösung kugelig und frei beweglich geworden sind. Die Zellen wurden nun in ca. 5 – 10 ml Medium resuspendiert und die Zellsuspension im Verhältnis 1:5 verdünnt.

3.1.5 Kultur von Suspensionszellen

Die Suspensionszellen wurden ebenso alle drei bis vier Tage verdünnt. Hierzu wurde das Medium mit den Zellen in sterile Falconröhrchen übertragen und bei 1000 bis 1200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, bzw. abgeerntet und das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert. Abschließend wurden die Zellsuspension im Verhältnis 1:5 verdünnt.

3.1.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren:

Bei einer dauerhaften Lagerung der Zellen, wurden diese geerntet, bevor sich die Konfluenz einstellte. Die Zellen wurden bei 1200 rpm in der Zentrifuge pelletiert und in eiskaltem Einfriermedium (50% FCS; 40% RPMI; 10% Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Die Dichte der Zellen sollte $1 - 3 \times 10^6$ Zellen / ml betragen. Die so entstandene Zellsuspension wurde zu je 1,8 ml in Kryoröhrchen überführt und für mindestens 24 Stunden bei -80°C tiefgefroren. Bei einer Aufbewahrungsdauer von nicht länger als 6 Monate können die Zellen bei -80°C gelagert werden (Patel, 1987). Lagerungszeiten von mehr als 6 Monaten erfordern eine Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff, in welchen die Zellen anschließend überführt wurden.

Auftauen:

Zur erneuten Kultivierung tiefgefrorener Zellen, wurden diese bei 37°C zügig aufgetaut und anschließend umgehend in 20 ml warmes Kulturmedium aufgenommen. Um die Eliminierung des toxisch wirkenden DMSO zu gewährleisten, wurden die Zellen für 8 Min. bei 4°C und 1200 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 20 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.1.7 Gewinnen von Überstand aus der Zellkultur

3.1.7.1 Gewinnen von Überstand aus adhärent wachsenden Zellkulturen

Der Überstand wurde geerntet, in eine saubere verschließbare Flasche pipettiert und bei 4°C im Dunklen gelagert. Die zurückbleibenden Zellen wurden wie oben genannt weiter kultiviert oder eingefroren.

3.1.7.2 Gewinnen von Überstand aus Suspensionszellkulturen

Das Medium mit den Zellen wurde in sterile Falconröhrchen pipettiert und bei 1.000rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde geerntet, in eine saubere verschließbare Flasche gegeben und bei 4°C gelagert. Das Zellpellet wurde wie oben erwähnt weiter kultiviert oder eingefroren.

3.1.8 Transfektion

Bei der Transfektion handelt es sich um ein Verfahren zum Einbringen von zellfremder DNA oder RNA in eine Zielzelle durch physikalische und chemische Methoden. Damit repräsentiert die Transfektion ein wichtiges Instrument zur Untersuchung, bzw. zur Kontrollierung der Expression eines Genes. Die Ziele einer durchgeführten Transfektion können vielfältig sein. Zum einen können die Gene, welche transfiziert worden sind, biochemisch charakterisiert werden. Zum anderen können die Folgen und Effekte von Genmutationen genauso bestimmt werden wie die Auswirkungen von Überexpressionen von Genen auf das jeweilige Zellwachstum. Letztendlich kann die Transfektion verwendet werden, um ein bestimmtes rekombinantes Protein für die Reinigung herzustellen.

Grundsätzlich werden zwei Arten von Transfektion unterschieden. Die transiente Transfektion und die stabile Transfektion.

Bei der transienten Transfektion werden die Gene nur kurzfristig in die Zelle eingebracht. Es findet bei den Genen auch nur für eine kurze Zeit eine Expression statt. Außerdem werden sie nicht in die chromosomale DNA der Zelle eingebaut. Bereits nach einigen Mitosen sind die

eingebrachten Gene verloren gegangen und werden nicht mehr exprimiert. Vorteile der transienten Transfektion ist die hohe Transfektionsrate, welche erreicht wird (bis zu 80%), das relativ kurze Procedere (ein bis drei Tage) und die Tatsache, dass relativ wenige Zellen und wenig DNA erforderlich ist. Einen Nachteil stellt die kurze Etablierung gut charakterisierter Klone da, sowie, dass für wiederholte Experimente ein erhöhter Aufwand und eine etwaige erhöhte Variabilität in Kauf genommen werden muss.

Die zweite Form der Transfektion wird durch die stabile Transfektion dargestellt. Sie kann nur mit linearisierten DNA-Vektoren durchgeführt werden, da eine Integration der transfizierten DNA in das Genom der Zelle stattfinden muss. Es kommt damit zur Etablierung von Zellklonen mit dauerhafter Integration des DNA-Vektors. Eine Co-Transfektion ist oft nötig, da sonst keine stabil-transfizierte homogene Zellpopulation erreicht werden kann. Zur Co-Transfektion wird ein selektionierbares Marker-Gen, meist ein Antibiotika-Resistenz-Gen (im vorliegenden Fall wurde als Selektionsmarker Hygromycin verwendet) verwendet. Die Wahrscheinlichkeit ist sehr hoch, dass sowohl der Selektionsmarker wie auch die zu transfizierende DNA (sie wird im Verhältnis 1:10 eingesetzt) in dieselbe Zelle aufgenommen werden. Nachdem das jeweilige Antibiotikum (Hygromycin) zugegeben worden ist, sterben alle Zellen ab, außer jene, welche das Antibiotika-Resistenz-Gen und damit wahrscheinlich auch die DNA stabil in ihr Genom aufgenommen haben. Vorteil dieser Form der Transfektion ist die Etablierung von unbegrenzt verwendbaren und gut charakterisierten Klonen mit konstanter und gleich bleibender Expression. Als Nachteil zeigt sich ein sehr aufwendiges und langes Procedere, eine Integration des DNA-Vektors an meist zufälliger Lokalisation sowie ein großer Bedarf an Zellen und DNA.

Zur Einschleusung von DNA in die Zelle haben sich verschiedene Methoden etabliert. Die älteste und kaum noch angewandte Technik ist die Di-ethyl-amino-ethyl-Dextran-Technik (DEAE-Dextran-Technik). Die Kalziumphosphat-Kopräzipitation zählt ebenfalls zu den ältesten Techniken und findet auch heute noch vielfach ihre Anwendung. Eine neuere Technik ist die Transfektion mittels Elektroporation. Hierbei wird die Permeabilisierung durch Elektroschocks erreicht. Ein großer Vorteil dieser Technik ist das kurze Procedere. Weitere zur Anwendung kommende Techniken sind die Mikroinjektion, hierbei wird mittels einer Mikrokapillare die DNA-Lösung direkt in den Zellkern injiziert, und die virale Transfektion, bei der ein speziell verändertes Virus als Vektor benutzt, der die DNA in die Zelle schleust.

Letztendlich gibt es noch die liposomenvermittelte Transfektion. Die Permeabilisierung wird dabei durch DNA-haltige Liposomen erreicht. Die negativ geladenen DNA-Moleküle binden durch elektrostatische Wechselwirkungen an die positiv geladenen Lipide und bilden einen sogenannten DNA-Lipid-Komplex. Dieser DNA-Lipid-Komplex ist ähnlich wie die Zellmembran aufgebaut und verschmilzt mit dieser. Somit kommt die DNA in das Zellstroma und letztendlich in den Kern, wo sie exprimiert wird. Diese Technik ist sowohl bei der stabilen, wie bei der transienten Transfektion möglich und zeigt als Vorteil ein breites Spektrum an Zielzellen und eine relativ geringe Anzahl von Zellen und DNA.

Im Vorliegenden wurde die liposomenvermittelte Transfektionstechnik nach LIPOFECTAMINE™ durchgeführt.

3.1.8.1 transiente Transfektion vom Ag8-Zellen

LIPOFECTAMINE™ wurde für die Transfektion der Ag8-Zellen verwendet. Am ersten Tag wurden in einer 6-well-Zellkulturplatte (Ø 35 mm) 5×10^5 Ag8-Zellen pro well ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 80% hatten. Am nächsten Tag wurden die Plasmide in einer Konzentration von 30 µg / ml in serumfreiem Medium angesetzt. Ebenso wurde das Liposomengemisch (LIPOFECTAMINE™) in einer Konzentration von 10 µl / ml in serumfreiem Medium angesetzt. Äquivalente Mengen der Liposomenlösung und der Plasmidlösung wurden

gemischt und für 45 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. In dieser Zeit fand die Ausbildung von Mycellen um die DNA statt. Anschließend wurde die Lösung mit der vierfachen Menge serumfreien Mediums verdünnt. Je 1 ml dieser Lösung wurde nun auf die zuvor zweimal mit serumfreiem Medium gewaschenen Zellen gegeben und für sechs Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurde das Transfektionsgemisch wieder entfernt, die Zellen erneut zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und komplettes Medium hinzu gegeben. Am dritten Tag konnte eine Expression des eingebrachten Genes gerechnet werden.

3.1.8.2 stabile Transfektion von Ag8-Zellen

Am ersten Tag wurden 5×10^5 Zellen je Kultur in 6-well-Platte ausgebracht und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Plasmide (Konzentration: $30 \mu\text{g} / \text{ml}$) und das Liposomengemisch (LIPOFECTAMINETM) (Konzentration: $10 \mu\text{l} / \text{ml}$) getrennt in serumfreiem Medium ohne Antibiotika angesetzt. Gleiche Mengen von Plasmid- und Liposomenlösung wurden gemischt, für 45 Minuten inkubiert und anschließend mit der vierfachen Menge an serumfreiem Medium aufgefüllt. Die zweimalig gewaschenen Zellen in der Zellkulturplatte (Waschlösung: serumfreies Medium) wurde pro Kultur mit 1 ml der Reagenzlösung versetzt. Nach einer Inkubation von 6 Stunden im Brutschrank wurde die Lösung wieder entfernt, durch komplettes Medium ohne Hygromycin ersetzt und für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellkulturen wurden am dritten Tag in Selektionsmedium, welches neben FCS auch $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ Hygromycin enthält, umgebettet. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert, in dem Selektionsmedium resuspendiert und erneut auf der Platte ausgesät. Nach einer Inkubation von 72 Stunden waren alle nicht transfizierten Zellen abgestorben und Klone von den Transfektanten zu beobachten. Nachdem pro well ca. 200 Zellen erreicht waren, wurden sie zunächst in Zellkulturplatten und später in Zellkulturflaschen kultiviert.

3.1.9 TNF-Zytotoxizitätsassay

Zur Bestimmung des TNF-induzierten Zelltodes von L929-Zellen wurde das Eluat, welches bei der Reinigung über Protein G – Sepharose gewonnen wurde, erneut dialysiert. Dazu wurde das Eluat in einen Dialyseschlauch gegeben und über Nacht bei 4°C im Kühlraum gegen RPMI dialysiert. Das so gewonnene Eluat wurde zur Kontrolle der biologischen Aktivität im TNF-Zytotoxizitätsassay eingesetzt. Hierzu wurden zuvor kultivierte L929-Zellen in der Kulturflasche mit PBS gewaschen, mit Trypsinlösung behandelt, um die interzellulären Adhärenzen zu lösen und das Trypsin wieder abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend mittels 5 ml Zellkulturmedium suspendiert und in ein steriles Falcon-Tube pipettiert. Unter Zuhilfenahme der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden $10 \mu\text{l}$ Zellsuspension mit $40 \mu\text{l}$ Trypan-Blau versetzt in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellzahl bestimmt. Danach wurde die Zellsuspension auf $2,5 \times 10^5$ Zellen pro 10 ml eingestellt. Auf eine 96-well-Platte wurde nun von dieser Zellsuspension, mit definierter Zellzahl, pro well $100 \mu\text{l}$ (entspricht ca. $2,5 \times 10^4$ Zellen pro well) aufgebracht. Die Platte wurde über Nacht (16 bis 24 Stunden) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und $200 \mu\text{l}$ der Proben, Kontrollen und Standards in die erste Reihe aufgetragen. In die folgenden wells der Platte wurden jeweils $100 \mu\text{l}$ Verdünnungsmedium vorgelegt. Nun wurde eine serielle Verdünnung von 1:2 durchgeführt und $100 \mu\text{l}$ aus dem ersten well in das zweite gegeben, dort gut gemischt und dann $100 \mu\text{l}$ vom 2 well in das dritte gegeben, usw., so dass eine Verdünnungsreihe von 1:2 entstanden ist. Zur Sensibilisierung der Zellen wurde jeweils $100 \mu\text{l}$ des Proteinsynthese-Inhibitors Actinomycin D ($4 \mu\text{g}/\text{ml}$) in jedes well gegeben. Die Zellen wurden nun wieder bei

37 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde pro well 10 µl MTT (5 mg/ml PBS) (CAVE: kanzerogen) zugefügt und die Platte über 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde je well 70 µl 20%iges SDS zugegen und erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde am nächsten Tag die Mikrotitrierplatte im ELISA-Reader (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) die OD (= optical density) bei 540 nm die Messung durchgeführt. Je höher die OD ist, desto mehr Zellen sind lebendig und desto niedriger ist die TNF-Konzentration.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Poteinanalyse mittels SDS-PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht wurden SDS-Polyacrylamidgele, bestehend aus einem Sammelgel und einem Trenngel, verwendet (Shapiro et al., 1967, Lämmli et al. 1970). Die Sammel-, bzw. Trenngele hatten folgende Zusammensetzung:

Sammelgel (3%)	
Acrylamid-Stammlösung (30%)	0,85 ml
Sammelgel-Trispuffer (pH 6,8)	1,5 ml
H ₂ O	3,75 ml
SDS (10%)	60 µl
APS (10%)	50 µl
TEMED	5 µl

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Sammelgels

Trenngel (6%)	
Acrylamid-Stammlösung (30%)	3,25 ml
Trenngel-Trispuffer (pH 8,8)	3,75 ml
H ₂ O	8 ml
SDS (10%)	150 µl
APS (10%)	100 µl
TEMED	10 µl

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Trenngels

Die Stromstärke während der Elektrophorese betrug 0,8 mA / cm².

3.2.2 Western-Blot-Analyse

Um eine Immobilisierung der Proteine aus dem SDS-Gelen zu erreichen, war es nötig, diese mittels eines elektrophoretischen Transfers im Semy-dry-Verfahren zu blotten (Towbin et al., 1979). Dazu wurden jeweils drei gelgroße Lagen Whatman Filterpapier von 3 mm (Millipore) in drei verschiedene Anodenpuffer eingelegt (Transferpuffer A: 0,3 M Tris Base, 20% Methanol, pH 10,4; Transferpuffer B: 25 mM Tris Base, 20% Methanol, pH 10,4; Transferpuffer C: 4 mM ε-Amino-n-Caprone, 20% Methanol, pH 7,6). Die Nirozellulosemembran wurde ebenfalls auf die Größe des Gels zugeschnitten und zuerst mit Methanol benetzt und anschließend in Transferpuffer B geschwenkt. Das SDS-Gel wurde aus der Elektrophorese-Kammer genommen und kurz in Transferpuffer B gelegt. Nun wurden

zuerst die drei Lagen Whatmanpapier aus dem Transferpuffer A, dann aus dem Transferpuffer B auf die Anodenplatte der Blotapparatur gelegt. Darauf wurde die Membran, das SDS-Gel und schließlich das Whatmanpapier aus Transferpuffer C aufgelegt. Wobei darauf geachtet wurde, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten befanden. Mit der Kathodenplatte wurde die Blotapparatur geschlossen. Für die Dauer von 45 Minuten wurde der Proteintransfer bei $0,8 \text{ mA} / \text{cm}^2$ Gelfläche durchgeführt.

Kathode
3 Lagen Whatman Filterpapier aus Transferpuffer C
SDS-Gel
Nitrozellulosemembran
3 Lagen Whatman Filterpapier aus Transferpuffer B
3 Lagen Whatman Filterpapier aus Transferpuffer A
Anode

Tabelle 3.7: Western-Blot-Aufbau

3.2.3 Nachweis und Charakterisierung von Proteinen

Zur Detektion der mittels Western-Blot aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulosemembranen oder in Polyacrylamidgelen, wurden die Färbung nach Coomassie mit Coomassie Blue und die Immunfärbung von Proteinen mit Antikörpern verwendet.

3.2.3.1 Coomassiefärbung von Proteinen in Gelen

Die Membran oder das Gel wurden für ca. 10 Minuten in die Färbelösung (0,25% Coomassie Blue R250/L, 45% Methanol, 10% Ethansäure (=Essigsäure)) gegeben. Danach wurden sie in die Entfärbelösung (40% Methanol, 10% Ethansäure) gelegt, bis die einzelnen Banden der Proteine deutlich auszumachen waren.

3.2.3.2 Immunfärbungen von Proteinblots

Zur Detektierung der Proteine mittels Immunfärbung wurden die Membran nach dem elektrophoretischen Transfer für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 8°C in 1% Magermilchpulverlösung mit 0,05% Tween und TBS blockiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 – 4 mal mit TBST für ca. 10 Minuten gewaschen. Es wurde nun der erste Antikörper, suspendiert in 1% Magermilchpulverlösung (3 μg Antikörper pro ml Magermilchpulverlösung), auf die Membran gegeben und für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde nun erneut 3 – 4 mal mit TBST für ca. 10 Minuten gewaschen. Der zweite, Peroxidase-gekoppelte Antikörper wurde nun ebenfalls in 1% Magermilchpulverlösung 1:1000 gelöst, auf die Membran gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss dieser Inkubation wurde die Membran 5 mal mit TBST und 3 mal mit TBS für je 10 Minuten gewaschen. Die Detektion des Antikörpers erfolgte mit dem ECL-Western-Blot-System (Energene). Die Nachweisreaktion beruht auf einer Chemolumineszenzreaktion, die durch die Oxidation eines Substrats (Luminol) hervorgerufen wird. Diese Lichtemission kann anschließend auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm-ECL) sichtbar gemacht werden.

3.2.4 Reinigung des Zellkulturüberstand

3.2.4.1 Ammoniumsulfat-Fällung

Zur Reinigung des, in den Zellkulturüberstand sezernierten, Proteins, musste dieses zuerst mit Ammoniumsulfat (Peters, 1990) ausgefällt werden. Ursächlich für das Ausfallen des Proteins, wobei das Protein selbst nicht denaturiert wird, ist die verringerte Dipolwechselwirkung zwischen Oberflächenamino-säuren und dem Lösungsmittel.

Zur Fällung wurde zu 55% gekühltem Zellkulturüberstand langsam und unter ständigem Rühren 45% eisgekühlte gesättigte Ammoniumsulfatlösung $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ hinzu gegeben. Die Lösung wurde zur Ausfällung für 6 Stunden bei 4°C im Kühlraum stehen gelassen. Die Lösung wurde anschließend in 250 ml Bechern bei 20.000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Die Pellets wurden vereinigt und in möglichst wenig Wasser gelöst. Das Wasser mit den gelösten Pellets wurde in einen Dialyseschlauch gegeben und über Nacht im Kühlraum gegen eine möglichst große Menge PBS dialysiert. Anschließend wurde eine zweite Dialyse durchgeführt. Dazu wurde die Lösung mit den Pellets über Nacht bei 4°C im Kühlraum gegen 0,1 M Natrium-Acetat (pH 5,0) dialysiert. Das Natrium-Acetat stellt den Bindungspuffer für die Protein G – Sepharose dar.

3.2.5 quantitative Proteinbestimmung mittels Protein-G

Zur Reinigung des Proteins wurde Protein G, ein Streptokokken-Oberflächenprotein, verwendet, welches gegen den Fc-Teil eines Anti-Körpers gerichtet ist und an diesen bindet. Zuerst wurde die Säule mit 0,5 ml Bindungspuffer pro Minute gespült. Anschließend wurden 30 ml, der zuvor bei Fällung und Dialyse gewonnenen Antikörper-Lösung auf die Säule aufgetragen. Nun wurde mit dem Bindungspuffer gewaschen, bis die Extinktion 0, den Grundlevel erreichte. Mittles 0,1 M Glycin, mit dem pH-Wert 2,8 wurde das Protein von der Säule gelöst und das Eluat in einem Eppendorf-Cup aufgefangen, in dem bereits 10 µl TrisHCl mit dem pH-Wert 11 vorgelegt wurden, um das Eluat sofort abzapfuffern.

3.2.6 Dialyse des Eluats

Nach Durchführung der quantitativen Proteinbestimmung mittels Protein-G musste das Eluat mit dem Fusionsprotein erneut dialysiert werden. Deshalb wurde das Eluat in einen Dialyseschlauch gegeben und über Nacht im Kühlraum bei 4°C gegen möglichst viel RPMI dialysiert. Am nächsten Tag wurde der Dialyseschlauch entnommen und der Inhalt in Eppendorf-Cups überführt. Diese wurden zur weiteren Lagerung in den Kühlraum gegeben.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur Führung des Nachweises der spezifischen Bindung von rekombinanten Proteinen an Antikörpern, welche aus Überständen von antikörpersezernierend Zelllinien gewonnen wurden, wurde als Bindungstest ein ELISA durchgeführt.

3.3.1.1 Allgemeine ELISA-Methoden

Der Immunoassay stellt ein Prinzip eines immunologischen und serologischen Nachweisverfahrens dar. In ihm wird die Präsenz antigene Substanzen mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion *in vitro* gezeigt.

Generell stehen verschiedene Testaufbauten zur Verfügung, die in zwei Bereiche aufgeteilt werden können. Zum einen kommen kompetitive Verfahren zum Einsatz. Hierbei stehen Antigen und Ligand (markiert) in Konkurrenz zueinander. Dieses Verfahren findet im Rahmen von Radio-Immunoassays (RIA) seine Anwendung. Zum anderen gibt es nicht-kompetitive Verfahren, bei denen der jeweilige Antikörper im Überschuss vorhanden ist. Hierunter fällt die ELISA-Methode. Im Rahmen der ELISA-Methode, kann das jeweilige Antigen entweder direkt durch Bindung an eine inerte Oberfläche (Mikrotiterplatte) und Zugabe eines Antikörper nachgewiesen werden oder man führt den Nachweis mittels der Sandwichmethode. Dabei wird die Mikrotiterplatte über Nacht mit einem Capture-Antikörper inkubiert. Anschließend wird nach dreimaligem Waschen der wells mit Waschlösung eine Blockierlösung zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen an der Oberfläche der wells aufgetragen. Die Platte wird für eine Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C in der Kühlkammer inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Blockierlösung entfernt und die Probe mit dem Antigen auf die Platte pipettiert. Die Platte wird erneut für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Probe entfernt und die Platte erneut dreimal gewaschen. Das Antigen wird nun durch ein Zweitantikörper, welcher hinzupipettiert wird, nachgewiesen. Dieser zweite Antikörper, auch Detektionsantikörper oder Sekundärantikörper genannt, kann nun selbst an ein Enzym gebunden vorliegen. Ist dies der Fall, so kann nach einer weiteren Inkubationszeit von einer Stunde bei Zimmertemperatur in Gegenwart von Substrat die photometrische Messung durchgeführt werden. Ist der Sekundärantikörper nicht an ein Enzym gebunden, so muss ein weiterer Antikörper hinzugegeben, welcher den Sekundärantikörper erkennt, an ihn bindet und selbst eine enzymatische Markierung enthält, der wiederum Substrat umsetzt.

Häufig gekoppelte Enzyme sind Peroxidase (POX), alkalische Phosphatase (AP). Darüber hinaus finden Antikörper, welche biotinyliert sind Anwendung. Diese werden dann mittels Streptavidin-POX-Komplex oder mittels Streptavidin-AP-Komplex detektiert.

Nachdem der dritte Antikörper hinzugegeben wurde und eine Stunde inkubiert, kann die photometrische Messung, durch Zugabe von Substrat für das Enzym, durchgeführt werden.

3.3.1.2 Qualifizierung / Quantifizierung der Bindungsfähigkeit des Fusionsproteins mittels ELISA

Bei der Sandwichmethode wurde wie folgt vorgegangen:

Zuerst wurde in jedes well einer Mikrotiterplatte ein Capture-Antikörper (P75TNFR) pipettiert und über Nacht bei 4°C im Kühlraum bei leichtem Rotieren inkubiert, so dass jedes well von Capture-Antikörper beschichtet war (coaten). Am nächsten Tag wurde der Überstand mit dem nichtgebundenen Capture-Antikörper entfernt und jedes well dreimal mit 200 µl Waschlösung gespült. Damit sicher gestellt war, dass im folgenden Schritt nur an den Capture-Antikörper gebunden wird, wurden mögliche andere Bindungsstellen an der Oberfläche der wells mit einer Blockierlösung geblockt. Hierzu wurde in jedes well ein Volumen von 200 µl der Blockierlösung pipettiert und für eine Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach abgeschlossener Blockierung wurde die Blockierlösung entfernt. Die Probe mit dem Antigen (mTNF = raw-Überstand) wurde nun hinzupipettiert und die Platte für ca. eine Stunde bei Zimmertemperatur und leichtem Schütteln stehen gelassen. Nach Ablauf der Stunde wurde die Probe wieder entfernt und die Platte dreimal mit Waschlösung gewaschen. Zum Nachweis des gebundenen Antigens wurde nun ein

Sekundärantikörper (anti-Maus TNF = V1QH8 rat anti-mTNF Ratten IgG 1,0 ng/ml) zugegeben und die Platte erneut bei Zimmertemperatur, unter leichtem Schütteln, für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Sekundärantikörper wieder entfernt und die Platte erneut mit Waschlösung dreimal gespült.

Auf Grund der Tatsache, dass der Sekundärantikörper (V1QH8 rat anti-mTNF IgG 1,0 ng/ml) selbst nicht an ein Enzym gekoppelt ist, wurde ein dritter Antikörper (anti-rat-AK-IgG-POX) zugegeben. Dieser dritte Antikörper bindete an den Sekundärantikörper. Die Mikrotiterplatte wurde bei Zimmertemperatur für eine Stunde unter leichtem Rotieren inkubiert. Danach wurde überschüssige Menge des dritten Antikörpers wieder entfernt. Um letztendlich die Detektion und damit die photometrische Messung möglich zu machen, wurde Substrat (Sigma 104), für eine enzymatische Reaktion zugegeben. Nach einer Inkubation von ca. einer Stunde bei Zimmertemperatur und leichtem Schütteln, wurde die photometrische Messung durchgeführt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Reader (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) durchgeführt.

Die Menge an umgesetztem Substrat (Sigma 104) ist der Menge an gebundenem Antigen proportional. Unter Verwendung einer Standardkonzentration kann die Menge im Photometer bestimmt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Fusionsprotein

Das Fusionsprotein besteht aus der Extrazellulärdomäne des Maus-p75TNFR und dem Fc-Teil eines humanen IgGs. Ag8-Zellen wurden transfiziert, das Fusionsprotein exprimiert und von den Zellen in den Zellkulturüberstand sezerniert. Die Zellen wurden kultiviert und die Überstände jeweils bei Mediumwechsel geerntet.

4.2 Transfektion

Bei der vorliegenden Dissertation wurde auf eine bereits transfizierte Ag8-Zelllinie zurückgegriffen.

4.3 Reinigung des Fusionsproteins

Zur Reinigung des Fusionsproteins wurde die Affinitätschromatographie mittels Protein-G-Sepharose verwendet.

4.4 Western Blots

4.4.1 Western Blot ungereinigter Überstand

Nachdem die transfizierten Ag8p75-Ig-Zellen für einige Wochen kultiviert wurden und die Zellkulturüberstände dabei jeweils geerntet, gesammelt und bei 4 °C im Kühlraum gelagert worden waren, wurde durch einen Western Blot (Gel: 12,5 % SDS-PAGE) geprüft, ob die Zelllinie das Fusionsprotein sezerniert und somit in den Überständen die Extrazellulärdomäne des p75TNF-Rezeptor enthalten ist (Abb. 4.1).

Es wurde eine 12,5 %ige SDS-PAGE durchgeführt. Als Antikörper wurde der gegen das Fc-Teil des Fusionsproteins gerichtete Antikörper Anti-human IgG, Fc-Fragment-Specific, HP6069 Mouse, Biotin conjugate (3 µg / ml) und zur Detektion des Antikörpers, POX-conjugate Streptavidin (1 µg / ml) verwendet. Der verwendete Standard war der SDS-PAGE Molekulargewichtsstandard

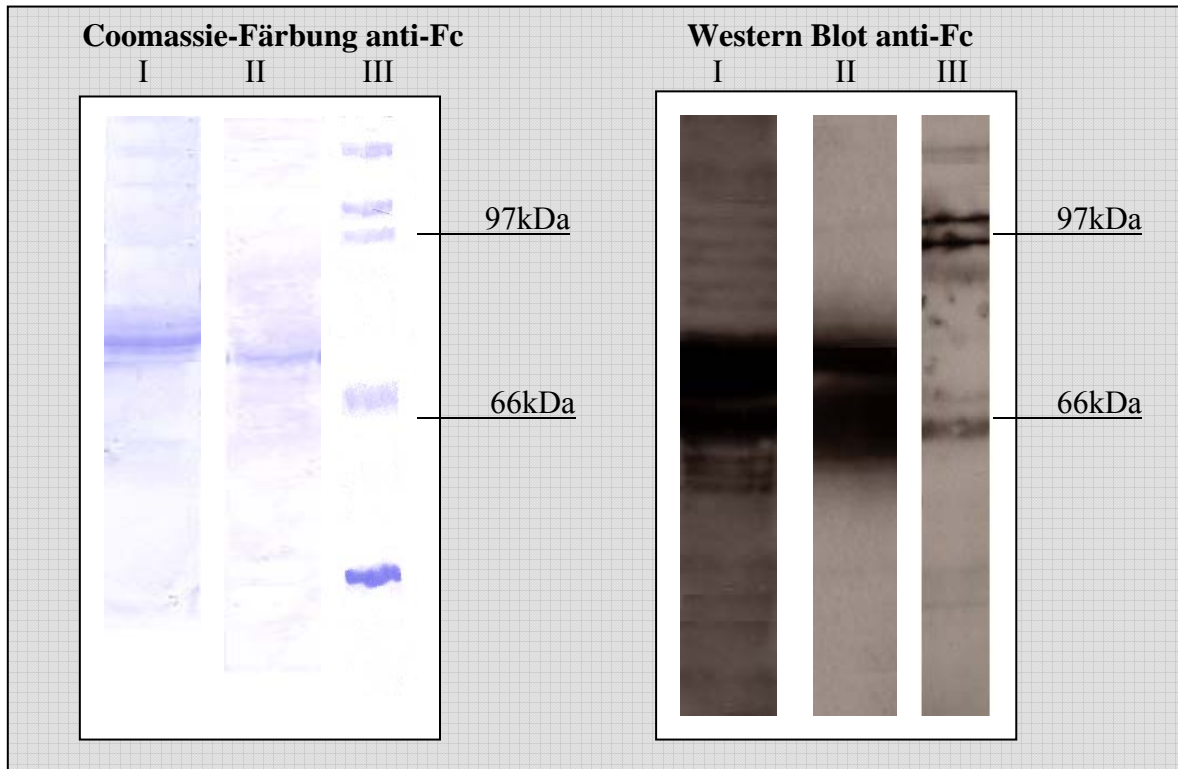


Abbildung 4.1: Western Blot und Coomassie-Färbung (anti-Fc)

Es wurden eine Coomassie-Färbung und ein Western Blot durchgeführt, wobei Zellüberstand aus zwei unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkultivierung verwendet wurde. I stammt aus einem späteren Stadium der Zellkultivierung, als II. III stellt den Längenstandard dar. In beiden Zellüberständen lässt sich auf Höhe von ca. 76kDa eine Bande ausmachen. Ebenso zeigt sich in der Coomassie-Färbung und im Western Bot mit anti-Fc eine deutliche spezifische Bande bei ca. 76kDa. Dies zeigt an, dass sich in dem Zellkulturüberstand das Fusionsprotein mit dem Molekulargewicht von 76kDa befindet.

4.4.2 Anti-p75

Nach Durchführung der Fusionsproteinreinigung über Protein-G-Sepharose wurden die drei Eluate, welche durch die Aufreinigung entstanden, getrennt voneinander in einem Western Blot auf die Anwesenheit des Fusionsproteins hin geprüft.

Der Antikörper Anti-mouse (anti-p75), welcher gegen den p75-Extrazellulär-Teil des Fusionsproteins gerichtet ist, wurde in einer Konzentration von 1 µg / ml als Primärantikörper verwendet und POX-conjugate Streptavidin (1 µg / ml) als Zweitantikörper.

Es wurde eine 8%ige SDS-PAGE durchgeführt und als Standard der SDS-PAGE Molekulargewichtsstandard verwendet.

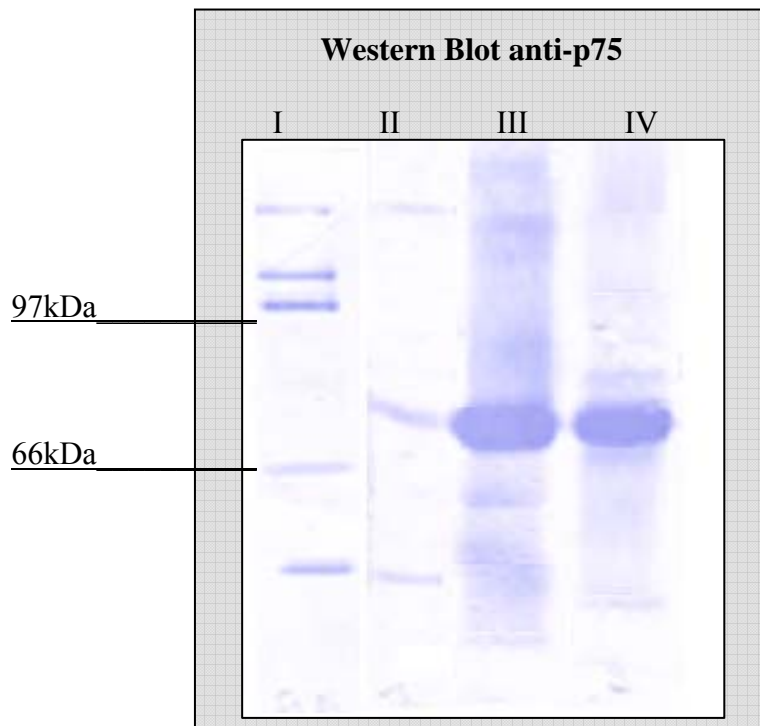


Abbildung 4.2: Western Blot (anti-p75)

Mit den Eluaten aus der Reinigung wurde ein Western Blot durchgeführt.

Hierbei kamen drei Eluate zur Anwendung. Eluat 1 (Line II) ist jenes, welches zu Beginn der Aufreinigung gewonnen werden konnte, Eluat 2 (Line III) ist jenes aus der Mitte und Eluat 3 (Line IV) jenes, welches zum Ende der Reinigung gewonnen werden konnte. Bei Eluat 1 zeigt sich eine sehr feine Bande auf Höhe von 76 kDa. In Eluat 2 und 3 eine deutlich kräftigere Bande auf der gleichen Höhe.

In allen drei Fraktionen, aber im Besonderen in Fraktion II und III zeigt sich in der Coomassie-Färbung und im Western Blot mit anti-p75TNFR jeweils bei ca. 76kDa eine deutliche Bande. Auf Grund dieser Tatsache lässt sich sagen, dass in allen drei Eluaten das aufgereinigte Fusionsprotein vorhanden ist.

4.4.3 Anti-Fc-Fragment und Anti-p75

Das gereinigte Eluat wurde in einem weiteren Western Blot auf die Anwesenheit des Fusionsproteins hin geprüft. Dabei wurde auf dem einen Teil (A1 und B1) des Western Blots ein Primärantikörper verwendet, welcher gegen den Fc-Teil des Fusionsproteins gerichtet ist und zum anderen wurde getrennt davon auf dem anderen Teil (A2 und B2) des selben Western Blots ein Primärantikörper verwendet, der gegen den p75-extrazellulär-Domäne gerichtet ist. Es wurde dabei sowohl ein 12,5 % iges SDS-PAGE (Abb.4.3A), sowie ein 8 % iges SDS-PAGE (Abb.4.3B) durchgeführt und als Standard der Full Range Rainbow-Molekulargewichtsstandard verwendet. Es wurden zwei Gele mit zwei unterschiedlich hohen prozentualen Anteilen an Acrylamid gewählt, um unterschiedliche Porengrößen und damit unterschiedliche Auftrennungsbereiche zu erreichen.

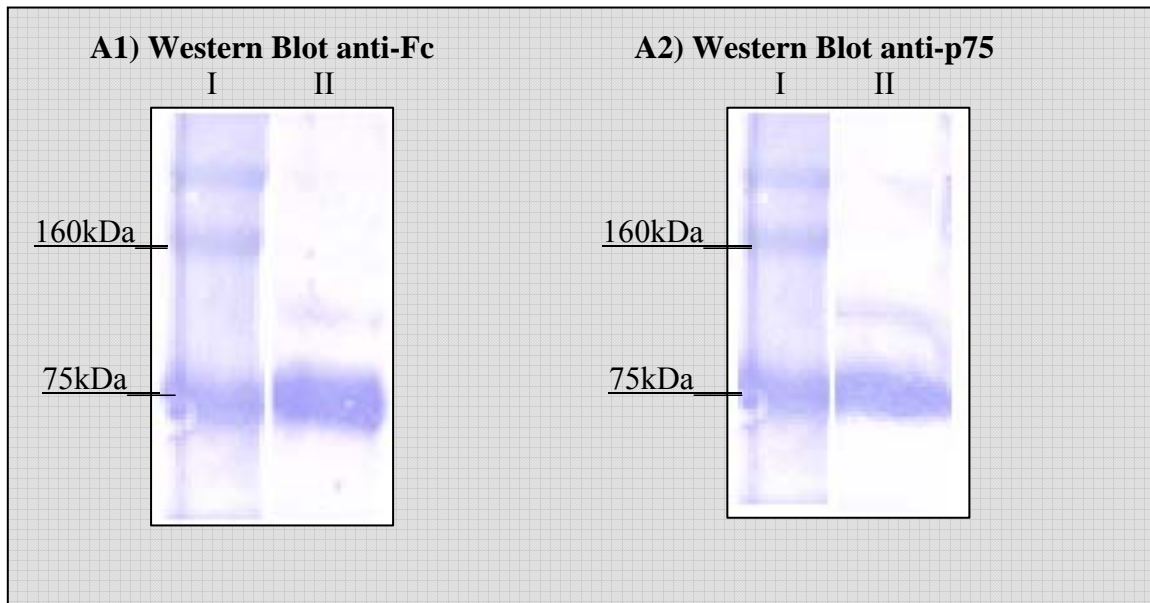


Abbildung 4.3A (Gel: 12,5 % SDS-PAGE):

Western Blot (anti-Fc und anti-p75)

Es wurden zwei Western Blots mit einem 12,5%igem SDS-PAGE-Gel durchgeführt.

Hierbei wurden bei A1 ein anti-Fc-AK verwendet und bei A2 ein anti-p75-AK. In beiden Western Blots zeigt sich auf Höhe von ca. 76 kDa eine Bande.

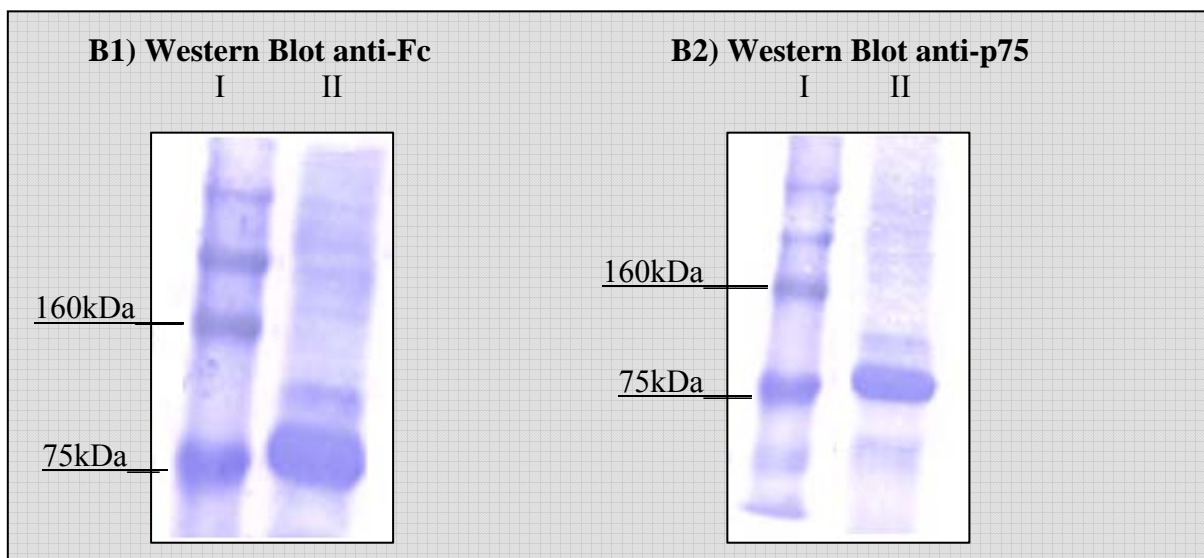


Abbildung 4.3B (Gel: 8 % SDS-PAGE):

Western Blot (anti-Fc und anti-p75)

Es wurde ein Western Blot mit einem 8%igem SDS-PAGE-Gel durchgeführt. In B1 wurde ein anti-Fc-AK und in B2 ein anti-p75-AK verwendet. Hier zeigt sich ebenso bei beiden Antikörpern eine deutliche Bande auf Höhe von ca. 76 kDa. Auf Grund der Banden bei ca. 76 kDa in beiden Western Blots bei Verwendung eines Antikörpers gegen den Fc-Teil und eines Antikörpers gegen den p75-Teil zeigt, dass das Fusionsprotein vollständig, also mit Fc- und p75-Teil vorliegt.

4.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration in den durch Aufreinigung erhaltenen Eluaten wurde ein Proteinbestimmung durchgeführt. Dabei ergaben sich für die einzelnen Eluate folgende Konzentrationen:

> Eluat 1:	0,148 mg / ml
> Eluat 2:	1,644 mg / ml
> Eluat 3:	1,147 mg / ml

Somit ergab sich für das gesamte erhaltene Eluat eine Proteinkonzentration von

> Eluat Gesamt:	2,939 mg / ml
-----------------	---------------

Das Gesamtvolumen der Eluate betrug 7 ml.

4.6 TNF-Zytotoxizitätsassays

Auf Grund der Tatsache, dass der lösliche p75TNFR und damit auch das Fusionsprotein, die Fähigkeit besitzt, TNF zu binden und es zu neutralisieren, wurde das Fusionsprotein im TNF-Zytotoxizitätsassay bei L-929-Zellen eingesetzt, um die Bindungsfähigkeit und dadurch die biologische Aktivität zu prüfen.

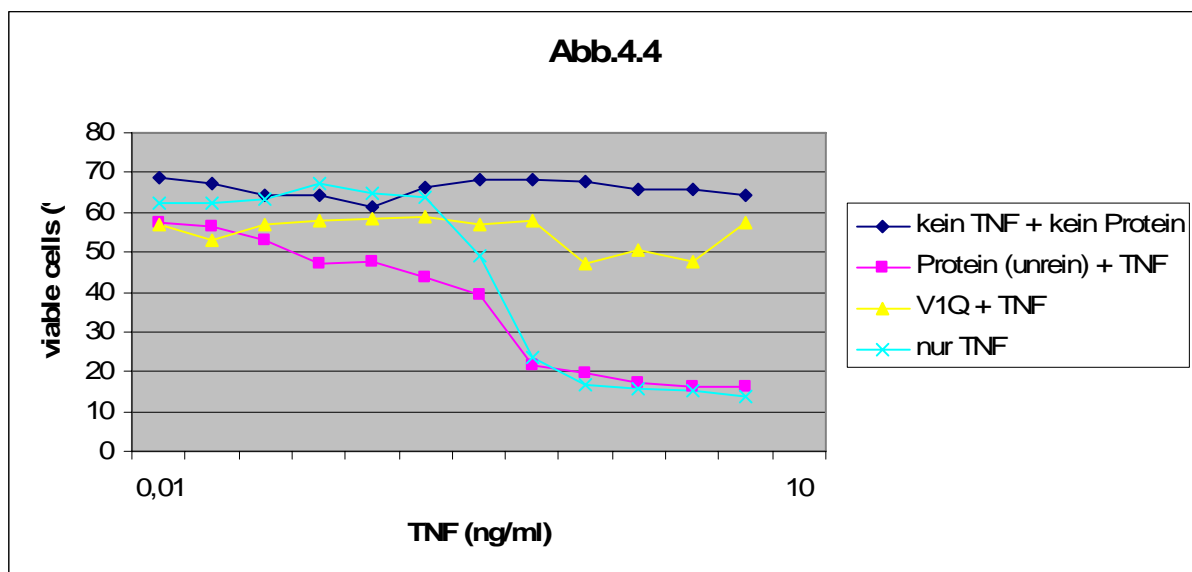


Abb. 4.4: TNF-Zytotoxizitäts-Assay

Zytotoxizitätsassay, wobei bei Gruppe 1 kein TNF und kein Protein zugegeben wurde. Bei Gruppe 2 wurde TNF und das Fusionsprotein vor Aufreinigung hinzugegeben. Gruppe 3 wurde mit dem Vektor V1Q und mit TNF versetzt. Bei Gruppe 4 wurde lediglich TNF hinzugegeben. Zugabe von TNF in aufsteigender Konzentration.

Es wurden L-929-Zellen kultiviert und dann in vier gleich große Populationen aufgeteilt. Diese vier Populationen wurden dann wie folgt behandelt:

- **Gruppe 1:** es wurde weder TNF, noch das Fusionsprotein zugegeben
- **Gruppe 2:** es wurde TNF und das noch nicht gereinigte Protein zugegeben

- **Gruppe 3:** es wurde TNF und der Vektor V1Q (ein IgD der Ratte gegen mTNF) zugegeben
- **Gruppe 4:** es wurde nur TNF zugegeben

TNF wurde dabei in einer aufsteigenden Konzentration zugegeben.

Die unbehandelten Zellen und die mit TNF und V1Q behandelten Zellen zeigen eine etwa gleich hohe Anzahl an lebenden Zellen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der monoklonale Antikörper das TNF gebunden hat und es somit nicht zu einer zytotoxischen Wirkung kommen konnte.

Bei den Zellen, welche nur mit TNF bzw. mit TNF und dem Fusionsprotein vor der Reinigung verwendet wurde, zeigte sich mit zunehmender TNF-Konzentration ein deutliches Abfallen der lebenden Zellen.

Da die berechnete TNF-Konzentration durch Zugabe des Fusionsproteins geringer wird, bedeutet das, dass das Fusionsprotein TNF noch toxischer macht.

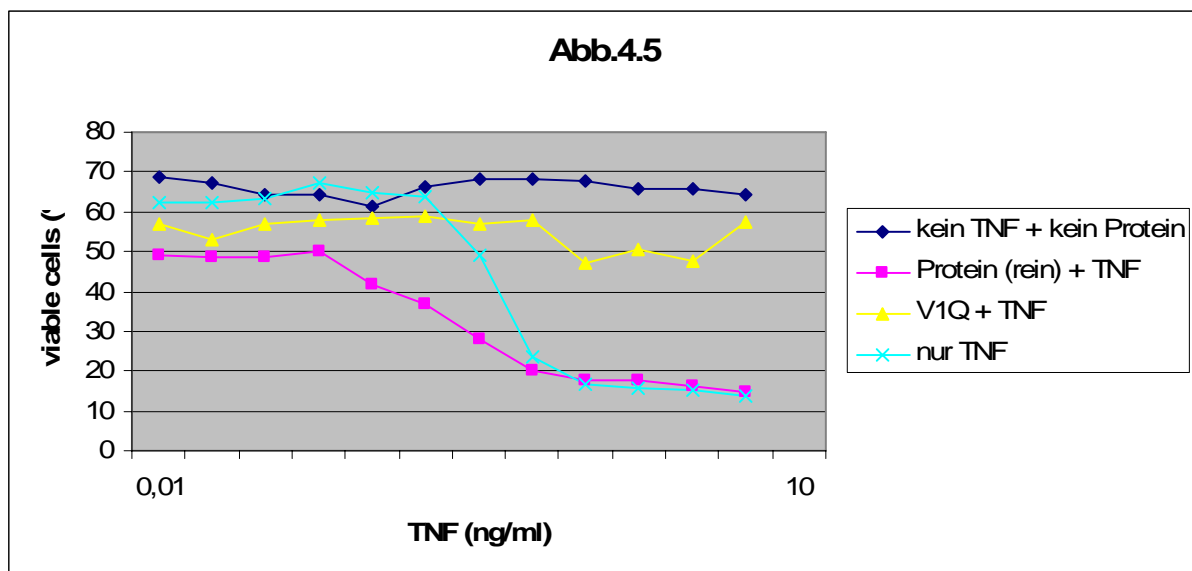


Abb.: 4.5: TNF-Zytotoxizitäts-Assay

Zytotoxizitätsassay, wobei bei Gruppe 1 kein TNF und kein Protein zugegeben wurde. Bei Gruppe 2 wurde TNF und das Fusionsprotein nach Aufreinigung hinzugegeben. Gruppe 3 wurde mit dem Vektor V1Q und mit TNF versetzt. Bei Gruppe 4 wurde lediglich TNF hinzugegeben. Zugabe von TNF in aufsteigender Konzentration.

Es wurden L-929-Zellen kultiviert und dann in vier gleich große Populationen aufgeteilt. Diese vier Populationen wurden dann wie folgt behandelt:

- **Gruppe 1:** es wurde weder TNF, noch das Fusionsprotein zugegeben
- **Gruppe 2:** es wurde TNF und das gereinigte Protein zugegeben
- **Gruppe 3:** es wurde TNF und der Vektor V1Q (ein IgD der Ratte gegen mTNF) zugegeben
- **Gruppe 4:** es wurde nur TNF zugegeben

TNF wurde dabei in einer aufsteigenden Konzentration zugegeben.

Die unbehandelten Zellen und die mit TNF und V1Q behandelten Zellen zeigen auch hier eine etwa gleich hohe Anzahl an lebenden Zellen. Zu einer toxischen Wirkung von TNF kam es nicht.

Bei den Zellen, welche nur mit TNF bzw. mit TNF und dem Fusionsprotein nach der Reinigung verwendet wurde, zeigte sich mit zunehmender TNF-Konzentration auch hier ein

deutliches Abfallen der lebenden Zellen. Unter der Zugabe von TNF und Fusionsprotein kam es schon bei einer niedrigeren TNF-Konzentration zu einer stärkeren zytotoxischen Wirkung als bei alleiniger TNF-Zugabe. Das Fusionsprotein scheint auch hier TNF noch toxischer zu machen.

4.7 Immunpräzipitation

Zur weiteren Abklärung der Bindungsfähigkeit des Fusionsproteins wurde ein TNF-Zytotoxizitäts-Assay mit einer Vorbehandlung mit Sepharose (Immunpräzipitation) durchgeführt. Dabei wurde das Fusionsprotein mit TNF zusammen inkubiert, so dass sich das Fusionsprotein an das TNF binden kann und einen TNF-Fusionsprotein-Komplex bildet. Anschließend wurde Protein-G-Sepharose hinzugegeben, um ebenfalls an das Fusionsprotein am Fc-IgG-Teil zu binden und somit nicht nur dieses, sondern auch das vorher gebundene TNF, zu eliminieren. Die Lösung, welche man, nach Abzentrifugieren und Verwerfen des Pellets (darin enthalten der TNF-Fusionsprotein-Sepharose-Komplex), erhalten hat und in dem bei voller Bindungsfähigkeit des Fusionsproteins kein TNF mehr enthalten sein darf, wurde im TNF-Zytotoxizitäts-Assay bei L-929-Zellen eingesetzt.

Im Vergleich zu dem Assay mit Sepharose wurde zeitgleich und unter den gleichen Bedingungen ein Assay ohne Sepharose-Vorbehandlung durchgeführt.

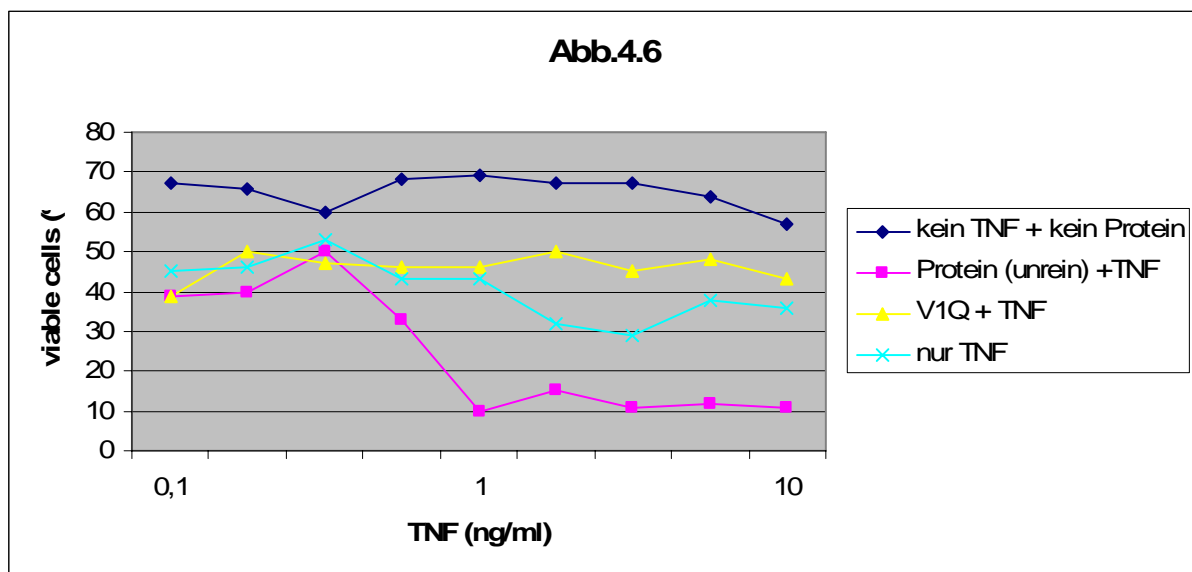


Abb. 4.6: TNF-Zytotoxizitäts-Assay mit Sepharose-Vorbehandlung

Zytotoxizitätsassay, wobei bei Gruppe 1 kein TNF und kein Protein zugegeben wurde. Bei Gruppe 2 wurde TNF und das Fusionsprotein vor Aufreinigung und nach Sepharosevorbehandlung hinzugegeben. Gruppe 3 wurde mit dem Vektor V1Q und mit TNF versetzt. Bei Gruppe 4 wurde lediglich TNF hinzugegeben. Zugabe von TNF in aufsteigender Konzentration.

Es wurden L-9292-Zellen kultiviert und in fünf gleich große Gruppen eingeteilt. Diese Gruppen wurden wie folgt behandelt:

- **Gruppe 1:** L-929-Zellen ohne Behandlung mit TNF oder Fusionsprotein
- **Gruppe 2:** es wurde das ungereinigte Protein zugegeben, welches zuvor zuerst mit TNF und dann mit Sepharose zusammengegeben und abzentrifugiert wurde
- **Gruppe 3:** es wurde der Vektor V1Q (IgD der Ratte gegen mTNF) zugegeben, welcher zuvor zuerst mit TNF und dann mit Sepharose zusammengegeben wurde
- **Gruppe 4:** es wurde nur TNF zugegeben

TNF wurde hierbei wieder in aufsteigender Konzentration verwendet.

Es zeigte sich auch hier, dass die prozentuale Anzahl der überlebenden Zellen bei der Behandlung mit dem Vektor V1Q und TNF über denen liegt, welche mit dem gereinigten Protein und TNF, mit dem ungereinigtem Protein und TNF, sowie über denen, welche nur mit TNF behandelt wurden. Bei der Zugabe von TNF und Fusionsprotein vor Aufreinigung zeigte eine deutlich zytotoxischere Wirkung als TNF alleine.

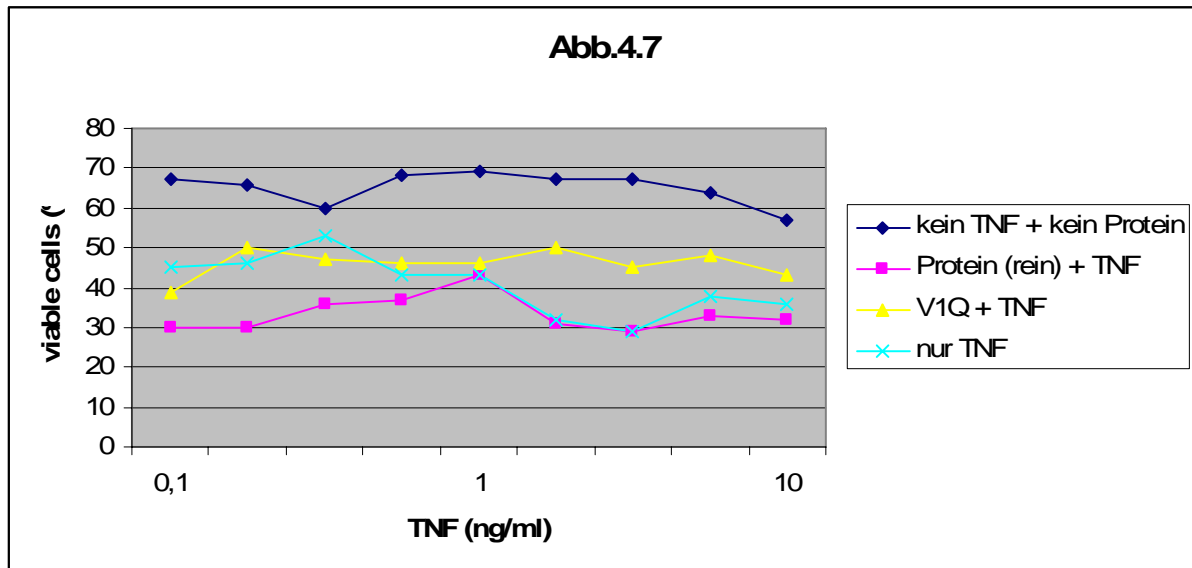


Abb. 4.7: TNF-Zytotoxizitäts-Assay mit Sepharose-Vorbehandlung

Zytotoxizitätsassay, wobei bei Gruppe 1 kein TNF und kein Protein zugegeben wurde. Bei Gruppe 2 wurde TNF und das Fusionsprotein nach Aufreinigung und nach Sepharosevorbehandlung hinzugegeben. Gruppe 3 wurde mit dem Vektor V1Q und mit TNF versetzt. Bei Gruppe 4 wurde lediglich TNF hinzugegeben.

Es wurden L-9292-Zellen kultiviert und in fünf gleich große Gruppen eingeteilt. Diese Gruppen wurden wie folgt behandelt:

- **Gruppe 1:** L-929-Zellen ohne Behandlung mit TNF oder Fusionsprotein
- **Gruppe 2:** es wurde das gereinigte Protein zugegeben, welches zuvor zuerst mit TNF und dann mit Sepharose zusammengegeben und abzentrifugiert wurde
- **Gruppe 3:** es wurde der Vektor V1Q (IgD der Ratte gegen mTNF) zugegeben, welcher zuvor zuerst mit TNF und dann mit Sepahrose zusammengegeben wurde
- **Gruppe 4:** es wurde nur TNF zugegeben

TNF wurde hierbei wieder in aufsteigender Konzentration verwendet.

Es zeigte sich, dass die prozentuale Anzahl der überlebenden Zellen bei der Behandlung mit dem Vektor V1Q und TNF über denen liegt, welche mit dem ungereinigtem, bzw. gereinigten Protein und TNF behandelt wurden. Bei der Zugabe von TNF und Fusionsprotein vor und nach Aufreinigung zeigte zudem eine deutlich zytotoxischere Wirkung als TNF alleine.

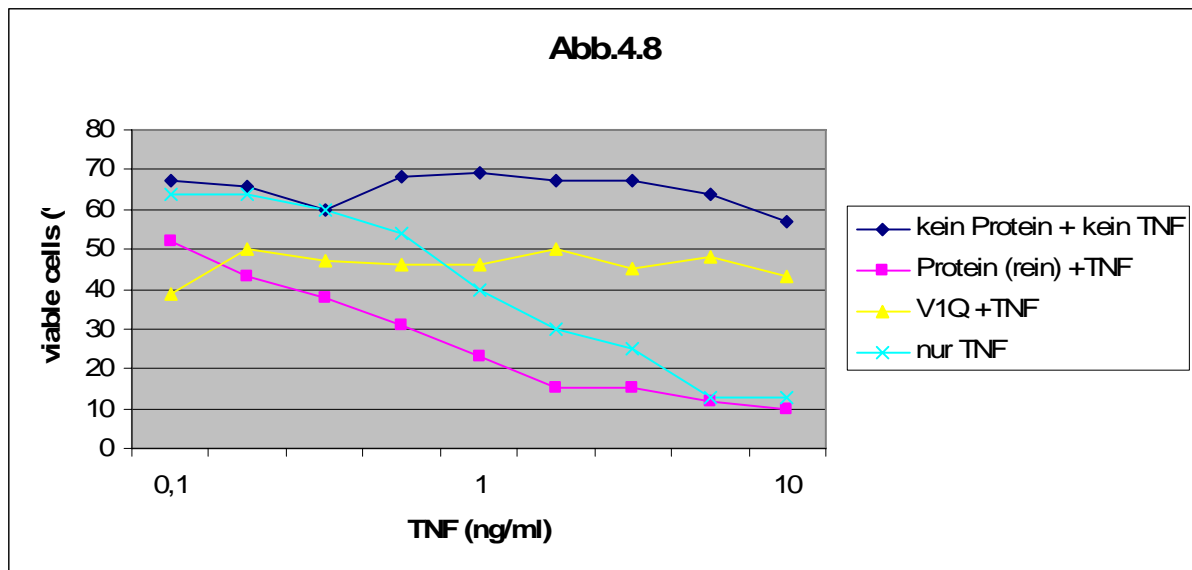


Abb. 4.8: TNF-Zytotoxizitäts-Assay ohne Sepharose-Vorbehandlung

Zytotoxizitätsassay, wobei bei Gruppe 1 kein TNF und kein Protein zugegeben wurde. Bei Gruppe 2 wurde TNF und das Fusionsprotein nach Aufreinigung und ohne Sepharosevorbehandlung hinzugegeben. Gruppe 3 wurde mit dem Vektor V1Q und mit TNF versetzt. Bei Gruppe 4 wurde lediglich TNF hinzugegeben.

Zum direkten Vergleich wurde analog zu dem Versuch mit Sepharose-Vorbehandlung ein Versuch ohne Sepharose-Vorbehandlung durchgeführt. Die L-929-Zellen wurden wieder entweder unbehandelt gelassen oder mit gereinigtem Protein und TNF, dem Vektor V1Q und TNF oder nur mit TNF behandelt. Unter aufsteigender TNF-Konzentration zeigt sich erneut, dass der Vektor V1Q eine schützende Wirkung vor der zytotoxischen Wirkung des TNF besitzt, das gereinigte Protein jedoch nicht. Unter der Behandlung mit TNF und Protein zeigt sich eine stärkere zytotoxische Wirkung als unter alleiniger Zugabe von TNF.

In dem Assay ohne Sepharose-Vorbehandlung bestätigte sich das Ergebnis, wonach keine biologische Bindungsfähigkeit des Fusionsproteins gegeben ist. Ebenso zeigte der Assay mit Sepharose-Vorbehandlung, dass in der Vorbehandlung kein TNF mittels Fusionsprotein gebunden und dann durch die Sepharose eliminiert werden konnte.

4.8 TNF- ELISA-Bindungstest

Um eine weitere Bestimmung der Bindungsfähigkeit zu erlangen, wurde ein ELISA-Bindungstest durchgeführt. Dabei wurde mit dem Fusionsprotein (p75TNFR-Extrazellulärdomäne) gecoatet und TNF zugegeben. Das TNF müsste bei biologischer Aktivität des Fusionsproteins an dieses binden. Anschließend wurde V1Q (= anti-TNF der Ratte) zugegeben, welches seinerseits ebenfalls an das TNF bindet. Zur Detektion des V1Q wurde ein anti-rat AP gekoppelter Antikörper hinzugegeben. Schließlich wurde Sigma 104 hinzugegeben, um eine Auswertung zu ermöglichen.

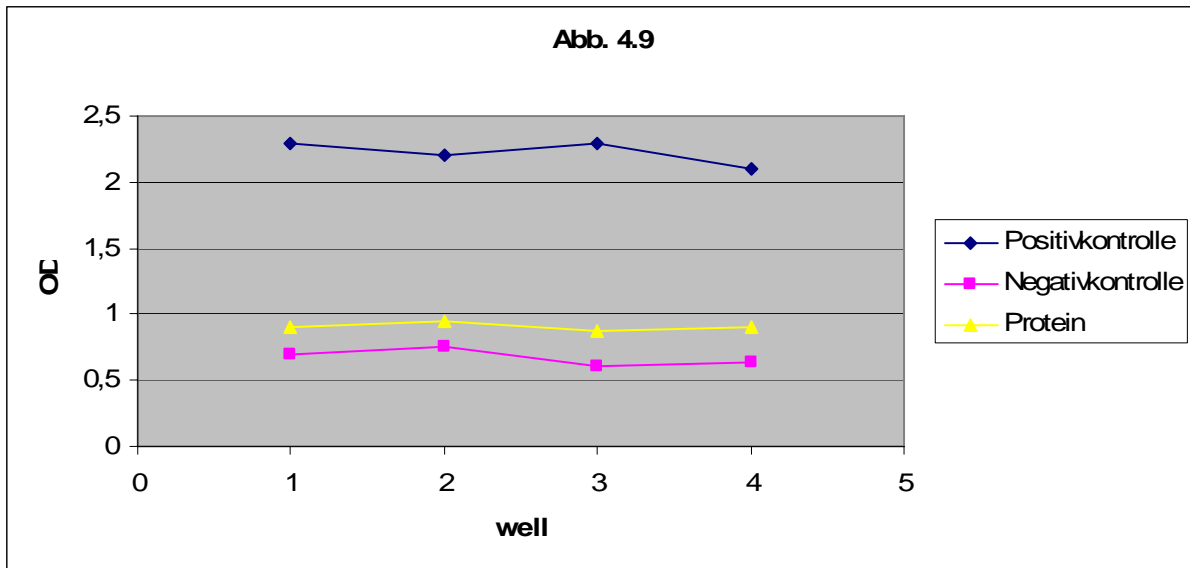


Abb.: 4.9: TNF-ELISA-Bindungstest

Es wurde ein 96-well-Platte mit dem gereinigten Fusionsprotein.

Dazu wurde zuerst mTNF, dann das anti-mTNF V1Q (IgG der Ratte gegen mTNF), dann ein Antikörper (anti-rat-AK) gegen das IgD-der Ratte (=V1Q) und dann das Sigma 104, welches gegen das anti-rat-AK gerichtet ist, gegeben. In der Positivkontrolle wurde statt dem Fusionsprotein mTNF verwendet. In der Negativkontrolle PBS. Anschließend wurde OD (optical density) im ELISA-Reader gemessen. Es wurde für jedes well die OD aufgetragen.

Es zeigt sich, dass das Fusionsprotein auch in dem TNF-ELISA-Bindungstest keine Bindungsfähigkeit besitzt. Die OD des mit Protein behandeltem ELISA's liegt auf gleicher Höhe wie die Negativkontrolle. Somit hat sich in den Western Blot gezeigt, dass das Fusionsprotein zwar vorhanden ist, allerdings, wie die TNF-Zytotoxizitäts-Test zeigten, in biologisch inaktiver Form.

5 Diskussion

5.1 Biologicals und TNF-Antikörper in der klinischen Anwendung

Seit Anfang dieses Jahrhunderts kam es durch den Einsatz von sog. Biologicals, also Arzneimitteln, welche durch Verfahren der Biotechnologie in gentechnisch veränderten Organismen hergestellt werden, zu ganz neuen therapeutischen Möglichkeiten.

Biologicals finden heute ihre Anwendung unter anderem als Gerinnungsfaktoren, z.B. Eptacog alfa (NovoSeven®) (Hedner, 2010; Franchini, 2009; Roberts, 2004) und als Fibrinolytika, z.B. Alteplase (recombinant tissue-type plasminogen activator, rt-PA) (Lees, 2010; Madhani, 1993), aber auch als Hormone, z.B. Somatotropin, hämatopoetische Wachstumsfaktoren, z.B. Erythropoetin, Interferone, z.B. Interferon- α und Impfstoffen.

Eine weitere Arzneimittelgruppe, welche ebenfalls zu den Biologicals gehört, sind die TNF-Antikörper. Seit Einführung vor ca. 10 Jahren findet es seine Anwendung durch Rheumatologen, Gastroenterologen und Dermatologen.

Nimmt man die TNF-Ligandenbindungsdomäne des TNFR-p75 und fusioniert diese mit dem Fc-Teil des IgG, so erhält man ein Fusionsprotein, welches TNF α binden und somit seine biologische Aktivität neutralisieren kann.

Bei dem Fusionsprotein im vorliegenden Fall wurde der Fab-Teil des Immunglobulins G (IgG), welche die Antigenbindungsstelle des IgG darstellt, durch die Extrazellulärdomäne des murinTNFR-p75 ersetzt.

Zwei Wirkmechanismen stehen momentan zur Verfügung. Zum einen gibt es die Möglichkeit, einen löslichen TNF-Rezeptor, wie Etanercept, zu applizieren, der in seiner Struktur dem zellulären TNF-Rezeptor entspricht (Blumenauer, 2003). Etanercept hat jedoch dadurch, dass er dimerisiert vorliegt, eine höhere Affinität zu TNF als die Membranrezeptoren und fungiert so als kompetitiver Inhibitor für die TNF-Bindung an Zellrezeptoren. Etanercept bindet somit TNF, welches seinerseits nun nicht mehr an die TNF-Rezeptoren auf der Zelle binden kann und damit keine biologische Wirkung hat (Wiens, 2009; Mohler, 1993). Die zweite Möglichkeit ist der Wirkmechanismus von Infliximab und Adalimumab. Hierbei handelt es sich um monoklonale Antikörper, welche an TNF binden und dadurch TNF neutralisieren, wodurch die Bindung von TNF an die Rezeptoren verhindert wird (Knight, 1993).

Strukturell sind die erwähnten TNF-Antikörper aufgebaut wie das Fusionsprotein, welches in dieser Arbeit untersucht wurde. Sie haben wie das Fusionsprotein eine Ligandenbindungsdomäne des TNF-Rezeptors und einen Fc-Teil des IgG. Der Fc-Teil bei Etanercept ist humanen Ursprungs (Knight, 1993), bei Infliximab murinen Ursprungs, also von der Maus stammend (Mohler, 1993). Bei dem Fusionsprotein ist die Ligandenbindungsdomäne des p75-TNF-Rezeptors von der Maus.

Die Indikationen für die Anwendung von TNF-Antikörpern sind momentan Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, z.B. rheumatoide Arthritis (Blumenauer, 2009; Taylor, 2009; Rankin, 1995; Elliott, 1993), Morbus Crohn (Kollias, 2010; Behm, 2008; Brown, 2005), Psoriasis (Mease, 2000) und M. Bechterew (Kalden, 2002).

Immer wieder werden auch kleinere Studien oder Einzelfallbeobachtungen publiziert, welche die Wirksamkeit von TNF-Blockern prüfen. Hier zeigte sich z.B. eine Wirksamkeit bei Erkrankungen aus dem Bereich der Vasulitiden (Morbus Behcet, Churg-Strauss-Vaskulitis, Riesenzellarteritis) oder bei Dermatomyositiden. Ebenso bei granulomatösen Erkrankung (Morbus Wegener, Sarkoidose) zeigte sich ein Ansprechen auf eine Infliximab-Behandlung (Keystone, 2004).

Die wichtigsten, in der Klinik verwendeten Wirkstoffe sind Infliximab, Etanercept, Adalimumab und Certolizumab.

Als zwei Vertreter für die beiden Wirkmechanismen der in der Klinik angewandten TNF-Antikörper sind im Folgenden Infiximab und Etanercept dargestellt

5.1.1. Infiximab (Remicade®)

Infiximab war das erste TNF-Antikörper-Biological, welches im August 1999 die Zulassung zur Therapie bei schwergradigen, aktiven und fistulierenden Morbus Crohn bekam. Seit Mai 2003 besteht auch die Zulassung zur Erhaltungstherapie des schwergradig aktiven Morbus Crohn. Des Weiteren hat Infiximab die Zulassung zur Behandlung von rheumatoider Arthritis (seit 2000) und ankylosierender Spondylitis (= Morbus Bechterew) (seit 2003).

Infiximab ist ein chimärer monoklonaler IgG-Antikörper, welcher zu 75 % aus einer humanen und zu 25 % aus murinen, antigenbindenden Sequenzen besteht und mit hoher Spezifität an TNF bindet und dieses neutralisiert (Elliot, 1993; Kalden, 2002).

Junming Le und Jan Vilcek gelang es 1989, den monoklonalen Antikörper gegen TNF zu erzeugen. Die Wirksamkeit und Effektivität von Infiximab konnte in den letzten Jahren durch mehrere klinische Studien belegt werden (Elliot, 1993; Elliot 1994; Maini, 1998; Maini, 1999; Lipsky, 2000). In der sogenannten ACCENT-I-Studie (A Crohn's Disease Clinical Trial Evaluating Infiximab in a New Long Term Treatment Regime) konnte die Wirksamkeit von Infiximab als langfristige Medikation bei Morbus Crohn gezeigt werden (Hanauer, 2002). Nach einer zweiwöchigen Gabe sprachen bereits 58 % der Patienten auf die Behandlung an. Nach einer Behandlungsdauer von 30 Wochen war der Anteil, der sich in Remission befindenden Patienten, in der Infiximab-Gruppe (42%) deutlich höher als in der Kontrollgruppe (21%) (Hanauer, 2002). Die Wirksamkeit von Infiximab bei rheumatoider Arthritis konnte in zwei multizentrischen, randomisierten, doppelverblindeten Studien gezeigt werden, der ATTRACT-Studie (= Anti-TNF-alpha Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy) und der ASPIRE-Studie (= Active controlled Study of Rheumatoid arthritis of Early onset). In der ATTRACT-Studie waren insgesamt 428 Patienten mit einer aktiven rheumatoiden Arthritis trotz Methotrexat-Therapie eingeschlossen. Es fand eine Randomisierung in fünf Gruppen statt, wobei die Patienten 3, bzw. 10 mg Infiximab pro Kilogramm Körpergewicht alle 4 bzw. 8 Wochen zusammen mit Methotrexat erhielten. Die fünfte Gruppe erhielt nur Methotrexat mit einer Placeboinfusion alle 4 Wochen. Die Wirksamkeit von Infiximab wurde nach 30 und 54 Wochen an Hand der ACR-Kriterien beurteilt. Es konnte durch die Kombination von Methotrexat und Infiximab die Therapieansprechrate gegenüber einer Methotrexat-Monotherapie verdoppelt werden (Maini, 2004; Lipsky, 2000; Maini, 1999).

Die ASPIRE-Studie konnte zeigen, dass die Kombinationstherapie von Methotrexat und Infiximab bei Patienten mit früher rheumatoider Arthritis fortschreitende Gelenkerstörung verhindern kann und einer Monotherapie mit Methotrexat überlegen ist (Maini, 1999; St Claire, 2004; Maini, 2004). Eine im Jahre 2005 veröffentlichte Studie (the BeSt Study) konnte ebenfalls zeigen, dass die Kombinationstherapie von DMARD mit Prednisolon oder Infiximab eine frühe Verbesserung der Funktionsfähigkeit und eine geringere Gelenkschädigung nach einem Jahr zur Folge hat (Goekoop-Ruiterman, 2005).

5.1.1. Etanercept (Enbrel®)

Etanercept ist ein menschliches TNF-Rezeptor-p75-Fc-Fusionsprotein (Kalden, 2002; Moreland, 1999), welches seit Februar 2000 eine Zulassung als Immunsuppressivum bei rheumatoiden Erkrankungen, Psoriasis-Arthritis, sowie des Morbus Bechterew besitzt.

Etanercept besteht aus 934 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 150kDa (Fachinfo Enbrel® 25mg / 50 mg). Etanercept ist strukturell sehr ähnlich aufgebaut wie das Fusionsprotein, welches in dieser Arbeit untersucht wurde. Es ist ein dimeres chimäres

Protein, bestehend aus dem extrazellulären Ligandenbindungsdomäne des humanen Tumornekrosefaktor-Rezeptors 2 (p75) und dem Fc-Teil des IgG1-Antikörpers des Menschen (Moreland, 2002). An diese Punkt unterscheidet sich Entanercept von dem Fusionsprotein, da hier der TNFR-p75 von der Maus angehängt ist. Etanercept hat die Möglichkeit, sowohl TNF als auch Lymphotoxin zu binden (Taylor, 2003).

Im Rahmen der Indikation rheumatoide Arthritis, eine der häufigsten entzündlichen Erkrankungen der Gelenke mit einer Prävalenz von ca. 0,5 bis 1 % der Weltbevölkerung, zeigte sich in mehreren multizentrischen, randomisierten, doppelverblindeten Studien, dass es zu einer Reduktion der ACR (= American College of Rheumatology)-Klassifikationkriterien von 1987 kam (Moreland, 1997; Moreland, 1999; Kalden, 2002; Genovese, 2002). Zu diesen Kriterien zählen Morgensteifigkeit von mindestens einem Gelenk für mindestens eine Stunde, Gelenkentzündungen in mindestens drei verschiedenen Gelenkregionen, sowie an Hand- oder Fingergelenken, beidseitige Gelenkentzündung derselben Gelenke beider Körperhälften, Rheumaknoten, Nachweis von Rheumafaktor, radiologische Veränderungen der Gelenke.

Ebenso zeigte sich, dass Etanercept in Kombination mit Metotrexat (MTX) eine gute Verträglichkeit besitzt und einer Monotherapie mit MTX überlegen ist (Weinblatt, 1999; Bathon, 2000).

Weiterhin findet Etanercept bei der polyartikulären juvenilen idiopathischen Arthritis, der Arthritis psoriatica und des Morbus Bechterew Anwendung (Kalden, 2002).

Etanercept findet zur Zeit eine Anwendung von 25 mg zweimal die Woche oder 50 mg einmal die Woche.

5.2 Molekulargewicht des Fusionsproteins

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass ein Protein von den transfizierten Ag8-Zellen produziert wurde. Dieses Protein wurde sowohl im ungereinigten Zellüberstand sowie nach Reinigung in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen.

Das Fusionsprotein besteht aus zwei Teilen. Zum einen aus der Extrazellulärdomäne des Maus-p75TNFR und zum anderen aus dem Fc-Teil des IgG. Das Molekulargewicht des Fusionsproteins ergibt sich somit als Summe aus den Molekulargewichten der beiden Bestandteile. Der Fc-Teil des humanen IgG besteht aus 232 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 26kDa (Carosella, 1988, Michaelsen, 1971). Die Extrazellulärdomäne des Maus-p75TNFR hat ein Molekulargewicht von ca. 50kDa. Hieraus ergibt sich, dass das Fusionsprotein ein Molekulargewicht von ca. 76kDa hat und auch in der SDS-PAGE bei ca. 76kDa erscheint. Es lässt sich somit aussagen, dass das Fusionsprotein in der erwarteten molekularen Größe produziert wurde.

5.3 Antigenstruktur des Proteins und Erkennung durch Antikörper gegen mTNFRp75 und Fc-IgG

Bei dem Fusionsprotein wurde davon ausgegangen, dass es aus zwei Anteilen besteht, einem Fc-Anteil eines Immunglobulin G1 und dem extrazellulären Anteil des murinen-TNFRp75.

Eine Detektion des Fusionsproteins, mit entsprechenden Antikörpern, ist somit sowohl über den mTNFR-p75 als auch über den Fc-IgG-Teil möglich.

Zur Klärung der Frage, ob das Protein überhaupt in dieser erwarteten Struktur produziert wurde, wurden sowohl Western Blots mit Antikörpern gegen den mTNFRp75-Anteil, als auch gegen den Fc-IgG-Anteil durchgeführt. Es wurde hierbei auf Antikörper zurückgegriffen, welche bereits vielfach zur Detektion eingesetzt worden sind (Pennica, 1992).

In beiden Fällen konnte ein positiver Nachweis geführt werden. Somit lässt sich der Schluss zu, dass das Fusionsprotein, wie erwartet, einen mTNFRp75- und einen Fc-IgG-Teil hat.

Da es bei Verwendung eines Antikörpers, welcher gegen den mTNFRp75-Anteil gerichtet ist, zu einer Detektion des Fusionsproteins im Western Blot gekommen ist, kann man erwarten, dass dieser Anteil des Fusionsproteins auch die Fähigkeit zur Bindung an ein passendes Gegenstück besitzen und nicht grundsätzlich seine Bindungsfähigkeit verloren hat.

5.4 Erklärungsversuche für das Fehlen der biologischen Wirksamkeit des Proteins

Wie bisher beschrieben, konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein zum einen in der berechneten molekularen Größe mit 76kDa produziert wurde und auch in der erwarteten Antigenstruktur vorhanden ist. Ebenso konnte dargestellt werden, dass sowohl der Fc-IgG-Anteil, aber vor allem auch der TNFRp75-Anteil eine Bindungsfähigkeit für entsprechende Antikörper besitzen, da sie durch speziell gegen sie gerichtete Antikörper in den Western Blots detektiert werden konnten. Eine grundsätzliche Bindungsfähigkeit sollte also gegeben sein. In den TNF-Zytotoxizitäts-Tests und dem TNF-ELISA-Bindungstest wurde jedoch gezeigt, dass das Fusionsprotein die biologische Wirkung von TNF nicht vermindert oder gar ganz inhibiert, wie es bei anderen TNF-Blockern schon gezeigt werden konnte (Bigda, 1994) und wie es bei den in der Klinik bereits eingesetzten TNF-Blockern der Fall ist (Moreland, 1997; Weinblatt, 1999; Mease, 2000). Im Gegenteil wurde eine verstärkte zytotoxische Wirkung gemessen.

Das Fusionsprotein hat nicht die biologische Fähigkeit, TNF zu binden. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsversuche:

5.4.1. Sequenzfehler / Mutation im TNF-Bindungsbereich und potentielle Sequenzierung des Fusionsproteins

Einer der Erklärungsversuche setzt bei der DNA des TNFRp75 und damit der Primärstruktur des Fusionsproteins an. Die initial verwendeten Nukleinsäuren, welche in die Ag8-Zellen durch Transfektion eingeschleust wurde und zur Sezernierung des Fusionsproteins führen sollte, kann von Anfang an oder erworben durch während der Transfektion aufgetretene Veränderungen Mutationen in sich getragen haben. Würden diese Mutationen nun in einem Bereich aufgetreten sein, in dem die Aminosäurenabfolge des TNF-Bindungsbereiches des Proteins codiert ist, so würde sich daraus eine Veränderung der Bindungsfähigkeit ergeben.

Hierbei würde das Protein in der erwarteten Antigenstruktur produziert werden. Ebenso würde es keine Veränderung in der Molekularmasse geben. Die Bindungsfähigkeit im Nachweis des Proteins über einen Fc-Fragment-Antikörper wäre dabei nicht beeinflusst. Auch der Nachweis des Proteins über einen gegen den TNFR-p75 gerichteten Antikörper ebenso unbeeinflusst sein. Lediglich die spezifische Bindung an TNF könnte beeinflusst sein und damit eine Bindung von Protein und TNF unterbinden.

Zur Klärung, ob es hierdurch zu einer fehlenden TNF-Bindung gekommen ist, wäre es nötig, eine Sequenzierung des Fusionsproteins durchzuführen. Hierdurch würde man die Aminosäurenabfolge sehen und klären können, ob es hierbei zu einer Abweichung von der ursprünglichen Nukleinsäure gekommen ist.

5.4.2. Fehlfaltung des Proteins im Bindebereich

Für die Funktion von Proteinen und damit auch für die Funktion des Fusionsproteins ist es notwendig, dass das Protein in einer zu Bindung fähigen Konformation vorliegt (Abbas, 2000). Im vorliegenden Fall kann es nun möglich sein, dass das Protein im TNF-Bindungsbereich bereits mit einer Fehlfaltung (= veränderten Sekundärstruktur) produziert wurde. Dies kann zum einen auf dem Boden einer veränderten Primärstruktur (siehe 5.4.1) und damit veränderten Wasserstoffbrückenbindungen geschehen sein. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es durch die Kultivierung oder Aufreinigung zu einer partiellen oder vollständigen Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen gekommen ist und somit es zu einer sekundären Fehlfaltung, also Veränderung der Sekundärstruktur, gekommen ist.

Je nach Ausmaß der Fehlfaltung wäre dann die TNF-Bindungsfähigkeit eingeschränkt oder aufgehoben. Bei nur geringen Veränderungen in der Faltung könnte es möglich sein, dass das Fusionsprotein seine Bindungsfähigkeit bezüglich der Antikörper gegen den TNFRp75-, bzw. den Fc-IgG-Anteil im Western Blot behält, aber seine spezifische Bindungsfähigkeit gegenüber TNF verliert.

Um zu klären, ob eine etwaige Fehlfaltung bereits von Anfang an vorhanden war, wäre, wie bereits oben erwähnt, eine Sequenzierung hilfreich. Hierdurch würde man die genaue Aminosäureabfolge kennen, damit auch die auftretenden Wasserstoffbrückenbindungen und es wäre ersichtlich, ob es zu einer veränderten Faltung gekommen ist.

Um zu klären, ob es zu einer sekundären Fehlfaltung gekommen ist, wäre die Durchführung einer Röntgenstrukturanalyse möglich, wodurch die vorhandene Faltung ersichtlich wäre. Bei einer unauffälligen Primärstruktur in der Sequenzierung und einer veränderten Faltung wäre eine erworbene Fehlfaltung durch Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen während der Kultivierung oder Aufreinigung des Proteins möglich.

5.4.3. Interaktion zwischen mTNFRp75 und hTNF

Letztendlich ergibt sich als eine weitere Erklärung für die TNF-Bindungsunfähigkeit eine Interaktion zwischen dem maus-TNFRp75 und dem humanen TNF.

Es besteht die Möglichkeit, dass der von der Maus stammende Rezeptor das vom Menschen stammende TNF nicht binden kann (Bäumel, 2008; Vandenbeele, 1995; Sheehan, 1995).

5.5 Erklärungsversuche für die stärkere toxische Wirkung des Fusionsproteins im Zytotoxizitätsassay

In den Zytotoxizitätsassays wirkte das Fusionsprotein zusammen mit TNF zytotoxischer, als TNF alleine. Eine Erklärung hierfür wäre, dass in dem Fusionsproteinpräparat eine toxische Komponente enthalten ist, welche selbst, oder zusammen mit dem TNF zytotoxisch wirkt. Sowol das Fusionsprotein vor, als auch nach der Aufreinigung zeigt diese stärkere zytotoxische Wirkung, so dass davon auszugehen ist, dass eine toxische Komponente bereits von Anfang an enthalten war und nicht erst durch den Aufreinigungsprozess hinzugekommen ist.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass die durch Transfektion zur Sekretion gebrachten Ag8-Zellen das gewünschte Fusionsprotein, bestehend aus einem Fc-Teil und einem Anti-p75-Teil, erfolgreich bilden.

Dieses Fusionsprotein ist auch molekular vollständig in dem gewonnen Eluat enthalten und wurde damit nicht in unvollständiger Weise sezerniert oder bereits in der Zellkultur oder in den Verarbeitungsgängen gespalten.

Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass das vorliegende Fusionsprotein mit seinem murinen-TNFRp75-Teil nicht im Stande ist, humanes TNF zu binden und damit die biologische Wirkung von TNF aufzuheben.

Auf Grund dessen lässt sich der Schluss ziehen, dass das Fusionsprotein vorhanden, aber biologisch inaktiv in Bezug auf Bindung an humanes TNF ist.

7 Literaturverzeichnis

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pober J. S. 1996. Immunologie, Verlag Hans Huber, Bern.

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pober J. S. 2000. Cellular and molecular immunology. W. B. Saunders company.

Aderka D. 1996. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors.
Cytokine Growth Factor Rev; 7: 231 – 240.

Aderka D., Engelmann H., Hornik V., Skornick Y., Levo Y., Wallach D., Kushtai G. 1991. Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. Cancer Res; 51: 5602 – 5607.

Aderka D., Wysenbeek A., Engelmann H., Cope A.P., Brennan F., Molad Y., Hornik V., Levo Y., Maini R.N., Feldmann M. 1993. Correlation between serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor and disease activity in systemic lupus erythemathodes. Arthritis Rheum; 36: 1111 – 1120.

Aggarwal B. B., Eessalu T. E., Haas P. E. 1985. Characterization of receptors of human tumor necrosis factor and their regulation by γ -interferon. Nature; 318: 231 – 237.

Aggarwal B. B., Kohr W. J., Hass P. E., Moffat B., Spencer S. A., Henzel W. J., Bringman T. S., Nedwin G. E., Goeddel D. V., Harkins R. N. 1985. Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization. J Biol Chem; 260: 2345 – 2354.

Aggarwal B. B., Natarajan K. 1996. Tumor necrosis factor: developments during the last decade. Eur Cytokine Netw; 7: 93 – 124.

Akassoglou K, Douni E., Bauer J., Lassmann H., Kollias G., Probert L. 2003. Exclusive TNF signalling by the p75TNFR triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. PNAS 21.01.2003; vol. 100; no. 2, 709 – 714.

Aksentijevich I., Galon J., Soares M., Mansfield E., Hull K., Oh H. H., Goldbach-Mansky R., Dean J., Athreya B., Reginato A.J., Henrickson M., Pons-Estel B., O'Shea J. J., Kastner D. L. 2001. The tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrom: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. Am J Hum Genet; 69: 301 – 314.

Angus D. C., Linde-Zwirble W. T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J., Pinsky R. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United State: Analysis of incidence, outcome and associated costs of care. Crit Care Med; Vol. 29, No. 7.

Antoni C. E., Kavanaugh A., Kirkham B., Tutuncu Z., Burgmester G. R., Schneider U., Furst D. E., Molitor J., Keystone E., Gladman D., Manager B., Wassenberg S., Weier R., Wallace D. J., Weiman M. H., Kalden J. R., Smolen J. 2005. Sustained benefits of infliximab therapy for dermatologic and articular manifestations of psoriatic arthritis: results from the infliximab multinational psoriatic arthritis controlled trial (IMPACT). *Arthritis Rheum*; 52 (9): 2951.

Antoniu S. 2006. Infliximab for chronic obstructive pulmonary disease: towards a more specific inflammation targeting? *Expert Opin Investig Drugs*; 15 (2): 181 - 184.

Aukrust P., Liabakk N. B., Muller F., Lien E., Espevik T., Froland S. S. 1994. Serum level of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) and soluble TNF receptors in human immunodeficiency virus type 1 infection: correlations to clinical, immunologic and virologic parameters. *J Infect Dis*; 169: 420 – 424.

Banner D. W., D Acry A., Chéne C., Winkler F. K., Guha A., Konigsberg W. H., Nemerson Y., Kirchhofer D. 1997. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF β complex: implication for TNF receptor activation. *Cell*; 73: 431 – 445.

Barasch J. 2003. TNF α and its soluble receptor (sTNFR) p75 during acute human parvovirus B 19 infection in children. *Immunology Letters*; 88 (2003): 109 – 112.

Bartholdy C., Nanasen A., Marker O., Thomsen A. R. 1999. Soluble TNFR-levels in serum as markers of anti-viral host reactivity. *Clin Exp Immunol*; 116: 299 – 306.

Bathon J. M., Martin R. W., Fleischmann R. M., Tesser J. R., Schiff M. H., Keystone E. C., Genovese M. C., Wasko M. C., Moreland L. W., Weaver A. L., Markenson J., Fink B. K. 2000. A comparison of Etanercept and MTX in patients with early RA. *N Engl J Med*; 343: 1586 – 1593.

Bäumel M., Lechner A., Hehlhans T., Männel D.N. Enhanced susceptibility to Con A-induced liver injury in mice transgenic for the intracellular isoform of human TNF receptor type 2. *J Leukoc Biol*; 84 (1): 162 – 169.

Behm, V.W., Bickston S.J. 2008. Tumor necrosis factor-alpha antibody for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systemic Reviews*. Issue 1. Art.No.: CD006893.

Bethea J. R., Ohmori Y., Hamilton T. A. 1997. A tandem GC Box motif is necessary for LPS-induced transcription of the type II TNFR gene. *J Immunol*; 158: 5815 – 5823.

Bigda J., Beletsky I., Brakebusch C., Varfolomeey Y., Engelmann H., Holtmann H., Wallach D. 1994. Dual role of the p75 TNFR in TNF cytotoxicity. *J Exp Med*; 180: 445 – 460.

- Black R. A., Rauch C. T., Kozlosky C. J., Peschon J. J., Slack J. L., Wofson M. F., Castner B. J., Stocking K. L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K. A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J. N., Johnson R. S., Paxton R. J., March C. J., Cerretti D. P.** 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumor necrosis factor alpha from cells. *Nature*; 385: 729 – 733.
- Blumenauer B.B.T.B., Cranney A., Burls A., Coyle D., Hochberg M.C., Tugwell P., Wells G.A.** 2003. Etanercept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Cochrane Database of Systemic Reviews*; Issue 3. Art. No.: CD004525.
- Bozkurt B., Torre-Amione G., Warren M. S., Whitmore J., Soran O. Z., Feldmann A. M., Mann D. L.** 2001. Results of targeted anti-TNF-Therapy with Etanercept in patients with advanced heart failure. *Circulation*; 103: 1044 – 1047.
- Brennan F. M., Feldmann M.** 1992. TNF α – a pivotal role in rheumatoid arthritis? *Br J Rheuma*; 31: 293 – 298.
- Brennan A., Bansback N., Reynolds A., Conway P.** 2004. Modelling the cost-effectiveness of etanercept in adults with RA in the UK. *Rheumatology*; 43: 62 – 72.
- Brown, S. J., Abreu M. T.** 2005. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha in the treatment of Crohn's disease. *Curr Opin Drug Discov Devel*; 8(2): 160 – 168.
- Byung Suk K., Byung-S. Y., Byoung S. K.** 1999. Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor / ligand superfamilies in lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*; 11: 340 – 345.
- Calin A, Dijkmans B. A., Emery P., Hakala M., Kalden J., Leirisalo-Repo M., Mola E. M., Salvarani C., Sanmarti R., Sany J., Silbilia J., Sieper J., van der Linden S., Veys E., Appel A. M., Fatenejad S.** 2004. Outcomes of a multicentre randomised clinical trial of etanercept to treat ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*; 63 (12): 1594 - 600.
- Carosselo E.D., Gay C., Armand J., Touraine J.L.** 1988. Human B-cell differentiation by Fc-Fragment of IgG. I. Fc-Fragment from human IgG induces plasma cell generation but cannot induce lymphocyte proliferation. *Cell Immunol*; 112(2): 262 – 270.
- Carswell E. A., Old L. J., Kassel R. L., Green S., Fiore N., Williamson B.** 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 72: 3666 – 3670.
- Cassano N., Loconsole F., Coviello C., Vena G. A.** 2006. Infliximab in recalcitrant severe atopic eczema associated with contact allergy. *Int J Immunopathol Pharmacol.*; 19(1): 237 - 40.

- Cerami A., Ikeda Y., Le Trang N., Hotez P. J., Beutler B.** 1985. Weight loss associated with an endotoxin-induced mediator from peritoneal macrophages: the role of cachectin (tumor necrosis factor).
Immunol Lett; 11 (3 - 4): 173 – 177.
- Coley W. B.** 1893. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases.
Am J Med Sci; 487 – 491.
- Cope A. P., Aderka D., Doherty M., Engelmann H., Gibbons D., Jones A. C., Brennan F. M., Maini R. N., Wallach D., Feldmann M.** 1992. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptor in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases.
Arthritis Rheum; 35: 1160 – 1169.
- Davis J. C. Jr.** 2002. The role of etanercept in ankylosing spondylitis.
Clin Exp Rheumatol; 20 (6): 111 – 115.
- Davis J. C., van der Heijde D., Braun J., Dougados M., Cush J., Clegg D. O., Kivitz A., Fleischmann R., Inman R., Tsuji W., Enbrel Ankylosing Spondylitis Study Group.** 2003. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis.
Arthritis Rheum; 48 (11): 3230 – 3236.
- Davis J. C. Jr., Huang F., Maksymowych W.** 2003. New therapies for ankylosing spondylitis: etanercept, thalidomide, and pamidronate.
Rheum Dis Clin North Am; 29 (3): 481 - 494.
- Dembic Z., Loetscher H., Gubler U., Pan Y. C., Lahm H. W., Gentz R., Brockhaus M., Lesslauer W.** 1990. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences.
Cytokine; 2: 231 – 237.
- Crowe P. D., Van Arsdale T. L., Goodwin R. G., Ware C. F.** 1993. Specific induction of 80-kDa tumor necrosis factor receptor shedding in T-lymphocytes involves the cytoplasmic domain and phosphorylation.
J Immunol; 151: 6882 – 6890.
- Deswal A., Bozkurt B., Seta Y., Pariliti-Eiswirth S., Hayes F. A., Blosch C., Mann D. L.** 1999. Safety and Efficacy of a soluble p75 TNFR (Etanercept) in patients with advanced heart failure.
Circulation; 99: 3224 – 3226.
- Eggermont A. M., Schraffordt K. H., Klausner J. M., Lienard D., Kroon B. B., Schlag P. M., Ben Ari G., Lejeune F. J.** 1997. Isolation limb perfusion with tumor necrosis factor alpha and chemotherapy for advanced extremity soft tissue sarcomas.
Semin Oncol; 24: 547 – 555.
- Eigler A., Sinha B., Hartmann G., Endres S.** 1997. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine.
Immunol Today; 18: 487 – 492.

Elliott M. J., Maini R. N., Feldmann M., Long-Fox A., Charles P., Katsikis P., Brennan F. M., Walker J., Bijl H., Ghrayeb J. 1993. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to TNFalpha. *Arthritis Rheum*; 36: 1681 – 1690.

Elliott M. J., Maini R. N., Feldmann M., Kalden J. R., Antoni C., Smolen J. S., Leeb B., Breedveld F. C., Macfarlane J. D., Bijl H. 1994. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to TNFalpha versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet*; 344: 1105 – 1110.

Epidemiologisches Bulletin, Nr. 35; Robert-Koch-Institut; August 2003.

Erickson S. L., de Sauvage F. J., Kikly K., Carver-Moore K., Pitts-Meek S., Billett N., Sheehan K. C., Schreiber R. D., Goeddel D. V., Moore M. W. 1994. Decreased sensitivity to tumor necrosis factor but normal T-cell development in TNF-receptor-2-deficient mice. *Nature*; 372: 560 – 563.

Feldmann M., Brennan F. M., Maini R. N. 1996. Role of cytokines in RA. *Annu Rev Immunol*; 14: 397 – 440.

Feldmann M., Maini R. N. 2001. Anti-TNFalpha therapy of rheumatoid arthritis: What have we learned? *Annu Rev Immunol*; 19: 163 – 196.

Finckh A., Simard J. F., Gabay C., Guerne P. A. 2005. Evidence for differential acquired drug resistance to anti-tumour necrosis factor agents in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*; 65(6): 746 - 52.

Franchini M., Manzato F., Salvano G.L., Montagnan M., Zaffanello M., Lippi G. 2009. Prophylaxis in congenital hemophilia with inhibitors: the role of rekombinant activated factor VII. *Semin Thromb Hemost*; 35 (8): 814 – 819.

Fu Y. 2002. Regulation of TNFalpha promoter by human Parvovirus B 19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *Journal of Virology*; June 2002: 5395 – 5403.

Genovese M. C., Bathon J. M., Martin R. W., Fleischmann R. M., Tesser J. R., Schiff M. H., Keystone E. C., Wasko M. C., Moreland L. W., Weaver A. L., Markenson J., Cannon G. W., Spencer-Green G., Finck B. K. 2002. Etanercept vs. MTX in patients with early RA: 2-year radiographic and clinical outcomes. *Arthritis Rheum*; 46: 1443 – 1450.

Genevay S., Stingelin S., Gabay C. 2004. Efficacy of etanercept in the treatment of acute, severe sciatica: a pilot study. *Ann Rheum Dis*; 63: 1120 – 1123.

Gérain J., Liénard D., Pampallona S., Baumgartner M., Rüegg C., Buurman W. A., Eggermon A., Lejeune F. 1997. Systemic release of soluble TNF receptors after high-dose TNF in isolated limb perfusion. *Cytokine*; 9 (12): 1034 – 1042.

Goekoop-Ruitermann Y. P. M., de Vries-Bouwstra J. K., Allaart C. F., van Zeben D., Kerstens P. J. S. M., Hazes J. M. W., Zwinderman A. H., Roday H. K., Han K. H., Westedt M. L., Gerards A. H., van Groenendael J. H. L. M., Lems W. F., van Krugten M. V., Breedveld F. C., Dijkmans B. A. C. 2005. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid Arthritis (the BeSt Study). *Arthritis Rheum*; 52: 3381 – 3390.

Grell M., Becke F. M., Wajant H., Männel D. N., Scheurich P. 1998. TNFR type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNFR type 1. *Eur J Immunol*; 28: 257 – 263.

Gunterberg B. 1997. Is limb amputation necessary for locally advanced soft tissue sarcomas? *European Journal of Cancer*; 33 (14): 2295 – 2301.

Hanauer S.B., Reagan B.G., Lichtenstein G.R., Myer L.F., Schreiber S., Colombel J.F., Rachmilewitz D., Wolf D.C., Olson A., Bao W., Rugeerts P. 2002. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*; 359: 1514 – 1549.

Hanauer S. B., Sandborn W. J., Rutgeerts P., Fedorak R. N., Lukas M., MacIntosh D., Panaccione R., Wolf D., Pollack P. 2006. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology*; 130(2): 323 - 333.

Hedner U. 2010. History of rFVIIa therapy. *Thromb Res*. 125 Suppl 1: 4 – 6.

Hellon R., Townsend Y., Laburn H.P., Mitchell D. 1991. Mechanisms of fever. In: Schönbaum E., Lomax P. (eds) *Thermoregulation: pathology, pharmacology and therapy*. Pergamon, New York, pp 19 – 54.

Hober D., Benyoucef S., Delannoy A. S., DeGroot D., Ajana F., Mouton Y., Wattre P. 1996. High plasma level of soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFRII) in asymptomatic HIV-1-infected patients. *Infection*; 24: 213 – 217.

Hof H., Dörries R., Müller R. L. 2000. *Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Horneff G., Schmeling H., Biedermann T., Foeldvari I., Ganser G., Girschick H. J., Hospach T., Huppertz H. I., Keitzer R., Kuster R. M., Michels H., Moebius D., Rogalski B, Thon A. 2004. The German etanercept registry for treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*; 63 (12): 1683 – 1644.

Isaacs A., Hitchcock G. 1960. Role of interferon in recovery from virus infections. *Lancet*; 2: 69 – 71.

- Jacobsen F. W., Dubois C. M., Rusten L. S., Veiby O. P., Jacobsen S. E.** 1995. Inhibition of stem cell-factor-induced proliferation of primitive murine hematopoietic progenitor cells signalled through the 75-kD TNFR.
The Journal of Immunology; 154: 3732 – 3741.
- Janeway C.A., Trauers P., Walport M., Shlomichik M.** 2002. Immunologie, 5. Auflage, Heidelberg, Berlin. Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Junqueira L. C., Carneiro J.** 1997. Histologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Kageyama Y., Takahashi M., Torikai E., Suzuki M., Ichikawa T., Nagafusa T., Koide Y., Nagano A.** 2006. Treatment with anti-TNF-alpha antibody infliximab reduces serum IL-15 levels in patients with rheumatoid arthritis.
Clin Rheumatol; 26(4): 505 - 509.
- Kalden J.** 2002. Emerging role of anti-TNF-Therapy in rheumatic diseases.
Arthritis Research; 4 (suppl. 2): 34 – S.40.
- Karppinen J., Korhonen T., Malmivaara A.** 2003. Tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, infliximab, used to manage severe sciatica.
Spine; 28: 750 – 753.
- Kenton King M., Wood W. B.** 1957. Studies on the pathogenesis of fever: V. The relation of endogenous pyrogen to the fever of acute bacterial infections.
J Exp Med; 107: 305 – 318.
- Kerr J. R., Barah F., Matthey D. L., Laing I., Hopkins S. J., Hutchinson I. V. Tyrrell D. A.** 2001. Circulating TNF- α and Interferon- γ are detectable during acute and convalescent parvovirus B-19 infection and are associated with prolonged and chronic fatigue.
J Gen Virol; 82: 3011 – 3019.
- Keystone E.C.** 2004. The utility of tumour necrosis factor blockade in orphan diseases.
Ann Rheum Dis; 63 Suppl 2: ii79 - ii83.
- Kirchner H., Kruse A., Neustock P., Rink L.** 1993. Cytokine und Interferone.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelber.
- Kluger M.J.** 1979. Fever, its biology, evolution and function.
Princeton University Press, New Jersey.
- Kluger M.J.** 1991. Fever: role of pyrogens an cryogens.
Physol Rev; 71: 93 – 127.
- Kollias G., Sfrikakis P.P.** 2010. TNF Pathophysiology. Molecular and Cellular Mechanisms.
Curr Dir Autoimmun; 11: 180 – 210.
- Korzenik J. R.** 2004. Crohn's disease: future anti-tumor necrosis factor therapies beyond infliximab.
Gastroenterol Clin North Am; 33 (2): 285 – 301.

Lantz M., Bjornberg F., Olsson I., Richter J. 1994. Adherence of neutrophils induces release of soluble tumor necrosis factor receptor forms.
J Immunol; 152: 1362 – 1369.

Lees K.R., Bluhmki E., von Kummer R., Brott T.G., Toni D., Grotta J.C., Albers G.W., Kaste M., Marler J.R., Hamilton S.A., Tilley B.C., Davis S.M., Donnan G.A., Hacke W.; ECASS, ATLANTIS, NINDS and EPITHET rt-PA Study Group, Allen K., Mau J., Meier D., del Zoppo G., De Silva D.A., Butcher K.S., Parsons M.W., Barber P.A., Levi C., Bladin C. Byrnes G. 2010. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS and EPITHET trials.
Lancet; 375 (9727): 1667 – 1668.

Lindenmann J., Burke D. C., Isaacs A. 1957. Studies on the production, mode of action and properties of interferon.
Br J Exp Pathol; 38 (5): 551 – 562.

Lipsky P. E., van der Heijde D. M., St. Clair E. W., Furst D. E., Breedveld F. C., Kalden J. R., Smolen J. S., Weisman M., Emery P., Feldmann M., Harriman G. R., Maini R. N. 2000. Infliximab and MTX in the treatment of RA.
N Engl J Med; 343: 1594 – 1603.

Löffler G., Petrides P. E. 1997. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Loetscher H., Pan Y. C., Lahm H. W., Gentz R., Brockhaus M., Tabuchi H., Lesslauer W. 1990. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor.
Cell; 61: 351 – 359.

Lorenz H., Kalden J. 2002. Perspectives for TNF- α -targeting therapies.
Arthritis Research; 4 (suppl. 3): 17 – 24.

Lovell D. J. 2000. Etanercept in children with polyarticular juvenile RA.
NEngJMed; 342: 763 – 769.

Madhani J., Movsowitz H., Kotler M.N. 1993. Tissue plasminogen activator (t-PA).
Ther Drug Monit; 15 (6): 546 – 551.

Männel D. N. 1986. Biological aspects of tumor necrosis factor.
Immunobiology; 172 (3 - 5): 283 – 290.

Männel D.N., Echtenacher B. 2000. TNF in the inflammatory response.
Chem Immunol; 74: 141 – 161.

Maini R. N., Breedveld F. C., Kalden J. R., Smolen J. S., Davis D., Macfarlane J. D., Antoni C., Leeb B., Elliott M. J., Woody J. N., Schaible T. F., Feldmann M. 1998. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-TNF α monoclonal antibody combined with low-dose weekly MTX in RA.
Arthritis Rheum; 41: 1552 – 1563.

- Maini R. N., St. Clair E. W., Breedveld F., Furst D., Kalden J., Weisman M., Smolen J., Emery P., Harriman G., Feldmann M., Lipsky P.** 1999. Infliximab (chimeric anti-TNF factor a monoclonal antibody) versus placebo in RA patients receiving concomitant MTX: a randomised phase III trial. *Lancet*; 354: 1932 – 1939.
- Maini R.N., Breedveld F.C., Kalden J.R. et. al.** 2004. Anti-Tumor-Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. Sustained improvement over two years in physical function, structural damage, and signs and symptoms among patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and methotrexate. *Arthritis Rheum*; 50: 1051 – 1065.
- Martin G. S., Mannino D. M., Eaton S., Moss M.** 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*; 348: 1546 – 1554.
- Mease P. J., Goffe B. S., Metz J., Van der Stoep A., Finck B., Burge D. J.** 2000. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet*; 356: 385 – 390.
- Michaelsen T.E., Natvig J.B.** 1971. Isolation and characterization of IgG subclass proteins and Fc-Fragment from normal human IgG. A method for utilizing “non a” and “non g” as genetic markers. *Immunochemistry*; 8(3): 235 – 242.
- Miheller P., Muzes G., Zagoni T., Toth M., Racz K., Tulassay Z.** 2006. Infliximab therapy improves the bone metabolism in fistulizing Crohn's disease. *Dig Dis*; 24(1-2): 201 - 206.
- Mohler K. M., Torrance D. S., Smith C. A., Goodwin R. G., Stremler K. E., Fung V. P., Madani H., Widmer M. B.** 1993. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol*; 151: 1548 – 1561.
- Moreland L. W., Baumgartner S. W., Schiff M. H., Tindall E. A., Fleischmann R. M., Weaver A. L., Ettliger R. E., Cohen S., Koopman W. J., Mohler K., Widmer M. B., Blosch C. M.** 1997. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human TNF-Receptor (p75)-Fc-fusion-protein. *N Engl J Med*; 337: 141 – 147.
- Moreland L. W., Schiff M. H., Baumgartner S. W., Tindall E. A., Fleischmann R. M., Bulpitt K. J., Weaver A. L., Keystone E. C., Furst D. E., Mease P. J., Ruderman E. M., Horwitz D. A., Arkfeld D. G., Garrison L., Burge D. J., Blosch C. M., Lange M. L., McDonnell N. D., Weinblatt M. E.** 1999. Etanercept Therapy in RA – A randomised, controlled Trial (Etanercept = Enbrel®). *Ann. Intern Med*; 130: 478 – 486.
- Moreland L. W.** 2004. Biologic therapies on the horizon for rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol*; 10: 32 - 39.

- Moriya N., Miwa H., Orita K.** 1984. Antitumor effects of bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in mice.
Surgery today; 14 (2): 163 – 166.
- Moss M. L., Jin S. L., Milla M. E.** 1997. Cloning a disintegrin metalloprotease that processes precursor tumor-necrosis factor- α from cells.
Nature; 385: 733 – 736.
- Nedwin G. E., Naylor S. L., Sakaguchi A. Y.** 1985. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization.
Nucleic Acids Res; 13: 6361 – 6373.
- Noguchi M.** 1998. Secretion imbalance between TNF and inhibitors in inflammatory bowel disease.
Gut; 43: 203 – 209.
- Owen-Schaub L. B., Crump W. D., Morin G. I., Grimm E. A.** 1998. Regulation of lymphocyte tumor necrosis factor receptors by IL-2.
J Immunol; 143: 2236 – 2241.
- Paul W. E.** 1999. Fundamental Immunology, Fourth Edition.
Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia.
- Pennica D., van Lam T., Mize N. K., Weber R. F., Lewis M., Fendly B. M., Lipari M. T., Goeddel D. V.** 1992. Biochemical Properties of the 75-kDa Tumor Necrosis Factor Receptor.
J Biol Chem; 267: 21171 – 2178.
- Petersdorf R. G., Keene W. R., Bennett I. L.** 1957. Studies on the pathogenesis of fever: IX. Characteristics of endogenous serum pyrogen and mechanisms governing its release.
J Exp Med; 106: 787 – 809.
- Pfeffer K., Matsuyama T., Kundig T. M., Wakeham A., Kishihara K., Shahinian A., Wiegmann K., Ohashi P. S., Kronke M., Mak T. W.** 1993. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection.
Cell; 73: 457 – 467.
- Rankin E. C., Choy E. H., Kassimos D., Kingsley G. H., Sopwith A. M., Isenberg D. A., Panayi G. S.** 1995. The therapeutic effects of an engineered human anti-tumour necrosis factor alpha antibodies (CDP571) on RA.
Br J Rheuma; 34: 334 – 342.
- Reinemer P., Sebald W., Duchl A.** 2000. Der Interleukin-4-Rezeptor: vom Erkennungsmechanismus zur pharmakologischen Zielstruktur.
Angew Chem; 112: 2954 – 2966.
- Riedemann N. C., Guo R., Ward P. A.** 2003. The enigma of sepsis.
J Clin Invest; 112: 460 – 467.

- Roberts H.R., Monroe D.M., White G.C.** 2004. The use of recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding disorders.
Blood; 104: 3858 - 3864.
- Rothe J., Lesslauer W., Lotscher H., Lang Y., Koebel P., Kontgen F., Althage A., Zinkernagel R., Steinmetz M., Bluethmann H.** 1993. Mice lacking the tumor necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infections by *Listeria monocytogenes*.
Nature; 364: 798 – 802.
- Rothe M., Wong S. C., Henzel W. J., Goeddel D. V.** 1994. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor.
Cell; 78: 681 – 692.
- Rostoker G., Rymer J. C., Bagnard G., Petit-Phar M., Griuncelli M., Pilatte Y.** 1998. Imbalance in serum proinflammatory cytokines and their soluble receptors: a putative role in the progression of idiopathic IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura nephritis, and a potential target of immunoglobulin therapy?
Clin Exp Immunol; 114: 468 – 476.
- Sandborn W. J.** 2005. New concepts in anti-tumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel diseases.
Rev Gastroenterol Disord; 5 (1): 10 – 18.
- Schroder J., Stuber F., Gallati H., Schade F. U., Kremer B.** 1995. Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis.
Infection; 23: 143 – 148.
- Seitz C., Männel D. N., Hehlhans T.** 1998. Isolation and functional characterization of the mouse p75TNFR promoter.
Genomics; 48: 111 – 116.
- Seitz C., Männel D. N.** 2001. A novel p75TNFR Isoform mediates NFκB activation.
The Journal of Biological Chemistry; 276: 19390 - 19395.
- Sheehan K., Pinckard J. K., Arthur C. D., Dehner L. P., Goeddel D. V., Schreiber R. D.** 1995. Monoclonal antibodies for murine p55 and p75 TNFR: Identification of a novel in vivo role for p75.
J Exp Med; 181: 607 – 617.
- Singh J.A., Christensen R., Wells G.A., Alvarez-Almazor M.E., Buchbinder R., Lopez-Olivio M.A., Tanjong Ghogomu E., Tugwell P.** 2009. Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews.
Cochrane Database Syst Rev. Nr. 4, S. CD007848.
- Smith R.A., Baglioni C.** 1987. The active form of tumor necrosis factor is a trimer.
Biol Chem; 262: 6951 – 6954.

- Smith C. A., Davis T., Anderson D.** 1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science*; 248: 1019 – 1023.
- Spies T., Morton C. C., Nedospasov S. A., Fiers W., Pious D., Strominger J. L.** 1986. Genes for the tumor necrosis factor alpha and beta are linked in the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA*; 83: 8699 – 8702.
- St Claire E.W., van der Heijde D.M., Smolen J.S., et al.** 2004. Active-controlled study of patients receiving infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis of early onset study group. Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum*; 52: 3432 -3434.
- Stevenson F. T., Bursten S. L., Lochsley R. M., Lovett D. H.** 1992. Myristyl acylation on the tumor necrosis factor alpha precursor on specific lysine residues. *J Exp Med*; 176: 1053 – 1062.
- Tartaglia L. A., Ayres T. M., Wong G. H., Goeddel D. V.** 1993. A novel domain within the 55kd TNF receptor signals cell death. *Cell*; 74: 845 – 853.
- Tartaglia L. A., Goeddel D. V., Reynolds C., Figari I. S., Weber R. F., Fendly B. M., Palladino M. A.** 1993. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol*; 151: 4637 – 4641.
- Taylor P.** 2003. Anti-TNFalpha therapy for rheumatoid arthritis: an up-date. *Internal Medicine*; 42: 15 – 20.
- Taylor P.C., Feldmann M.** 2009. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 5 (10): 578 – 582.
- Tsimberidou A.** 2003. Pilot study of rec. hum. STNFRp75-fusion-protein (TNFR:Fc; Enbrel) in patients with refractory multiple myeloma (myeloma = Plasmozytom). *Leukemia Research*; 27 (2003): 375 – 380.
- Tsujimoto M., Feinmann R., Kohase M., Vilcek J.** 1986. Characterization and affinity crosslinking of receptors for tumor necrosis factor on human cells. *Arch Biochem Biophys*; 249 (2): 563 – 568.
- Tsujimoto M., Yip Y. K., Vilcek J.** 1986. Interferon- γ enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J Immunol*; 136: 2441 – 2444.
- Tynjälä P., Lahdenne P., Vähäsalo P., Kautiainen H., Honkanen V.** 2006. Impact of anti-TNF therapy on growth in severe juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*; 65 (8): 1044 – 1049.

- Utsumi T., Takeshige T., Tanaka K., Takami K., Kira Y., Klostergaard J.** 2001. Transmembrane TNF (pro-TNF) is palmitoylated. *FEBS Lett*; 500: 1 – 6.
- Vandenabeele P., Declercq W., Beyaert R., Fiers W.** 1995. Two TNFR: structure and function. *Trends in cell biology*; vol. 5, October 1995.
- Vis M., Havaardsholm E. A., Haugenberg G., Uhlig T., Voskuyl A. E., van de Stadt R. J., Dijkmans B. A., Woolf A. D., Kvien T. K., Lems W. F.** 2006. Evaluation of bone mineral density, bone metabolism, osteoprotegerin and receptor activator of the NFkappaB ligand serum levels during treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*; 65 (11): 1495 – 1499.
- Wajant H., Pfizenmaier K., Scherich P.** 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*; 10: 45 – 65.
- Wallach D., Varfolomeey E. E., Malini N. L., Goltsev Y. V., Kovalenko A. V., Boldin M. P.** 1999. TNFR and Fas-signaling mechanism. *Annu. Rev Immunol*; 17: 331 – 367.
- Ware C. F., VanArsdale S., VanArsdale T. L.** 1996. Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families. *J Cell Biochem*; 60: 47 – 55.
- Weinblatt M. E., Kremer J. M., Bankhurst A. D., Bulpitt K. J., Fleischmann R. M., Fox R. I., Jackson C. G., Lange M., Burge D. J.** 1999. A trial of Etanercept, a recombinant TNF-Receptor: Rc fusion protein in patients with RA receiving MTX. *N Engl J Med*; 340: 253 – 259.
- Wiens A., Correr C.J., Pontarolo R., Venson R., Quinalha J.V., Otuki M.F.** 2009. A systemic review and meta-analysis of the efficacy and safety of Etanercept for treating rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Immunology*; 70: 337 – 344.
- Wingfield P., Pain R. H., Craig S.** 1987. Tumor necrosis factor is a compact trimer. *FEBS Lett*; 211 (2): 179 – 184.
- Zink A., Listing J., Kary S., Ramlau P., Stoyanova-Scholz M., Babinsky K., von Hinueber U., Gromnica-Ihle E., Wassenberg S., Antoni C., Herzer P., Kekow J., Schneider M., Rau R.** 2005. Treatment continuation in patients receiving biological agents or conventional DMARD therapy. *Ann Rheum Dis*; 2005; 64 (9): 1274 - 1279.
- Zylberberg H., Rimaniol A. C., Pol S., Masson A., De Grotte D., Berthelot P., Bach J. F., Bréchet C., Zavala F.** 1999. Soluble TNFR in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. *J of Hepatology*; 30: 185 – 191.

8 Danksagung

Bei allen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Daniela N. Männel für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Überlassung des interessanten Themas.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Markus J. Pausch