

Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper  
gegen die Anaphylatoxin-Rezeptoren

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Ziba Kifard  
aus Täbriz/Iran

Göttingen 2007

D 7

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Korreferentin: Frau PD Dr. Sigrid Hoyer-Fender

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2007

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Komplementsystem</b>	<b>1</b>
1.1.1 Biologische Funktion des Komplementsystems	2
<b>1.2 Das Anaphylatoxin C5a</b>	<b>2</b>
1.2.1 Der Rezeptor für das Anaphylatoxin C5a	4
1.2.2 C5L2-Rezeptor	4
1.2.3 C5aR-Expression auf myeloischen Zellen	4
<b>1.3 Das Anaphylatoxin C3a</b>	<b>5</b>
1.3.1 Der Rezeptor für das Anaphylatoxin C3a	6
1.3.2 C3aR-Expression auf myeloischen Zellen	7
<b>1.4 Expression der C5a- und C3a-Rezeptoren in verschiedenen Organen</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Ziel der Arbeit</b>	<b>11</b>
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>12</b>
2.1.1 Allgemeine Geräte	12
2.1.2 Allgemeine Labormaterialien	13
2.1.3 Allgemeine Chemikalien	13
2.1.3.1 Allgemeine Chemikalien, flüssig	13
2.1.3.2 Allgemeine Chemikalien, fest	14
2.1.4 Tiere	15
2.1.5 Stammlösungen und Standardpuffer	15
2.1.6 Medien für Bakterienkulturen	16
2.1.7 Bakterienstamm	17
2.1.8 Oligonukleotide	17
2.1.9 Vektor	18
2.1.10 Vorbereitung der Antikörper (FACS-Analyse)	18
2.1.11 Rekombinante humane C5a- und C3a-Proteine	20

<b>2.1.12 Zelllinien und Medien für die Zellkultur</b>	<b>20</b>
2.1.12.1 Zelllinien	20
2.1.12.2 Kulturmedien	21
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>23</b>
<b>2.2.1 Isolierung und Klonierung von cDNA</b>	<b>23</b>
2.2.1.1 Extraktion von Gesamt-RNA und Reverse Transkription (RT)	23
2.2.1.2 Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente mittels der RT-PCR	24
2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	25
<b>2.2.2 Vorbereitung von DNA zur Klonierung</b>	<b>26</b>
2.2.2.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
2.2.2.2 Phenol-Chloroformextraktion	26
2.2.2.3 Restriktionsverdau von DNA	27
2.2.2.4 Dephosphorylierung von DNA-Enden	27
2.2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten in dem Vektor pEF1/Myc-His A	28
2.2.2.6 Einbringung von Plasmid-DNA in Bakterien	28
2.2.2.6.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28
2.2.2.6.2 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	29
2.2.2.6.3 Positive Klone picken und expandieren	30
2.2.2.7 Kolonie-PCR	30
2.2.2.8 Minipräparation von Plasmid-DNA	31
2.2.2.9 Maxipräparation von Plasmid-DNA	31
2.2.2.10 Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA und RNA	31
2.2.2.10.1 Photometrische Analyse	31
2.2.2.10.2 Konzentrationsbestimmung über Vergleich mit Markerbanden im Gel	31
2.2.2.11 DNA-Sequenzierung	32
<b>2.3 Zellbiologische und proteinchemische Methoden</b>	<b>32</b>
<b>2.3.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen</b>	<b>32</b>
<b>2.3.2 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität</b>	<b>33</b>
<b>2.3.3 Lagerung eukaryotischer Zellen</b>	<b>33</b>
2.3.3.1 Einfrieren	33
2.3.3.2 Auftauen	34
<b>2.3.4 Transfektion eukaryotischer Zellen</b>	<b>34</b>
2.3.4.1 Elektroporation von RBL-2H3 Zellen	35
<b>2.3.5 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den humanen C5a- und den murinen C3a-Rezeptor</b>	<b>36</b>
2.3.5.1 Immunisierung der Ratten	36
2.3.5.2 Gewinnung der Milzzellen	36
2.3.5.3 Fusion von Ratte-B-Lymphoblasten mit der Maus-Myelomzelllinie P3X63Ag8/653	36
2.3.5.4 Klonierung positiver Hybridome	38
2.3.5.5 Präparation von Maus-Peritoneal-Makrophagen als Feederzellen	38

<b>2.3.6</b>	<b>Massenproduktion monoklonaler Antikörper</b>	<b>39</b>
<b>2.3.7</b>	<b>Isotypbestimmung monoklonaler Antikörper</b>	<b>39</b>
<b>2.3.8</b>	<b>Aufreinigung monoklonaler Antikörper</b>	<b>40</b>
2.3.8.1	Protein G-Affinitätschromatographie	40
<b>2.3.9</b>	<b>Fluorochromkopplung monoklonaler Antikörper</b>	<b>42</b>
<b>2.3.10</b>	<b>Photometrische Bestimmung der Antikörperkonzentration</b>	<b>43</b>
<b>2.3.11</b>	<b>Bestimmung der Antikörperkonzentration mittels ELISA</b>	<b>43</b>
<b>2.3.12</b>	<b>Peptid-ELISA</b>	<b>45</b>
<b>2.3.13</b>	<b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</b>	<b>46</b>
<b>2.3.14</b>	<b>Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)</b>	<b>48</b>
2.3.14.1	Färbung von Zellen mit spezifischen Fluorochrom-markierten Reagenzien	49
<b>2.3.15</b>	<b>Isolierung und Präparation von humanen und murinen Zellen</b>	<b>50</b>
2.3.15.1	Präparation von Knochenmarkzellen	50
2.3.15.2	Isolierung von Granulozyten aus dem Knochenmark	51
2.3.15.3	Einzelzellsuspensionen aus Thymus	52
2.3.15.4	Isolierung humaner Monozyten aus Vollblut	53
2.3.15.4.1	Isolierung mononukleärer Leukozyten (MNL)	53
<b>2.3.16</b>	<b>Immunhistochemie</b>	<b>54</b>
2.3.16.1	Das Gefriermikrotom (Kryotom)	54
2.3.16.2	Gefrierschnittmethode	55
2.3.16.3	Immunhistochemische Färbung	55
<b>2.3.17</b>	<b>Immunzytochemische Färbung</b>	<b>57</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung monoklonaler Antikörper mit Spezifität für den humanen C5aR</b>	<b>58</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Immunisierung</b>	<b>58</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Zellfusion</b>	<b>58</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Nachweis hC5aR-spezifischer Antikörper mittels RBL-hC5aR Zellen</b>	<b>59</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Nachweis hC5aR-spezifischer Antikörper mittels humaner Monozyten</b>	<b>60</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Bestimmung der Epitopspezifität der Antikörper gegen humanen C5aR</b>	<b>61</b>
3.1.5.1	C5aR-Chimäre	61
3.1.5.2	Peptid-ELISA	62
<b>3.1.6</b>	<b>Reinheitskontrolle in der SDS-PAGE</b>	<b>64</b>
<b>3.1.7</b>	<b>Nachweis der Rezeptorspezifität der monoklonalen anti-hC5aR-Antikörper</b>	<b>64</b>
<b>3.1.8</b>	<b>Vergleich der monoklonalen anti-hC5aR-Antikörper aus Maus und Ratte</b>	<b>65</b>
3.1.8.1	Verwendung von RBL-hC5aR Zellen	65
3.1.8.2	Verwendung von C5aR-Chimären	66
3.1.8.3	Vergleich der Epitop-Erkennung der Ratten- und Mauseantikörper	68
3.1.8.4	Verwendung von Monozyten	69

3.1.9	Immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis der Expression des humanen C5aR in der Niere	70
3.1.10	Immunzytochemische Untersuchungen zum Nachweis der Expression des humanen C5aR in Epithelzellen des proximalen Nierentubulus (RPTEC)	72
3.1.11	Untersuchung der hC5aR-mRNA-Expression in proximal tubulären Zellen der Niere (RPTEC) mittels RT-PCR	73
<b>3.2</b>	<b>Herstellung und Charakterisierung spezifischer Antikörper gegen murinen C3aR</b>	<b>74</b>
3.2.1	Isolierung von mC3aR-cDNA aus J774A.1 Zellen	74
3.2.2	Klonierung des mC3aR	74
3.2.3	Sequenzierung des mC3aR	74
3.2.4	Permanente Expression des mC3aR in RBL-2H3 Zellen	75
3.2.5	Nachweis der mC3aR-Expression auf stabil transfizierten RBL-2H3 Zellen	75
3.2.6	RT-PCR-Analyse der mC3aR-mRNA-Expression in mC3aR-transfizierten RBL-2H3 Zellen	76
3.2.7	Untersuchung der Bindungsspezifität des Liganden (rhC3a) an stabil transfizierte RBL-mC3aR Zellen	77
3.2.8	Herstellung monoklonaler Antikörper mit Spezifität für den mC3aR	78
3.2.8.1	Zellfusion	79
3.2.9	Nachweis mC3aR-spezifischer Antikörper mittels der Maus-Makrophagen-Zelllinie J774A.1	79
3.2.10	Nachweis mC3aR-spezifischer Antikörper mittels der M-CSF-Maus-Makrophagen	80
3.2.11	Nachweis der Rezeptorspezifität des anti-mC3aR-Antikörpers durch Internalisierung des Rezeptors auf J774A.1 Zellen	81
3.2.12	Nachweis der spezifischen Bindung der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper durch Verwendung unterschiedlicher RBL-2H3-Transfektanten	83
3.2.13	Nachweis der Rezeptorspezifität der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper durch Internalisierung des Rezeptors auf RBL-mC3aR Zellen	84
3.2.14	Test auf Erkennung der Ligandbindungsstelle mittels monoklonaler anti-mC3aR-Antikörper	86
3.2.14.1	Blockierung der Ligandbindungsstelle mittels monoklonaler Antikörper	86
3.2.14.2	Blockierung der Ligandbindungsstelle mittels rhC3a	88
3.2.15	Untersuchung zur Epitoperkennung der anti-mC3aR-Antikörper	90
3.2.16	Charakterisierung der mC3aR-Expression auf myeloischen Zellen	93
3.2.16.1	Rezeptornachweis auf Peritoneal-Makrophagen aus der Maus	93
3.2.16.2	Rezeptornachweis auf Granulozyten aus dem Knochenmark	94
3.2.16.3	Nachweis der mC3aR-Expression auf GM-CSF-dendritischen Zellen aus der Maus	95
3.2.17	Charakterisierung der mC3aR-Expression auf lymphoiden Zellen	96
3.2.17.1	Nachweis der mC3aR-Expression auf Milzzellen und Thymozyten	96

3.2.18	<b>Immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis der C3aR-Expression in der Niere von Mäusen</b>	<b>98</b>
2.3.18.1	C3aR-Expression in der Niere von BALB/c-Mäusen	98
2.3.18.2	C3aR-Expression in der Niere von MRL/lpr-Mäusen	100
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>102</b>
4.1	<b>Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den humanen C5aR</b>	<b>102</b>
4.2	<b>Expression der Rezeptoren für die Anaphylatoxine C5a und C3a in der humanen Niere</b>	<b>103</b>
4.3	<b>Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den murinen C3aR</b>	<b>109</b>
4.4	<b>Charakterisierung der C3aR-Expression auf myeloischen und lymphoiden Zellen der Maus</b>	<b>112</b>
4.5	<b>Expression der Rezeptoren für die Anaphylatoxine C5a und C3a in der murinen Niere</b>	<b>116</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>
	<b>Danksagungen</b>	<b>140</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>141</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 2.1:</b>	Plasmidkarte des Expressionsvektors pEF1/ <i>Myc</i> -His	<b>18</b>
<b>Abbildung 3.1:</b>	Bindung der anti-hC5aR-Antikörper an hC5aR-exprimierende RBL-2H3 Zellen	<b>59</b>
<b>Abbildung 3.2:</b>	Bindung des anti-hC5aR-Antikörpers 8D6 an humane Monozyten	<b>60</b>
<b>Abbildung 3.3:</b>	SDS-PAGE-Analyse aufgereinigter Antikörper	<b>64</b>
<b>Abbildung 3.4:</b>	Monoklonale Antikörper für den hC5aR binden nicht an RBL-mC5aR	<b>65</b>
<b>Abbildung 3.5:</b>	Bindung der monoklonalen Ratten- bzw. Mausantikörper an RBL-hC5aR Zellen	<b>66</b>
<b>Abbildung 3.6:</b>	Bindung der monoklonalen Ratten- bzw. Mausantikörper an die chimären hC5a-Rezeptoren	<b>67</b>
<b>Abbildung 3.7:</b>	Vergleich der monoklonalen Mausantikörper mit den Rattenantikörpern gegen hC5aR auf Monozyten	<b>69</b>
<b>Abbildung 3.8:</b>	Vergleich der FLUOS-markierten anti-hC5aR-Mausantikörper P12/1 mit dem Rattenantikörper 8D6 auf Monozyten	<b>70</b>
<b>Abbildung 3.9:</b>	C5aR-Expression in normalem humanen Nierengewebe	<b>71</b>
<b>Abbildung 3.10:</b>	Monoklonaler Mausantikörper P12/1 reagiert mit humanen proximalen tubulären Zellen der Niere (RPTEC)	<b>72</b>
<b>Abbildung 3.11:</b>	RT-PCR-Analyse zum Nachweis von hC5aR- und $\beta$ -Aktin-mRNA in humanen primären Nierentubuluszellen (RPTEC)	<b>73</b>
<b>Abbildung 3.12:</b>	Nachweis des mC3aR auf RBL-2H3 Zellen	<b>76</b>
<b>Abbildung 3.13:</b>	Nachweis der mC3aR-mRNA-Expression in mC3aR-exprimierenden RBL-2H3-Transfektanten	<b>77</b>
<b>Abbildung 3.14:</b>	Reduktion der Bindung des rekombinanten hC3a <sup>FLUOS</sup> an RBL-mC3aR Zellen durch rhC3a	<b>78</b>
<b>Abbildung 3.15:</b>	Nachweis der Bindung des anti-mC3aR-Antikörpers 1G4 an die C3aR-exprimierende Zelllinie J774A.1	<b>80</b>
<b>Abbildung 3.16:</b>	Durchflusszytometrische Analyse der mC3aR-Expression auf M-CSF-Makrophagen	<b>81</b>
<b>Abbildung 3.17:</b>	Spezifische Bindung des monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpers 1G4 an J774A.1 Zellen	<b>82</b>
<b>Abbildung 3.18:</b>	Spezifische Bindung des monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpers 1G4 an RBL-mC3aR Zellen	<b>84</b>
<b>Abbildung 3.19:</b>	Reduktion der Bindung des monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpers 1G4 an RBL-mC3aR Zellen durch Vorinkubation der Zellen mit rhC3a	<b>85</b>
<b>Abbildung 3.20:</b>	Anti-mC3aR-Antikörper 1G4 erkennt nicht die Bindungsstelle des rhC3a an mC3aR	<b>87</b>
<b>Abbildung 3.21:</b>	Blockierung der Bindung des rekombinanten rhC3a <sup>FLUOS</sup> an RBL-mC3aR Zellen durch rhC3a	<b>88</b>

<b>Abbildung 3.22:</b>	Anti-mC3aR-Antikörper 1G4 erkennt nicht die Bindungsstelle des rhC3a an mC3aR	<b>89</b>
<b>Abbildung 3.23:</b>	Die Bindung des FLUOS-markierten Antikörpers an mC3aR Zellen wurde durch 1G4-Antikörper vollständig oder teilweise inhibiert	<b>91</b>
<b>Abbildung 3.24:</b>	Expression des mC3aR auf Peritoneal-Makrophagen	<b>93</b>
<b>Abbildung 3.25:</b>	Untersuchung der mC3aR-Expression auf Granulozyten	<b>94</b>
<b>Abbildung 3.26:</b>	Durchflusszytometrische Analyse der mC3aR-Expression auf GM-CSF-dendritischen Zellen	<b>95</b>
<b>Abbildung 3.27:</b>	Durchflusszytometrische Analyse der mC3aR-Expression auf Lymphozyten	<b>97</b>
<b>Abbildung 3.28:</b>	C3aR-Expression in der Niere von LPS-behandelten BALB/c-Mäusen	<b>99</b>
<b>Abbildung 3.29:</b>	C3aR-Expression in der Niere von MRL/lpr-Mäusen	<b>101</b>

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 2.1:</b>	Erstantikörper und Kontrollgammaglobuline	<b>19</b>
<b>Tabelle 2.2:</b>	Sekundärantikörper	<b>20</b>
<b>Tabelle 2.3:</b>	Zusammensetzung eines 12% SDS-Gels	<b>47</b>
<b>Tabelle 3.1:</b>	Zusammenfassung der Fusionsergebnisse	<b>61</b>
<b>Tabelle 3.2:</b>	Bindung der Rattenantikörper an C5aR-Transfektanten	<b>62</b>
<b>Tabelle 3.3:</b>	Epitopspezifität der Kulturüberstände gegen hC5aR	<b>63</b>
<b>Tabelle 3.4:</b>	Zusammenfassung der Epitopanalyse der anti-C5aR-Antikörper	<b>63</b>
<b>Tabelle 3.5:</b>	Bindung der monoklonalen Maus- und Rattenantikörper an RBL-hC5aR bzw. RBL-C5aR-Ex1hu-rat und zwei N-terminale C5aR-Peptide	<b>68</b>
<b>Tabelle 3.6:</b>	Mittlere Fluoreszenzintensität der mC3aR-Expression auf stabil transfizierten RBL-2H3 Zellen	<b>79</b>
<b>Tabelle 3.7:</b>	Zusammenfassung der Fusionsergebnisse	<b>81</b>
<b>Tabelle 3.8:</b>	Nachweis der Rezeptorspezifität der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper auf J774A.1 Zellen	<b>83</b>
<b>Tabelle 3.9:</b>	Nachweis der Rezeptorspezifität der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper nach der Behandlung der Zellen mit rhC3a oder ohne den Ligand	<b>86</b>
<b>Tabelle 3.10:</b>	Mittlere Fluoreszenzintensität des FLUOS-markierten rhC3a auf RBL-mC3aR Zellen mit oder ohne Vorinkubation mit den anti-mC3aR-Antikörpern	<b>87</b>
<b>Tabelle 3.11:</b>	Mittlere Fluoreszenzintensität der C3aR-Expression auf RBL-mC3aR Zellen mit oder ohne rhC3a-Behandlung	<b>89</b>
<b>Tabelle 3.12:</b>	Mittlere Fluoreszenzintensität der anti-mC3aR-Antikörper auf RBL-mC3aR Zellen vor und nach der Blockierung des Rezeptors mit jeweiligem Antikörper	<b>92</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat (6)]
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bidest.	destilliert
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
C	Komplementprotein
C3aR	Rezeptor des Komplementproteins C3a
C5aR	Rezeptor des Komplementproteins C5a
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxiribonucleotid-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLUOS	5(6)-Carboxy-fluorescein-N-hydroxysuccinimidester
g	Gramm
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophge Colony Stimulating Factor</i>
h	Stunde bzw. human
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton

KG	Körper Gewicht
l	Liter
Lab.	Laboratories
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mA	milli-Amper
mAk	monoklonaler Antikörper
M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikromolar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MNL	mononukleäre Leukozyten
MRL lpr/lpr	Mäusestamm mit Mutation des lpr-Gens
mRNA	messenger RNA
nM	Nanomolar
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

## Abkürzungsverzeichnis

U	<i>units</i> (Einheit)
v/v	Volumenverhältnis
w/v	Gewichts-/Volumen-Verhältnis
w/w	Gewichtsverhältnis

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Komplementsystem

Das Komplement wurde vor etwa einem Jahrhundert als hitzelabiler Bestandteil des Plasmas entdeckt. Der Begriff „Komplement“ ergibt sich historisch aus der Beobachtung, dass in frischem Serum zusätzlich zu den Antikörpern weitere Faktoren vorliegen, die die spezifische Wirkung des Antikörpers „komplementieren“ und zur Lyse von antikörperbeladenen Mikroorganismen führen.

Das Komplementsystem besteht aus mehr als 30 Plasma- und Membranproteinen, die von unterschiedlichen Geweben und Zellen (wie Hepatozyten, Monozyten/Makrophagen) produziert werden können (WALPORT, 2001). Dieses System kann über verschiedene Mechanismen aktiviert werden, was zu einer kaskadenartigen Aktivierung der beteiligten Proteine mit abschließender Lyse des Eindringlings führt. Man unterscheidet je nach Auslöser vier Wege der Komplementaktivierung.

**1. Klassischer Weg:** Die Auslöser für den klassischen Weg sind IgG- oder IgM-Moleküle (in Immunkomplexen oder membrangebunden) und Produkte inflammatorischer Reaktionen wie C-reaktives Protein (CRP) und amyloides Protein. Dabei wird durch die Bildung einer C3-Konvertase nach Aktivierung von C1-, C4- und C2-Komponenten C3 in C3a und C3b gespalten.

**2. Alternativer Weg:** Die Aktivierung über den alternativen Weg wird durch die direkte Bindung von C3b an bestimmte Oberflächenstrukturen, wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS), eingeleitet (GÖTZE und MÜLLER-EBERHARD, 1976).

**3. Lektin-Weg:** Das Komplement wird dabei durch Bindung des Mannose-bindenden Lektins (MBL) an Mannose oder N-Acetyl-Glukosamin auf der pathogenen Oberfläche (z.B. bakterielles Peptidoglykan) aktiviert. Eine C1-unabhängige C4-Aktivierung findet im Lektin-Weg durch Aktivierung MBL-assoziiierter Serinproteasen (MASP-1, -2 und -3) statt.

Die ersten drei Reaktionswege konvergieren bei der Bildung einer C3-Konvertase, die C3 in die aktive Komplementkomponente C3b und das kleinere Anaphylatoxin C3a spaltet.

Nach Bildung der C5-Konvertase und Spaltung von C5 in C5b und das kleinere Anaphylatoxin C5a setzt das C5b-Fragment die Bildung des Membranangriffs-Komplexes (*Membrane Attack Complex*, MAC) in Gang.

**4. Komplementaktivierung durch Gerinnungsaktivierung:** Kürzlich wurde über einen neuen Weg der Komplementaktivierung berichtet. Bei diesem Reaktionsweg findet die C5-Spaltung durch Aktivierung von Enzymen der Gerinnungskaskade in Abwesenheit des C3 statt (HUBER-LANG *et al.*, 2006).

### 1.1.1 Biologische Funktionen des Komplementsystems

**Opsonisierung:** Während der Aktivierung des Komplementsystems kommt es zur Bildung von Spaltprodukten bestimmter Komplementkomponenten (C3b, C4b), die sich auf der Membran von Pathogenen ablagern können. Diese Produkte erleichtern die Phagozyten-Aufnahme durch Bindung an spezifische Membranrezeptoren.

**Entzündung:** Andere Spaltprodukte des Komplements wie z.B. die Anaphylatoxine C5a und C3a locken Entzündungszellen an und zeigen pro-inflammatorische Wirkungen.

**Lyse:** Nach vollständiger Aktivierung des Komplementsystems und der Ausbildung des terminalen Membranangriffs-Komplexes kann es zur Lyse und somit Zerstörung der Pathogene kommen.

### 1.2 Das Anaphylatoxin C5a

Das humane Anaphylatoxin C5a ist ein Spaltprodukt des Komplementfaktors C5 mit einem Molekulargewicht von ca. 11 kDa und besteht aus 74 Aminosäuren (FERNANDEZ und HUGLI, 1978). C5a entsteht üblicherweise während der Komplementaktivierung durch entsprechende Serin-Proteasen. Proteasen von Alveolar-Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie Thrombin können das C5-Protein ebenfalls spalten und C5a produzieren (HUBER-LANG *et al.*, 2002, 2006).

Unter den vielen Produkten, die durch die Aktivierung des Komplementsystems entstehen, zeichnet sich das C5a als hochpotentes inflammatorisches Peptid aus und verfügt über ein breites Spektrum biologischer Funktionen. C5a ist ein potentes Chemotaxin für neutrophile Granulozyten und bewirkt ebenfalls die chemotaktische Migration von Monozyten und Makrophagen an den Ort der Entzündung (HUGLI, 1981; MARDER *et al.*, 1985). Es führt zur Freisetzung von Histamin aus Mastzellen (SCHMUTZLER *et al.*, 1995), stimuliert die Kontraktion glatter Muskulatur (REGAL *et al.*, 1980; SCHEID *et al.*, 1983) und erhöht die Gefäßpermeabilität (WILLIAMS und JOSE, 1981). C5a induziert toxische

Sauerstoffradikale (*oxidative burst*) in Granulozyten, erhöht die Phagozytose mit konsekutiver Freisetzung lysosomaler Enzyme (GOLDSTEIN und WEISSMANN, 1974; SACKS *et al.*, 1978; MOLLNES *et al.*, 2002) und besitzt gefäßerweiternde Eigenschaften (SCHUMACHER *et al.*, 1991). Des Weiteren stimuliert C5a die Synthese und Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin-1, -6, -8 (IL-1, -6 und -8 ) sowie TNF- $\alpha$  (*Tumour Necrosis Factor alpha*) aus humanen und murinen Leukozyten (SCHOLZ *et al.*, 1990; OKUSAWA *et al.*, 1987, 1988; EMBER *et al.*, 1994; KACANI *et al.*, 2001) und fördert die Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selektin auf Endothelzellen (FOREMAN *et al.*, 1994; MULLIGAN *et al.*, 1997). cDNA-Microarray-Analysen bestätigten die C5a-induzierte Genexpression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. E-Selektin, ICAM-1 (*Intracellular Adhesion Molecule-1*) und VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), von Zytokinen/Chemokinen und der entsprechenden Rezeptoren, z.B. VEGFC- (*Vascular Endothelial Growth Factor-C*), IL-6- und IL-8-Rezeptor in humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC Zellen, *human umbilical vein endothelial cells*) (ALBRECHT *et al.*, 2004).

Durch Stimulation der TNF- $\alpha$ - und IL-6-Produktion in Monozyten/Makrophagen kann C5a die Sensitivität dieser Zellen für eine HIV-Infektion erhöhen (KACANI *et al.*, 2001). C5a bewirkt über die Induktion von TNF- $\alpha$  und Prostaglandinen *in vivo* die Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten. Ferner kann C5a inflammatorische dendritische Zellen an den Ort einer Entzündung locken und ihre Maturierung einleiten (SORURI *et al.*, 2003c) sowie die Produktion von IL-12 in humanen Monozyten, die mit LPS oder IFN- $\gamma$  behandelt wurden, stark reduzieren. (WITTMANN, 1999). Die Untersuchung von RIEDEMANN *et al.* (2004) zeigt, dass C5a die Freisetzung von MIF (*Migration Inhibitory Factor*) aus neutrophilen Granulozyten von Maus und Ratte bewirkt.

Die biologische Aktivität von C5a im Serum wird durch die Carboxypeptidase N und die Carboxypeptidase R reguliert. Durch Abspaltung des C-terminalen Arginins-74 entsteht so C5a(desArg), was zum Verlust oder zur Einschränkung einiger biologischer Funktionen des Moleküls führt. Carboxypeptidase N liegt immer in aktiver Form im Serum vor, während Carboxypeptidase R im Verlauf einer Entzündung induziert wird (CAMPBELL *et al.*, 2002).

### **1.2.1 Der Rezeptor für das Anaphylatoxin C5a**

Die vielfältigen Effekte des Anaphylatoxins C5a werden über eine hochaffine Bindung an den C5a-Rezeptor (C5aR) vermittelt, der von zwei Arbeitsgruppen (GERARD und GERARD, 1991; BOULAY *et al.*, 1991) kloniert und charakterisiert wurde. Der C5aR gehört zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren mit sieben transmembranen Domänen und besteht aus 350 Aminosäuren (GERARD und GERARD, 1994). Das Molekulargewicht beträgt etwa 50-55 kDa. Zum besseren Verständnis der Interaktion zwischen C5a und C5aR wurde ein „Zwei-Bindungsstellen“-Modell vorgeschlagen. Während die disulfidverknüpfte Kernregion des C5a das N-terminale Segment des Rezeptors sowie seine dritte extrazelluläre Schleife („*recognition site*“) erkennt und damit interagiert, passt die C-terminale Region des C5a in eine „Bindungstasche“, die von der fünften transmembranösen Domäne („*effector site*“) geformt wird. Dies führt zur Aktivierung der G-Proteine und löst damit eine intrazelluläre Signaltransduktion aus (SICILIANO *et al.*, 1994).

### **1.2.2 C5L2-Rezeptor**

Seit seiner Klonierung schien der C5aR der einzige Rezeptor für C5a zu sein. Im Jahr 2000 beschrieben OHNO *et al.* die Expression des C5aR-ähnlichen Rezeptors C5L2 (*C5a-like receptor 2*) auf humanen neutrophilen Granulozyten und unreifen dendritischen Zellen. CAIN und MONK (2002) sowie OKINAGA *et al.* (2003) zeigten die hochaffine Bindung von C5a und C5a(desArg) an den C5L2-Rezeptor und charakterisierten den C5L2-Rezeptor als nicht G-Protein gekoppelt mit geringem biologischen Effekt. Eine anti-inflammatorische Funktion wurde für den C5L2-Rezeptor von GAO *et al.* (2005), GERARD *et al.* (2005) und HUBER-LANG *et al.* (2005) berichtet. Durch Hochregulation des C5L2-Rezeptors während des Entzündungsprozesses wird C5a vermehrt gebunden, was zu einer verminderten Aktivierung des C5aR führt.

### **1.2.3 C5aR-Expression auf myeloischen Zellen**

Zahlreiche Untersuchungen deuten auf die Expression des C5aR auf Leukozyten hin. Mit Hilfe von <sup>125</sup>I- oder fluoreszenzmarkiertem C5a (CHENOWETH und HUGLI, 1978; CHENOWETH *et al.*, 1982; WERFEL *et al.*, 1992) und monoklonalen anti-C5aR-Antikörpern (OPPERMANN *et al.*, 1993; SORURI *et al.*, 2003b) konnte der Rezeptor auf humanen neutrophilen Granulozyten, humanen Monozyten und murinen mononukleären

Phagozyten nachgewiesen werden. Mit Hilfe polyklonaler Antikörper wurde der C5aR auf humanen T-Lymphozyten (NATAF *et al.*, 1999a) und mit Hilfe monoklonaler Antikörper auf Gedächtnis- und naiven B-Lymphozyten (OTTONELLO *et al.*, 1999) gefunden. OPPERMANN *et al.* (1993) und WERFEL *et al.* (1992) hingegen konnten auf humanen T-Lymphozyten und SORURI *et al.* (2003b) auf murinen T-Lymphozyten, die durch Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert worden waren, keine C5aR-Expression nachweisen ebenso wenig wie auf B-Lymphozyten unter Concanavalin A (Con A)-Stimulation. Auf T-Lymphozyten von MRL-lpr/lpr Mäusen, die eine SLE-ähnliche Autoimmunerkrankung mit massiver Lymphoproliferation entwickeln, und auf humanen B-Lymphozyten konnte ebenfalls keine C5aR-Expression gefunden werden (SORURI *et al.*, 2003b; ZWIRNER *et al.*, 1999b). Eine C5a-abhängige Chemotaxis muriner B-Lymphozyten wurde nur bei B-Lymphozyten des Germinal-Zentrums, nicht jedoch bei anderen Populationen von B-Lymphozyten beobachtet (KUPP *et al.*, 1991).

Eine C5aR-Expression wurde auf humanen Mastzellen der Haut, der humanen Mastzelllinie HMC-1 und auf basophilen Granulozyten nachgewiesen (FÜREDER *et al.*, 1995; WERFEL *et al.*, 1996a, 1997; ZWIRNER *et al.*, 1999b).

MORELLI *et al.* (1996) sowie KIRCHHOFF *et al.* (2001) demonstrierten die C5aR-Expression auf epidermalen Langerhans-Zellen und dermalen dendritischen Zellen. An unreifen, aus humanen Monozyten gewonnenen dendritischen Zellen wurde ebenfalls gezeigt, dass C5a chemotaktisch aktiv ist (SOZZANI *et al.*, 1995). YANG *et al.* (2000) sowie WEINMANN *et al.* (2003) zeigten die C5aR-Expression auf reifen und unreifen dendritischen Zellen *in vitro*. Eine Subpopulation humaner dendritischer Zellen des Blutes soll ebenfalls den C5aR exprimieren (SCHAKEL *et al.*, 2002).

### **1.3 Das Anaphylatoxin C3a**

Über die biologische Bedeutung des Anaphylatoxins C3a ist weniger bekannt. Sie scheint daher, obwohl im Allgemeinen ähnlich, etwas weniger vielfältig als die des C5a zu sein. Zu der pro-inflammatorischen Aktivität des C3a gehört die Freisetzung von Histamin aus basophilen Granulozyten (GLOVSKY *et al.*, 1979; BISCHOFF *et al.*, 1990a, 1990b) und Mastzellen (JOHNSON *et al.*, 1975; eL LATI *et al.*, 1994), Zytokin- und Chemokin-Synthese (MONSINJON *et al.*, 2003), Steigerung der Expression von Adhäsionsmolekülen (DISCIPIO *et al.*, 1999) und Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale aus neutrophilen (EHRENGRUBER *et al.*, 1994 ; ELSNER *et al.*, 1994b) und eosinophilen Granulozyten (ELSNER *et al.*, 1994a). Darüber hinaus aktiviert C3a eosinophile Granulozyten

(DAFFERN *et al.*, 1995) und humane Mastzellen (NILSSON *et al.*, 1996; HARTMANN *et al.*, 1997; ZWIRNER *et al.*, 1998a) und wirkt chemotaktisch auf diese Zellen. In humanen Monozyten/Makrophagen fördert C3a die Freisetzung von PGE<sub>2</sub> und einen Anstieg des intrazellulären Calciums (MORGAN, 1987; ZWIRNER *et al.*, 1997).

C3a induziert die Chemotaxis hämatopoietischer Stamm- oder Vorläuferzellen im Knochenmark (HONCZARENKO *et al.*, 2005, RECA *et al.*, 2003) und ist an der Aufrechterhaltung des für diese Zellen wichtigen Mikromilieus beteiligt (RATAJCZAK *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu C5a wurden für das Anaphylatoxin C3a anti-inflammatorische Wirkungen postuliert. Bei Zugabe von C3a zu Kulturen humaner PBMC konnte die Lipopolysaccharid-induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 inhibiert werden (TAKABAYASHI *et al.*, 1996, 1998; FISCHER *et al.*, 1999). Studien an C3aR-knockout-Mäusen zeigten eine protektive Rolle für C3aR. Die C3aR-defizienten Tiere wiesen eine erhöhte Mortalitätsrate bei Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine nach LPS-Behandlung auf (KILDGAARD *et al.*, 2000). Pro- und anti-inflammatorische Wirkungen des C3a entstehen durch die Bindung an C3aR.

### **1.3.1 Der Rezeptor für das Anaphylatoxin C3a**

Der humane C3aR besteht aus 482 Aminosäuren und zeichnet sich im Vergleich zu allen anderen bisher bekannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch eine große zweite extrazelluläre Schleife von ca. 172 Aminosäuren zwischen der vierten und fünften transmembranen Domäne aus (AMES *et al.*, 1996; CRASS *et al.*, 1996; ROGLIC *et al.*, 1996). Durch Konstruktion chimärer Rezeptoren sowie durch Punktmutationsversuche konnte gezeigt werden, dass die außergewöhnliche Struktur der zweiten extrazellulären Schleife im C3aR an der Ligand-Rezeptor-Interaktion beteiligt ist (AMES *et al.*, 1996; CHAO *et al.*, 1999; CRASS *et al.*, 1999). Der murine C3aR hat eine Länge von 477 Aminosäuren und zeigt eine Homologie von 65% zum humanen C3aR (TORNETTA *et al.*, 1997; HSU *et al.*, 1997; HOLLMANN *et al.*, 1998).

### **1.3.2 C3aR-Expression auf myeloischen Zellen**

Eine deutliche C3aR-Expression wurde auf Basophilen von Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie gezeigt (KRETZSCHMAR *et al.*, 1993). Eosinophile Granulozyten sind weitere C3a-Rezeptor-tragende Zellen (DAFFERN *et al.*, 1995; ELSNER *et al.*, 1994a; TAKAFUJI *et al.*, 1994; MARTIN *et al.*, 1997; ZWIRNER *et al.*, 1999b). Die C3aR-Expression auf neutrophilen Granulozyten wurde kontrovers diskutiert. Während VAN-EPPS und CHENOWETH (1984) den C3aR auf diesen Zellen nicht nachweisen konnten, erbrachten GERARDY-SCHAHN *et al.* (1989), KLOS *et al.* (1992) und NORGAUER *et al.* (1993) den Beweis für einen funktionell aktiven C3aR auf neutrophilen Granulozyten. Drei weitere Forschungsgruppen bestätigten später die Expression des C3aR auf neutrophilen Granulozyten (MARTIN *et al.*, 1997; HAWLISCH *et al.*, 1998 und ZWIRNER *et al.*, 1999b).

Unstimulierte B- und T-Lymphozyten scheinen den C3aR nicht zu exprimieren (MARTIN *et al.*, 1997; HAWLISCH *et al.*, 1998; ZWIRNER *et al.*, 1999b). Nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* und IL-12 reagierten B-Lymphozyten auf eine C3a-Gabe mit einer Hemmung der polyklonalen Immunantwort und einer Reduktion der Zytokin-Synthese (FISCHER und HUGLI, 1997). Darüber hinaus wurde die C3aR-Expression auf aktivierten, nicht jedoch auf ruhenden menschlichen T-Lymphozyten gezeigt (WERFEL *et al.*, 2000).

Auf humanen Monozyten/Makrophagen aus der Haut und dem Blut konnte ebenfalls die Expression des C3aR nachgewiesen werden (ZWIRNER *et al.*, 1997, 1999b; MARTIN *et al.*, 1997).

GUTZMER *et al.* (2004) zeigten die Hochregulation des C3aR auf dendritischen Zellen nach Stimulation mit Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ), Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) oder Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>). Die stärkste Hochregulation des C3aR wurde unter Verwendung von INF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  in Kombination erreicht.

RECA *et al.* (2003) berichteten von humanen CD34<sup>+</sup> Zellen und hämatopoietischen Stamm- oder Vorläuferzellen, die einen funktionellen C3aR exprimieren sollen. Diese Autoren verwendeten monoklonale Antikörper gegen den C3aR. HONCZARENKO *et al.* (2005) hingegen konnten die C3aR-Expression auf CD34<sup>+</sup> Zellen nicht nachweisen, obwohl sie denselben monoklonalen Antikörper verwendeten.

#### **1.4 Expression der C5a- und C3a-Rezeptoren in verschiedenen Organen**

Es finden sich vermehrt Berichte, dass nicht-myeloische Zellen in verschiedenen Organen eine hohe C3aR- und C5aR-Expression aufweisen. TORNETTA *et al.* (1997) und HSU *et al.* (1997) zeigten in Mäusen eine C3aR-Expression mittels in-situ-Hybridisierung und Northern-Blot-Analysen in verschiedenen Organen, welche in Herz und Lunge besonders ausgeprägt war. Diese Methode ließ allerdings keine Zuordnung zu spezifischen Zellen im untersuchten Gewebe zu.

Die Existenz des C3a- und C5a-Rezeptors wurde auf Gliazellen, Astrozyten, Neuronen und Endothelzellen bei Untersuchungen am gesunden Gehirn und während des Entzündungsprozesses gezeigt (GASQUE *et al.*, 1995, 1997, 1998; DAVOUST *et al.*, 1999; VAN BEEK *et al.*, 2000; NATAF *et al.*, 1999b). Auch neurale Stamm- oder Vorläuferzellen scheinen den C3aR und C5aR zu exprimieren (RAHPEYMAI *et al.*, 2006).

HAVILAND *et al.* (1995) berichteten über die Expression des C5aR in unterschiedlichen Organen wie Leber, Milz, Lunge, Herz, Niere und Darm. Die C5aR-tragenden Zelltypen konnten jedoch nicht identifiziert werden. AMES *et al.* (1996) zeigten mittels Northern-Blot-Analyse eine C3aR-Expression in unterschiedlichen humanen Geweben. Die stärkste Expression trat in Lungen- und lymphatischem Gewebe auf, während Blutleukozyten vergleichsweise wenig C3aR-mRNA exprimierten.

Untersuchungen an gesunden humanen und murinen Lungen legten nahe, dass die Rezeptoren für C3a und C5a auf bronchialen Epithelzellen und Zellen der glatten Muskulatur exprimiert werden. Bei Endotoxin-bedingter Sepsis in einem Tiermodell wurde die C3aR-Expression deutlich erhöht und eine starke Expression in den glatten Muskelzellen bei Mäusen in einem Ovalbumin-induzierten Asthma beobachtet. Darüber hinaus zeigte der C5aR nach Endotoxin-Behandlung eine verstärkte Expression auf Epithelzellen (DROUIN *et al.*, 2001). Auf primär kultivierten alveolären Epithelzellen in der Ratte wiesen RIEDEMANN *et al.* (2002b) die Bindung von rekombinantem C5a mit hoher Affinität nach. Unter LPS-, IL-6- oder TNF- $\alpha$ -Stimulation fanden sie einen Anstieg der C5aR-mRNA. In einer weiteren Arbeit dieser Gruppe wurde die C5aR-Expression auf Epithelzellen der Bronchien in einem Mausmodell der CLP-induzierten (*Cecal Ligation and Puncture*) Sepsis beschrieben (RIEDEMANN *et al.*, 2002a).

Die Expression des C5aR in Primärzellkulturen humaner bronchialer Epithelzellen (HBEC) wurde von FLOREANI *et al.* (1998), WYATT *et al.* (1999) und ALLEN-GIPSON *et al.* (2005) berichtet. Unter Zigarettenrauch erfolgte eine C5a-abhängige Freisetzung von IL-8 und IL-6.

Immunhistochemische Untersuchungen der Lungen von Patienten, die an letalem Asthma erkrankt waren, zeigten eine Hochregulation des C3aR auf Zellen der Submukosa und parenchymatösen Gefäßen sowie eine C5aR-Expression auf Epithelzellen der Bronchien. Es wurde gefunden, dass die C3a- und C5a-Rezeptoren bei gesunden Menschen auf Epithelzellen der Bronchien und der glatten Muskulatur, Submukosa und parenchymatösen Gefäßen exprimiert werden (FREGONESE *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu diesen Daten konnten THANGAM *et al.* (2005) mittels RT-PCR, Durchflusszytometrie und konfokal-mikroskopischer Analyse eine Expression des C3aR und C5aR auf Zellen der glatten Muskulatur in humanen und murinen Lungen nicht bestätigen.

Mittels in-situ-Hybridisierung und immunhistochemischer Untersuchungen erwiesen sich bronchiale und alveolare Epithelzellen, Endothelzellen sowie vaskuläre Zellen der glatten Muskulatur in Lungenschnitten ebenfalls als C5aR-negativ (FAYYAZI *et al.*, 1999, 2000; ZWIRNER *et al.*, 1999a).

Über die Expression der C3a- und C5a-Rezeptoren in der humanen und murinen Niere liegen widersprüchliche Daten vor. FAYYAZI *et al.* (2000) entdeckten den C5aR auf proximal tubulären Zellen der humanen Niere mittels immunhistochemischer Färbung und in-situ-Hybridisierung. ZAHEDI *et al.* (2000) untersuchten neben humanen Nierenschnitten auch kultivierte proximal tubuläre Zellen (RPTEC) und proximal tubuläre Zelllinien (HK-2) hinsichtlich Expression und Funktion des C5aR. Trotz nachgewiesener C5aR-Expression konnte keine C5a-bedingte funktionelle Aktivität der Zellen nachgewiesen werden. ABE *et al.* (2001) fanden zusätzlich eine konstitutive Expression des C5aR in renalen vaskulären Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur. Ihre Ergebnisse legen nahe, dass eine Hochregulation von mRNA und C5aR-Protein bei verschiedenen Nierenerkrankungen erfolgen könnte.

Die C5aR-Expression auf kultivierten humanen Mesangiumzellen wurde von BRAUN und DAVIS III (1998) sowie WILMER *et al.* (1998) beschrieben. SHUSHAKOVA *et al.* (2005) vermuteten, dass der C5aR auf humanen Mesangiumzellen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung entzündlicher Erkrankungen der Nieren spielen könnte. PEAKE *et al.* (1999) führten den Nachweis, dass die humane proximal tubuläre Zelllinie HK-2 C3aR-mRNA exprimiert und durch C3a-Stimulation zur Produktion von *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1) fähig ist.

Auf der Grundlage von immunhistochemischen Untersuchungen und in-situ-Hybridisierungen berichteten BRAUN *et al.* (2004) über die C3aR-Expression in der Niere von Mensch und Maus. Während Epithelzellen den C3aR exprimieren, wurde für die glomerulären Endothel- und Mesangiumzellen kein Hinweis auf Rezeptorexpression gefunden. Diese Forschergruppe konnte den C3aR in kultivierten humanen proximal tubulären Zellen (RPTEC) mittels Durchflusszytometrie, Western Blot und RT-PCR nachweisen.

BAO *et al.* (2005b) zeigten mittels Immunfluoreszenzfärbung, dass tubuläre und glomeruläre Zellen in der Niere normaler Mäuse für den C5aR positiv sind und eine Hochregulation bei an Lupus-Nephritis erkrankten Mäusen auftritt. Diese Autoren zeigten zudem eine C3aR-mRNA-Expression in normalen Tubuluszellen der murinen Niere und eine verstärkte Expression bei der Lupus-Nephritis. Außerdem wird C3aR in den Epithelzellen der Glomeruli exprimiert (BAO *et al.*, 2005a).

Die Expression der C5aR-mRNA in der Niere normaler Mäuse und ihre Hochregulation in einem *in vivo* Ischämie/Reperfusion-Modell wurde von DE VRIES *et al.* (2003) mittels RT-PCR gezeigt. Die immunhistochemischen Untersuchungen wiesen eine Expression des C5aR-Proteins in den tubulären und mesangialen Zellen normaler Mäuse nach. Bei erkrankten I/R-Mäusen wurde der C5aR auf tubulären Zellen hochreguliert. RIEDEMANN *et al.* (2002a) fanden nach CLP-Behandlung bei BALB/c-Mäusen eine sehr hohe Expression des C5aR in proximalen und distalen tubulären Zellen der Niere. Hierbei waren die Glomeruli ungefärbt geblieben.

BAO *et al.* (2005a, b), WENDERFER *et al.* (2005) und WELCH *et al.* (2002) vermuteten, dass die Anaphylatoxin-Rezeptoren eine pathophysiologische Rolle in der experimentellen Lupus-Nephritis bei MRL/lpr-Mäusen spielen würden, ebenso bei Tubulus-Interstitium-Schäden in einem murinen Modell der Immunkomplex-induzierten Glomerulonephritis. In all diesen Untersuchungen wurde jedoch kein überzeugender Beweis für die pathophysiologische Rolle präsentiert, die der Expression des C3a- und C5a-Rezeptors auf nicht-myeloischen Zellen innewohnen könnte.

## **1.5 Ziel der Arbeit**

Aufgrund der zum Teil widersprüchlichen publizierten Beobachtungen sollten in dieser Arbeit zum besseren Verständnis der (patho)physiologischen Bedeutung des C5a- und C3a-Rezeptors monoklonale Antikörper mit Spezifität für den humanen C5a- bzw. murinen C3a-Rezeptor generiert und charakterisiert werden.

Die monoklonalen Antikörper sollten den Rezeptor nicht nur auf der Zelloberfläche lebender Zellen erkennen, sondern auch den Rezeptornachweis in Gefrierschnitten durch eine immunhistochemische Untersuchung erlauben. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die C5aR-Expression in der menschlichen Niere mit Hilfe neu generierter, hochspezifischer monoklonaler Antikörper für den humanen C5aR reevaluiert werden.

Weiterhin sollten zur Generierung monoklonaler Antikörper gegen den murinen C3aR RBL-2H3-Transfektanten, die den Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren, hergestellt und zur Immunisierung von Lou/C-Ratten verwendet werden. Anti-mC3aR monoklonale Antikörper sollten die Charakterisierung der C3aR-Expression nicht nur in der Niere gesunder Tiere, sondern auch in pathologisch veränderten Nieren nach LPS-Behandlung und bei MRL/lpr-Mäusen erlauben.

Über die C3aR-Verteilung auf murinen myeloischen Zellen liegen bisher keine Untersuchungen vor. Daher war eine eindeutige zelluläre Zuordnung der Expression des mC3aR ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

Die Klärung des Expressionsmusters von C5a- und C3a-Rezeptor ist von großer Bedeutung für das Verständnis der Rolle der Anaphylatoxine in inflammatorischen Prozessen *in vivo*.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Allgemeine Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Automatische Pipettierhilfen ( <i>accu-jet</i> )		Brand GmbH & Co KG, Wertheim
	( <i>Pipetboy accu</i> )	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Brutschränke:	T 6060 (für Bakterien)	Heraeus-Kendro, Hanau
	B 5060 EC-CO2 (für Eukaryoten)	Heraeus-Kendro, Hanau
Feinwaage	KB BA 100	Sartorius, Göttingen
Heizblöcke:	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
	KBT 100-1P	HLC Haep Labor Consult, Bovenden
Mikroskope:	Telaval 31	Zeiss, Oberkochen
	IM 15	Zeiss, Oberkochen
Multikanalpipette	Calibra 825	Socorex, Schweiz
pH-Meter	PHM63	Radiometer, Kopenhagen Dänemark
Pipetten (10, 100, 1000 µl)	Reference	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator	CH-4103	Infors AG, Schweiz
Sterilbänke:	(Eukaryotische Zellkulturen) DLF BSS6 ( <i>Clean Air</i> )	Med. Tech. Geräte J.H. Schrader, Göttingen
	(Prokaryotische Zellkulturen) DLF BSS4 ( <i>Clean Air</i> )	Med. Tech. Geräte. J.H. Schrader, Göttingen

Zentrifugen:

Ultrazentrifuge	L8 -70M	Dupont, Bad Nauheim
Zentrifuge	5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Biofuge A	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	EBA 21	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	Rotanta/RP	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	Sorvall RC-3B	Dupont, Bad Nauheim

### 2.1.2 Allgemeine Labormaterialien

Einweg-Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Einweg-Pipetten	Greiner GmbH, Nürtingen
Einwegspritzen (2, 5, 10, 20 ml, steril)	Braun-Melsungen, Melsungen
Einwegspritzen (50 ml, steril)	BD Biosciences, Heidelberg
Faltenfilter-Papier	Whatman, Dassel
Gewebekulturflaschen (25, 75 cm <sup>2</sup> )	Nunc GmbH, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen (175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturplatten (6- und 24-Lochplatten)	Nunc GmbH, Wiesbaden
Gewebekulturschalen (ø 10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturschalen (ø 14 cm)	Greiner GmbH, Nürtingen
Glaspipetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml Plastikröhrchen (steril)	Greiner GmbH, Nürtingen
50 ml Plastikröhrchen (steril)	Sarstedt, Nümbrecht
0,5 und 1,5 Reaktionsgefäße („Eppendorf-cups“)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (Porengröße 0,45 und 0,22 µm)	Sartorius AG, Göttingen
Zellzählkammer (Neubauer Improved)	Ommilab Krannich GmbH, Göttingen

### 2.1.3 Allgemeine Chemikalien

#### 2.1.3.1 Allgemeine Chemikalien, flüssig

2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Aceton	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt

Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend (37%)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Gibco BRL-Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (35%)	Merck, Darmstadt

### 2.1.3.2 Allgemeine Chemikalien, fest

Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck, Darmstadt
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz (EDTA-Na <sub>2</sub> )	Serva, Heidelberg
Glukose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Merck, Darmstadt
Glycin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Mangan(II)-Chlorid-Tetrahydrat (MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Calbiochem, USA
Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Na O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS) (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> SNa)	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH)

Merck, Darmstadt

Tris Ultra Pure (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)

Roth, Karlsruhe

Urea (Harnstoff) (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O)

Roth, Karlsruhe

#### **2.1.4 Tiere**

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den hC5a- und mC3a-Rezeptor wurden weibliche Ratten (Inzuchtstamm, Lou/C) ausgewählt, die zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung ungefähr 8-12 Wochen alt waren. Diese wurden vom Institut für Humangenetik (Abteilung Tierzucht) in Göttingen bezogen. BALB/c-Mäuse wurden zur Präparation von Organen für die immunhistochemische Färbung und NMRI-Mäuse zur Präparation von Peritoneal-Makrophagen verwendet. Beide Inzuchtstämme waren aus eigener Zucht. MRL/lpr-Mäuse zur Untersuchung von C3a- und C5a-Rezeptor-Expression wurden freundlicherweise von Dr. Neumann (Anatomisches Institut der Medizinischen Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

#### **2.1.5 Stammlösungen und Standardpuffer**

##### **PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)**

0,36 mM	129,29 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O
0,14 mM	19,18 g/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O

Die Bestandteile der Stammlösung wurden in 2 Liter bidest. H<sub>2</sub>O unter geringer Wärmezufuhr vollständig gelöst und der pH auf 7,2-7,4 eingestellt. Einfach konzentriertes PBS wurde mit 18 ml Stammlösung/l und 7,2 g NaCl (123 mM) mit H<sub>2</sub>O hergestellt, gegebenenfalls wurde diese Lösung autoklaviert.

##### **EDTA-Stammlösung**

0,2 M	7,45 g/100 ml	EDTA-Na <sub>2</sub>
pH 7,2		

### **Natriumazid-Stammlösung**

10 % (w/v) 10 g/100 ml Natriumazid

Das Natriumazid wurde in bidest. H<sub>2</sub>O gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

### **FACS-Puffer**

1,5 % (v/v) FCS  
0,1 % (w/v) Natriumazid in PBS,  
Aufbewahrung bei 4°C

### **Aggregiertes humanes IgG**

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Taufkirchen

10 mg humanes Gammaglobulin wurden in 1 ml PBS gelöst und für 30 min bei 63°C aggregiert.

## **2.1.6 Medien für Bakterienkulturen**

### ***Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)***

1 % (w/v)	10 g/l	Bacto™ Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
0,5 % (w/v)	5 g/l	Bacto™ Hefe-Extrakt	BD Biosciences, Heidelberg
1 % (w/v)	10 g/l	NaCl	
Zusatz:	100 mg/l	Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Das LB-Medium für die Bakterienkultur wurde mit bidest. H<sub>2</sub>O angesetzt und der pH auf 7 eingestellt. Zum Gießen von Agarplatten wurde zusätzlich 1,5% Bacto-Agar (Difco, Detroit USA) zugesetzt. Die Medien wurden direkt nach dem Ansetzen autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf unter 60°C wurde dem Bacto-Agar gegebenenfalls Ampicillin zugefügt und das Ganze in 10-cm-Petrischalen gefüllt (ca. 20 ml/Schale). Den Flüssigmedien wurde das Ampicillin je nach Bedarf direkt vor Gebrauch zugesetzt. Ampicillin wurde als Konzentrat (50 mg/ml) in bidest. H<sub>2</sub>O gelöst. Sterilfiltrierte 1-ml-Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

## SOB-Medium

2 % (w/v)	5 g	Bacto™ Trypton
0,5 % (w/v)	1,25 g	Bacto™ Hefe-Extrakt
10 mM	146 mg	NaCl
2,5 mM	47 mg	KCl
10 mM	508 mg	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
10 mM	516 mg	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O

Das Medium wurde mit 0,25 Liter bidest. H<sub>2</sub>O angesetzt, mit NaOH auf pH 7 eingestellt, anschließend autoklaviert.

### 2.1.7 Bakterienstamm

Top10F<sup>c</sup> F<sup>c</sup>(lacI<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>) mcrA Δ(mrr -hsdRMS -mcrBC) Φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 nupG (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

### 2.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonuklotide wurden von der Firma IBA (Göttingen) hergestellt.

Maus C3aR- <i>sense</i>	5'-GCA GCA GTA CTA GTG CCA TGG AGT CTT TCG ATG CTG-3'
Maus C3aR- <i>antisense</i>	5'-GCA GCA GTA CTA GTT CAC ACA TCT GTA CTC ATA TTG TTT-3'
humanes C5aR- <i>sense</i>	5'-CAG GAG ACC AGA ACA TGA ACT CC-3'
humanes C5aR- <i>antisense</i>	5'-TAC ATG TTG AGC AGG ATG AGG G-3'
humanes β-Aktin- <i>sense</i>	5'-GCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA-3'
humanes β-Aktin- <i>antisense</i>	5'-ATG GAA GAG TGC CTC AGG GCA GCG-3'
Maus β-Aktin- <i>sense</i>	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'
Maus β-Aktin- <i>antisense</i>	5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'
Ratte β-Aktin- <i>sense</i>	5'-GAT ATC GCT GCG CTC GTC GTC-3'
Ratte β-Aktin- <i>antisense</i>	5'-CCT CGG GGC ATC GGA ACC-3'
pEF-BOS- <i>sense</i>	5'-TCT CAA GCC TCA GAC AGT-3'

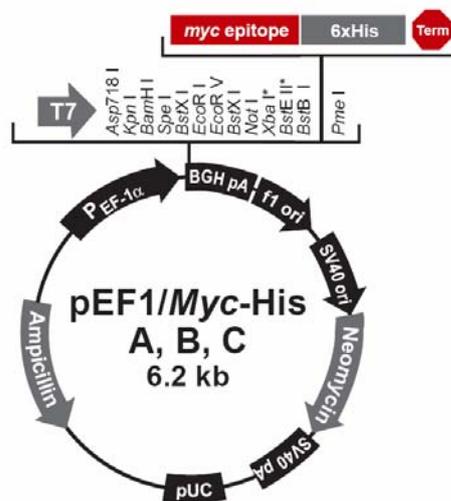
## Sequenz Primer

T7-Primer 5'-TA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'

Maus C3aR Seq 607-sense 5'-ACT GCT CAG CTA ACT GGA C-3'

### 2.1.9 Vektor

Zur Klonierung und stabilen Transfektion der RBL-2H3 Zellen wurde der Vektor pEF1/*Myc*-His A (Abb. 2.1) von der Firma Gibco BRL-Invitrogen GmbH, Karlsruhe, verwendet.



**Abbildung 2.1:** Plasmidkarte des Expressionsvektors pEF1/*Myc*-His

#### 2.1.10 Vorbereitung der Antikörper (FACS-Analyse)

Die Merkmale und die Herkunft der benutzten Antikörper sind in Tabelle 2.1 und 2.2 aufgelistet. Die optimale Verdünnung der Primärantikörper wurde in Vorversuchen mit Verdünnungsreihen (0,65-10 µg/ml) erarbeitet. Zur Verdünnung der Antikörper wurde der FACS-Puffer benutzt. Die markierten Antikörper bzw. das Streptavidin wurden bis zum Gebrauch in einer Dunkelkammer aufgehoben.

**Tabelle 2.1: Erstantikörper und Kontrollgammaglobuline**

Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
Ratte-IgG1 (Isotypkontrolle)	R3-34	IgG1	BD Biosciences, Heidelberg, Nr. 555839
Ratte-IgG2a (Isotypkontrolle)	R35-95	IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg, Nr. 555841
Ratte-IgG2b (Isotypkontrolle)	R35-38	IgG2b	BD Biosciences, Heidelberg, Nr. 555846
Maus-anti-hC5aR	P12/1	IgG2a	Abteilung Immunologie
Maus-anti-hC5aR	W17/1	IgG1	Abteilung Immunologie
Maus-anti-hC5aR	S5/1	IgG2a	Abteilung Immunologie
Maus-anti-hC5aR	61	IgG1	Abteilung Immunologie
Ratte-anti-mC5aR	20-70	IgG2b	Abteilung Immunologie
Ratte-anti-mC5aR	10-92	IgG2a	Abteilung Immunologie
Maus-anti-His-tag (X-X-Gly-Ser-His-His-His)	MAXIMILIAN	IgG1	Connex GmbH, Martinsried
FITC/PE (Isotypkontrolle)		IgG1/IgG2a	Dako Cytomation, Hamburg, Nr. X0949
Ratte-anti-Maus CD68	FA-11	IgG2a	Serotec, Düsseldorf, Nr. MCA1957GA
R-Phycoerythrin konjugierter Ratte-anti-Maus CD19	1D3	IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg, Nr. 557399
R-Phycoerythrin konjugierter Hamster-anti-Maus CD3e	(145-2C11)	IgG1	BD Biosciences, Heidelberg, Nr. 553063
R-Phycoerythrin konjugierter Ratte-anti-Maus F4/80	CI:A3-1	IgG2b	Caltag Lab. Burlingame USA, Nr. R2b04

**Tabelle 2.2: Sekundärantikörper**

Antikörper	Klon	Hersteller
Ziege-anti-Maus	Fluorescein konjugierter polyklonaler IgG+IgM (H+L)	Dako Cytomation, Hamburg, Nr. F0479
Ziege-anti-Ratte	Fluorescein konjugierter polyklonaler IgG+IgM (H+L)	Jackson ImmunoResearch Lab./ Dianova, Hamburg, Nr. 112-096-068
Esel-anti-Ratte	R-Phycoerythrin konjugierter polyklonaler IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Lab./ Dianova, Hamburg, Nr. 712-116-153
Maus-anti-Ratte-	Fluorescein konjugierter IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Lab./ Dianova, Hamburg, Nr. 212-096-168

### 2.1.11 Rekombinante humane C5a- und C3a-Proteine

Die beiden Liganden wurden rekombinant als Fusionsproteine mit einem 6 x Histidin (His)-tag am N-terminalen Ende mit Hilfe des *QIAexpress* Systems exprimiert und gereinigt. Die sechs Histidin-Reste dienten zur Isolierung und Aufreinigung der Expressionsprodukte über eine Nickel-Chelat-Säule. Die funktionelle Aktivität der rekombinanten Proteine wurde über die Induktion der Freisetzung des lysosomalen Enzyms N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAGA) aus Dibutyryl-cAMP-stimulierten U937 Zellen gezeigt. Das Anfügen der N-terminalen Aminosäuren hatte keinen Einfluss auf die biologische Aktivität der Moleküle (ROTHERMEL *et al.*, 1997a; ZWIRNER *et al.*, 1997). Die Herstellung der rekombinanten humanen C5a- und C3a-Moleküle sowie die Kopplung der Proteine mit dem Fluorochrom 5(6)-Carboxy-fluorescein-N-hydroxysuccinimidester (FLUOS) wurde von Frau Ines Heine durchgeführt (Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie).

### 2.1.12 Zelllinien und Medien für die Zellkultur

#### 2.1.12.1 Zelllinien

*RBL-2H3 (Rat Basophilic Leukemia):*

Diese Zelllinie wurde von der *American Tissue Culture collection*, Rockville MD USA, bezogen.

*RBL-hC5aR:*

Bei diesen Zellen handelt es sich um stabil transfizierte RBL-2H3 Zellen, die den entsprechenden Rezeptor in großer Menge auf ihrer Oberfläche exprimieren (ROTHERMEL *et al.*, 1997b).

*RBL-hC3aR:*

RBL-2H3 Transfektanten, die den humanen C3aR stabil exprimieren (ZWIRNER *et al.*, 1998b).

*RBL-mC5aR:*

Stabil transfizierte RBL-2H3 Zellen, die den Maus-C5aR exprimieren (SORURI *et al.*, 2003b).

*RBL-C5aR-Ex1hu-rat:*

Es handelt sich um einen chimären C5aR, der stabil auf RBL-2H3 Zellen exprimiert wird. Bei dieser Chimäre wurden die Aminosäuren 1-40 des C5aR der Ratte durch die entsprechenden Aminosäuren des humanen C5aR ersetzt.

*RBL-C5aR-Ex1/2rat-hu:*

Bei der Chimäre C5aR-Ex1/2rat-hu wurde der Bereich der extrazellulären Domäne 3 bis zum C-Terminus des Ratten-C5aR durch den entsprechenden Bereich des humanen C5aR ersetzt und stabil in RBL-2H3 Zellen zur Expression gebracht.

Die beiden chimären C5aR waren von SABINE RABINI (1996) im Rahmen ihrer Diplomarbeit hergestellt worden (Abteilung Immunologie).

*J774A.1: Maus-Makrophagen-Zelllinie:*

Diese Zelllinie wurde von der *American Tissue Culture Collection*, Rockville MD USA, bezogen.

*RPTEC (Renal Proximal Tubular Epithelial Cell):*

Diese Zelllinie wurde von der *Cambrex Bio Science*, Walkersville USA, bezogen.

*Lymphoblastische Mausmyelomzelllinie P3X63Ag8/653:*

Diese Zelllinie wurde aus dem Mineralöl-induzierten Plasmozytom MOPC/21 aus BALB/c-Mäusen gewonnen.

**2.1.12.2 Kulturmedien**

Zellkulturmedien wurden nach der Herstellung sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Zur Inaktivierung des Komplementsystems musste das benutzte FCS (Fetales Kälberserum) hitzeinaktiviert werden. Dazu wurde das im Kühlschrank aufgetaute und im Wasserbad auf

37°C vorgewärmte FCS für eine halbe Stunde auf 56°C erwärmt, unter der Sterilbank aliquotiert und danach eingefroren.

### Medium 80/20-10

80 % (w/v)	Instamed RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
20 % (w/v)	Instamed Medium 199 Earle	Biochrom AG, Berlin
10 % (v/v)	FCS Pan™	Biotech GmbH, Aidenbach

### Zusammensetzung des Mediums 80/20 für 5 Liter

	41,6 g	RPMI 1640	
	9,8 g	Medium 199	
200 mM	50 ml	L-Glutamin	PAA Lab. GmbH, Cölbe
100 mM	50 ml	Natrium Pyruvat	Biochrom AG, Berlin
	50 ml	nicht essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom AG, Berlin
	50 ml	Antibiotika/Antimykotika (100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin Sulfat)	PAA Lab. GmbH, Cölbe
	10 g	NaHCO <sub>3</sub>	
	4,5 l	bidest. H <sub>2</sub> O	

Das Medium erreichte unter CO<sub>2</sub>-Zufuhr einen pH von 6,8-7,0.

### *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*

	56,75 g	DMEM	Biochrom AG, Berlin
	17,5 g	Glukose	
	50 ml	Penicillin G (100 U/ml)-Streptomycin Sulfat (100 µg/ml)	
	10 g	NaHCO <sub>3</sub>	
	4,5 l	bidest. H <sub>2</sub> O	

Der pH-Wert wurde durch CO<sub>2</sub>-Begasung auf 7,2-7,4 eingestellt.

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 Isolierung und Klonierung von cDNA**

#### **2.2.1.1 Extraktion von Gesamt-RNA und Reverse Transkription (RT)**

##### **Material**

NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kit

Macherey-Nagel, Düren

70% EtOH

Superscript<sup>™</sup> II<sup>®</sup> Kit

Gibco BRL-Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde der NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kit verwendet.

Das System der RNA-Isolierung basiert auf den selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran. Ein spezielles Puffersystem bewirkt die Bindung von bis zu 100 µg RNA (länger als 200 bp) an dieser Membran. Die Denaturierung aller Proteine, einschließlich der RNasen, erfolgte durch einen Guanidinium-Isothiocyanat-haltigen Puffer in Verbindung mit 2-Mercaptoethanol. Durch die Inaktivierung der RNasen wird der Abbau der RNA verhindert. Ethanol schafft adäquate Bindungsverhältnisse, so dass die RNA vollständig an die Membran binden kann und so eine effiziente Reinigung möglich ist. Die genomischen DNA-Kontaminationen wurden durch Verwendung von DNase I entfernt. Die Extraktion von Gesamt-RNA erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II *Handbooks* „*Protocol for Total RNA purification from cultured cells and tissue*“). Da RNA sehr instabil ist und innerhalb kürzester Zeit enzymatisch gespalten wird, wurde nach der Konzentrationsbestimmung durch Messung der optischen Dichte die RNA sofort in stabile DNA umgeschrieben. Dazu wurde das Enzym Reverse Transkriptase (=RNA-abhängige DNA-Polymerase) verwendet. Dieses Enzym ist Bestandteil verschiedener RNA-Viren (Retroviren), die zur Vermehrung (Replikation) darauf angewiesen sind, ihr eigenes Genom in das der Wirtszelle (DNA) einzubauen. Die durch die Reverse Transkription entstehende DNA wird als cDNA bezeichnet (*complementary DNA*). Die cDNA-Umschreibung wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt (*Handbook* „*SUPERSCRIPT<sup>™</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR*“).

### 2.2.1.2 Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente mittels der RT-PCR

#### Material

zu amplifizierende cDNA

5'-Primer (100 pmol)

3'-Primer (100 pmol)

dNTP-Mischung (10 mM)

Eppendorf, Hamburg

Taq DNA-Polymerase-Puffer (10x)

Hot Star Taq DNA-Polymerase

Qiagen GmbH, Hilden

Red Taq™ DNA-Polymerase

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Taufkirchen

Thermocycler

GeneAmp PCR-System 9600 Perkin  
Elmer, Boston USA

Für die Amplifikation von cDNA zur Klonierung und zur Analyse (Kolonie-PCR) wurde die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) eingesetzt. Diese Methode erlaubt die spezifische Amplifikation einer definierten Region eines DNA-Moleküls *in vitro*. Die PCR verläuft in drei Schritten, die in 20-40 Zyklen wiederholt durchlaufen werden. Zuerst wird die zu amplifizierende cDNA (*Template*) thermisch in die Einzelstränge zerlegt (*Denaturierung*), anschließend binden die Primer an komplementäre Sequenzabschnitte auf den Matrizensträngen (*Annealing*) und schließlich werden die 3'-Enden der gebundenen Primer durch die Verwendung einer thermostabilen Taq DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*, einem thermophilen Bakterium) verlängert (*Elongation*). Für die Klonierung wurde die cDNA durch Hot Star Taq DNA-Polymerase amplifiziert. Zur Aktivierung der Hot Star Taq wurde vor dem PCR-Programm eine Inkubation für 5 min bei 95°C durchgeführt. Um die Fehlerrate beim Nukleotideinbau zu reduzieren, wurden nur 20 Amplifizierungszyklen durchlaufen. Für die analytischen PCR-Ansätze wurde die Red Taq™ DNA-Polymerase in bis zu 40 Zyklen verwendet.

In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden 1 µl cDNA mit 1 µl dNTP-Lösung, 5 µl Taq DNA-Polymerase-Puffer (10x), 1 µl 5'-Primer, 1 µl 3'-Primer und 1 µl Taq DNA-Polymerase zusammengebracht. In einem Thermocycler wurde das PCR-Programm wie folgt durchgeführt: 1 min 94°C, 1 min 55-58°C, 1 min 72°C und abschließend 10 min 72°C.

### 2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

#### Material

Agarose NEEO Ultra Pure			Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid-Lösung (1%)			Merck, Darmstadt
DNA-Längenmarker, 100 bp- bzw. 1 kbp-Leiter			Roth, Karlsruhe; Gibco BRL-Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Elektrophoresepuffer TBE (10x)	108	g/l	Tris/HCl
	45	g/l	Borsäure
	8,32	g/l	ETDA-Na <sub>2</sub>
			pH 8,6
Probenpuffer	20%	(w/v)	Ficoll 400, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	0,5	% (w/v)	Bromphenolblau
	100	mM	EDTA-Na <sub>2</sub>
	1	% (w/v)	SDS
			pH 8,0
Gelkamm			
Agarosegelkammer			
Gelelektrophorese-Apparat	Typ Agagel Maxi		Biometra, Göttingen
Transilluminator	Typ Ti 1		Biometra, Göttingen
Gene Power Supply	Typ GPS 200/400		Pharmacia (GE-Healthcare), Freiburg

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gele verwendet. DNA-Fragmente, die einem elektrischen Feld ausgesetzt werden, wandern aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle hängt dabei von Größe, Ladung der Moleküle und von der Gelmatrix, in der sich die DNA-Fragmente befinden, ab. Da die Wanderungsstrecke der DNA-Moleküle umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist, kann anhand eines Standards die Größe der Fragmente bestimmt werden.

Agarose wurde in einer Konzentration von 0,8-1,5% (w/v) in 1x TBE-Puffer durch Mikrowellenbehandlung gelöst. Nach dem Abkühlen wurden 7,5 µl der Ethidiumbromid-

Lösung zu 150 ml der Agaroselösung dazugegeben. Das Gel wurde in eine Gelkammer gegossen und ein passender Kamm für die Auftragstaschen eingesetzt. Nachdem die Agarose erstarrt war, wurde der Kamm entfernt, die Kammer mit dem Gel in einen horizontalen Gelelektrophorese-Apparat eingesetzt und das Gel mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben (bzw. DNA-Längenmarker) wurden im Probenpuffer verdünnt und in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V konstanter Stromstärke (bei RT), bis der Farbmarker den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Der DNA-Längenmarker wurde ebenfalls aufgetragen. Die DNA-Banden wurden auf einem Transilluminator mit Licht der Wellenlänge 254 nm analysiert und fotografiert.

## **2.2.2 Vorbereitung von DNA zur Klonierung**

### **2.2.2.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

#### **Material**

QIAquick Gel Extraktion Kit

Qiagen GmbH, Hilden

Zur Isolierung eines DNA-Fragments wurde zunächst die entsprechende DNA Bande unter schwachem UV-Licht aus einem Agarosegel ausgeschnitten und ausgewogen. Die Extraktion der enthaltenen DNA aus dem Gelstück erfolgte mittels „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ nach den Angaben des Herstellers.

### **2.2.2.2 Phenol-Chloroformextraktion**

Diese Methode wurde immer dann angewendet, wenn es nötig war, Proteine und gelöste Moleküle aus einer wässrigen DNA-Lösung zu entfernen bzw. wenn eine DNA-Lösung konzentriert werden sollte. Mit Phenol wurde Protein extrahiert und die DNA mittels Alkohol anschließend gefällt.

#### **Material**

DNA in wässriger Lösung (<1 mg/ml) in 100 µl bis 400 µl Volumen

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Biomol, Hamburg

Natriumacetat

3 M

pH 5,2

TE-Puffer

10 mM

Tris/HCl

1 mM

EDTA-Na<sub>2</sub>

pH 8,0

Ethanol 96%, eiskalt

Ethanol 70%, Raumtemperatur

Zu der DNA-Lösung wurde gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und kräftig gemischt, bis sich eine Emulsion bildete. Die Emulsion wurde zentrifugiert (13000 rpm, 15 sec, RT) und die obere wässrige Phase ohne das weiße Proteinpräzipitat in der Interphase in ein neues Reaktionsröhrchen gegeben. Um die von Protein gereinigte DNA zu isolieren, wurde die DNA aus der wässrigen Phase nach Zugabe von 1:10 Volumen Natriumacetat (3 M) und 2-3 Volumen 96% eiskaltem Ethanol für 30 min bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 4°C wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

### **2.2.2.3 Restriktionsverdau von DNA**

#### **Material**

Vektor pEF1/*Myc*-His A

DNA-Fragmente

*Spe*I

MBI Fermentas GmbH, St.-Leon-Rot

*Spe*I-Puffer

Zur Vorbereitung des Vektors (pEF1/*Myc*-His A, Abb. 2.1) und der DNA-Fragmente auf die Klonierung wurden diese mit dem Restriktionsenzym *Spe*I geschnitten. Für den Restriktionsansatz zu analytischen Zwecken wurden ca. 10 µg DNA mit 10-20 Units *Spe*I, 2 µl *Spe*I-Puffer in einem 20-µl-Ansatz für 2-3 h bei 37°C inkubiert. Für präparative Zwecke wurden bis zu 100 µg DNA in einem Volumen von 150 µl mit 100-150 Units *Spe*I verdaut. Nach dem Verdau wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt (vgl. 2.2.1.3), ausgeschnitten und aus dem Gel aufgereinigt (vgl. 2.2.2.1).

### **2.2.2.4 Dephosphorylierung von DNA-Enden**

#### **Material**

Vektor

*Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)*

MBI Fermentas GmbH,

St.-Leon-Rot

QIAquick Gel Extraktion Kit

Um eine Selbstligation von geöffneten Vektoren zu verhindern, wurde die 5'-Phosphatgruppe an den DNA-Enden durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*) entfernt. In der Regel wurde nach Ende des präparativen Restriktionsverdau 1-10 U CIAP pro µg DNA direkt in den Verdau pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die CIAP wurde durch 1 h Erhitzen auf 65°C deaktiviert.

### 2.2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten in dem Vektor pEF1/Myc-His A

#### Material

T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St.-Leon-Rot
Ligationspuffer	
Vektor pEF1/Myc-His A, <i>SpeI</i> geschnitten, CIAP-behandelt	
DNA-Fragment	
Polyethylenglycol 4000 (PEG 4000)	Merck, Darmstadt

Nach Restriktionsverdau und Aufreinigung der DNA-Fragmente wurden diese unter Verwendung von T4-DNA-Ligase in den Vektor ligiert. Hierzu wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:14 und 20 µl Ansatz mit 2 µl Ligationspuffer, 2 µl PEG 4000 und 1 µl T4-DNA-Ligase (5 Units) für 2-3 h bei RT ligiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 15 min Inkubation bei 65°C abgestoppt und die DNA direkt in der Hitzeschock-Transformation eingesetzt.

### 2.2.2.6 Einbringung von Plasmid-DNA in Bakterien

#### 2.2.2.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

#### Material

LB-Medium

Inoue-Puffer	10 mM	3,46 g/l	PIPES, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	15 mM	2,20 g/l	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	250 mM	18,64 g/l	KCl
	55 mM	10,88 g/l	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O
	pH 6,7 Aufbewahrung bei -20°C		

Eine einzelne *E. coli*-Kolonie (Stamm Top10F<sup>'</sup>) wurde in 15 ml LB-Vorkultur angeimpft und für 6-8 h bei 37°C in einer Schüttelkammer inkubiert. Mit 1, 3 bzw. 5 ml dieser Vorkultur wurden 3 Hauptkulturen je 100 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 18-22°C geschüttelt. Bei Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,55 wurden die Zellen einer 100-ml-Kultur für 10 min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (bei 4°C für 10 min bei 3500 rpm). Die Bakterien wurden unter Vermeidung von Schaumbildung in 100 ml kaltem und sterilem Inoue-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Aufnahme in 10 ml Inoue-Puffer und Zugabe von 0,75 ml DMSO wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und in 200- $\mu$ l-Aliquots in Stickstoff schockgefroren. Gelagert wurden die Bakterien im Gefrierschrank bei -80°C.

#### **2.2.2.6.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen**

##### **Material**

Kompetente *E. coli*-Zellen (-80°C)

Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz

SOC-Medium (SOB + 20 mM Glukose)

Ampicillinagarplatten

Im Anschluss an die Ligation des geschnittenen Plasmids mit der zu klonierenden DNA wurden *E. coli*-Bakterien mit den fertigen Plasmiden transformiert. Um die Zellmembran eine kurze Zeit lang permeabel zu machen und dadurch den Durchtritt von Plasmid-DNA zu ermöglichen, wurden die Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt. Da die Transformation nur bei einer kleinen Minderheit der Bakterien tatsächlich stattfindet, wurden anschließend alle untransformierten Bakterien an der weiteren Vermehrung gehindert, indem man dem Kulturmedium, auf dem die Bakterien anschließend expandiert wurden, ein Antibiotikum zugab. Die transformierten Bakterien konnten sich durch das eingebaute Plasmid ungehindert vermehren, da das Plasmid ein entsprechendes Resistenzgen enthält. Als Selektionsantibiotikum wurde Ampicillin verwendet. Ampicillin inhibiert eine Reihe von bakteriellen Enzymen, die an der Synthese der Zellwand beteiligt sind.

Ein Aliquot der kompetenten Top10F<sup>'</sup>-Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, in 100  $\mu$ l zu den Ligations- oder Kontrollansätzen gegeben und 30 min auf Eis stengelassen. Im Thermoschüttler bei 42°C wurden die Ansätze für 1 min hitzegeschockt und auf Eis abgekühlt. Danach wurden zu jedem Ansatz je 800  $\mu$ l SOC-Medium gegeben und 1 h bei

37°C präinkubiert. Die Bakterien wurden dann 15 sec bei 13000 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf zwei Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) LB-Platten jeweils 10 µl bzw. 90 µl ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.2.2.6.3 Positive Klone picken und expandieren**

Bakterienkolonien, die auf das Vorhandensein des rekombinanten Plasmids getestet werden sollten, wurden einzeln von der Agarplatte in 2 ml LB-Selektionsmedium überführt und über Nacht bei 37°C kultiviert. Von dieser Kultur wurden 0,5 ml mit 0,5 ml 100% Glycerin (Merck, Darmstadt) vermischt und bei -70°C gelagert. Aus den restlichen 1,5 ml erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA. Für die Maxipräparation der Plasmid-DNA wurden von dem Glycerinstock der Klone 100 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert.

### **2.2.2.7 Kolonie-PCR**

Zur schnellen Überprüfung von Bakterienkolonien auf das Vorhandensein des rekombinanten Plasmids nach Transformation wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierzu wurde das DNA-Fragment mittels geeigneter Oligonukleotid-Primer (Plasmid-spezifisch bzw. Insert-spezifisch) amplifiziert und anschließend gelelektrophoretisch nachgewiesen. Von 10 Einzelkolonien wurde mit sterilen Pipettenspitzen ein kleiner Teil abgenommen und in separate PCR-Reaktionsansätze überführt. Im Falle einer erfolgreichen Ligation konnte im Agarose-Gel eine Bande der erwarteten Größe beobachtet werden. Auf diese Weise wurde sowohl das Vorhandensein als auch die Orientierung des Inserts im Vektor ermittelt.

### **Material**

(vgl. 2.2.1.2 und 2.2.1.3)

Ampicillinagarplatten

Resuspendierte Bakterienkolonie in 50 µl bidest. H <sub>2</sub> O	41 µl
dNTP-Mischung (10 mM)	1 µl
Primer <i>sense</i> (pEF-BOS)	1 µl
Primer <i>antisense</i> (Insert)	1 µl
10x Puffer	5 µl
Taq-Polymerase	1 µl

Dieser Ansatz wurde unter den bereits beschriebenen Bedingungen im PCR-Block inkubiert und anschließend auf einem 1,5% Agarose-Gel analysiert.

#### **2.2.2.8 Minipräparation von Plasmid-DNA**

Minipräparationen dienen zur Produktion kleiner Mengen Plasmid-DNA für die Restriktionsanalyse und zur Sequenzierung des Inserts. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des AX 20-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers.

#### **2.2.2.9 Maxipräparation von Plasmid-DNA**

Die meisten Maxipräparationen dienen zur Erzeugung großer Mengen Plasmid-DNA für die Transfektion eukaryotischer Zellen. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des Nucleobond AX 500-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers.

#### **2.2.2.10 Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA und RNA**

##### **2.2.2.10.1 Photometrische Analyse**

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer Absorption von Licht der Wellenlänge 260 nm quantifiziert werden. Für doppelsträngige DNA gilt, dass eine OD von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml, entspricht bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml. Da die Nukleinsäuren auch das Licht der Wellenlänge 280 nm absorbieren, aber in geringerem Ausmaß als Proteine, kann auch die Reinheit der DNA photometrisch bestimmt werden. Reine DNA sollte einen Quotienten von  $OD_{260}/OD_{280} = 1,6-1,8$  und reine RNA einen Quotienten von 1,8-2,0 aufweisen. Protein-Kontaminationen führen zu einer erhöhten Absorption bei der Wellenlänge 280 nm und somit zu einem erniedrigten Koeffizienten.

##### **2.2.2.10.2 Konzentrationsbestimmung über Vergleich mit Markerbanden im Gel**

Die Methode liefert nur einen Schätzwert, gibt dafür aber Auskunft über die Plasmid- bzw. Fragmentgröße und Nukleinsäureverunreinigungen wie RNA und chromosomale DNA. Der DNA-Marker (1 kbp, 1 µg) und 1-5 µl Probe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Intensitäten von Probe und Referenzbande unter UV-Licht verglichen. Die 1,6-kbp-Bande diente als Referenzbande, sie enthielt 10% der aufgetragenen Marker-DNA, d.h. 100 ng.

### 2.2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Übereinstimmung der Sequenzen der Rezeptor-DNA mit den Referenzsequenzen wurde durch Sequenzierung überprüft. Diese wurde bei der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

## 2.3 Zellbiologische und proteinchemische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

#### Material

Trypsin/EDTA-Lösung	0,025 % (w/v)	Trypsin	Biochrom AG, Berlin
	0,01 % (w/v)	EDTA-Na <sub>2</sub>	
		in PBS	

80/20-10 Medium

G-418-Sulfat ( <i>Geneticin</i> <sup>®</sup> )		PAA Lab. GmbH, Cölbe
G-418-Stammlösung	100 mM	200 mg/ml in HEPES
	pH 7,3	
	Aufbewahrung bei -20°C	

DMEM-Medium + 10% FCS

TNE-Puffer	40 mM	Tris
	1 mM	EDTA-Na <sub>2</sub>
	150 mM	NaCl
	pH 7,5 mit 32% HCl	

REGM<sup>™</sup> (*Renal Epithelial Cell Growth Medium*) BulletKit<sup>®</sup> BioWhittaker, Apen

Der Kit enthält REBM (*Renal Epithelial Cell Basal Medium*) und Wachstumsfaktoren [Hydrokortison, Epinephrin, Triiodthyronin, hEGF (*human Epithelial Growth Factor*), Insulin und Transferin].

Vor Gebrauch wurden dem REBM-Medium Wachstumsfaktoren, GA (Gentamycin-Amphotericin B) und 5% FCS zugefügt.

Alle verwendeten Zelllinien (vgl. 2.1.12.1) wuchsen adhärent und wurden in Gewebekulturschalen (ø 14 cm) in 40 ml Kulturmedium kultiviert. Zum Passagieren von RBL-2H3 Zellen wurden sie im konfluenten Stadium mit PBS gespült, um Spuren von FCS zu beseitigen, mittels Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst und verdünnt in einer neuen Zellkulturschale ausgesät.

Stabil transfizierte RBL-2H3-Zellen wurden in 80/20-10 Medium + 0,6 mg/ml G-418 kultiviert. Um den proteolytischen Abbau von Membran-Proteinen durch Trypsin zu vermeiden, wurden sie unter Verwendung von kaltem PBS abgelöst.

Zum Ablösen der J774A.1-Zelllinie wurden die Zellen mit PBS gespült und mit 5 ml TNE-Puffer für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch leichtes Klopfen abgelöst, einmal mit PBS gewaschen und verdünnt in DMEM-Medium + 10% FCS aufgenommen.

RPTEC (*Renal Proximal Tubular Epithelial Cell*) in der dritten Passage wurden in REGM-Medium + Wachstumsfaktoren ( $5 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in 25-ml-Kulturflasche) kultiviert. Sobald der Boden der Kulturflasche 70-90% konfluent bewachsen war, wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA (3 min bei RT) abgelöst, anschließend wurde das Trypsin/EDTA durch Zugabe von frischem Medium neutralisiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen bei geeigneter Dichte in neuen Flaschen kultiviert.

Die Inkubation aller eukaryotischen Zelllinien erfolgte in einer feuchten Atmosphäre unter konstanter  $\text{CO}_2$ -Konzentration (5%) im Brutschrank bei 37°C.

### **2.3.2 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität**

Für die Auszählung wurden die Zellen mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt. Lebende Zellen können den Farbstoff aktiv ausschließen, abgestorbene Zellen erscheinen blau. Auf diese Weise wurden nur lebende Zellen bei der Zählung berücksichtigt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### **2.3.3 Lagerung eukaryotischer Zellen**

#### **2.3.3.1 Einfrieren**

##### **Material**

Kryoröhrchen		Corning GmbH, Wiesbaden
Einfriermedium	10 % (v/v)	Dimethylsulfoxid (DMSO) in FCS

Zum Einfrieren wurden die Zellen ( $1 \times 10^7$ /ml) in  $4^\circ\text{C}$  kaltem Einfriermedium suspendiert und in vorgekühlten Kryoröhrchen in einer Styroporbox bei  $-20^\circ\text{C}$  zur langsamen Abkühlung gelagert. DMSO diffundiert in die Zellen und verhindert die Kristallbildung beim Einfrieren und somit die Zerstörung der Zellmembran. Die Zellen wurden danach für wenige Tage bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Zur langfristigen Lagerung wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) überführt.

### 2.3.3.2 Auftauen

Die Kryoröhrchen wurden dem Flüssigstickstoff entnommen, vorsichtig geöffnet, um das mögliche explosionsartige Entweichen eingedrungener Stickstoffs zu verhindern, und zügig im  $37^\circ\text{C}$  Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig aspiriert und in ein vorgekühltes 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden tropfenweise mit 10 ml eiskaltem Zellkulturmedium langsam verdünnt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm wurde die Zellsuspension im entsprechenden Zellkulturmedium aufgenommen und die Vitalität sowie die Zellzahl bestimmt.

### 2.3.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion ist eine Methode zur Einschleusung von DNA in eukaryotische Zellen. Die Gene, die auf einem Vektor liegen, werden in der Zelle durch zelluläre Enzyme in eine Aminosäureabfolge (Protein) übersetzt. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen der transienten und der stabilen Transfektion einer Zelle. Bei der transienten Transfektion wird der Expressionsvektor in die Zelle aufgenommen, es kommt zur Ablesung des Zielgens über einen bestimmten Zeitraum. Danach wird das Plasmid abgebaut und die Synthese des Zielproteins kommt wieder zum Erliegen. Bei der stabilen Transfektion kommt es zu einem zufälligen Einbau (eines Teils) des Expressionsvektors in die chromosomale DNA der Zielzelle. Das übertragene Gen wird hier im Gegensatz zur transienten Transfektion bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Diese behalten damit die Fähigkeit, das gewünschte Protein über einen langen Zeitraum hinweg herzustellen. Für die Expression von Rezeptor-DNA wurden stabile Transfektionen in RBL-2H3 Zellen mit Hilfe der Elektroporationsmethode durchgeführt. Als Selektionsmarker wurde das Neomycinresistenz-Gen auf dem Expressionsvektor pEF1/Myc-His A (Abb. 2.1) verwendet. In Gegenwart von G-418 (ein Neomycinanalog) überlebten nur Zellen, bei denen eine Integration des Expressionsvektors in ein Chromosom stattgefunden hatte. Zur

Erleichterung der Integration wurde der Expressionsvektor vorher mit *ScaI* (MBI Fermentas GmbH, St.-Leon-Rot) linearisiert.

### 2.3.4.1 Elektroporation von RBL-2H3 Zellen

#### Material

Expressionsvektor, linearisiert mit *ScaI* (vgl. 2.2.2.3 und 2.2.2.5)

GenePulser™ und Capacitance Extender Bio-Rad, Hercules

Elektroporationsküvette Typ Gene Pulser (0,4 cm) Bio-Rad, Hercules

Medium 80/20-10

G-418-Stammlösung (200 mg/ml)

Die Elektroporationsmethode beruht auf der Beobachtung, dass kurze Hochspannungspulse Poren in den Zellmembranen verursachen, durch welche dann exogene DNA in die Zelle aufgenommen werden kann (NEUMANN *et al.*, 1982; CHU *et al.*, 1987).

RBL-2H3 Zellen wurden ( $1 \times 10^7$  Zellen in 250  $\mu$ l PBS) in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette auf Eis gelagert. Zu diesen Zellen wurden 18  $\mu$ g linearisierten Expressionsvektors pipettiert, für weitere 10 min auf Eis inkubiert und im Elektroporationsgerät mit einem Puls von 260 V elektroporiert. Die Zellen wurden erneut für 10 min auf Eis inkubiert, anschließend mit 10 ml 80/20-10 Medium gewaschen. Das Zellsediment wurde in Medium aufgenommen und auf 3 sterile 24-Loch-Zellkulturplatten ausplattiert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Selektion stabil transfizierter Klone durch Zugabe von 0,6 mg/ml G-418. Nach etwa einer Woche waren alle nicht transfizierten Zellen abgestorben und Klone von Transfektanten zu beobachten. Diese wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in je einen Napf einer 24-Lochplatte überführt. Sobald ausreichend Zellen zur Verfügung standen, wurden sie im Durchflusszytometer (vgl. 2.3.14.1) analysiert und bei einer hohen Expressionsstärke des transfizierten Rezeptors subkloniert. Hierzu wurde das gleiche Verfahren wie bei der Klonierung von Hybridomen angewandt (vgl. 2.3.5.4).

### **2.3.5 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den humanen C5a- und den murinen C3a-Rezeptor**

#### **2.3.5.1 Immunisierung der Ratten**

Für die Immunisierung der Ratten zur Herstellung der rezeptorspezifischen monoklonalen Antikörper wurden je  $2-4 \times 10^7$  hC5aR bzw. mC3aR exprimierende RBL-Zellen in 1 ml PBS pro Injektion verwendet. Die Zellen wurden den Ratten intraperitoneal injiziert. Zur Auffrischung der Immunantwort wurden die Ratten 9- bis 10-mal im Abstand von ca. 4 Wochen erneut immunisiert. 3 Tage nach der letzten Injektion wurden die Milzzellen einer immunisierten Ratte mit einer nicht produzierenden Myelomzelllinie fusioniert.

#### **2.3.5.2 Gewinnung der Milzzellen**

Die immunisierte Ratte wurde durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet und mit Ethanol desinfiziert. Alle folgenden Schritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Zur Entnahme der Milz wurde die Bauchdecke geöffnet und die Milz herausgeschnitten. Sie wurde mit PBS gewaschen und anhaftende Fettreste entfernt. Anschließend wurde die Milz mit einer 20-G-Kanüle perforiert und die Milzzellen mit vorgewärmtem (37°C) PBS aus der Milz in eine Petrischale gespült. Die Zellsuspension wurde in ein Röhrchen überführt und zum Absetzen der Zellaggregaten 5 min stehengelassen. Im Anschluss erfolgte die Zellfusion.

#### **2.3.5.3 Fusion von Ratte-B-Lymphoblasten mit der Maus-Myelomzelllinie P3X63Ag8/653**

Um Zelllinien zu erhalten, die monoklonale Antikörper stabil und in größeren Mengen produzieren, können B-Zellen mit Myelomzellen fusioniert und im weiteren Verlauf kloniert werden (KÖHLER und MILSTEIN, 1975). Die B-Zellen liefern die Fähigkeit zur Antikörperproduktion, während die Myelomzellen die unbegrenzte Wachstumsfähigkeit und die kontinuierliche Antikörpersekretion beisteuern.

Die Fusion erfolgte in Gegenwart von Polyethylenglykol (PEG). Als Fusionspartner wurde die murine HAT-sensitive P3X63Ag8/653 (Kurzname „Ag8“) Myelomzelllinie gewählt. Die verwendete Zelllinie weist einen Defekt im Reservestoffwechselweg der Nukleinsäuresynthese auf. Es fehlt das Enzym **Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase** (HGPRT).

HGPRT katalysiert die Synthese einer gemeinsamen Vorstufe von AMP und GMP aus Hypoxanthin. Zur Selektion der Hybridomzellen blockiert man den Hauptstoffwechselweg des Purin- und des Pyrimidin-Stoffwechsels durch Verwendung von Aminopterin in HAT-Medium (HAT: **H**ypoxanthin, **A**minopterin, **T**hymidin). Eine Zelle, die Purine und Pyrimidine aus Hypoxanthin und Thymidin über den Reservestoffwechselweg synthetisiert, kann die HAT-Behandlung überleben. Fusionierte Hybridomzellen erwerben diese Fähigkeit durch B-Lymphozyten. Myelomzellen sterben dagegen ab, da beide Stoffwechselwege blockiert sind.

### ***Material***

Mikrotiter 96-Flachbodenplatte	Sarstedt, Nümbrecht
RPMI 80/20-10	
HAT-Stammlösung (50x)	Biochrom AG, Berlin
PEG 4000 GC	Merck, Darmstadt Nr. 9727
PEG-Lösung	10 g PEG 4000 in 10 ml serumfreiem 80/20 Medium, Aufbewahrung bei 4°C
Rekombinantes humanes IL-6	5-20 U/ml, Strathmann Biotech AG, Hamburg
Phosphatpuffer (PBS)	

Ag8 Zellen wurden ca. 14 Tage vor der Fusion aufgetaut und in 250-ml-Zellkulturflaschen in RPMI 80/20-10 Medium kultiviert. Gut wachsende Zellen wurden alle 48 Stunden im Verhältnis 1:4 gesplittet. Für die Fusion wurden logarithmisch wachsende Zellen (ca.  $2 \times 10^8$  Zellen) verwendet.

Die Zellen wurden schließlich geerntet, zweimal in serumfreiem Medium gewaschen und in einem 50-ml-Plastikröhrchen in 80/20 Medium auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Zellen im Verhältnis 2 Teile Ag8 Zellen und 1 Teil Lymphozyten wurden in einem 50-ml-Plastikröhrchen vereint und bei 1200 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellsediment vorsichtig resuspendiert. Unter ständigem Schütteln des Röhrchens wurden dann 1,5 ml auf 37°C vorgewärmte PEG-Lösung innerhalb 1 min hinzugesetzt. Danach wurde eine Minute lang bei 37°C gemischt, gefolgt von der Zugabe von 20 ml vorgewärmtem PBS unter ständigem Weiterrühren wie unten dargestellt:

1 ml in 30 sec

3 ml in 30 sec

16 ml in 1 min

Anschließend wurde die Zellsuspension vorsichtig resuspendiert und 5 min bei RT erneut zentrifugiert (300g). Die Zellen wurden 5 min bei RT inkubiert und dann der Überstand abgesaugt. Nach Zugabe von 250 ml Medium und der erforderlichen HAT-Menge (Endkonz.: Hypoxanthin 100  $\mu$ M, Aminopterin 0,4  $\mu$ M, Thymidin 16  $\mu$ M) wurden 25% der Fusion auf 16 Zellkulturplatten (96-Flachbodenplatte) verteilt. Jeweils zwei Tropfen (ca. 80  $\mu$ l) dieser Zellsuspension wurden aus einer 10-ml-Glaspipette pro Napf pipettiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Rest der Fusion wurde eingefroren.

Das Medium der Fusion wurde alle 3 Tage abgesaugt und durch frisches HAT-Medium ersetzt. Gegebenenfalls wurde rhIL-6 (B-Zell-Wachstumsfaktor) zugefügt. Nach ca. 10 Tagen konnten 100  $\mu$ l der Hybridomüberstände (ca. 1600 Proben) mittels Durchflusszytometrie (vgl. 2.3.14.1) auf die Sekretion spezifischer Antikörper untersucht werden. Positive Klone wurden dann weiter in HAT-Medium kultiviert und subkloniert.

#### **2.3.5.4 Klonierung positiver Hybridome**

Eine Zelllinie wird als stabil und monoklonal angesehen, wenn sie ein- bis zweimal rekloniert worden ist (PETERS und BAUMGARTEN, 1990). Dazu wurden durchflusszytometrisch positive Klone durch Endpunktverdünnung (*limiting dilution*) nach COLLER und COLLER (1983) weiter subkloniert. Es wurde versucht, aus Zellgemischen die Zellen zu isolieren, die den gewünschten Antikörper produzieren. Zu diesem Zweck wurden die Hybridomzellen so verdünnt, dass pro Napf statistisch höchstens eine Zelle vorkommt. Hierfür wurden einzeln liegende Klone in den positiven Nöpfen mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in ein Röhrchen überführt. Nach der Zellzahlbestimmung wurde aus der Zellsuspension eine Verdünnung hergestellt, die in 10 ml ca. 100 Zellen enthält. Diese Verdünnung wurde auf eine 96-Lochplatte mit 100  $\mu$ l/Napf verteilt, mit 100  $\mu$ l HAT-Medium befüllt und im Brutschrank inkubiert. Diese Subklonierung wurde in Gegenwart von Peritoneal-Makrophagen durchgeführt.

Nach 10 Tagen wurden die wachsenden Klone auf Antikörperproduktion getestet. Positive Klone wurden sowohl rekloniert als auch weiterkultiviert, bis sie als Sicherheitsreserve eingefroren werden konnten.

#### **2.3.5.5 Präparation von Maus-Peritoneal-Makrophagen als Feederzellen**

Die wesentlichen Aufgaben von Peritoneal-Makrophagen sind die Beseitigung der toten Zellen durch Phagozytose und Freisetzung von Wachstumsfaktoren. Diese Feederzellen

wurden einige Tage vor der Subklonierung durch Ausspülen der Bauchhöhle einer frisch getöteten NMRI-Maus mit 10 ml eiskaltem PBS gewonnen. Die Zellen wurden in Medium 80/20-10 aufgenommen und in zehn 96-Lochplatten ausplattiert.

### **2.3.6 Massenproduktion monoklonaler Antikörper**

#### **Material**

Minibioreaktor	Typ miniTHERM CTT	Heraeus-Kendro, Osterode
Kulturmedium	Medium 80/20 mit 10% FCS	

Zur Herstellung großer Mengen anti-hC5aR- bzw. -mC3aR-Antikörper wurden die Antikörper produzierenden Hybridomzellen zu  $7,5 \times 10^5$  Zellen/ml in dem Heraeus miniPERM-System kultiviert und bei 5 Umdrehungen/min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Der miniPERM-Bioreaktor besteht aus einem Produktions- und einem Versorgungsmodul. Diese sind durch eine semipermeable Membran mit einer Ausschlussgröße von 12,5 kDa voneinander getrennt und werden nach außen durch eine gasdurchlässige Silikonmembran begrenzt, die Zellen und hochmolekulare Produkte zurückhält. Nährstoffe, physikalisch gelöste Gase und Metabolite können jedoch passieren. Hierdurch ist eine starke Anreicherung von Zellen und Zellprodukten möglich. Zu Beginn wurden 40 ml Zellsuspension in das Produktionsmodul überführt und das Versorgungsmodul wurde mit 350 ml RPMI 80/20-10 aufgefüllt. Gegebenenfalls wurden HAT und rhIL-6 zugefügt. Nach jeweils zwei bis drei Tagen wurde die Zellzahl im Produktionsmodul bestimmt. Bei ausreichenden Zellzahlen wurden 20 bis 30 ml der Kultur geerntet und das Medium im Versorgungsmodul wurde durch frisches Medium ersetzt. Die Zellsuspension wurde bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Überstand bis zur späteren Aufreinigung bei -20°C eingefroren.

### **2.3.7 Isotypbestimmung monoklonaler Antikörper**

#### **Material**

Isotypisierungskit	Zymed Lab., South San Francisco USA
FACS-Puffer	
Streptavidin-FITC	Dako Cytomation, Hamburg, Nr. F 0422
Streptavidin-RPE-Cy5	Dako Cytomation, Hamburg, Nr. C 0050

Die Bestimmung des Isotyps der monoklonalen Antikörper erfolgte aus dem Kulturüberstand der klonierten Hybridome mit einem Kit der Firma Zymed. Zur Isotypisierung von Antikörpern der Ratte gehört die Aufklärung der Immunglobulinklasse (z.B. IgA, IgG, IgM) und –subklasse (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) durch die Bestimmung der Schwere- und Leichtkette (H sowie der Leichtkette L (kappa ( $\kappa$ ) und lambda ( $\lambda$ )). Die Isotypisierung diente der Charakterisierung der monoklonalen Antikörper. Diese war erforderlich, um das beste Verfahren zur Aufreinigung der monoklonalen Antikörper wählen zu können.

Mit dem Kit, der ursprünglich für einen ELISA vorgesehen war, wurde stattdessen eine Immunfluoreszenzfärbung nach der indirekten Biotin-Streptavidin-Methode durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Affinität von Streptavidin (ein Protein von *Streptomyces Avidinii*) zum Vitamin Biotin. Der an das Antigen gebundene spezifische (primäre) Antikörper wurde mit einem biotinylierten sekundären, gegen den primären Antikörper gerichteten Antikörper gebunden. Der Nachweis der Sekundärantikörper wiederum geschieht mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Streptavidin.

In je 8 Näpfe der Mikrotiter-Rundbodenplatte (Spalte, senkrecht) wurden  $1,5 \times 10^5$  hC5aR- bzw. mC3aR-exprimierende RBL-Zellen mit 100  $\mu$ l Hybridomkulturüberstand für 45 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei 1400 rpm für 1 min sedimentiert, mit 200  $\mu$ l FACS-Puffer zweimal gewaschen und in 50  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen. Danach wurden in je einer Reihe (waagrecht) der Mikrotiterplatte pro Napf 50  $\mu$ l der verschiedenen H- bzw. L-Ketten-spezifischen Antikörper (biotinyliert) pipettiert. Nach einer Inkubation für 45 min auf Eis wurden die Zellen sedimentiert und wie zuvor zweimal mit je 200  $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Streptavidin-FITC bzw. Streptavidin-PE-Cy5 in einer Verdünnung von 1:100 hinzugefügt und ebenfalls für 45 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurde die Isotypbestimmung mittels Durchflusszytometer durchgeführt.

### **2.3.8 Aufreinigung monoklonaler Antikörper**

#### **2.3.8.1 Protein G-Affinitätschromatographie**

##### **Material**

Protein G-Sepharose™ 4 Fast Flow rekombinantes Protein G, kovalent gekoppelt an Sepharose 4 Fast Flow (5 ml), Amersham Biosciences (GE-Healthcare), Freiburg

Protein G-Sepharose-Säule Amersham Biosciences (GE-Healthcare), Freiburg

## Material und Methoden

Photometer	UV-Monitor UV-1, für Durchflussmessung bei 280 nm mit angeschlossenem Schreiber, Pharmacia (GE-Healthcare), Freiburg		
Säulenpuffer (Waschpuffer)	20 mM	10,71 g/10 l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	20 mM	43,98 g/10 l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O pH 7,0
Elutionspuffer	0,1 M	3,75 g/500 ml	Glycin, pH 2,7
Neutralisationspuffer	1 M	60,57 g/500ml	Tris-HCl, pH 9,0
Regenerierungspuffer	2 M	60,06 g/500 ml	Harnstoff
	1 M	21,19 g/500 ml	LiCl
	0,1 M	3,75 g/500 ml	Glycin pH 2,5
Lagerungspuffer	PBS mit 0,1% (w/v) Natriumazid		
Dialyseschläuche (16 und 29 mm) Phosphatpuffer (PBS)	Ausschlussvolumen 12-14 kDa	Serva, Heidelberg	

Zur Immun-Affinitätschromatographie der hergestellten monoklonalen Antikörper aus Zellkulturüberständen kam eine Protein G-Säule zum Einsatz. Protein G ist ein bakterielles Oberflächenprotein aus *Streptokokken* der G-Gruppe mit einer spezifischen Affinität zur Fc-Region von Immunglobulinen der G-Klasse (NILSON *et al.*, 1986).

Die Bindungsaffinität der verschiedenen IgG-Subklassen ist pH-abhängig und erfolgt bei pH 5-7. Wegen einer hohen Bindungskonstanten zwischen Immunglobulin und Protein G erfordert die Elution relativ saure Bedingungen bei pH 2,7. Abhängig von Herkunft (Spezies) und Subklasse des Antikörpers kann die Bindungsstärke von Protein G erheblich variieren. Alle IgG-Subklassen der Ratte binden gut an Protein G. Vor der Aufreinigung wurden die Zellkulturüberstände (200-300 ml) bei 1700 rpm 10 min zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert (0,22 µm). Dadurch wurden partikuläre Bestandteile wie Zellen oder Zellenabrieb entfernt. Anschließend erfolgte eine zweimalige Dialyse mit je 10 Liter Säulenpuffer über 48 h bei 4°C. Zu Beginn wurde die Säule mit 5 ml Protein G befüllt.

Diese Menge verfügt über eine IgG-Bindungskapazität von ca. 7 mg/ml. Vor jeder Aufreinigung wurde die IgG-Konzentration der Kulturüberstände bestimmt, um eine Überladung der Säule zu verhindern. Vor dem Probenauftrag wurde die Protein G-Säule mit dem 10fachen Säulenvolumen Waschlösung (Flussrate von 1 ml/min) equilibriert. Der Probenauftrag erfolgte bei 4°C mit derselben Geschwindigkeit. Es wurde immer darauf geachtet, dass keine Luft auf die Säule gepumpt wurde und die Säule „trocken lief“. Die Säule wurde dann an ein Photometer angeschlossen und solange mit Säulenpuffer gewaschen, bis der Schreiber die Basislinie zeichnete. Der Antikörper wurde mit Elutionspuffer eluiert. 10 Fraktionen von je 1 ml Eluat wurden hierbei manuell gesammelt. Durch Zugabe von Neutralisationspuffer wurden alle Fraktionen möglichst zügig neutralisiert, da aufgrund des sauren pH-Wertes die IgG-Moleküle irreversibel denaturieren würden. Die Antikörperkonzentration des Eluates wurde im Photometer bei 280 nm Wellenlänge bestimmt (vgl. 2.3.10) und Protein-haltige Fraktionen bei Extinktion (OD) über 1 vereinigt und zweimal gegen PBS (je 5 Liter) über 24 h dialysiert. Der aufgereinigte Antikörper wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Die Säule wurde direkt nach der Elution im Wechsel von je 10fachem Säulenvolumen Elutions-, Säulen-, Regenerierungs- und Säulenpuffer regeneriert. Zur Aufbewahrung bei 4°C wurde abschließend Lagerungspuffer über die Säule gegeben.

### **2.3.9 Fluorochromkopplung monoklonaler Antikörper**

Zur Fluorochromkopplung wurden über Protein G gereinigte Antikörper verwendet. Als Fluorochrom wurde der Fluoreszenzfarbstoff FLUOS 5(6)-Carboxy-fluorescein-N-hydroxysuccinimidester (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet.

#### **Material**

Kopplungspuffer	0,1 M	NaHCO <sub>3</sub>
	pH 8,4	
FLUOS-Stammlösung	1 mg FLUOS in 250 µl DMSO	

Der Antikörper wurde gegen den Kopplungspuffer dialysiert, um störende Aminogruppen (z.B. des Tris-Puffers) zu entfernen. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 280 nm auf 1 mg/ml eingestellt (vgl. 2.3.10). Durch Zugabe von 4, 12 bzw. 40 µl FLUOS-Stammlösung zu je 1 mg Antikörper wurde die Kopplung

gestartet (Immunglobulin:FLUOS Verhältnisse 1:5, 1:15, 1:50). Gegebenenfalls konnte die Konzentration von FLUOS erhöht werden. Die Menge der FLUOS-Lösung wurde durch folgende Formel bestimmt.

Menge von FLUOS ( $\mu\text{g}$ ) = Ak-Menge ( $\mu\text{g}$ ) x MW Ak (160000 Da für IgG): MW FLUOS (473 Da) x Konjugationsfaktor

Der Reaktionsansatz wurde in Alufolie eingewickelt und unter Rotation für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der markierte Antikörper gegen PBS dialysiert. Zur Untersuchung der erfolgreichen Kopplung wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt.

### 2.3.10 Photometrische Bestimmung der Antikörperkonzentration

#### Material

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Küvetten, (Typ UVette) 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg

Unter den Voraussetzungen von LIVINGSTON (1974), dass eine Antikörperlösung von 1 mg/ml bei einem Küvettdurchmesser von  $d = 1 \text{ cm}$  eine Absorption (280 nm) von 1,46 aufweist, wurde die IgG-Konzentration im Biophotometer bestimmt. Mit dieser Methode konnten nur Antikörperfraktionen ohne Fremdproteinanteil gemessen werden. Sollten jedoch Zellkulturüberstände gemessen werden, die FCS enthielten, wurde folgender ELISA angewendet.

### 2.3.11 Bestimmung der Antikörperkonzentration mittels ELISA

#### Material

ELISA-Platte Maxi Sorp	Nunc GmbH, Wiesbaden		
Beschichtungspuffer	Stammlösung A:	0,2 M 10,6 g /500 ml	$\text{Na}_2\text{CO}_3$
	Stammlösung B:	0,2 M 8,4 g /500 ml	$\text{NaHCO}_3$
	Gebrauchslösung:	85 ml Stammlösung A, 40 ml Stammlösung B aufgefüllt auf 500 ml mit bidest. $\text{H}_2\text{O}$ pH 10,6	
Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper	Dako Cytomation, Hamburg, Nr. Z0455		

## Material und Methoden

Waschpuffer	PBS mit 0,05% (w/v) Tween 20 (5 g auf 10 l)		
Blockierungspuffer	Beschichtungspuffer mit 1% Gelatine (Bacto Gelatin) Difco, Detroit USA Lagerung bei -20°C		
Nachweisantikörper	Peroxidase-konjugierter Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper Dako Cytomation, Hamburg, Nr. P0450		
ABTS (Substrat)	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat (6)] C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub> -(NH <sub>4</sub> ), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim		
Substrat-Lösung	2 mM	0,11 g/100ml	ABTS
	100 mM	0,82 g/100ml	Natriumacetat
	50 mM	0,69 g/100ml	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	pH 4,2 mit konzentrierter Essigsäure, Lagerung bei -20°C		
Plattenphotometer	Typ	Thermo <sub>max</sub>	Molecular Devices, Menlo Park USA
Waschgerät für Mikrotiterplatten	Typ	Nunc-Immuno™ Wash 12 Nunc Brand Products, Dänemark	

Mittels "Sandwich Ig-ELISA" (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) wurden die Ig-Konzentrationen in Hybridomkulturüberständen bestimmt. Dazu wurde die ELISA-Platte zunächst mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper (1:1000 Verdünnung im Beschichtungspuffer), der an die schweren Ketten von Ig-Molekülen bindet, über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer beschichtet. Nach Blockierung der unspezifischen Bindungen durch Blockierungspuffer für 45 min bei RT wurde die Platte dreimal mit jeweils 200 µl PBS/Tween pro Napf gewaschen. Die Proben (verdünnt 1:500 – 1:16000) und der Ig-Standard (3,90-500 pg/ml) wurden in Doppelbestimmung in die Mikrotiterplatte überführt (je 100 µl) und für 2 h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen der Nöpfe entfernt. Der Nachweis erfolgte mit einem Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper. Dazu wurde der Antikörper 1:2000 in PBS/Tween verdünnt und 100 µl pro

Napf in die Platte eingebracht. Nach 90 min wurde die Platte viermal gewaschen und ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frisch (40 µl 3,4%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 10 ml Substrat-Lösung) als Peroxidasesubstrat eingesetzt. Nach Zugabe von je 100 µl pro Napf wurde die optische Dichte bei 405-490 nm im Plattenphotometer bestimmt.

Mit Hilfe einer Standardkurve ( $y = OD$ ,  $x = \text{Konzentration}$ ) aus der Verdünnungsreihe der definierten Antikörpermengen (Ig-Standards) lässt sich die Konzentration der im Überstand vorhandenen Antigen-spezifischen Antikörper ermitteln.

### **2.3.12 Peptid-ELISA**

#### **Material**

vgl. 2.3.11

Kaninchen-anti-Maus IgG, HRP-konjugiert

Dako Cytomation, Hamburg,  
Nr. P0260

Der Peptid-ELISA diente zur Epitopanalyse der monoklonalen Antikörper gegen den N-Terminus des hC5aR. Hierfür wurden die Peptide REX1 (Aminosäuren 1-31 des hC5aR: **MNSFNYYTTPDYGHYDDKDTLNLNTPVDKTSN**) und XAL (Aminosäuren 15-27 des hC5aR: **DDKDTLNLNTPVD**) verwendet. Die beiden Peptide wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. M. Oppermann zur Verfügung gestellt.

Pro Napf einer ELISA-Platte wurden 0,5-5 µg/ml Peptid REX1 bzw. XAL in je 100 µl Beschichtungspuffer über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden danach durch Zugabe von 200 µl/Napf Blockierungspuffer für 45 min bei RT blockiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit je 200 µl PBS/Tween pro Napf gewaschen und 100 µl Hybridomkulturüberstand in Doppelproben in die Mikrotiterplatte eingebracht. Nach einer Inkubation von 2 h bei RT wurde die Platte erneut dreimal gewaschen. In die Näpfe wurden dann 100 µl Peroxidase-gekoppelter Kaninchen-anti-Ratte- bzw. anti-Maus-Antikörper (1:2000 verdünnt in PBS/Tween) als Nachweisantikörper pipettiert und 45 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Platte wurde dreimal gewaschen und ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat eingesetzt. Die Messung der spezifischen Absorption erfolgte bei 405 nm (Referenzwellenlänge 490 nm).

### 2.3.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt werden (LAEMMLI, 1970; LAEMMLI und FAVRE, 1973). Dabei wandern die zu untersuchenden Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix, gebildet von einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid. Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale lange Polymere in einer Kettenreaktion. Bisacrylamid dient dazu, diese Polymere zu vernetzen. Als Katalysator wird TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin), als Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat (APS) eingesetzt.

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein Detergens, das sich an Proteine anlagert und diese denaturiert. Die resultierenden Komplexe erhalten durch die Sulfatgruppen eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist dann nur noch von der relativen Molekülmasse abhängig.

In dieser Arbeit wurde SDS-PAGE benutzt, um die Reinheit der aufgereinigten monoklonalen Antikörper zu überprüfen.

#### Material

Trenngelpuffer	2,25 M	Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,743 M	Tris/HCl, pH 6,8
Agarose zum Abdichten	1 % (w/v)	
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (AA/BIS), 30 % (w/v)		Serva, Heidelberg
	29 % (w/v)	Acrylamid
	1 % (w/v)	Bisacrylamid
	(Aufbewahrung bei 4°C)	
Ammoniumperoxodisulfat (APS) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	10 % (w/v)	Merck, Darmstadt
	(Aufbewahrung bei 4°C)	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 % (w/v)	

## Material und Methoden

Probenpuffer	62,5	mM	Tris/HCl, pH 6,8
	5	% (w/v)	Saccharose, Serva, Heidelberg
	5	% (v/v)	2-Mercaptoethanol
	2,0	% (w/v)	SDS
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer	0,025	M	Tris
	0,19	M	Glycin
	0,1	%(w/v)	SDS
TEMED			Roth, Karlsruhe
<i>Prestained Protein Molecular Weight Marker</i>			MBI Fermentas GmbH, St.–Leon-Rot
Elektrophorese-Kammer	Typ G 47		Biometra, Göttingen
Gene Power Supply GPS (200/400)			Pharmacia (GE-Healthcare), Freiburg

Die Gele wurden zwischen zwei durch Abstandshalter getrennte Glasplatten in einer Gelapparatur gegossen, die zuvor mit heißer Agaroselösung abgedichtet worden war. Bei einer Gelgröße von 10 x 7 cm betrug das Gelvolumen ca. 5,3 ml.

**Tabelle 2.3: Zusammensetzung eines 12% SDS-Gels**

Trenngel		Sammelgel		Lösungen
7,2	ml	1,6	ml	AA/BIS
3,0	ml	-		Trenngelpuffer
-		2,0	ml	Sammelgelpuffer
7,8	ml	8,4	ml	bidest. H <sub>2</sub> O
150	μl	100	μl	10% SDS
15	μl	10	μl	TEMED
100	μl	100	μl	10% APS

Vor der Zugabe von TEMED wurden die Lösungen entgast. Unmittelbar nach der TEMED-Zugabe wurden je 4,2 ml Trenngellösung in eine Gelkammer pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von 30 min wurde das Isopropanol durch Spülen mit bidest. H<sub>2</sub>O entfernt und das Sammelgel (1,5 ml) gegossen

(Tabelle 2.3). Vor der Polymerisation des Sammelgels wurde ein Kamm zur Ausbildung der Probenaschen eingesetzt.

Von dem aufgereinigten Antikörper wurden 1-5 µg in 20 µl Probenpuffer aufgenommen und für 3 min bei 100°C erhitzt. Mit einer Hamilton-Spritze wurden die Proben in die ausgesparten Probenaschen des Sammelgels gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 12,5 mA, bis die durch Bromphenolblau markierte Lauffront das Gelende erreicht hatte.

### ***Fixierung und Färbung von Polyacrylamidgelen***

Zur Fixierung und dauerhaften Färbung der SDS-Polyacrylamidgele wurden diese über Nacht bei RT in Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung auf einem Schüttler geschwenkt. Die Hintergrundfärbung der Gele wurde durch mehrfaches Schwenken in Entfärbelösung entfernt.

Fixier- und Färbelösung	0,25	% (w/v)	Coomassie-Brilliant-Blue G250, Serva, Heidelberg
	25	% (v/v)	Ethanol
	8	% (v/v)	Essigsäure
Entfärbelösung	25	% (v/v)	Ethanol
	8	% (v/v)	Essigsäure

### **2.3.14 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung gefärbter Einzelzellen in Suspension anhand der Lichtstreuungseigenschaften sowie der emittierten Fluoreszenzstrahlung. Beim Durchflusszytometer findet eine gleichzeitige Messung von relativer Zellgröße [Vorwärtslichtstreuung (FSC=*Forward Scatter*)], Granularität [Seitwärtslichtstreuung (SSC=*Side Scatter*)] sowie von bis zu vier verschiedenen Fluoreszenzfarben statt. Zur Analyse wird die Zellsuspension in ein Probenröhrchen gegeben. Die Zellen werden über ein Schlauchsystem mittels Überdruck in den Messbereich eingeführt. Hier treten sie in eine haarfeine Messküvette ein, die von einem fokussierten Argon-Laser (488 nm) durchstrahlt wird. Die Zellen können den Laser nur einzeln passieren. Die Streulicht und Fluoreszenzsignale werden durch Spiegel und

Filtersysteme auf die verschiedenen Photoverstärkerröhren geleitet. Über einen angeschlossenen Computer werden die Messdaten verarbeitet und gespeichert.

### **2.3.14.1 Färbung von Zellen mit spezifischen Fluorochrom-markierten Reagenzien**

#### **Material**

Phosphatpuffer (PBS)

FACS-Puffer

Blockierungspuffer aggregiertes humanes IgG (10 mg/ml)

Mikrotiter 96-Rundbodenplatte Greiner GmbH, Nürtingen

FACS-Röhrchen Sarstedt, Nümbrecht

Fluorochrom-markierte Reagenzien anti-Maus- bzw. anti-Ratte-IgG-Antikörper

Platten-Zentrifuge Typ 2-5 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Osterode

Durchflusszytometer Typ Coulter Epics XL

Beckman Coulter, Krefeld

FACS-Messungen wurden durchgeführt, um die Eigenschaften der hergestellten monoklonalen Antikörper zu untersuchen. Außerdem sollte auf diese Weise die Expression der mC3aR auf der Oberfläche von transfizierten RBL-Zellen überprüft werden.  $1-2 \times 10^5$  Zellen wurden jeweils in einem Endvolumen von 100  $\mu\text{l}$  gefärbt. Die Färbungen wurden in einer Mikrotiter-Rundbodenplatte oder 4-ml-FACS-Röhrchen durchgeführt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und bei 1400 rpm für 1 min bei 4°C sedimentiert. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde das Zellpellet für 30 min auf Eis mit 20  $\mu\text{g}$  aggregiertem humanem IgG in 100  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  Primärantikörper in einer Konzentration von 65 ng-10  $\mu\text{g/ml}$  in FACS-Puffer für 45 min auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen bei 4°C wurde der Sekundärantikörper (Fluorochrom-markierter anti-Maus- bzw. anti-Ratte-IgG-Antikörper) in einer Verdünnung von 1:100-1:400 hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 45 min auf Eis im Dunkeln wurden die Zellen zweimal mit je 200  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer gewaschen, in 300  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer mit Hilfe der Coulter Epics Software (XL/XL-MCL System II) analysiert.

## 2.3.15 Isolierung und Präparation von humanen und murinen Zellen

### 2.3.15.1 Präparation von Knochenmarkszellen

#### Material

BmDC-Medium	RPMI 1640-Medium + 5% FCS
	0,1 mM Nicht essentielle Aminosäuren
	2 mM L-Glutamin
	1 mM Natrium Pyruvat
	20 µg/ml Gentamycin
	5 x 10 <sup>5</sup> M 2-Mercaptoethanol

Phosphatpuffer (PBS)

70% EtOH

Erythrozyten-Lysispuffer	0,15 M NH <sub>4</sub> Cl
	1 mM KHCO <sub>3</sub>
	0,1 mM EDTA-Na <sub>2</sub>
	pH 7,4 mit NaOH

Zytokine	Maus GM-CSF	Cell Concepts GmbH, Umkirch
	Maus M-CSF	Cell Concepts GmbH, Umkirch
Maus-anti-Maus I-E <sup>K</sup>	Klon 14-4-4S	BD Biosciences, Heidelberg, Nr. 553544
PE anti-Maus CD80 (B7-1)	Klon 16-10A1	Pharmingen (BD Biosciences), Heidelberg, Nr. 096058
PE anti-Maus CD86 (B7-2)	Klon GL1	Pharmingen (BD Biosciences), Heidelberg, Nr. 092758

Die Gewinnung der Knochenmarkszellen („*bone marrow cells*“, *BMC*) sowie ihre Differenzierung zu dendritischen Zellen (BmDC) wurden in Anlehnung an die Methode von INABA *et al.* (1992) durchgeführt.

Die durch CO<sub>2</sub>-Asphyxiation getöteten Tiere wurden in Rückenlage fixiert und mit 70% EtOH desinfiziert. Das Knochenmark wurde aus der Tibia und dem Femur der BALB/c-Mäuse gewonnen. Dazu wurden die unteren Extremitäten von Haut befreit, entfernt und in sterilem PBS auf Eis gelegt. Durch diese Technik der Präparation sollte vermieden werden,

dass die Röhrenknochen schon vorzeitig geöffnet wurden. Mit Hilfe eines Skalpells wurden die Knochen von den umgebenden Muskeln und Sehnen befreit, mit sterilem Besteck Femur und Tibia an Epiphyse geöffnet und das Knochenmark mit ca. 10 ml PBS mittels einer 26G-Kanüle ausgespült. Das gewonnene Knochenmark wurde mit einer 10-ml-Pipette in PBS resuspendiert, bis die Zellsuspension homogen vorlag. Anschließend wurde die Suspension durch ein steriles Metallsieb gegeben, um Knochensplitter und andere grobe Bestandteile zu entfernen. Die filtrierte Zellsuspension wurde in ein 50-ml-Röhrchen überführt und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Zellsediment mit 5 ml sterilem Hämolysepuffer bei 37°C inkubiert und anschließend mit 20 ml PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 10 ml RPMI + 5% FCS resuspendiert, auf eine TC-Schale (ø 10 cm) gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die nicht adhärenen Zellen in ein Röhrchen überführt und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Zur Kultivierung wurden die Zellen in einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in GM-CSF- (100 U/ml) bzw. M-CSF- (20 ng/ml) haltigem Medium resuspendiert und jeweils 1 ml pro Napf auf eine 24-Lochplatte ausplattiert. Die Platte wurde für 8 bis 9 Tage bei 37°C inkubiert. Am Tag 3 und 5 wurden zwei Drittel des Mediums gewechselt. Die dendritischen Zellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt in Suspension oder sind nur leicht am Boden angeheftet, die sich auch bildenden Makrophagen sind fest adhären am Boden. Am Tag 6 wurden die Suspensionzellen abgenommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in eine 6-Lochplatte ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) überführt und frische Zytokine hinzugefügt. Die Platte wurde für weitere zwei Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionzellen in ein Röhrchen überführt und einmal gewaschen. Das Zellsediment wurde im FACS-Puffer aufgenommen, gezählt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch Verwendung von R-Phycoerythrin-konjugierten anti-MHC-Klasse II- (14-4-4S), anti-CD80- und anti-CD86-Antikörpern konnte die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu dendritischen Zellen überprüft werden.

### **2.3.15.2 Isolierung von Granulozyten aus dem Knochenmark**

#### **Material**

vgl. 2.3.15.1

Nylonsäule

1,2 g gezupfte Nylon-Wolle in 20-ml-Spritze gestopft, autoklaviert, mit PBS gewaschen

FACS-Puffer

Ratte-anti-Maus Ly-6G und Ly-6C (Gr-1)

Klon RB6-8C5

BD Biosciences, Heidelberg,

Nr. 553128

Knochenmarkzellen wurden nach der Präparation und Lyse der Erythrozyten tropfenweise über die Nytonsäule gegeben und der bis zu 80% Granulozyten enthaltende Durchfluss gesammelt. Die Säule wurde einmal mit PBS gewaschen und zu den bereits gewonnenen Zellen gegeben. Die Zellsuspension wurde sedimentiert und zur durchflusszytometrischen Analyse im FACS-Puffer resuspendiert. Die Reinheit von Granulozyten wurde durch R-Phycoerythrin-konjugierten Ratte-anti-Maus-Antikörper (Gr-1) bestimmt.

### **2.3.15.3 Einzelzellsuspensionen aus Thymus**

#### **Material**

(vgl. 2.3.15.1)

DMEM Medium +10% FCS+5 x 10<sup>5</sup> M 2-Mercaptoethanol

PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Taufkirchen

Ionomycin calicium salt

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Taufkirchen

Zur Untersuchung der C3a-Rezeptorexpression auf Thymozyten wurde der Thymus aus 4-8 Wochen alten BALB/c-Mäusen herauspräpariert und vorsichtig vom umgebenden Bindegewebe getrennt. Der Thymus wurde dann durch sterile Metallsiebe gedrückt und die Zellen in 5-10 ml PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 10 min) wurde der Überstand verworfen und die Erythrozyten durch Hämolysepuffer lysiert. Das Zellsediment wurde im FACS-Puffer aufgenommen und die Vitalität sowie die Zellzahl bestimmt (vgl. 2.3.2). Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Zur Stimulation der Thymozyten mit Ionomycin und PMA wurden die Zellen in DMEM-Medium für 24 bzw. 48 h kultiviert.

**2.3.15.4 Isolierung humaner Monozyten aus Vollblut**

Monozyten wurden aus Vollblut (100 ml) oder Leukapherese-Zellen freiwilliger, gesunder Blutspender (aus der Abteilung Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Göttingen) gewonnen. Zunächst wurden die mononukleären Leukozyten (MNL) isoliert. Um die Monozyten von den übrigen mononukleären Zellen zu trennen, wurde die Adhäsionsfähigkeit der Monozyten an der Polystyroloberfläche von Gewebekulturschalen ausgenutzt.

**2.3.15.4.1 Isolierung mononukleärer Leukozyten (MNL)****Material**

Ficoll-Hypaque™ Plus (Lymphoprep)-Lösung		Dichte 1,077 g/cm <sup>3</sup> , Amersham Biosciences (GE- Healthcare), Freiburg
PBS/EDTA		2 mM EDTA in PBS
RPMI 1640-Medium		RPMI 1640 + 5% hitze- inaktiviertes autologous serum
Maus-anti-Human CD14	Klon Tük4	Dako Cytomation, Hamburg, Nr. F0844
Zellschaber		Costar-Corning, Badhoevendrop Niederlande

Die MNL-Präparation erfolgte über eine Dichtegradienten-Zentrifugation nach dem Prinzip von BOYUM (1964). Dazu wurden in einem 50-ml-Spitzbodenröhrchen 20 ml Lymphoprep-Lösung vorgelegt und auf 37°C vorgewärmt. Auf das Lymphoprep wurden vorsichtig 20 ml des verdünnten Blutes (1:1 mit PBS) geschichtet und für 30 min bei 2600 rpm und RT ohne Bremse zentrifugiert. Die mononukleären Zellen sammeln sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und Lymphoprep an. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen. Nach Absaugen der Plasmaphase wurde die Schicht der mononukleären Zellen mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in ein frisches 50-ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und 10 min bei 4°C und 1700 rpm sedimentiert. Zum Entfernen der Thrombozyten wurde der Waschvorgang noch zweimal bei niedrigtouriger Zentrifugation (1000 rpm) wiederholt.

Das Zellpellet wurde in RPMI 1640-Medium aufgenommen und ausgezählt. Die Isolation der Monozyten aus aufgereinigten MNL schloss sich direkt an die Dichtegradienten-Zentrifugation an. Dazu wurde die Zellsuspension auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Jeweils 10 ml der Suspension wurden in eine Petrischale ( $\varnothing$  10 cm) gegeben. Nach vorsichtigem Schwenken der Petrischalen, um den Boden vollständig zu bedecken, wurde die Platte für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Monozyten adhärten in dieser Zeit an der Polystyroloberfläche der Petrischalen. Nach der Inkubation wurden die nicht adhärten Zellen durch Spülen mit PBS entfernt. Zum Ablösen der Monozyten wurde das Medium abgesaugt und PBS/EDTA auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde für 30-60 min auf Eis inkubiert und mit Hilfe eines Rubbers (Zellschaber) die Monozyten abgelöst. Die Zellen wurden in ein Röhrchen überführt, mit kaltem PBS gewaschen und sedimentiert. Das Zellsediment wurde in FACS-Puffer aufgenommen, gezählt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Reinheit an Monozyten betrug stets über 90% (Bestimmung durch anti-humane CD14).

### **2.3.16 Immunhistochemie**

Ziel der immunhistochemischen Untersuchungen war der Nachweis der Komplementrezeptoren für die Anaphylatoxine C3a und C5a in der humanen Niere [(n=5), das morphologisch normale Nierengewebe aus gesunden Randbereichen nach Tumor-Nephrektomien stellte Herr PD Dr. S. SCHWEYER aus der Abteilung Pathologie der Universität Göttingen freundlicherweise zur Verfügung] und der Maus-Niere durch selbst hergestellte monoklonale Antikörper. Um eine möglichst gute Antigenerhaltung zu gewährleisten, wurden die Organe nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff eingetaucht und schockgefroren. Danach wurden Gefrierschnitte von sehr geringer Dicke hergestellt. Für diese Arbeit wurde ein Gefriermikrotom (Frigocut 2800, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) verwendet.

#### **2.3.16.1 Das Gefriermikrotom (Kryotom)**

Das verwendete Kryotom ist ein Rotationsmikrotom. Darin wird der Objekthalter durch Drehen eines Handrades an der feststehenden Messerschneide auf und ab bewegt. Die Schnittfläche des Präparates ist dabei senkrecht gestellt. Eine Schwankung der Schnittdicke wurde minimiert, indem während des gesamten Schneidevorgangs die Kammertemperatur konstant bei  $-30^{\circ}\text{C}$  gehalten wurde. Die Objekttemperatur wurde je nach Organ verändert.

### 2.3.16.2 Gefrierschnittmethode

Die entnommenen Organe wurden von der Tiefkühltruhe zum Gefriermikrotom in flüssigem Stickstoff transportiert und im Inneren des Kryotoms mindestens 15 min temperiert. Die Gewebeproben wurden mit einem wasserlöslichen Klebemittel (Cryomatrix Thermo Shandon, Pittsburgh USA) auf der Objekthalterung aufgeklebt und mit demselben Klebemittel umrandet bzw. eingebettet. Dadurch wird eine bessere Schneidequalität erreicht. Zum Schneiden wurde ein C-Messer (keilförmig geschliffen) benutzt. Die Organe wurden in dünne Präparate (5 µm) geschnitten, auf einen warmen Objektträger aufgezogen und bei RT luftgetrocknet. Die getrockneten Gefrierschnitte wurden bis zur Durchführung der immunhistochemischen Färbungen bei -70°C aufbewahrt.

### 2.3.16.3 Immunhistochemische Färbung

#### Material

Objektträger HistoBond® (25 x 75 mm)			Marienfeld GmbH & Co, Lauda-Königshofen
Deckgläser (24 x 60 mm)			Schütt Labortechnik, Göttingen
Inkubationspuffer 1	5	% (v/v) FCS	
	1	% (w/v) aggregiertes humanes IgG (10 mg/ml)	
	0,1	% (w/v) Natriumazid (2 M)	
		in PBS	
Inkubationspuffer 2	5	% (v/v) FCS	
	1	% (w/v) aggregiertes humanes IgG (10 mg/ml)	
		in PBS	
Blockierungspuffer	60	µl	aggregiertes humanes IgG (10 mg/ml)
	20	µl	Natriumazid (2 M)
	67	µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%)
			in 2 ml PBS
<i>Avidin-Biotin-Blocking System</i>			Dako Cytomation, Hamburg, Nr. X0590

Kaninchen-anti-Ratte-IgG, biotinyliert	Maus-absorbiert, Nr. BA-4001, Vector, Lab.-Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen
Schaf-anti-Maus-IgG, biotinyliert	Amersham Biosciences (GE-Healthcare), Freiburg, Nr. RPN 1001
Streptavidin-Peroxidase	Jackson ImmunoResearch Lab./Dianova, Hamburg, Nr. 016-030-084
Färbelösung	BioGenex <i>One Step AEC Solution</i> , Innovative Diagnostik-System, Hamburg
Mayers-Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt

Zum Nachweis von Antigenen in Gewebeschnitten wurden Färbungen nach der indirekten Biotin-Streptavidin-Methode durchgeführt (vgl. 2.3.7). Nach Auftauen der Gefrierschnitte bei RT wurden sie für 10 min in Aceton fixiert und einmal für 5 min in PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen an Fc-Rezeptoren wurden die Gewebe 30 min mit 100 µl Blockierungspuffer inkubiert. Bei der Färbung von Nieren und Leber war zusätzlich die Blockierung des endogenen Biotins erforderlich. Dazu wurde das *Avidin-Biotin-Blockingsystem* angewendet. Der Kit enthielt zwei Reagenzien: Avidin und Biotin. Das erste wurde für 10 min auf den Schnitten inkubiert und dann zweimal 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde das Biotinreagenz auf die Schnitte gegeben und für 10 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen und Befreiung der Objektträger von der überflüssigen Waschlösung wurden 100 µl des ersten Antikörpers zugegeben (0,5-10 µg/ml) und 2 h (gegebenenfalls über Nacht) in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal für je 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl biotinyliertes anti-Ratte-IgG- (1:100) bzw. anti-Maus-IgG-Antikörper (1:400) auf die Schnitte gegeben und für 90 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Die ersten und zweiten Antikörper wurden im Inkubationspuffer 1 verdünnt. Die Objektträger wurden erneut gewaschen und dann 100 µl Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin (1:2000 verdünnt im Inkubationspuffer 2) zugegeben. Nach einer Inkubation für 45 min bei RT wurde das ungebundene Konjugat durch Waschen in PBS (dreimal je 5 min) entfernt und anschließend die Färbelösung auf die Proben gegeben. Die Objektträger wurden für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert, danach wieder gewaschen und mit Mayers-Hämalaunlösung

kurz gegengefärbt. Die Entfärbung erfolgte unter Leitungswasser. Zum Schluss wurden die Objektträger mit Kaisers Glyceringelatine (die zuvor bei 37°C verflüssigt wurde) unter Verwendung eines Deckglases eingedeckt. Die Auswertung erfolgte unter einem Lichtmikroskop bei 200-400facher Vergrößerung.

### **2.3.17 Immunzytochemische Färbung**

#### **Material**

(vgl. 2.3.16.3)

Zytozentrifuge	Typ Cytopro 7620	Wescor, USA
Maus-anti-humanes Zytokeratin	Klon MNF 116	Dako Cytomation, Hamburg, Nr. M 0821

Diese Methode wurde angewendet, um C5a-Rezeptor in humanen Epithelzellen des proximalen Nierentubulus (RPTEC) zu detektieren. Dazu wurden Zellen zwischen der dritten und siebten Passage benutzt. Nach der letzten Passage wurden die Zellen auf das Vorhandensein von Zytokeratin mit anti-Zytokeratin-Antikörper getestet.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  /ml in PBS eingestellt. Anschließend wurden sie mittels Cytospin-Zentrifugation (3 min bei 1300 rpm) auf Objektträger aufgebracht, 30 min luftgetrocknet und für 10 min in Aceton bei RT fixiert. Die immunzytochemische Färbung folgte dem oben beschriebenen Verfahren.

### **3 Ergebnisse**

#### **Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen die Anaphylatoxin-Rezeptoren**

##### **3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper mit Spezifität für den humanen C5aR**

###### **3.1.1 Immunisierung**

Monoklonale Antikörper gegen den humanen C5aR wurden durch intraperitoneale Immunisierung von Lou/C Ratten mit RBL-hC5aR Zellen hergestellt.

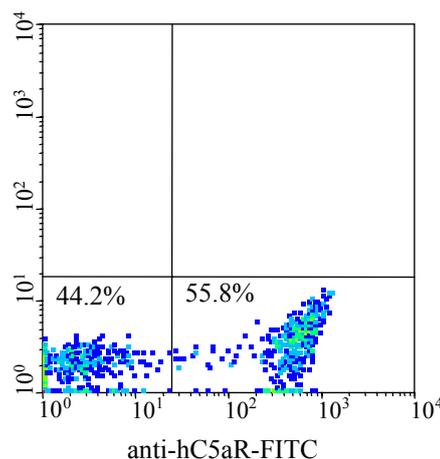
RBL-2H3 Zellen, die mit hC5aR-DNA transfiziert worden waren und den hC5aR in großer Zahl auf der Oberfläche exprimierten, wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. J. ZWIRNER zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden ohne Verwendung von Adjuvantien im Abstand von 3-4 Wochen in Ratten injiziert, da sie eine starke Immunantwort induzieren (PETERS und BAUMGARTEN, 1990). Um die Anzahl spezifischer B-Zellen und damit die Fusionsausbeute zu erhöhen, erfolgte 3 Tage vor der Fusion eine nochmalige Auffrischung (Boosterung). Da selbst innerhalb einer genetisch homogenen Versuchstiergruppe die Immunantwort auf ein injiziertes Antigen recht unterschiedlich ausfallen kann, wurden mehrere Tiere (4 Ratten) immunisiert.

###### **3.1.2 Zellfusion**

Immunglobulin produzierende Lymphozyten aus der Milz sind in der Zellkultur nicht überlebensfähig. Deshalb wurden sie mit der permanent wachsenden Maus-Myelomzelllinie P3X63Ag8/653 (vgl. 2.3.5.3) fusioniert und  $\frac{1}{4}$  der Fusion ausplattiert.

### 3.1.3 Nachweis hC5aR-spezifischer Antikörper mittels RBL-hC5aR Zellen

Etwa 10 Tage nach der Fusion wurden die Kulturüberstände der entstandenen Hybridome durchflusszytometrisch auf Antikörperproduktion getestet. Um die Bindung der Antikörper an den C5aR auf RBL-hC5aR Zellen nachweisen zu können, wurden  $5 \times 10^4$  RBL-hC5aR Zellen mit gleicher Anzahl von RBL-hC3aR Zellen gemischt und mit den Kulturüberständen inkubiert. Der Nachweis der Antikörperbindung wurde mit einem FITC-markierten polyklonalen Ziege-anti-Ratte-IgG-Antikörper durchgeführt. Es wurden Kulturüberstände als positiv gewertet, wenn ca. 50% der Zellen positiv reagierten (Abb. 3.1). Positive Hybridomüberstände wurden erneut auf RBL-hC5aR Zellen getestet mit der Erwartung, dass nun 100% der Zellen positiv erkannt würden. Von insgesamt 1536 untersuchten Kulturüberständen erwiesen sich 64 auf RBL-hC5aR Zellen als positiv (Tab. 3.1). Die Fusionsausbeute lag somit bei 3%.

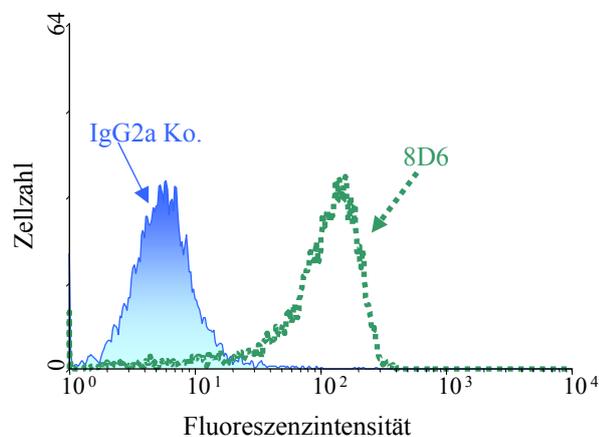


**Abbildung 3.1: Bindung der anti-hC5aR-Antikörper an hC5aR-exprimierende RBL-2H3 Zellen**

$5 \times 10^4$  RBL-hC5aR Zellen wurden mit  $5 \times 10^4$  RBL-hC3aR Zellen gemischt und mit 100  $\mu$ l Hybridom-Kulturüberständen für 45 min auf Eis inkubiert. Für den Nachweis der Antikörperbindung wurde ein FITC-markierter Ziege-anti-Ratte-IgG-Antikörper (1:400) verwendet. Antikörper gegen hC5aR erkennen ca. 50% der Zellen.

### 3.1.4 Nachweis hC5aR-spezifischer Antikörper mittels humaner Monozyten

Die Spezifität der anti-hC5aR-Antikörper wurde durch Erkennung des natürlichen Rezeptors auf humanen Monozyten überprüft. Dazu wurden Monozyten aus Vollblut oder Leukapherese-Präparationen gesunder Spender gewonnen (vgl. 2.3.15.4.1) und mit 100  $\mu$ l Kulturüberstand inkubiert. Über einen FITC-markierten polyklonalen Ziege-anti-Ratte-IgG-Antikörper wurde die Antikörperbindung durchflusszytometrisch nachgewiesen. Außerdem wurden die Monozyten mit einem PE-markierten anti-CD14-Antikörper gefärbt. Dadurch konnte bei der Datenerfassung ein Auswertungsfenster auf die CD14<sup>+</sup> Zellen gesetzt werden. In einem Parallelansatz wurden Monozyten mit Ratten-Kontroll-Antikörper inkubiert, um die isotypbedingte unspezifische Bindung des Antikörpers zu ermitteln. Eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität in Abbildung 3.2 zeigt die Bindung der sekundären Antikörper und damit die Bindung der ersten Antikörper im Vergleich zur Negativkontrolle. Es reagierten 48 positive Hybridomkulturüberstände mit dem natürlichen Rezeptor auf Monozyten (Tab. 3.1). Weiterhin wurden 18 Hybridome subkloniert (vgl. 2.3.5.4) und 44 Kulturüberstände, die in der FACS-Analyse mit Monozyten stark reagierten, auf Epitop-Erkennung untersucht.



#### Abbildung 3.2: Bindung des anti-hC5aR-Antikörpers 8D6 an humane Monozyten

1 x 10<sup>5</sup> humane Monozyten wurden mit 100  $\mu$ l Kulturüberstand sowie Isotypkontrolle (IgG2a) für 45 min auf Eis inkubiert. Für den Nachweis der Antikörperbindung wurde ein FITC-markierter Ziege-anti-Ratte-IgG-Antikörper (1:200) verwendet.

**Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Fusionsergebnisse**

getestete Hybridom- kulturüberstände	auf RBL-hC5aR Zellen positiv	auf Monozyten positiv
<b>1536</b>	<b>64</b>	<b>48</b>

Zum Nachweis der hC5aR-spezifischen Antikörper wurden die Hybridomkulturüberstände zehn Tage nach der Fusion durchflusszytometrisch getestet.

### **3.1.5 Bestimmung der Epitopspezifität der Antikörper gegen humanen C5aR**

Die Epitopspezifität der Antikörper gegen hC5aR wurde durch Verwendung von Rezeptor-chimären und N-terminaler Peptide untersucht.

#### **3.1.5.1 C5aR-Chimäre**

Eine Möglichkeit zur Epitopanalyse der Kulturüberstände bestand in der Verwendung zweier RBL-2H3 Zelllinien, die chimärische C5a-Rezeptoren exprimierten: C5aR-Ex1hu-rat und C5aR-Ex1/2rat-hu. In dem chimärischen Rezeptor C5aR-Ex1hu-rat wurde die N-terminale Domäne des Ratten-C5aR (Aminosäuren 1-40) durch die entsprechenden Aminosäuren des humanen C5aR ausgetauscht. Bei der chimärischen C5aR-Ex1/2rat-hu wurden die Aminosäuren 151-351 des Ratten-C5aR durch die entsprechenden Aminosäuren des humanen C5aR ersetzt. Zur Epitopanalyse wurden die beiden Chimären mit jeweils 100 µl Kulturüberstand inkubiert. Nach Zugabe des FITC-markierten Ziege-anti-Ratte sekundären Antikörpers wurde die Bindung der ersten Antikörper durchflusszytometrisch analysiert.

Von 44 Kulturüberständen reagierten 32 Antikörper mit der Chimäre C5aR-Ex1hu-rat und erkannten somit die N-terminale Domäne des humanen C5aR (Tab. 3.4). Die immunhistochemische Färbung mit diesen Kulturüberständen zeigte, dass acht Antikörper den C5aR in Gefrierschnitten erkennen. 12 Kulturüberstände reagierten mit der Chimäre C5aR-Ex1/2rat-hu, keiner dieser Antikörper war positiv auf Gefrierschnitten (Tab. 3.4). Tabelle 3.2 zeigt durchflusszytometrische Analysen von Kulturüberständen mit C5aR-Transfektanten, die zuvor auf Gefrierschnitten positiv getestet wurden.

**Tabelle 3.2: Bindung der Rattenantikörper an C5aR-Transfektanten**

	anti-hC5aR-Antikörper							
	8D6 MFI	14F6 MFI	15H2 MFI	15C4 MFI	15F10 MFI	12F1 MFI	12F7 MFI	9C12 MFI
<b>RBL- hC5aR</b>	1492	1670	1563	1214	1315	1534	1486	1757
<b>RBL- C5aR- Ex1hu- rat</b>	948	902	990	854	867	851	794	950
<b>RBL- C5aR- Ex1/2rat -hu</b>	7,3	3,7	7,5	7,3	7,6	7,5	7,7	7,8

1 x 10<sup>5</sup> RBL-hC5aR- bzw. RBL-C5aR-Ex1hu-rat- und RBL-C5aR-Ex1/2rat-hu Zellen wurden mit 5 µg/ml anti-hC5aR-Antikörpern für 45 min auf Eis inkubiert. Die Bindung wurde mit einem FITC-markierten Ziege-anti-Ratte-IgG-Antikörper (1:200) nachgewiesen und im FACS sichtbar gemacht. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI). Ein repräsentatives von insgesamt drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet.

### 3.1.5.2 Peptid-ELISA

Für die epitopspezifische Analyse der Kulturüberstände wurden die Peptide REX1 (C5aR Aminosäure 1-31) und XAL (C5aR Aminosäure 15-27) im Peptid-ELISA verwendet (vgl. 2.3.11 und 2.3.12). Anhand der Ergebnisse dieser Untersuchung konnten die Antikörper in drei Gruppen eingeteilt werden (Tab. 3.3).

- 1.) Bei neun Kulturüberständen konnte im ELISA eine Bindung an das Peptid REX1 nachgewiesen werden.
- 2.) Drei Kulturüberstände reagierten sowohl mit dem Peptid REX1 als auch mit dem Peptid XAL.
- 3.) 32 Kulturüberstände reagierten mit keinem der beiden Peptide.

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung monoklonaler Antikörper, die den C5aR auch in Gefrierschnitten erkennen. Daher wurden in Tabelle 3.3 nur Antikörper erwähnt, die in der immunhistochemischen Färbung positiv ausfielen. Alle Antikörper sezernierten Immunglobuline vom Typ IgG2a und besaßen leichte Ketten vom κ -Typ (vgl. 2.3.7).

**Tabelle 3.3: Eпитopspezifität der Kulturüberstände gegen hC5aR**

Antikörper	Peptid REX1	Peptid XAL
<b>Gruppe 1</b>		
8D6	799	<30
14F6	799	<30
15H2	672	<30
<b>Gruppe 2</b>		
15C4	736	372
15F10	946	391
<b>Gruppe 3</b>		
12F1	<30	-
12F7	<30	-
9C12	<30	-

ELISA-Platten wurden über Nacht mit 5 µg/ml Peptid REX1 bzw. Peptid XAL bei 4°C inkubiert. Die Bindung der Antikörper an die festphasengebundenen Peptide wurde mit einem polyklonalen Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Ratte-IgG-Antikörper und ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat nachgewiesen. Dargestellt sind die optischen Dichten (OD), die bei 490 nm gemessen wurden. Ein repräsentatives von insgesamt fünf Experimenten ist abgebildet.

**Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Eпитopanalyse der anti-hC5aR-Antikörper**

	getestete Klone	Chimäre C5aR-Ex1hu-rat positiv	Chimäre C5aR-Ex1/2rat-hu positiv	REX1 positiv	REX1 und XAL positiv	REX1 und XAL negativ
	44	32	12	9	3	32
Immunhistochemie positiv	8	8	-	3	2	3

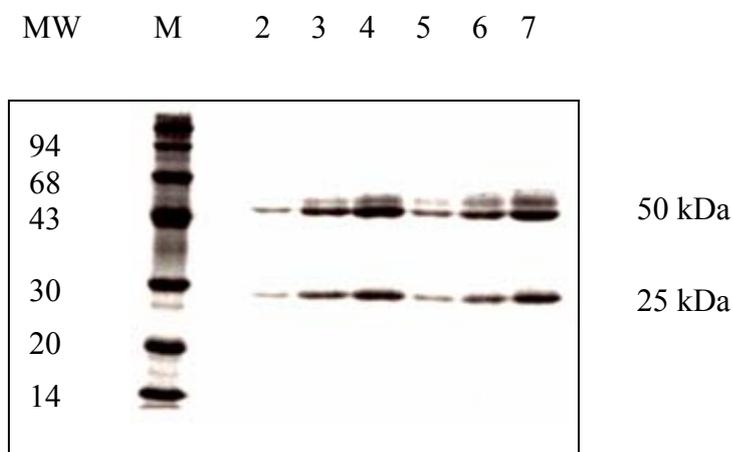
Chimärische C5a-Rezeptoren wurden im Durchflusszytometer und N-Terminus Peptide des C5aR im Peptid-ELISA getestet.

Die Klone 8D6 und 14F6 wurden zur Massenproduktion in einem miniPERM-System kultiviert (vgl. 2.3.6). Die Aufreinigung der Antikörper erfolgte aus dem zellfreien Überstand durch Immun-Affinitätschromatographie über eine Protein G-Sepharose-Säule (vgl. 2.3.8.1). Die eluierten Antikörper-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, gegen PBS dialysiert und die Konzentration in einem quantitativen ELISA bestimmt (vgl. 2.3.11). Zur Bestimmung der optimalen Verdünnung und Bindungsfähigkeit an RBL-hC5aR Zellen

wurden die gereinigten monoklonalen Antikörper durchflusszytometrisch überprüft. Insgesamt wurden von jedem Antikörper etwa 40 mg produziert.

### 3.1.6 Reinheitskontrolle in der SDS-PAGE

Die Reinheit der monoklonalen Antikörper wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Pro Bahn wurden 1, 3 bzw. 5 µg Antikörper aufgetragen und das 12%ige Gel anschließend mit Coomassie Brilliant Blue-Lösung gefärbt (vgl. 2.3.13). Abbildung 3.3 zeigt die aufgereinigten monoklonalen Antikörper 8D6 und 14F6. Sowohl die schweren (50 kDa) als auch die leichten Ketten (25 kDa) sind dargestellt. Die schwachen Banden über den schweren Ketten könnten auf eine Verunreinigung durch FCS hinweisen.



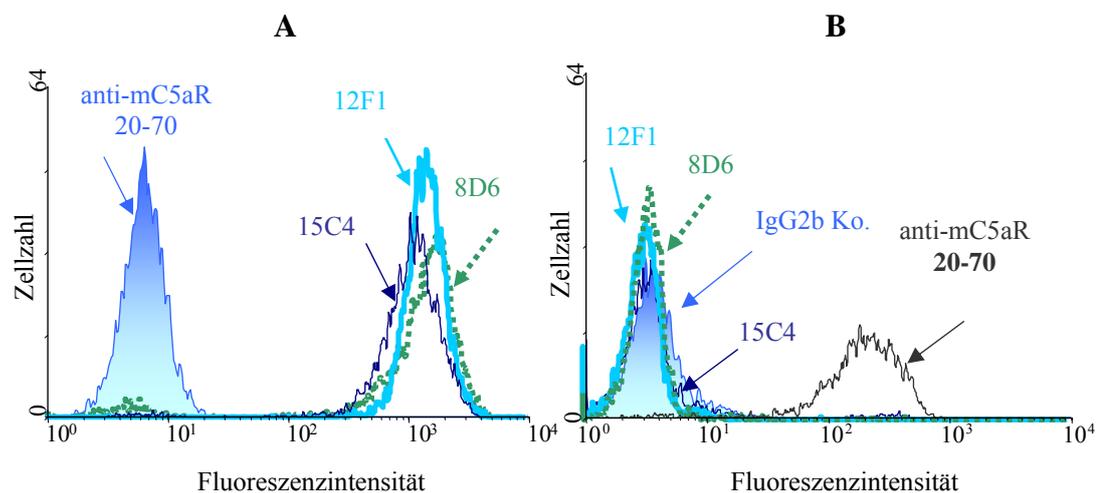
**Abbildung 3.3: SDS-PAGE-Analyse aufgereinigter Antikörper**

In der Bahn 1 wurde Referenz-Marker (M) aufgetragen. In den Bahnen 2-4 wurden jeweils 1, 3 bzw. 5 µg des mAk 8D6 aufgetragen, in den Bahnen 5-7 jeweils 1, 3 bzw. 5 µg des mAk 14F6. Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue.

### 3.1.7 Nachweis der Rezeptorspezifität der monoklonalen anti-hC5aR-Antikörper

Die Spezifität der monoklonalen Antikörper für den hC5aR-Antikörper konnte durch den Nachweis ihrer Bindung an hC5aR-, nicht jedoch an mC5aR-exprimierende RBL-2H3-Tansfektanten nachgewiesen werden. In verschiedenen parallelen Ansätzen wurden die RBL-hC5aR- bzw. RBL-mC5aR Zellen mit aufgereinigten monoklonalen Antikörpern inkubiert. Für die RBL-mC5aR Zellen wurde anti-mC5aR-Antikörper 20-70 als Positivkontrolle verwendet. Ratten-IgG2a und -IgG2b dienten als Negativkontrollen.

Abbildung 3.4A zeigt exemplarisch die Bindung der drei monoklonalen Antikörper (8D6, 15C4, 12F1) an RBL-hC5aR Zellen. Diese sind gegen drei verschiedene Epitope des N-Terminus vom humanen C5aR gerichtet. Eine unspezifische Bindung an RBL-mC5aR wurde nicht festgestellt (Abb. 3.4B).



**Abbildung 3.4: Monoklonale Antikörper für den hC5aR binden nicht an RBL-mC5aR**

1 x 10<sup>5</sup> hC5aR- bzw. mC5aR-exprimierende RBL-2H3-Tansfektanten wurden mit je 5 µg/ml der monoklonalen Antikörper 8D6, 15C4 und 12F1 sowie Isotypkontrollen IgG2a und IgG2b für 45 min auf Eis inkubiert. Anti-mC5aR-Antikörper 20-70 wurde als Positivkontrolle für die RBL-mC5aR Zellen verwendet. Die Bindung des Antikörpers wurde mit Hilfe eines FITC-markierten anti-Ratte-Antikörpers (1:200) nachgewiesen und durchflusszytometrisch analysiert. A: RBL-hC5aR Zellen, B: RBL-mC5aR Zellen.

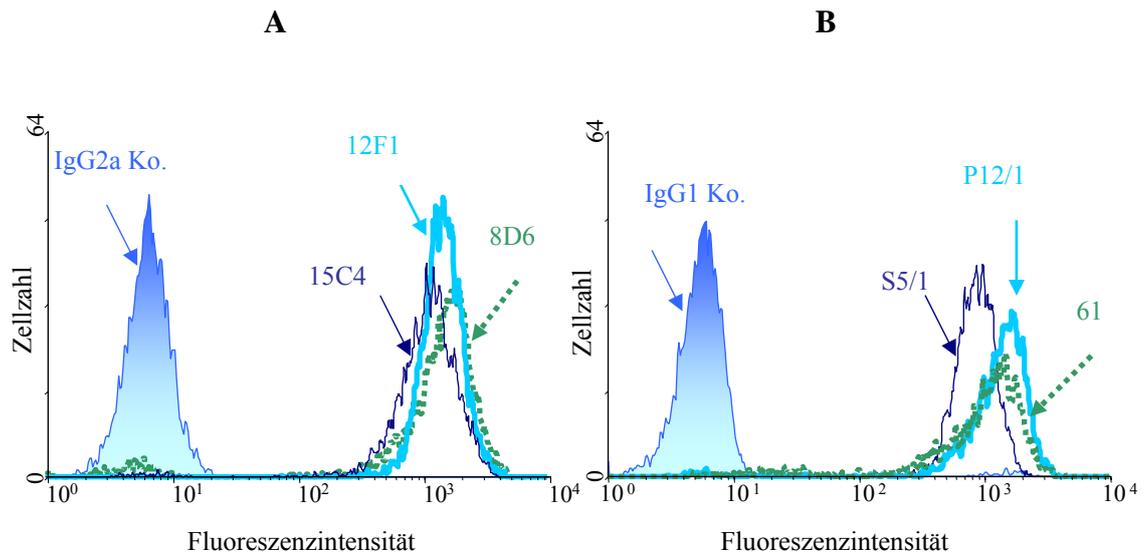
### 3.1.8 Vergleich der monoklonalen anti-hC5aR-Antikörper aus Maus und Ratte

#### 3.1.8.1 Verwendung von RBL-hC5aR Zellen

Die neu generierten monoklonalen Rattenantikörper gegen den hC5aR wurden mit in der Maus hergestellten Antikörpern auf ihre Bindung an RBL-hC5aR Zellen verglichen. Es wurden drei Rattenantikörper (8D6, 15C4 12F1) mit Spezifität für drei unterschiedliche Epitope des hC5aR, zwei Mausantikörper (P12/1, S5/1), die bereits veröffentlicht waren (OPPERMANN *et al.*, 1993; WERFEL *et al.*, 1996b; SCHAKEL *et al.*, 2002), sowie Mausantikörper 61 gewählt und mit RBL-hC5aR Zellen inkubiert. Nach Zugabe des FITC-

markierten Ziege-anti-Ratte- bzw. -anti-Maus sekundären Antikörpers wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die unspezifische Bindung des FITC-Konjugates an die Zellen wurde durch Isotypkontrollen IgG2a und IgG1 überprüft.

Abbildung 3.5 demonstriert, dass alle anti-hC5aR-Antikörper nahezu identisch mit hC5aR-exprimierenden RBL-2H3-Transfektanten reagieren.



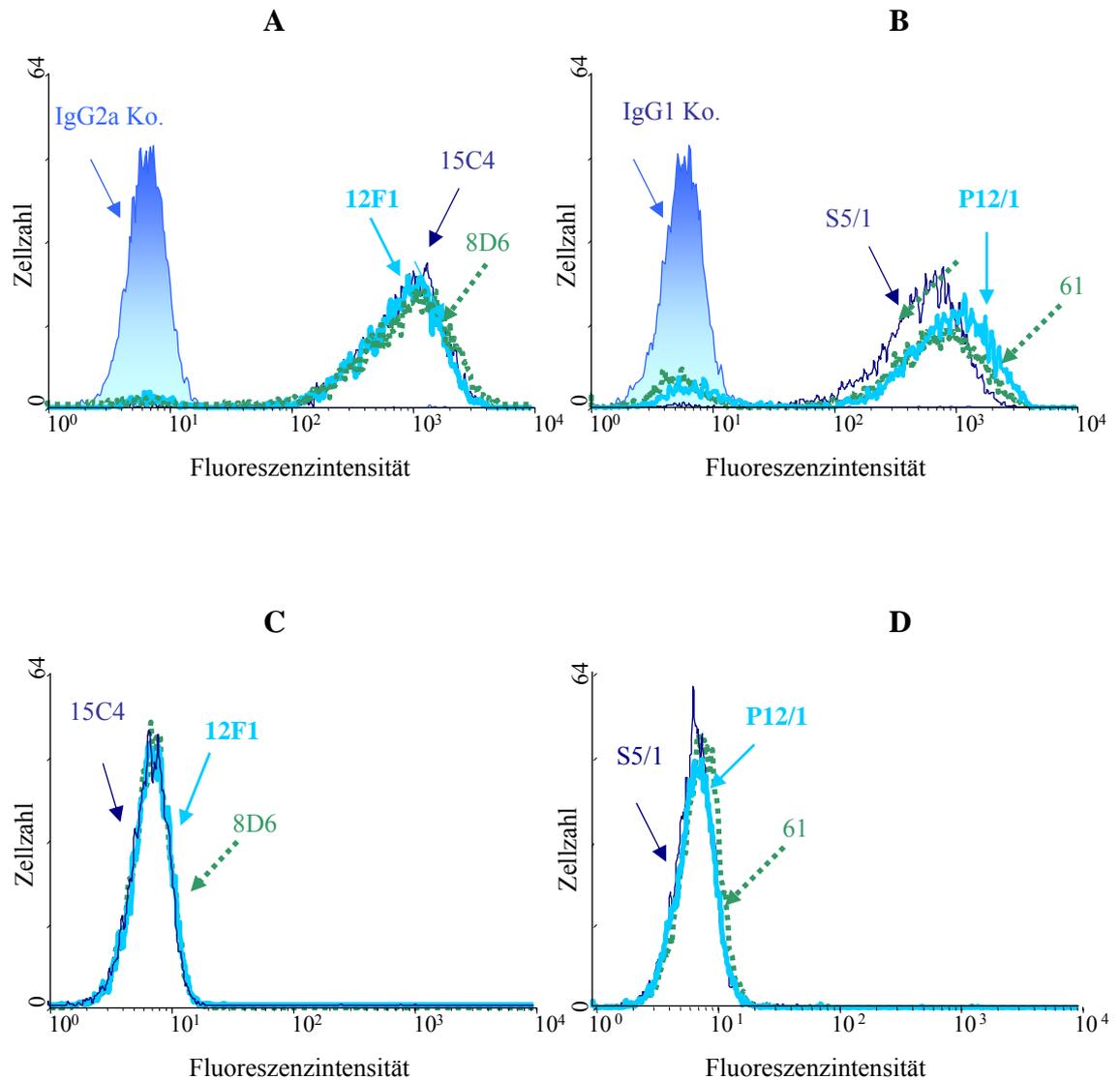
**Abbildung 3.5: Bindung der monoklonalen Ratten- bzw. Mausantikörper an RBL-hC5aR Zellen**

1 x 10<sup>5</sup> RBL-hC5aR Zellen wurden je mit 5 µg/ml Ratten anti-hC5aR- (A: 8D6, 15C4 und 12F1) und Maus anti-hC5aR-Antikörper (B: 12P/1, S5/1 und 61) für 45 min auf Eis inkubiert. Der Nachweis der Bindung wurde mit einem sekundären FITC-markierten Ziege-anti-Ratte- bzw. -anti-Maus-Antikörper (1:200) durchgeführt und durchflusszytometrisch analysiert.

### 3.1.8.2 Verwendung von C5aR-Chimären

Die Bindung der drei monoklonalen Rattenantikörper 8D6, 15C4 und 12F1 wurde mit der Bindung der monoklonalen Mausantikörper P12/1, S5/1 und 61 an die beiden chimären hC5a-Rezeptoren, Chimäre C5aR-Ex1hu-rat und Chimäre C5aR-Ex1/2rat-hu, verglichen. Nach der durchflusszytometrischen Untersuchung wurde kein wesentlicher Unterschied zwischen den mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der beiden Gruppen mit der Chimäre C5aR-Ex1hu-rat festgestellt (Abb. 3.6A und 3.6B). Es wurde keine Bindung der verwendeten monoklonalen Ratten- bzw. Maus-anti-hC5aR-Antikörper an die Chimäre C5aR-Ex1/2rat-hu nachgewiesen (Abb. 3.6C und 3.6D). Die Ergebnisse zeigen, dass

monoklonale Rattenantikörper genauso wie Mausantikörper die N-terminale Domäne des humanen C5aR erkennen.



**Abbildung 3.6: Bindung der monoklonalen Ratten- bzw. Mausantikörper an die chimären hC5a-Rezeptoren**

$1 \times 10^5$  RBL-C5aR-Ex1hu-rat- bzw. RBL-C5aR-Ex1/2rat-hu Zellen wurden je mit  $5 \mu\text{g/ml}$  Ratten-anti-hC5aR- (8D6, 15C4 und 12F1) (Abb. A und C) und Maus-anti-hC5aR-Antikörpern (P12/1, S5/1 und 61) (Abb. B und D) für 45 min auf Eis inkubiert. Der Nachweis der Bindung wurde mit einem FITC-markierten Ziege-anti-Ratte- bzw. -anti-Maus-Antikörper (1:200) durchgeführt und durchflusszytometrisch analysiert.

### 3.1.8.3 Vergleich der Epitop-Erkennung der Ratten- und Mausantikörper

Die Epitopanalyse mit den Peptiden REX1 und XAL zeigte, dass die monoklonalen Mausantikörper P12/1, S5/1 und W17/1 an beide Peptide binden und daher mit dem Rattenantikörper 15C4 vergleichbar sind. Bei dem monoklonalen Mausantikörper 61 konnte nur eine Bindung an das Peptid REX1 nachgewiesen werden. Dieser Antikörper wurde daher zusammen mit dem Rattenantikörper 8D6 einer Gruppe zugeteilt. Die monoklonalen Mausantikörper P12/1, S5/1 und W17/1 zeigten ein höheres Signal im Peptid-ELISA als die monoklonalen Rattenantikörper 15C5, 8D6 und der monoklonale Mausantikörper 61. Dies ist nicht erstaunlich, da die Antikörper mit dem höheren Signal im Peptid-ELISA auch gegen das REX1-Peptid generiert wurden. Hingegen wurde der Antikörper 61 durch Immunisierung der Mäuse mit hC5aR-exprimierenden RBL-2H3-Tansfektanten hergestellt. Tabelle 3.5 zeigt eine Zusammenfassung der Epitop- sowie Isotyp-Analyse der monoklonalen Maus- und Rattenantikörper gegen den hC5aR.

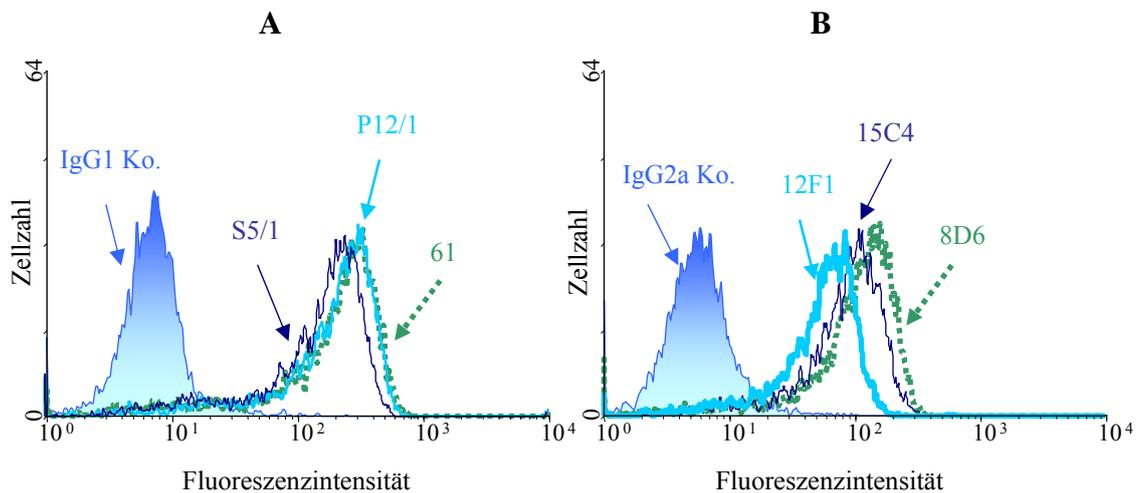
**Tabelle 3.5: Bindung der monoklonalen Maus- und Rattenantikörper an RBL-hC5aR bzw. RBL-C5aR-Ex1hu-rat und zwei N-terminale C5aR-Peptide**

Antikörper	Isotyp	RBL-hC5aR <sup>1</sup> MFI	Chimäre C5aR- Ex1hu/rat (1-40) <sup>1</sup> MFI	Peptid REX1 <sup>2</sup>	Peptid XAL <sup>2</sup>
<b>Gruppe 1</b>					
<b>15C4</b>	Ratte IgG2a	1214	854	736	372
<b>P12/1</b>	Maus IgG2a	1324	920	1206	1015
<b>S5/1</b>	Maus IgG2a	921	551	1184	897
<b>W17/1</b>	Maus IgG1	648	348	1300	780
<b>Gruppe 2</b>					
<b>8D6</b>	Ratte IgG2a	1492	948	799	<30
<b>61</b>	Maus IgG1	1139	652	764	<30
<b>Gruppe 3</b>					
<b>12F1</b>	Ratte IgG2a	1534	851	<30	-

- 1 Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde durch indirekte Immunofluoreszenzfärbung und anschließende durchflusszytometrische Analyse ermittelt.
- 2 Die Extinktionswerte wurden mittels Peptid-ELISA bestimmt.  
Ein repräsentatives von insgesamt sechs Experimenten ist abgebildet.

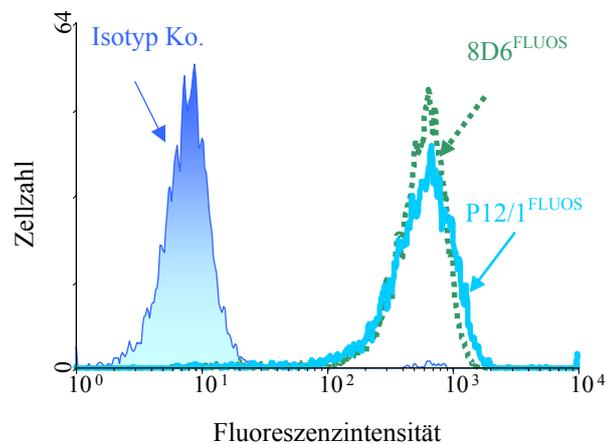
### 3.1.8.4 Verwendung von Monozyten

Mit Monozyten reagierten die monoklonalen anti-C5aR-Mausantikörper P12/1, S5/1 und 61 (Abb. 3.7A) stärker als die Rattenantikörper 8D6, 15C4 und 12F1 (Abb. 3.7B). Eine mögliche Ursache könnte in der Verwendung unterschiedlicher Sekundärantikörper liegen. Deshalb wurde je ein monoklonaler Maus- bzw. Rattenantikörper mit dem Fluorochrom FLUOS gekoppelt (vgl. 2.3.9) und in einer direkten Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. In Abbildung 3.8 ist die Bindung des FLUOS-markierten anti-hC5aR-Mausantikörpers P12/1 und Rattenantikörpers 8D6 an Monozyten in der durchflusszytometrischen Analyse dargestellt. Beide Antikörper zeigen die gleiche Fluoreszenzintensität auf Monozyten.



**Abbildung 3.7: Vergleich der monoklonalen Mousantikörper mit den Rattenantikörpern gegen hC5aR auf Monozyten**

$1 \times 10^5$  Monozyten wurden mit  $5 \mu\text{g/ml}$  monoklonalen anti-hC5aR-Mousantikörpern (P12/1, S5/1 und 61) (Abb. A) bzw. monoklonalen Rattenantikörpern (8D6, 15C4 und 12F1) (Abb. B) für 45 min auf Eis inkubiert. Ein FITC-markierter Ziege-anti-Maus- bzw. anti-Ratte-Antikörper (1:200) wurde als sekundärer Antikörper verwendet.

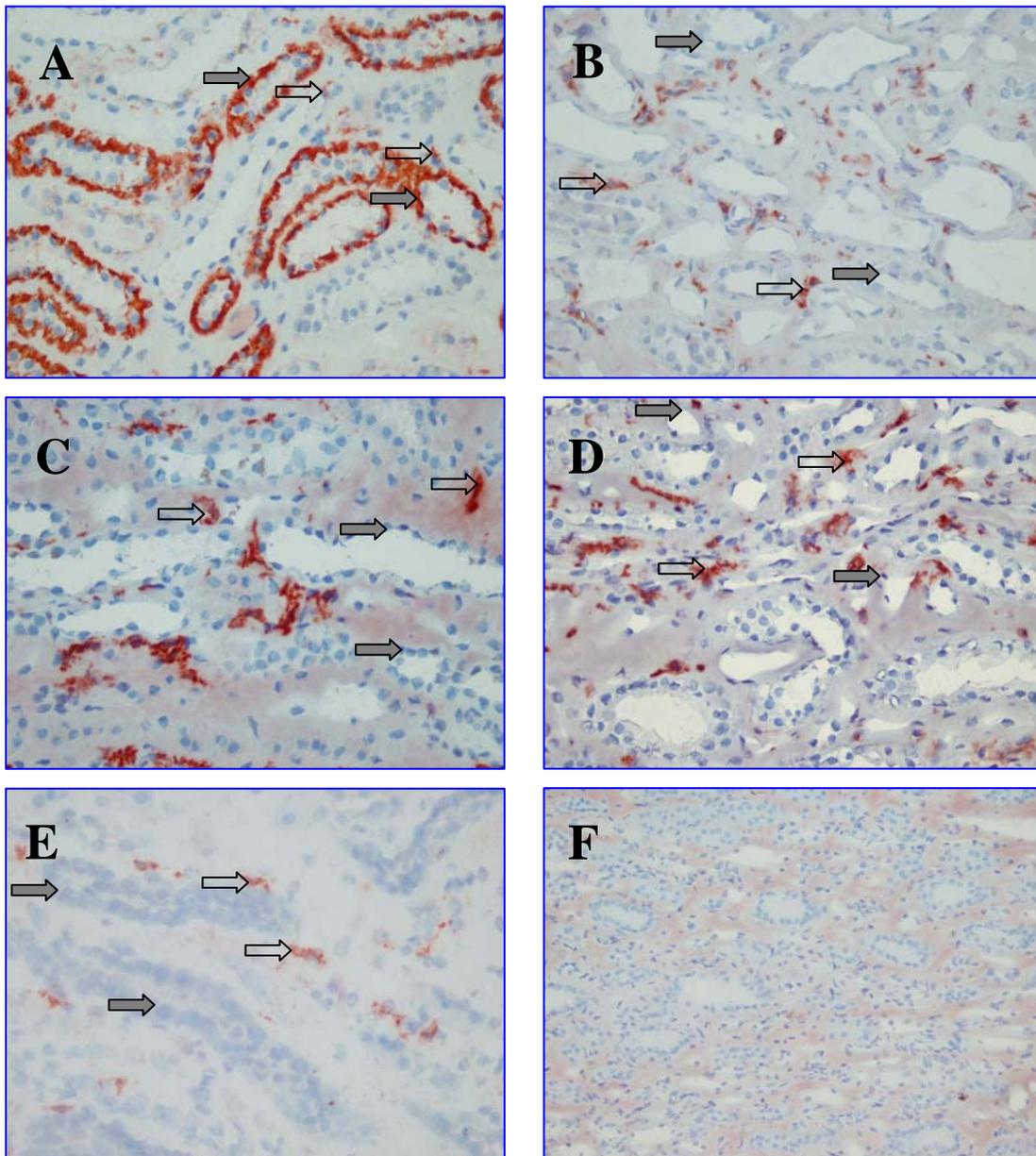


**Abbildung 3.8: Vergleich der FLUOS-markierten anti-hC5aR-Mausantikörper P12/1 mit dem Rattentantikörper 8D6 auf Monozyten**

$1 \times 10^5$  Monozyten wurden mit  $1 \mu\text{g}/\text{Ansatz}$  FLUOS-markiertem Maus- (P12/1) bzw. Rattentantikörper (8D6) für 45 min auf Eis inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert.

### 3.1.9 Immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis der Expression des humanen C5aR in der Niere

Die Expression des C5aR wurde in Gefrierschnitten normaler humaner Nieren mittels indirekter immunhistochemischer Färbung untersucht (vgl. 2.3.16.3). Der monoklonale Antikörper P12/1 bindet stark an Epithelzellen der proximalen Tubuli. Makrophagen wurden von P12/1 deutlich schwächer erkannt (Abb. 3.9A). Ein vergleichbares Muster der Expression des C5aR wurde durch die monoklonalen Mausantikörper S5/1 und W17/1 erkannt (Abbildungen nicht gezeigt). Wie aus Abbildung 3.9B-D zu erkennen ist, reagierten die monoklonalen Rattentantikörper 12F1, 8D6 und 15C4 stark mit C5aR auf Makrophagen, während die tubulären Strukturen ungefärbt blieben. Der monoklonale Maus-anti-C5aR-Antikörper 61 reagierte im Gewebe ähnlich wie die Rattentantikörper (12F1, 8D6 und 15C4) (Abb. 3.9E). Die Spezifität der monoklonalen Ratten- und Mausantikörper wurde durch Isotypkontrollen überprüft. (Abb. 3.9F).

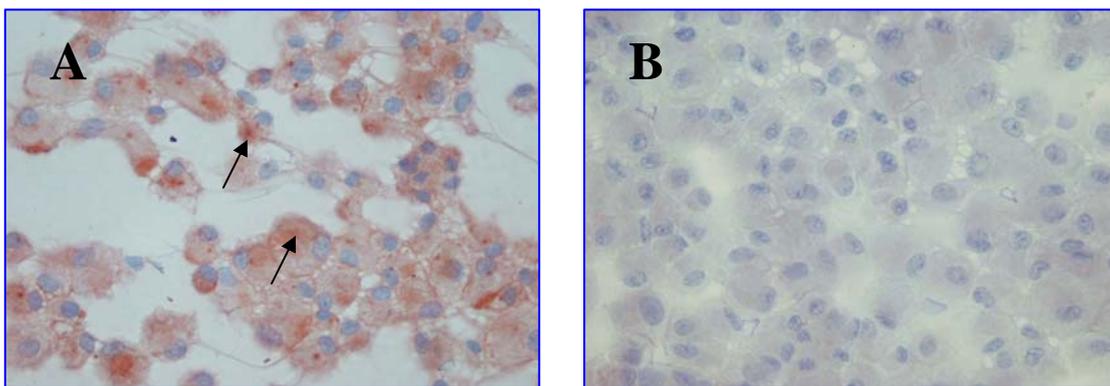


### Abbildung 3.9: C5aR-Expression in normalem humanen Nierengewebe

Immunohistochemische Färbung mit monoklonalen Mausantikörpern P12/1 (A), 61 (E) und Rattenantikörpern 12F1 (B), 8D6 (C) und 15C4 (D). Abbildung F zeigt die Färbung mit Ratten-IgG2a (Isotypkontrolle). Monoklonaler Antikörper P12/1 reagiert mit Epithelzellen der proximalen Tubuli. Monoklonale Antikörper 61, 8D6, 15C4 und 12F1 weisen den C5aR nur in einzelnen interstitiellen Makrophagen nach und zeigen keine Expression des C5aR auf Tubulusepithelien. Gefüllte Pfeile zeigen proximale Tubuluszellen, offene Pfeile Makrophagen (Vergrößerung 400x (A-E), 200x (F)).

### 3.1.10 Immunzytochemische Untersuchungen zum Nachweis der Expression des humanen C5aR in Epithelzellen des proximalen Nierentubulus (RPTEC)

Die Expression des humanen C5aR wurde durch monoklonale Mausantikörper P12/1 bzw. Rattenantikörper 8D6, 15C4 und 12F1 in kultivierten proximal tubulären Zellen der Niere (RPTEC) untersucht. Die Zellen (vgl. 2.3.17) wurden fixiert und mit Antikörper inkubiert. Die Bindung wurde über einen Biotin-markierten anti-Ratte- bzw. anti-Maus-Sekundärantikörper und anschließend Peroxidase-markiertem Streptavidin detektiert (vgl. 2.3.16.3). Die Epithelzellen der proximalen Tubuli reagierten deutlich mit dem monoklonalen Mausantikörper P12/1 (Abb. 3.10A). Die monoklonalen Rattenantikörper 8D6 (Abb. 3.10B), 15C4 und 12F1 (Abbildungen nicht gezeigt) zeigten hingegen keine Expression des C5aR.

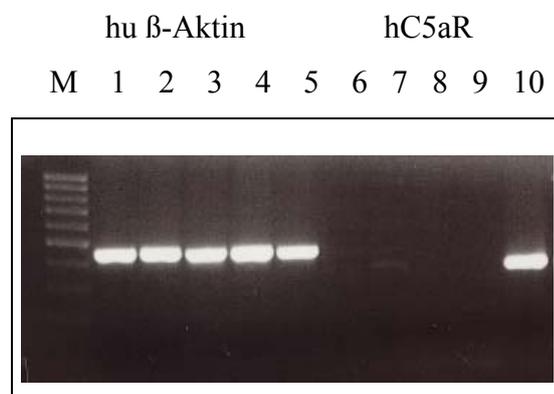


**Abbildung 3.10: Monoklonaler Mausantikörper P12/1 reagiert mit humanen proximalen tubulären Zellen der Niere (RPTEC)**

$5 \times 10^5$  kultivierte humane primäre Nierentubuluszellen wurden mit Hilfe der Cytopro-Zytozentrifuge auf Objektträger gebracht und mit Aceton fixiert. Die immunzytochemische Färbung wurde indirekt mit Biotin-Streptavidin-Methode durchgeführt und mikroskopisch analysiert. A: Detektion eines unbekanntes Proteins durch den monoklonalen Mausantikörper P12/1 (Pfeil). B: Monoklonaler Rattenantikörper 8D6.

### 3.1.11 Untersuchung der hC5aR-mRNA-Expression in proximal tubulären Zellen der Niere (RPTEC) mittels RT-PCR

Humane proximale Nierentubuluszellen wurden nach dem in Kapitel 2.3.1 des experimentellen Teils beschriebenen Verfahren in einer kleinen Kulturflasche konfluent kultiviert und mit IL-6 (10 bzw. 100 ng/ml) oder IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 24 h stimuliert. Von  $1 \times 10^7$  Zellen wurde die gesamte RNA isoliert und in einem Transkriptionsansatz mit reverser Transkriptase in cDNA-Einzelstränge umgeschrieben (vgl. 2.2.1.1). 1/20 des Ansatzes wurde dann in der PCR-Analyse mittels  $\beta$ -Aktin (Amplifikation eines 451 bp Fragmentes)- und hC5aR (Amplifikation eines 381 bp Fragmentes)-spezifischer Oligonukleotidprimer amplifiziert (vgl. 2.2.1.2). Als Positivkontrolle wurde parallel RNA aus Blutmonozyten isoliert. Abbildung 3.11 zeigt die Ergebnisse dieses Experiments. In den unstimulierten proximalen Nierentubuluszellen wurde keine deutliche Expression von C5aR-mRNA festgestellt (Bahn 6), während mRNA aus humanen Monozyten eine starke Expression zeigte (Bahn 10). Mit IL-1 $\beta$  konnte eine sehr schwache Expression des C5aR induziert werden (Bahn 7). IL-6-Stimulation (10 bzw. 100 ng/ml für 24 h) zeigte keinen Einfluss auf die Expression des C5aR in den RPTEC Zellen (Bahn 8 und 9). Die amplifizierten Mengen an  $\beta$ -Aktin-cDNA waren in allen Proben ähnlich (Bahnen 1 bis 5).



**Abbildung 3.11: RT-PCR-Analyse zum Nachweis von hC5aR- und  $\beta$ -Aktin-mRNA in humanen primären Nierentubuluszellen (RPTEC)**

RPTEC Zellen wurden mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) bzw. IL-6 (10 bzw. 100 ng/ml) für 24 h stimuliert. Die GesamtrNA aus den Zellen wurde mit Hilfe von reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Es wurden zum Nachweis von  $\beta$ -Aktin 28 und von C5aR 35 Amplifizierungszyklen durchlaufen. In den Bahnen 1 und 6 (unstimulierte Zellen), 2 und 7 (IL-1 $\beta$ ), 3 und 8 (IL-6, 10 ng/ml), 4 und 9 (IL-6, 100 ng/ml), 5 und 10 (Monozyten) wurden RT-PCR-Produkte von hu  $\beta$ -Aktin bzw. hC5aR aufgetragen. Der 100-bp-Marker (M) ist dargestellt. Von drei unabhängigen Experimenten ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

## **3.2 Herstellung und Charakterisierung spezifischer Antikörper gegen murinen C3aR**

### **3.2.1 Isolierung von mC3aR-cDNA aus J774A.1 Zellen**

Die molekulare Charakterisierung und Klonierung des mC3aR-Gens wurde 1997 von TORNETTA *et al.* und HSU *et al.* sowie 1998 von HOLLMANN *et al.* durchgeführt. ZWIRNER *et al.* (1998b) zeigten in Bindungsstudien mit FITC-markiertem rhC3a und mit einer mRNA-Analyse, dass die Maus-Makrophagen-Zelllinie J774A.1 den mC3aR exprimiert. Sie bildete daher das zelluläre Ausgangsmaterial für die Klonierung des C3aR in dieser Arbeit. Zur Gewinnung von cDNA wurde zunächst mRNA aus J774A.1 Zellen isoliert. Nach der Extraktion der Gesamt-RNA wurde diese durch reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde dann ohne weitere Behandlung in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide (vgl. 2.1.8) zu einer 1431 bp großen mC3aR-DNA amplifiziert.

### **3.2.2 Klonierung des mC3aR**

Das mC3aR-DNA-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstelle des Enzyms *SpeI* in das Plasmid pEF1/*Myc*-His A (Abb. 2.1) inkloniert und in *E. coli* Top10F<sup>c</sup> transformiert (vgl. 2.2.2.6.2). Bei der Überprüfung der Transformation wurden Plasmid-haltige Bakterienkolonien mit eingebautem mC3aR-Fragment erhalten (vgl. 2.2.2.7). Von zwei mC3aR-positiven Bakterienkolonien wurden Plasmidpräparationen im quantitativen Maßstab vorgenommen, um die DNA-Sequenz zu verifizieren.

### **3.2.3 Sequenzierung des mC3aR**

Das klonierte mC3aR-DNA-Fragment konnte im Plasmid pEF1/*Myc*-His A mittels der Primer mC3aR Seq 607 *sense* und T7 sequenziert werden. Die Sequenz des mC3aR beider Klone stimmte mit der von TORNETTA *et al.* (1997) und HSU *et al.* (1997) sowie HOLLMANN *et al.* (1998) publizierten überein.

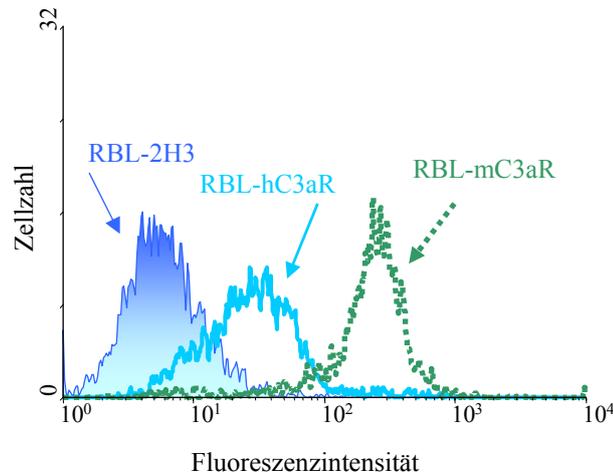
### **3.2.4 Permanente Expression des mC3aR in RBL-2H3 Zellen**

Für die stabile Expression der mC3aR-Moleküle in RBL-2H3 Zellen wurde die Elektroporation benutzt (vgl. 2.3.4.1). Bei dieser Methode wird durch das Anlegen eines (oder mehrerer kurz aufeinander folgender) elektrischen Impulses die Permeabilität der Zellmembran kurzfristig so erhöht, dass auch größere DNA-Moleküle in die Zellen eindringen können. Um die stabile Integration der transfizierten DNA in das Genom der Wirtszelle zu erleichtern, wurde die DNA linearisiert (vgl. 2.2.2.3).

Aus zwei Transfektionsansätzen waren innerhalb von 12 Tagen unter G418-Selektion über 1000 Zellen zu Klonen herangewachsen. Nach der Einzelzellklonierung wurde die Expression der mC3aR-Moleküle auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie überprüft. Es wurden 56 Klone des Ansatzes 1 und 107 Klone des Ansatzes 2 getestet.

### **3.2.5 Nachweis der mC3aR-Expression auf stabil transfizierten RBL-2H3 Zellen**

Der Nachweis des mC3aR auf RBL-2H3 Zellen wurde in Anlehnung an die Methode von WILKEN *et al.* (1999) durchgeführt. Unter Verwendung des hC3a-Liganden, der am N-Terminus ein Histidin (His)-Tag trägt, und des anti-His-Tag-Antikörpers Maximilian konnte der mC3aR auf RBL-2H3-Transfektanten nachgewiesen werden. Die Zellen einzelner Klone wurden mit rekombinantem hC3a inkubiert. Anschließend wurde anti-His-Tag-Antikörper hinzugefügt und der Nachweis der Bindung im Durchflusszytometer unter Verwendung eines FITC-markierten Ziege-anti-Maus-Antikörpers durchgeführt. Abbildung 3.12 zeigt die Bindung des anti-His-Tag-Antikörpers und damit die Expression des mC3aR auf RBL-2H3 Zellen. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte RBL-2H3 Zellen und als Positivkontrolle RBL-hC3aR Zellen eingesetzt. Eine starke Fluoreszenzintensität der RBL-mC3aR Zellen im Vergleich zu RBL-hC3aR Zellen deutete auf eine höhere Expression des mC3aR auf diesen Zellen hin. Insgesamt zeigten 144 RBL-2H3-transfizierte Klone eine Expression von mC3aR. Sechs Klone mit starker Fluoreszenzintensität wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt.

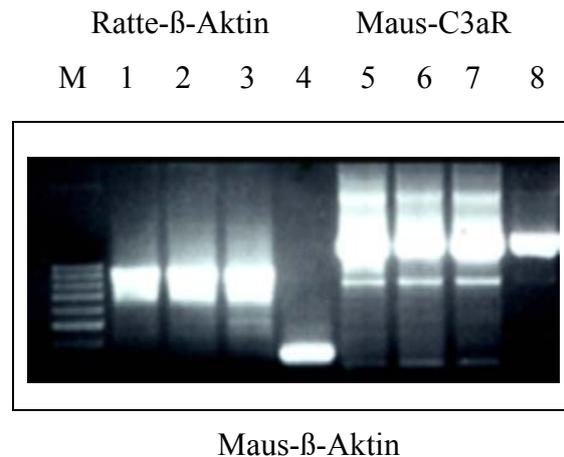


**Abbildung 3.12: Nachweis des mC3aR auf RBL-2H3 Zellen**

$1 \times 10^5$  Zellen der RBL-mC3aR-Transfektanten wurden mit rekombinatem hC3a (100 ng) für 30 min auf Eis inkubiert. Im zweiten Schritt wurde mAk Maximilian (10  $\mu$ g/ml) gegen His-Tag hinzugefügt und für weitere 45 min auf Eis inkubiert. Der Nachweis der Bindung wurde mit einem FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (1:100) durchgeführt und durchflusszytometrisch detektiert. Für die Positivkontrolle wurden mit dem hC3aR stabil transfizierte RBL-2H3 Zellen eingesetzt. Nicht transfizierte RBL-2H3 Zellen dienten als Negativkontrolle.

### 3.2.6 RT-PCR-Analyse der mC3aR-mRNA-Expression in mC3aR-transfizierten RBL-2H3 Zellen

In mC3aR-exprimierenden RBL-2H3-Transfektanten, die eine starke Fluoreszenzintensität bei der FACS-Analyse aufwiesen, wurde die mRNA-Expression für den mC3aR mittels RT-PCR untersucht (vgl. 2.2.1.2 und 2.2.1.3). In Abbildung 3.13 ist der Nachweis von mC3aR-mRNA in drei Transfektanten dargestellt. Als Positivkontrolle wurde mRNA aus der Maus-Makrophagen-Zelllinie J774A.1 verwendet. Alle Zellen zeigen eine sehr starke Expression des mC3aR.

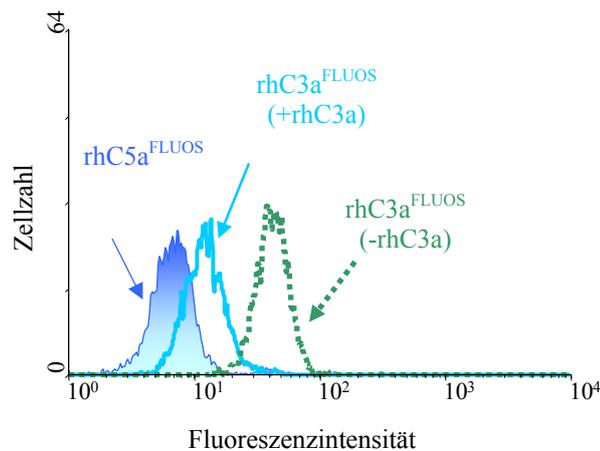


**Abbildung 3.13: Nachweis der mC3aR-mRNA-Expression in mC3aR-exprimierenden RBL-2H3-Transfektanten**

RT-PCR-Analysen von  $\beta$ -Aktin und mC3aR-spezifischer mRNA wurden in drei mC3aR-tragenden RBL-2H3-Transfektanten (1: Klon P13C2; 2: Klon P1B4; 3: Klon P3B10) durchgeführt. Gesamt-RNA aus diesen Zellen wurde mit Hilfe reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Jeweils 20  $\mu$ l des PCR-Produkts mit Probenpuffer wurden in die Taschen eines 1,5% Agarose-Gels geladen und innerhalb von 30-40 min bei 120V aufgetrennt. In den Bahnen 1, 2 und 3 wurden PCR-Produkte des Ratten- $\beta$ -Aktins, in Bahn 4 des Maus- $\beta$ -Aktins aufgetragen. In den Bahnen 5, 6 und 7 wurden PCR-Produkte des mC3aR von drei Klonen und in Bahn 8 der J774A.1 Zellen aufgetragen. Der 100-bp Marker (M) ist dargestellt.

### 3.2.7 Untersuchung der Bindungsspezifität des Liganden (rhC3a) an stabil transfizierte RBL-mC3aR Zellen

RBL-mC3aR Zellen wurden auf die Spezifität der rhC3-Bindung mittels Internalisierungsversuchen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des rhC3a an mC3aR nach Behandlung der Zellen mit einem 20fachen molaren Überschuss an unmarkiertem rhC3a reduziert wurde. Der Nachweis der rhC3a-Bindung gelang durchflusszytometrisch, nachdem ein Fluoreszenzfarbstoff (FLUOS) an das rhC3a konjugiert worden war (vgl. 2.3.9). Mit FLUOS-markiertem rhC5a in einem Parallelansatz wurde keine Bindung an die Zellen nachgewiesen (Abb. 3.14). Außerdem konnte keine Internalisierung des C3aR nach der Behandlung der Zellen mit einem Überschuss an rhC5a beobachtet werden (Abbildung nicht gezeigt).



**Abbildung 3.14: Reduktion der Bindung des rekombinanten hC3a<sup>FLUOS</sup> an RBL-mC3aR Zellen durch rhC3a**

1 x 10<sup>5</sup> RBL-mC3aR Zellen wurden mit 200 ng rhC3a<sup>FLUOS</sup> für 30 min auf Eis inkubiert. In einem Parallelansatz wurden die Zellen mit einem 20fachen molaren Überschuss an unmarkiertem rhC3a für 30 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit rhC3<sup>FLUOS</sup> versetzt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit rhC5a<sup>FLUOS</sup> gefärbt.

### 3.2.8 Herstellung monoklonaler Antikörper mit Spezifität für den mC3aR

RT-PCR und durchflusszytometrische Analyse zeigten, dass die getesteten Klone den mC3aR spezifisch exprimieren. Sechs Klone mit höherer Expression für mC3aR wurden subkloniert und expandiert. Der Klon RBL-mC3aR-P1B4 zeigte die höchste Expression von mC3aR-Molekülen und wurde deshalb zur Immunisierung der Ratten verwendet (Tab. 3.6).

**Tabelle 3.6: Mittlere Fluoreszenzintensität der mC3aR-Expression auf stabil transfizierten RBL-2H3 Zellen**

RBL-2H3 MFI	P1B4 MFI	P13C2 MFI	P3B10 MFI	P11A12 MFI	P5 4.2 MFI	P8 1.2 MFI	RBL- hC3aR MFI
<10	271	221	268	216	192	205	31

1 x 10<sup>5</sup> Zellen der RBL-mC3aR-Transfektanten wurden mit rekombinantem hC3a (100 ng) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurde mAk Maximilian (10 µg/ml) gegen His-Tag hinzugefügt und wiederum für 45 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde ein FITC-markierter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (1:100) zugegeben und durchflusszytometrisch gemessen. Für die Positivkontrolle wurden RBL-hC3aR Zellen verwendet, RBL-2H3 Zellen dienten als Negativkontrolle.

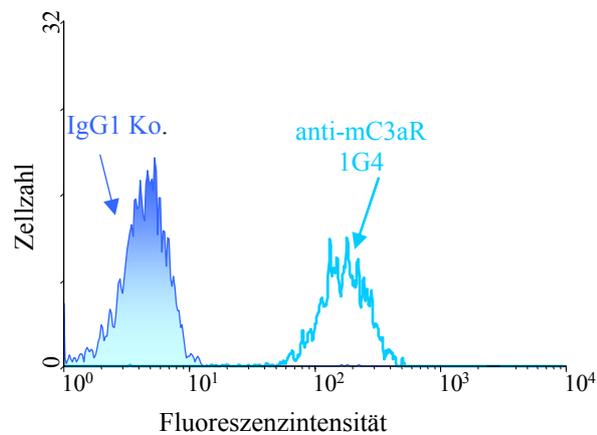
### 3.2.8.1 Zellfusion

Nach zehn Immunisierungen wurden die Milzzellen einer Ratte mit der Maus-Myelomzelllinie P3X63Ag8/653 fusioniert (vgl. 2.3.5.3) und ¼ der Fusion in 16 Mikrotiterplatten ausgesät.

Das Screening der Zellkulturüberstände auf das Vorhandensein mC3aR-spezifischer Antikörper erfolgte durchflusszytometrisch unter Verwendung der Maus-Makrophagen-Zelllinie J774A.1.

### 3.2.9 Nachweis mC3aR-spezifischer Antikörper mittels der Maus-Makrophagen-Zelllinie J774A.1

Die J774A.1 Zellen wurden mit 100 µl Kulturüberstand inkubiert und in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung im Durchflusszytometer untersucht. In Abbildung 3.15 ist exemplarisch die Bindung des Antikörpers 1G4 an diese Zelllinie dargestellt. Eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Isotypkontrolle (IgG1) weist auf die Rezeptorerkennung durch anti-Maus-C3aR-Antikörper hin. Die Untersuchung der Zellkulturüberstände zehn Tage nach der Fusion zeigte, dass insgesamt 108 Hybridome rezeptorspezifische Antikörper produzierten (Tab. 3.7).

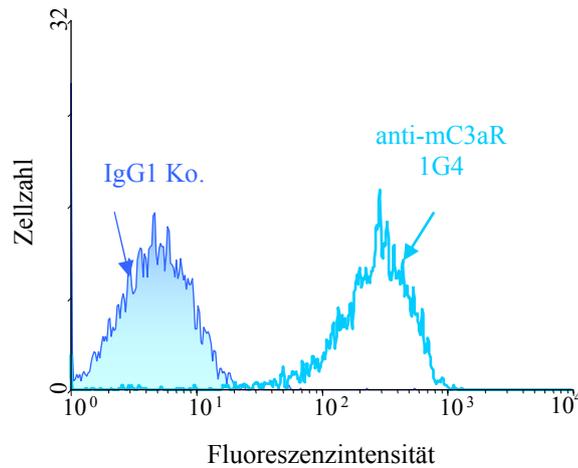


**Abbildung 3.15: Nachweis der Bindung des anti-mC3aR-Antikörpers 1G4 an die C3aR-exprimierende Zelllinie J774A.1**

1 x 10<sup>5</sup> J774A.1 Zellen wurden mit dem anti-mC3aR-Antikörper 1G4 sowie einer IgG1-Isotypkontrolle inkubiert. Die Bindung des Antikörpers an die Zellen wurde mit Hilfe eines FITC-markierten Ziege-anti-Ratte-IgG-Sekundärantikörpers (1:200) im Durchflusszytometer detektiert.

### 3.2.10 Nachweis mC3aR-spezifischer Antikörper mittels der M-CSF-Maus-Makrophagen

Da sehr viele Kulturüberstände mit J774A.1 Zellen positiv reagierten, wurden sie am Tag des Fusions-Screenings auf M-CSF-Makrophagen getestet. Diese Zellen wurden aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen unter Stimulation mit M-CSF gewonnen (vgl. 2.3.15.1). Die Auswertung der Ergebnisse ergab, dass 46 Kulturüberstände den Rezeptor auf M-CSF-induzierten Maus-Makrophagen erkennen (Tab. 3.7, Abb. 3.16). Es wurden nur Klone weiterhin in Kultur gehalten, deren Überstände mit M-CSF-Makrophagen stark positiv reagierten.



**Abbildung 3.16: Durchflusszytometrische Analyse der mC3aR-Expression auf M-CSF-Makrophagen**

$1 \times 10^5$  M-CSF-Makrophagen wurden mit 100  $\mu$ l Kulturüberständen, die positiv auf J774A.1 Zellen reagierten, für 45 min auf Eis inkubiert. Der Nachweis der Bindung wurde mit PE-markiertem Esel-anti-Ratte-IgG (1:100) durchgeführt und im Durchflusszytometer analysiert.

**Tabelle 3.7: Zusammenfassung der Fusionsergebnisse**

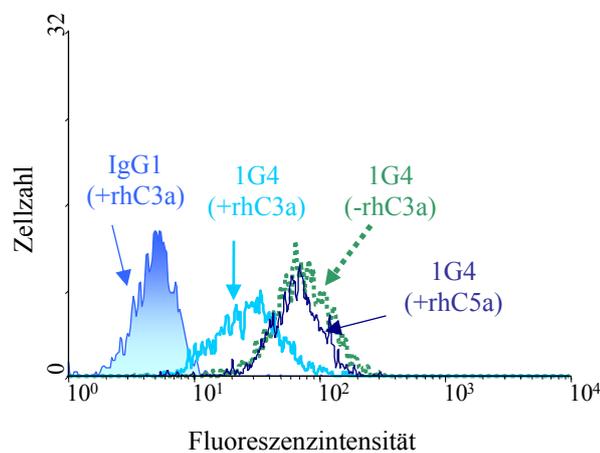
getestete Hybridomkulturerstände	auf J774A.1 Zellen positiv	auf M-CSF-Makrophagen positiv
<b>1536</b>	<b>108</b>	<b>46</b>

Zum Nachweis der mC3aR-spezifischen Antikörper wurden die Hybridomkulturüberstände zehn Tage nach der Fusion zunächst auf der Maus-Makrophagen-Zelllinie J774A.1 getestet. Positive Klone wurden anschließend auf M-CSF-Makrophagen durchflusszytometrisch untersucht.

### 3.2.11 Nachweis der Rezeptorspezifität des anti-mC3aR-Antikörpers durch Internalisierung des Rezeptors auf J774A.1 Zellen

Um positive Kulturüberstände, die auf M-CSF-Makrophagen stark reagierten, auf ihre Rezeptorspezifität zu untersuchen, wurden Internalisierungsversuche durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die J774A.1 Zellen zunächst mit einem Überschuss von rhC3a bei 37°C behandelt, bevor der anti-C3aR-Antikörper zugegeben wurde. In einem Parallelansatz wurde außerdem rhC5a im Überschuss bei anschließender anti-mC3aR-Antikörperzugabe mit den Zellen inkubiert. Zur Kontrolle der C3aR-Expression erfolgte parallel eine FACS-

Analyse der J774A.1 Zellen ohne Behandlung mit den jeweiligen Liganden. In Abbildung 3.17 ist die Reduktion der anti-mC3aR-Antikörperbindung (1G4) durch einen Überschuss an rhC3a gezeigt. Die Behandlung der Zellen mit einem rhC5a-Überschuss zeigte keinen Rückgang des Fluoreszenzsignals. Umgekehrt war es möglich, durch Vorinkubation mit einem Überschuss an rhC5a, nicht jedoch rhC3a, die Bindung des monoklonalen Antikörpers 20-70 an die J774A.1 Zellen zu reduzieren (Tab. 3.8). Der monoklonale Antikörper 20-70 erkennt spezifisch den C5aR der Maus (SORURI *et al.*, 2003b). Alle in der Tabelle 3.8 aufgeführten Antikörper zeigten eine deutliche Verringerung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) nach Inkubation der J774A.1 Zellen mit einem Überschuss an rhC3a.



**Abbildung 3.17: Spezifische Bindung des monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpers 1G4 an J774A.1 Zellen**

1 x 10<sup>5</sup> J774A.1 Zellen wurden in den verschiedenen Ansätzen mit einem Überschuss an rhC3a bzw. rhC5a für 30 min bei 37°C inkubiert. In einem parallelen Ansatz wurden die Zellen ohne Behandlung mit den Liganden eingesetzt. Der Nachweis des Rezeptors wurde mit monoklonalem anti-mC3aR-Antikörper 1G4 (5µg/ml) und anschließend FITC-markiertem Ziege-anti-Ratte-Antikörper (1:200) durchgeführt und im Durchflusszytometer analysiert.

**Tabelle 3.8: Nachweis der Rezeptorspezifität der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper auf J774A.1 Zellen**

Klon	J774A.1 MIF <sup>1</sup>	J774A.1+rhC3a MIF <sup>2</sup>	J774A.1+rhC5a MIF <sup>3</sup>
1G4	116	33	103
15G2	144	51	137
2E10	153	70	160
14G8	85	37	90
14D4	146	26	120
4D8	143	55	125
7B11	145	39	104
7E12	67	47	62
11E2	44	14	34
20-70 (anti-mC5aR)	351	321	89

1 Unbehandelte Zellen

2 Inkubation der Zellen mit einem Überschuss an rekombinantem hC3a vor der Zugabe der monoklonalen anti-C3aR- bzw. anti-C5aR-Antikörper

3 Inkubation der Zellen mit einem Überschuss an rekombinantem hC5a vor der Zugabe der monoklonalen anti-C3aR- bzw. anti-C5aR-Antikörper

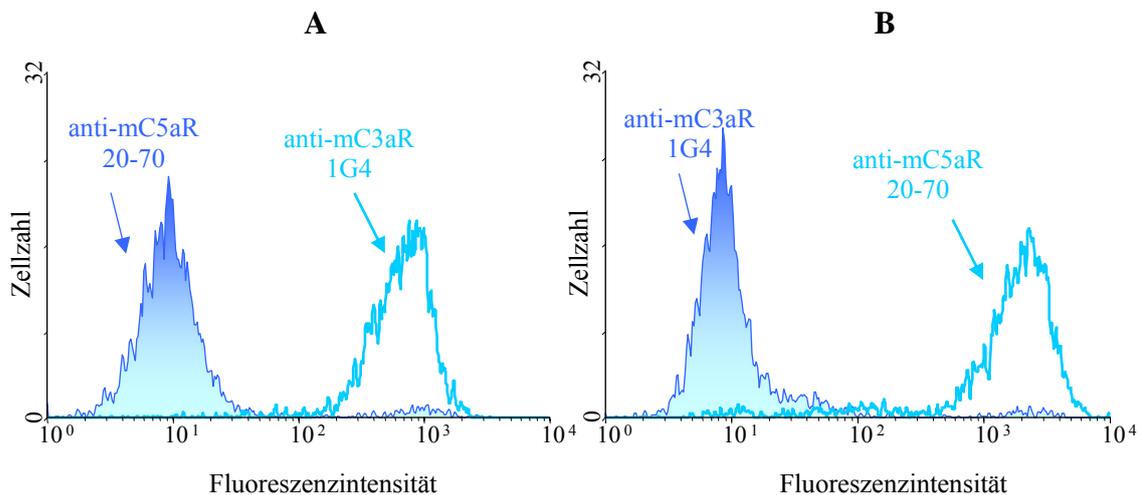
Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität bei einem von drei unabhängigen Experimenten.

Im Verlauf der Klonierung durch Grenzverdünnung wurden die Klone weiterverfolgt, die stabil waren und sich zur Produktion eigneten. Die Klone 1G4, 15H2, 2E10, 14G8, 4D8, 14D4 wurden weiter kloniert und die Isotypen der Klone wurden mit dem in Kapitel 2.3.7 des experimentellen Teiles beschriebenen Verfahren bestimmt. Die Klone 1G4, 15H2, 2E10, 14G8, 4D8 sezernierten Immunglobuline vom Typ IgG1. Der Antikörper des Klons 14D4 wurde als Isotyp IgG2a bestimmt. Alle Antikörper hatten leichte Ketten vom  $\kappa$ -Typ.

### **3.2.12 Nachweis der spezifischen Bindung der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper durch Verwendung unterschiedlicher RBL-2H3-Transfektanten**

Zur Überprüfung der spezifischen Bindung der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper wurden die gereinigten Antikörper unter Verwendung von mit mC5aR und mC3aR stabil transfizierten RBL-2H3 Zellen eingesetzt. Hier zeigten alle gereinigten Antikörper keine Bindung an RBL-mC5aR Zellen. In Abbildung 3.18 sind die Ergebnisse des monoklonalen Antikörpers 1G4 exemplarisch dargestellt.

Bei mC3aR-tragenden Zellen konnte nach Inkubation mit anti-mC3aR-Antikörper 1G4 und dem FITC-markierten Ziege-anti-Ratte-Sekundärantikörper im Vergleich zum 20-70 eine deutliche Bindung gezeigt werden (Abb. 3.18A). Bei mC5aR-tragenden Zellen verhielt es sich umgekehrt (Abb. 3.18B).



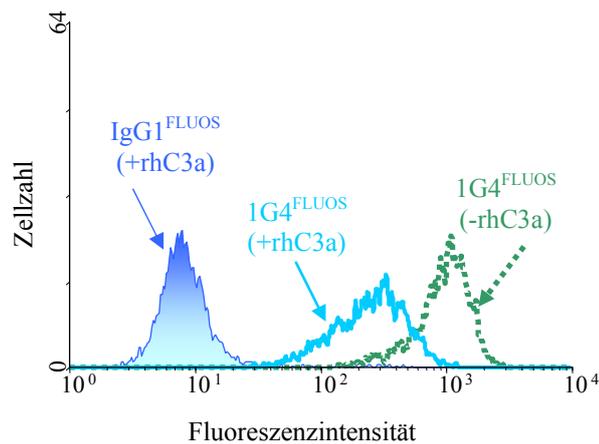
**Abbildung 3.18: Spezifische Bindung des monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpers 1G4 an RBL-mC3aR Zellen**

$1 \times 10^5$  RBL-mC3aR- (A) bzw. RBL-mC5aR Zellen (B) wurden mit  $5 \mu\text{g/ml}$  1G4 (anti-mC3aR-Antikörper) bzw. 20-70 (anti-mC5aR-Antikörper) für 45 min auf Eis inkubiert. Der Nachweis der Bindung wurde mit einem FITC-markierten anti-Ratte-Sekundärantikörper (1:400) durchgeführt und im Durchflusszytometer analysiert.

### 3.2.13 Nachweis der Rezeptorspezifität der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper durch Internalisierung des Rezeptors auf RBL-mC3aR Zellen

Die Rezeptorspezifität der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper wurde auch durch Internalisierung des Rezeptors mit rekombinantem hC3a auf RBL-mC3aR Zellen (Klon P1B4) überprüft. Die Vorinkubation der Zellen mit rhC3a reduzierte die Rezeptorexpression und damit die Bindung der rezeptorspezifischen monoklonalen Antikörper. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff (FLUOS) gekoppelt und in einer direkten Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. In Abbildung 3.19 wurde exemplarisch die Reduktion der Fluoreszenzintensität des anti-mC3aR-Antikörpers 1G4 nach der Vorinkubation der RBL-

mC3aR Zellen mit einem Überschuss an rekombinantem hC3a gezeigt. Die mittlere Fluoreszenzintensität für vier weitere monoklonale Antikörper mit und ohne Behandlung der Zellen mit rhC3a ist in Tabelle 3.9 aufgeführt. Eine deutliche Verringerung der Fluoreszenzintensität der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper auf RBL-mC3aR Zellen wurde nach Behandlung mit rhC3a beobachtet.



**Abbildung 3.19: Reduktion der Bindung des monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpers 1G4 an RBL-mC3aR Zellen durch Vorinkubation der Zellen mit rhC3a**

1 x 10<sup>5</sup> RBL-mC3aR Zellen wurden mit 1 µg/Ansatz 1G4<sup>FLUOS</sup> für 30 min auf Eis inkubiert. In einem Parallelansatz wurden die Zellen mit 2 µg rekombinantem hC3a bei 37°C vorinkubiert und anschließend 1G4<sup>FLUOS</sup> hinzugefügt. Für die Negativkontrolle wurde IgG1<sup>FLUOS</sup> nach der Behandlung der Zellen mit rhC3a verwendet.

**Tabelle 3.9: Nachweis der Rezeptorspezifität der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper nach der Behandlung der Zellen mit rhC3a oder ohne den Ligand**

	<b>anti-mC3aR (FLUOS)</b>					
	<b>1G4 MFI</b>	<b>15G2 MFI</b>	<b>14D4 MFI</b>	<b>2E10 MFI</b>	<b>14G8 MFI</b>	<b>Isotyp-kontrolle MFI</b>
<b>-rhC3a</b>	931	253	187	741	520	78
<b>+rhC3a</b>	248	115	71	212	279	93

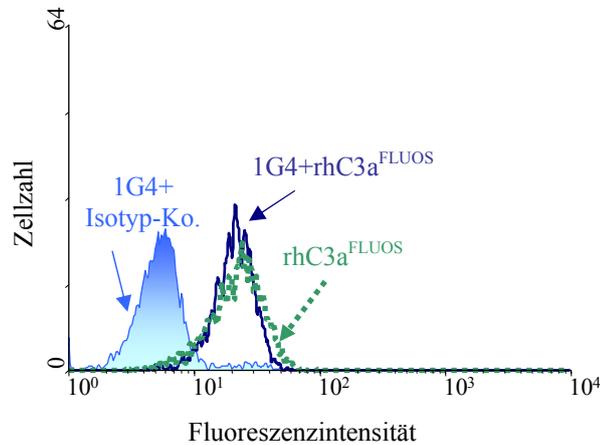
1 x 10<sup>6</sup> RBL-mC3aR Zellen wurden mit 2 µg rekombinatem hC3a für 30 min bei 37°C inkubiert. In einem Parallelansatz wurden die Zellen ohne Behandlung mit dem rhC3a eingesetzt. Anschließend wurde zu den behandelten sowie nicht behandelten Zellen FLUOS-markierter monoklonaler anti-mC3aR-Antikörper (1µg/Ansatz) hinzugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Die Bindung der Antikörper wurde durchflusszytometrisch analysiert.

### **3.2.14 Test auf Erkennung der Ligandbindungsstelle mittels monoklonaler anti-mC3aR-Antikörper**

#### **3.2.14.1 Blockierung der Ligandbindungsstelle mittels monoklonaler Antikörper**

Um festzustellen, ob die Ligandbindungsstelle des mC3aR für rhC3a durch die monoklonalen Antikörper erkannt wird, wurde ein Verdrängungsversuch durchgeführt (die Blockierung erfolgte bei 4°C, um Internalisierungsvorgänge auszuschließen). Dazu wurden RBL-mC3aR Zellen in verschiedenen Ansätzen mit den monoklonalen Antikörpern bzw. IgG1- und IgG2a-Isotypkontrollen vorinkubiert. Zu vorbehandelten Zellen sowie zu nicht behandelten Zellen wurde anschließend FLUOS-markiertes rhC3a zugegeben. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse ergab, dass die anti-mC3aR-Antikörper nicht in der Lage waren, die Bindung des FLUOS-markierten rhC3a an die RBL-mC3aR Zellen zu inhibieren. Die Fluoreszenzintensität des FLUOS-markierten rhC3a nach Vorinkubation der Zellen mit anti-mC3aR-Antikörper lässt keinen Unterschied im Vergleich mit unbehandelten Zellen erkennen. Abbildung 3.20 zeigt das Ergebnis dieses

Tests mit dem monoklonalen Antikörper 1G4. In der Tabelle 3.10 wurden die MFI-Werte für weitere vier gereinigte Antikörper dargestellt.



**Abbildung 3.20: Anti-mC3aR-Antikörper 1G4 erkennt nicht die Bindungsstelle des rhC3a an mC3aR**

1 x 10<sup>6</sup> RBL-mC3aR Zellen wurden mit je 50 µg 1G4 bzw. IgG1-Isotypkontrolle für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden zu den Ansätzen 500 ng FLUOS-markiertes rhC3a zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die FLUOS-markierten Zellen wurden im Durchflusszytometer sichtbar gemacht.

**Tabelle 3.10: Mittlere Fluoreszenzintensität des FLUOS-markierten rhC3a auf RBL-mC3aR Zellen mit oder ohne Vorinkubation mit den anti-mC3aR-Antikörpern**

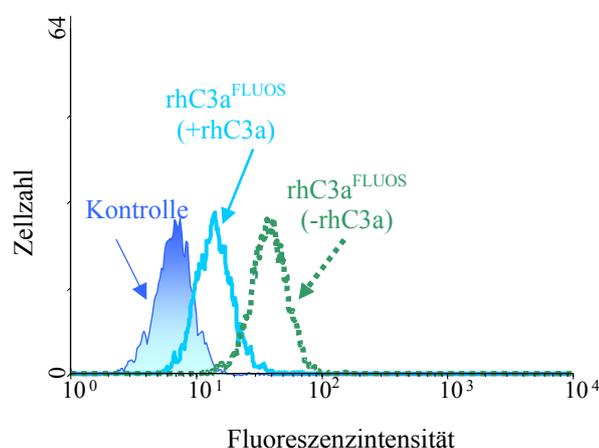
		anti-mC3aR-Antikörper						
RBL-mC3aR	-mAk	+1G4	+15G2	+14D4	+2E10	+14G8	+IgG1	+IgG2a
+rhC3a <sup>FLUOS</sup>	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI
	21.8	22.7	23.3	26.8	23.4	19.8	23.7	24.0

1 x 10<sup>6</sup> RBL-mC3aR Zellen wurden mit je 50 µg anti-mC3aR-Antikörper sowie IgG1- und IgG2a-Isotypkontrollen für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden zu den Ansätzen 500 ng FLUOS-markiertes rhC3a zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bindung wurde durchflusszytometrisch analysiert.

### 3.2.14.2 Blockierung der Ligandbindungsstelle mittels rhC3a

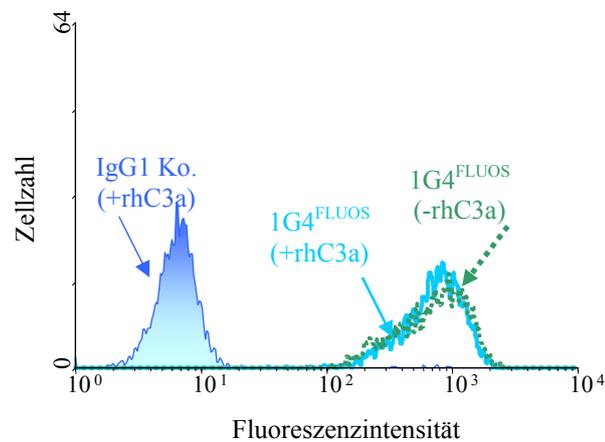
Bei diesem Versuch wurden die RBL-mC3aR Zellen vor der Zugabe der anti-mC3aR-Antikörper mit rekombinantem hC3a inkubiert. Die detektierbare Fluoreszenz sollte dann, falls die Bindung der monoklonalen Antikörper über die Ligandbindungsstelle erfolgte, deutlich vermindert sein, verglichen mit den Werten der Proben, die nur mit dem Antikörper inkubiert waren.

In einem Kontrollexperiment wurde zunächst gezeigt, dass die Bindung von rekombinantem hC3a<sup>FLUOS</sup> an RBL-mC3aR Zellen durch unmarkiertes rhC3a blockiert wird. Dazu wurden die Zellen mit einem Überschuss des unmarkierten Liganden auf Eis inkubiert, bevor rhC3a<sup>FLUOS</sup> zugegeben wurde. Abbildung 3.21 zeigt, dass die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen nach der Behandlung mit rhC3a stark reduziert wurde. Bei der Verwendung der anti-mC3aR-Antikörper (FLUOS-markiert) anstelle von rhC3a<sup>FLUOS</sup> wurde dagegen keine Reduktion der mittleren Fluoreszenzintensität mit oder ohne Behandlung mit einem Überschuss an rhC3a beobachtet (Abb. 3.22). Die mit den vier weiteren anti-mC3aR-Antikörpern erstellten durchflusszytometrische Daten sind in der Tabelle 3.11 aufgeführt.



**Abbildung 3.21: Blockierung der Bindung des rekombinanten rhC3a<sup>FLUOS</sup> an RBL-mC3aR Zellen durch rhC3a**

1 x 10<sup>5</sup> RBL-mC3aR Zellen wurden mit 200 ng rhC3a<sup>FLUOS</sup> für 30 min bei 4°C inkubiert. In einem Parallelansatz wurden die Zellen mit einem 20fachen molaren Überschuss an unmarkiertem rhC3a vorinkubiert und anschließend mit rhC3a<sup>FLUOS</sup> versetzt. In einem Kontrollansatz wurde kein rhC3a<sup>FLUOS</sup> zugesetzt. Die Vorinkubation der RBL-mC3aR Zellen mit rhC3a blockierte die Bindung des rhC3a<sup>FLUOS</sup> an die Zellen.



**Abbildung 3.22: Anti-mC3aR-Antikörper 1G4 erkennt nicht die Bindungsstelle des C3a an mC3aR**

1 x 10<sup>6</sup> RBL-mC3aR Zellen wurden mit einem rhC3a-Überschuss für 30 min bei 4°C inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen ohne Behandlung des rhC3a eingesetzt. Anschließend wurden zu den Ansätzen 1 µg FLUOS-markierter anti-mC3aR-Antikörper (1G4) sowie IgG1<sup>FLUOS</sup> zugegeben und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die FLUOS-markierten Zellen wurden im Durchflusszytometer sichtbar gemacht.

**Tabelle 3.11: Mittlere Fluoreszenzintensität der C3aR-Expression auf RBL-mC3aR Zellen mit oder ohne rhC3a-Behandlung**

	anti-mC3aR (FLUOS)					
	1G4 MFI	15G2 MFI	14D4 MFI	2E10 MFI	14G8 MFI	Isotypkontrolle MFI
-rhC3a	712	205	147	655	643	94
+rhC3a	703	204	171	660	563	71

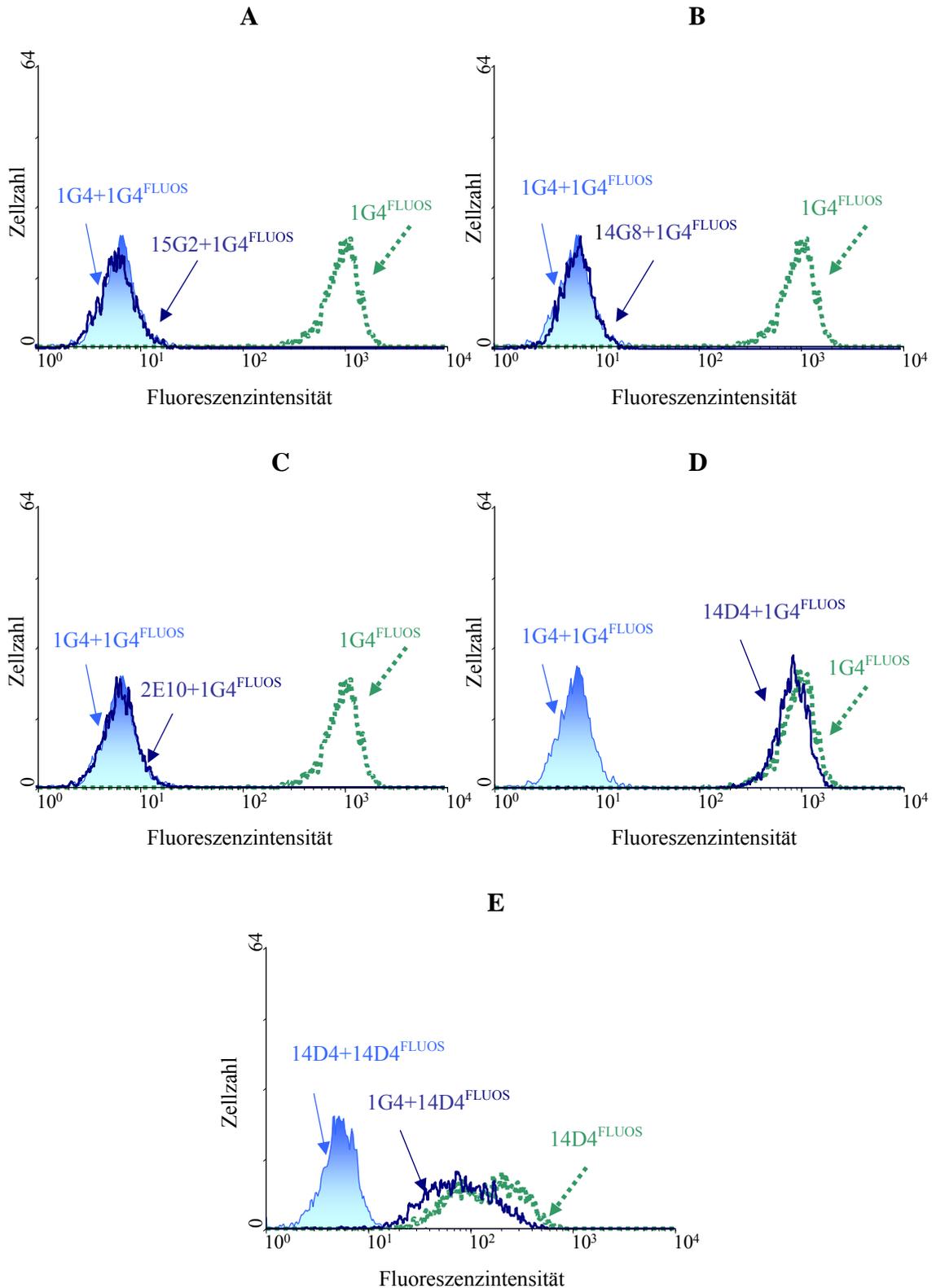
FLUOS-markierte anti-mC3aR-Antikörper (1 µg/Ansatz) wurden mit RBL-mC3aR Zellen nach der Behandlung der Zellen mit rhC3a oder ohne den Ligand für 30 min bei 4°C inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

**3.2.15 Untersuchung zur Epitoperkennung der anti-mC3aR-Antikörper**

Bei diesen Versuchen wurde untersucht, ob die neu hergestellten monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper 1G4, 15G2, 14D5, 2E10 und 14D4 ihre Bindung an RBL-mC3aR Zellen wechselseitig blockieren. Dazu wurden die RBL-mC3aR Zellen vor der Zugabe von FLUOS-markiertem Antikörper in verschiedenen parallelen Ansätzen jeweils mit einem 50fachen Überschuss nicht markierter anti-mC3aR-Antikörper (15G2, 1G4, 14G8, 2E10 und 14D4) vorinkubiert. In einem Kontrollansatz wurden die Zellen mit IgG1-Antikörper (Isotypkontrolle) behandelt.

Wie die Abbildungen 3.23 A-C und Tabelle 3.12 zeigen, verdrängen die anti-mC3aR-Antikörper 15G2, 14G8 und 2E10 die Bindung des monoklonalen Antikörpers 1G4 vollständig. Die Bindung von 1G4 (Abb. D), 2E10 und 14G8 an RBL-mC3aR Zellen ließ sich durch Vorinkubation mit 14D4 nicht inhibieren (Tab. 3.12, hellgraue Flächen). Eine geringfügige Blockade des 14D4 wurde durch Vorinkubation der Zellen mit 1G4 (Abb. E) und eine vollständige Blockierung durch monoklonale Antikörper 15G2 gezeigt (Tab. 3.12, dunkelgraue Fläche). Die Vorinkubation der RBL-mC3a Zellen mit 1G4 und 15G2 blockierte die Bindung der 2E10 und 14G8 ebenfalls vollständig. In Abbildung 3.23 und Tabelle 3.12 wurde außerdem die Eigenblockade der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper dargestellt. Diese Untersuchungen zeigten, dass drei monoklonale anti-C3aR-spezifische Antikörper (1G4, 14G8 und 2E10) sich gegenseitig vollständig inhibieren. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass diese Antikörper gleiche oder in der Nähe befindliche Epitope auf dem Rezeptorprotein erkennen. Der 14D4 dagegen wurde durch keinen der drei Antikörper blockiert und bindet offenbar an ein unabhängiges Epitop.

Der monoklonale Antikörper 15G2 nimmt eine Sonderstellung ein, da er sowohl 1G4, 14G8 und 2E10 als auch 14D4 vollständig blockiert. Dies bedeutet, dass die Bindungsstelle von 15G2 mit denen der anderen monoklonalen Antikörper überlappt.



**Abbildung 3.23: Die Bindung des FLUOS-markierten Antikörpers an mC3aR Zellen wurde durch 1G4-Antikörper vollständig oder teilweise inhibiert**

$1 \times 10^6$  RBL-mC3aR Zellen wurden mit je  $50 \mu\text{g}$  anti-mC3aR-Antikörper 1G4 (nicht konjugiert) für 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Unter Verwendung des FLUOS-markierten anti-mC3aR-Antikörpers ( $1 \mu\text{g}/\text{Ansatz}$ ) wurde die Bindung des Antikörpers an RBL-mC3aR direkt nachgewiesen.

**Tabelle 3.12: Mittlere Fluoreszenzintensität der anti-mC3aR-Antikörper auf RBL-mC3aR Zellen vor und nach der Blockierung des Rezeptors mit jeweiligem Antikörper**

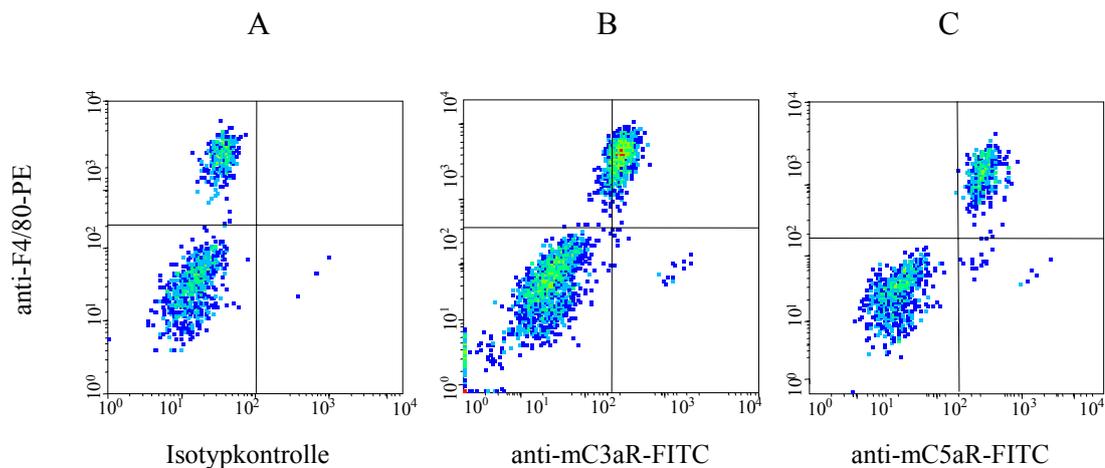
	FLUOS-markierte anti-mC3aR-Antikörper					
	<b>1G4 MFI</b>	<b>15G2 MFI</b>	<b>14D4 MFI</b>	<b>2E10 MFI</b>	<b>14G8 MFI</b>	<b>Isotyp- kontrolle MFI</b>
<b>RBL- mC3aR</b>	928	278	145	719	839	<10
<b>+ 50 µg 1G4</b>	<10	<10	82	<10	<10	<10
<b>+ 50 µg 15G2</b>	<10	<10	<10	<10	<10	<10
<b>+ 50 µg 14D4</b>	831	158	<10	639	693	<10
<b>+ 50 µg 2E10</b>	<10	<10	103	<10	<10	<10
<b>+ 50 µg 14G8</b>	<10	<10	123	<10	<10	<10
<b>+ 50 µg Isotyp- kontrolle</b>	766	242	167	640	672	<10

1 x 10<sup>6</sup> RBL-mC3aR Zellen wurden mit je 50 µg anti-mC3aR-Antikörper (nicht konjugiert) bzw. Isotypkontrolle für 1 h bei 4°C inkubiert. Unter Verwendung des FLUOS-markierten anti-mC3aR-Antikörpers (1 µg/Ansatz) wurde die Fluoreszenzintensität (MFI) der Antikörper in einer direkten FACS-Analyse ermittelt. Die Bindung des FLUOS-markierten Antikörpers an RBL-mC3aR Zellen wurde durch die übrigen monoklonalen Antikörper vollständig oder teilweise inhibiert. Angegeben sind die Mittelwerte eines repräsentativen aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.2.16 Charakterisierung der mC3aR-Expression auf myeloischen Zellen

#### 3.2.16.1 Rezeptornachweis auf Peritoneal-Makrophagen aus der Maus

Makrophagen wurden aus der Bauchhöhle einer BALB/c-Maus gewonnen (vgl. 2.3.5.5) und zur Untersuchung der C3aR-Expression mit monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpern inkubiert. Mit einem PE-markierten anti-F4/80-Antikörper wurden die Makrophagen identifiziert und im Anschluss nur diese Population untersucht. Als Positivkontrolle wurde der monoklonale anti-mC5aR-Antikörper 20-70 verwendet. Zu allen Ansätzen mit monoklonalen Antikörpern wurden parallele Ansätze mit entsprechenden Isotypen (IgG1, IgG2b) mitgeführt (Abb. 3.24A). Abbildung 3.24B zeigt exemplarisch die Bindung des monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpers 15G2 an Peritoneal-Makrophagen. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass diese Zellen den mC3aR einheitlich exprimieren. Eine deutlichere und stärkere Expression des mC5aR im Vergleich mit mC3aR auf Peritoneal-Makrophagen wurde ebenfalls dargestellt (Abb. 3.24C).



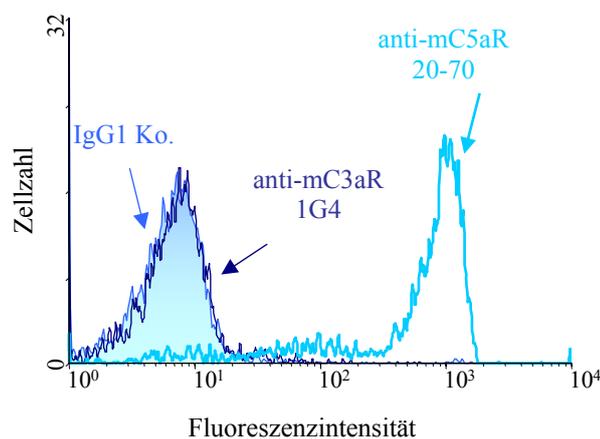
#### Abbildung 3.24: Expression des mC3aR auf Peritoneal-Makrophagen

$1 \times 10^5$  Zellen aus der Bauchhöhle einer BALB/c-Maus wurden mit je  $5 \mu\text{g/ml}$  anti-mC3aR-Antikörper 15G2 (Abb. B), anti-mC5aR-Antikörper 20-70 (Abb. C) oder entsprechenden Isotypkontrollen (Abb. A) für 45 min auf Eis inkubiert. Die Bindung des Antikörpers wurde mit einem FITC-markierten Maus-anti-Ratte-IgG-Antikörper (1:100) nachgewiesen. Durch PE-markierten anti-F4/80-Antikörper ( $2 \mu\text{l}/\text{Ansatz}$ ), der zusammen mit sekundärem Antikörper inkubiert wurde, konnten Makrophagen identifiziert werden.

### 3.2.16.2 Rezeptornachweis auf Granulozyten aus dem Knochenmark

Die Expression des mC3aR wurde mit Hilfe der monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper auf Granulozyten aus dem Maus-Knochenmark untersucht. Die Zellen wurden durch eine Nyloensäule auf > 70 % angereichert (vgl. 2.3.15.1 und 2.3.15.2) und mit dem monoklonalen Antikörper 1G4 sowie dem monoklonalen anti-mC5aR-Antikörper 20-70 als Positivkontrolle inkubiert. Um die Reinheit der Granulozyten darzustellen, wurden die Zellen mit PE-markiertem anti-Gr-1-Antikörper inkubiert.

Abbildung 3.25 zeigt die durchflusszytometrische Analyse der Granulozyten. Eine Expression des mC3aR konnte auf diesen Zellen nicht detektiert werden, während der mC5aR sehr stark exprimiert war.

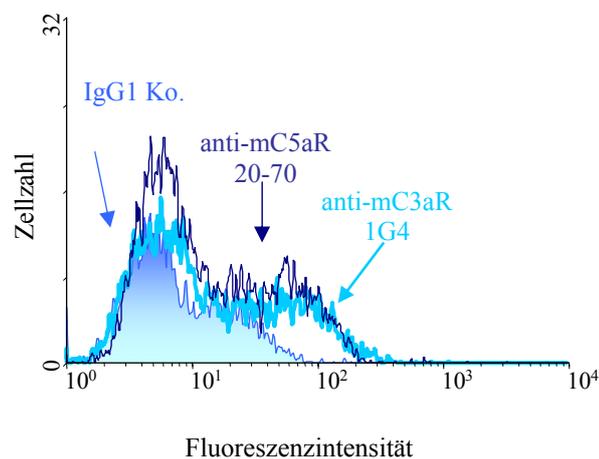


#### Abbildung 3.25: Untersuchung der mC3aR-Expression auf Granulozyten

Granulozyten aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen wurden mit 5 µg/ml anti-mC3aR-Antikörper 1G4 für 45 min auf Eis inkubiert. Die Bindung des Antikörpers wurde mit FITC-markiertem Maus-anti-Ratte-IgG-Antikörper (1:100) im Durchflusszytometer nachgewiesen. Durch PE-markierten anti-Gr-1-Antikörper wurden die Granulozyten identifiziert und eingegrenzt. Anti-mC5aR-Antikörper 20-70 wurde als Positivkontrolle und Ratte-IgG1 als Negativkontrolle verwendet. Ein repräsentatives von insgesamt vier Experimenten ist dargestellt.

### 3.2.16.3 Nachweis der mC3aR-Expression auf GM-CSF-dendritischen Zellen aus der Maus

Die monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper wurden im Durchflusszytometer auf ihre Fähigkeit überprüft, den Rezeptor für mC3a auf dendritischen Zellen der Maus zu detektieren. Dazu wurden aus Knochenmarkszellen durch Differenzierung mit GM-CSF so genannte BM-DC gewonnen (vgl. 2.3.15.1). Die dendritischen Zellen zeichneten sich durch schwache Expression von MHC-Klasse II I-E<sup>K</sup>-, CD80- und CD86-Antigenen aus und wurden als unreife dendritische Zellen charakterisiert (Abbildungen nicht gezeigt). Zur Untersuchung der mC3aR-Expression auf dendritischen Zellen wurden die Zellen mit dem monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper inkubiert. Außerdem wurden die Zellen mit irrelevanten Immunglobulinen der entsprechenden Isotypen behandelt. Der anti-mC5aR-Antikörper 20-70 wurde im Vergleich mit monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpern verwendet. In der Abbildung 3.26 ist die Expression des mC3aR sowie des mC5aR auf dendritischen Zellen dargestellt. Beide Rezeptoren zeigen eine relativ schwache Expression auf diesen Zellen.



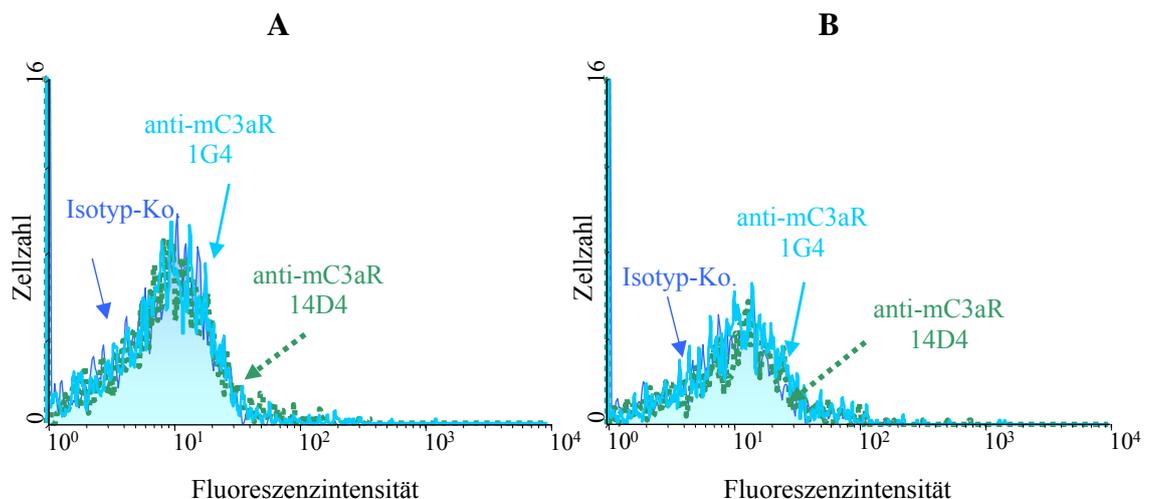
**Abbildung 3.26: Durchflusszytometrische Analyse der mC3aR-Expression auf GM-CSF-dendritischen Zellen**

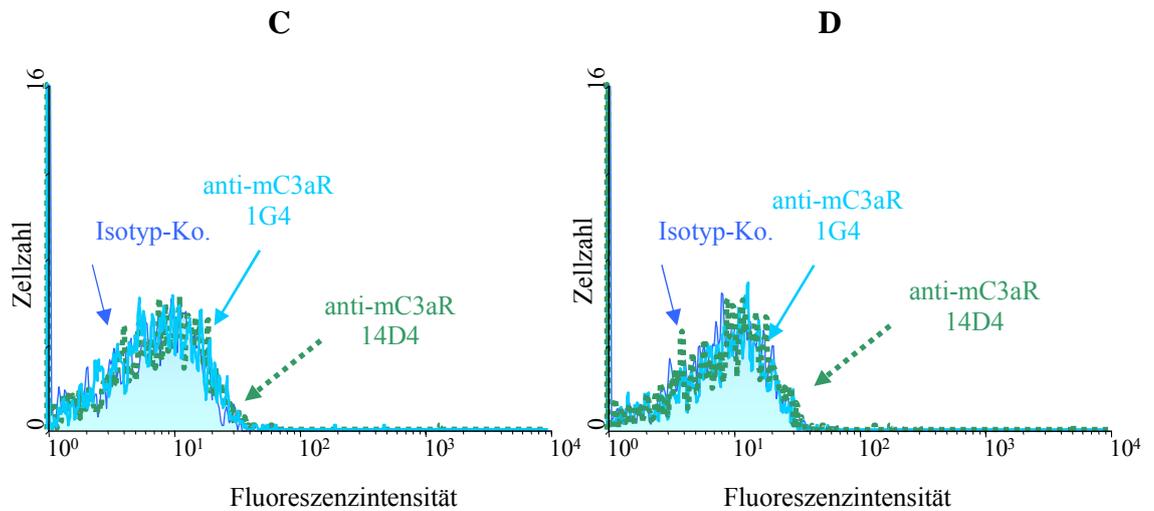
$1 \times 10^5$  dendritische Zellen aus Knochenmark von BALB/c-Mäusen wurden durch Differenzierung in GM-CSF-haltigem Medium gewonnen und mit je  $5 \mu\text{g/ml}$  anti-mC3aR-Antikörper 1G4, anti-mC5aR-Antikörper 20-70 oder entsprechenden Isotypkontrollen für 45 min auf Eis inkubiert. Die Bindung wurde mittels PE-markiertem polyklonalen Esel-anti-Ratte-IgG-Antikörper (1:100) nachgewiesen.

### 3.2.17 Charakterisierung der mC3aR-Expression auf lymphoiden Zellen

#### 3.2.17.1 Nachweis der mC3aR-Expression auf Milzzellen und Thymozyten

Mit den monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpern 1G4 und 14D4 konnte die Expression des mC3aR auf Lymphozyten aus Milz und Thymus untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden aus BALB/c-Mäusen Milz und Thymus herauspräpariert und je eine sterile Zellsuspension hergestellt (vgl. 2.3.5.2 und 2.3.15.3). Zur Aktivierung der Lymphozyten wurden die Zellen mit PMA (200 ng/ml) und Ionomycin (200 ng/ml) stimuliert und für 24 bzw. 48 h kultiviert. Durch Verwendung eines PE-markierten anti-CD3- bzw. anti-CD19-Antikörpers wurden T- bzw. B-Lymphozyten identifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Parallel wurden die Zellen der einzelnen Stimulationsansätze mit den anti-mC3aR-Antikörpern 1G4 und 14D4 gefärbt, deren Bindung an die Zellen mit PE-markiertem Esel-anti-Ratte-IgG-Antikörper nachgewiesen wurde. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit Ratten-IgG1 bzw. -IgG2a behandelt. Die durchflusszytometrische Analyse der gesamten Population aus Milz (Abb. 3.27A) und Thymus (Abb. 3.27B) zeigte, dass mC3aR auf diesen Zellen nicht detektiert werden konnten. Auf den Lymphozyten konnte nach Stimulation mit PMA und Ionomycin (24 bzw. 48 h) ebenfalls keine Expression des mC3aR nachgewiesen werden. Abbildungen 3.27C und 3.27D zeigen die durchflusszytometrische Analyse der stimulierten Zellen aus Milz und Thymus mit PMA und Ionomycin nach 48 h.





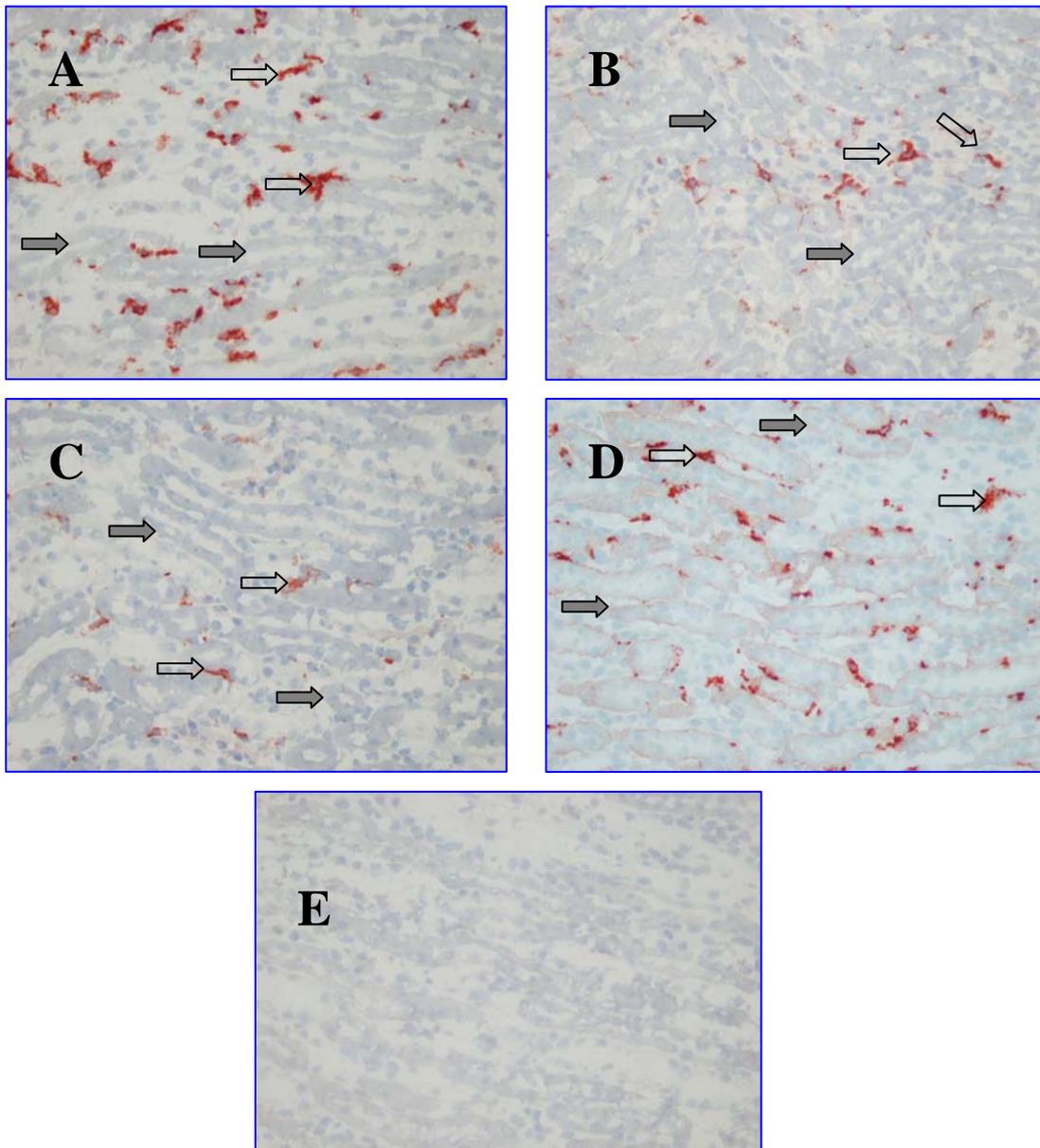
**Abbildung 3.27: Durchflusszytometrische Analyse der mC3aR-Expression auf Lymphozyten**

$1 \times 10^5$  Zellen aus Milz (unstimu., A und stimu., C) bzw. Thymus (unstimu., B und stimu., D) wurden vor und nach Aktivierung mit PMA (200 ng/ml) und Ionomycin (200 ng/ml) für 48 h mit 5  $\mu$ g/ml anti-mC3aR-Antikörper 1G4 bzw. 14D4 für 45 min auf Eis inkubiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte mit einem PE-markierten Esel-anti-Ratte-IgG-Antikörper (1:100). Dargestellt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

### **3.2.18 Immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis der C3aR-Expression in der Niere von Mäusen**

#### **3.2.18.1 C3aR-Expression in der Niere von BALB/c-Mäusen**

Zur Untersuchung der mC3aR-Expression in der Niere wurden BALB/c-Mäuse zunächst mit LPS (5 mg/kg KG) behandelt. Die Nieren wurden 8 bzw. 24 Stunden nach der LPS-Behandlung herauspräpariert und eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Alle sechs getesteten monoklonalen Antikörper gegen den mC3aR waren in der Lage, den Rezeptor in den Gefrierschnitten zu erkennen. Für weitere Untersuchungen wurden 14D4 und 1G4, die gegen verschiedene Epitope auf C3aR gerichtet waren, verwendet. Die Expressionsmuster von CD 68-, C5aR- und C3aR monoklonalen Antikörpern (14D4 und 1G4) sind identisch. Abbildungen 3.28A, B, C und D zeigen eine spezifische Bindung der Antikörper an interstitielle Makrophagen 8 Stunden nach Behandlung mit LPS. Ähnlich wie beim Menschen zeigt sich auch auf Maus-Makrophagen eine homogene Expression des C5aR (Abb. 3.28A). Die Makrophagen wurden aufgrund ihrer Morphologie und der Anfärbung mit dem anti-CD68-Antikörper identifiziert (Abb. 3.28B). Auf tubulären Strukturen wurde keine Expression des C3aR (Abb. 3.28C und D) bzw. C5aR (Abb. 3.28A) nachgewiesen. Bei Verwendung von Ratten-IgG1 (Abb. 3.28E) und -IgG2a als Negativkontrolle anstelle von monoklonalen Antikörpern konnte keine Färbung in den Nierenschnitten beobachtet werden. Abbildungen für die 24-Stunden-Behandlung mit LPS wurden nicht gezeigt.

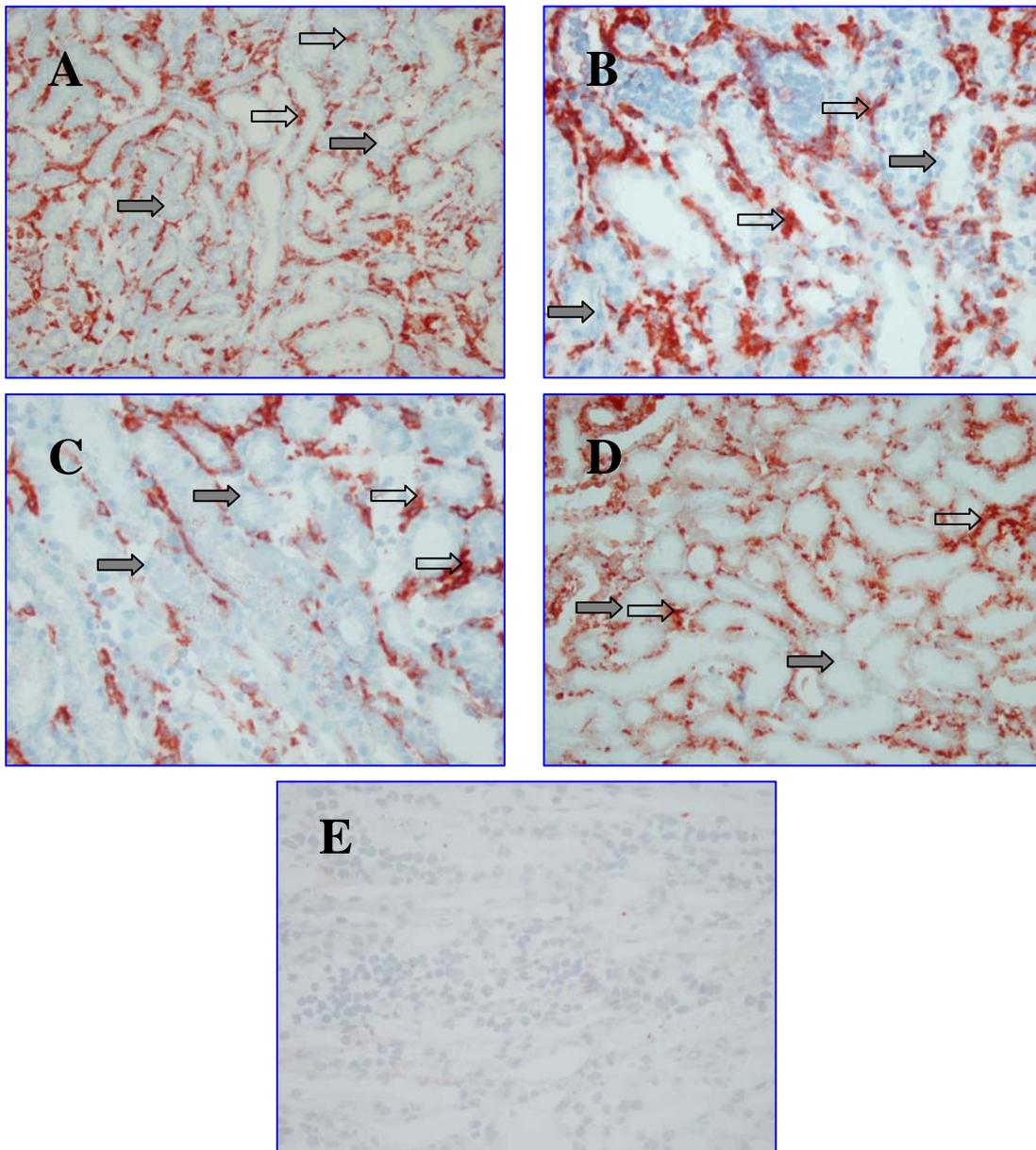


**Abbildung 3.28: C3aR-Expression in der Niere von LPS-behandelten BALB/c-Mäusen**

Immunhistochemische Färbung von Nieren-Gefrierschnitten von BALB/c-Mäusen nach LPS-Behandlung (5 mg/kg KG, 8 h) mit dem monoklonalen anti-mC5aR-Antikörper 10-92 (A), den monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpern (B, 1G4 und C, 14D4), anti-Maus CD68 (D) sowie Isotypkontrolle (E). Sowohl der C5aR als auch der C3aR wurden nur in einzelnen interstitiellen Makrophagen (offene Pfeile) exprimiert. Auf Tubulusepithelien wurden weder C5aR noch C3aR nachgewiesen (gefüllte Pfeile) (Vergrößerung 200x). Gezeigte Ergebnisse sind repräsentativ für Experimente, die mit vier Tieren durchgeführt wurden.

**3.2.18.2 C3aR-Expression in der Niere von MRL/lpr-Mäusen**

Zur Untersuchung der mC3aR-Expression in pathologisch verändertem Nierengewebe wurde ein Mausmodell (MRL/lpr-Maus) mit entzündlichen Nieren verwendet. Die MRL/lpr-Mäuse leiden, bedingt durch eine Mutation im Apoptose-induzierenden Fas-Gen, an einer lymphoproliferativen Erkrankung (WATANABE-FUKUNAGA *et al.*, 1992). Die Symptomatik ähnelt dem systemischen Lupus erythematoses, bei dem es infolge von Immunkomplexablagerungen zu entzündlichen Erkrankungen der unterschiedlichen Organsysteme, insbesondere der Niere, kommt. Die MRL/lpr-Mäuse entwickeln eine fortschreitende Glomerulonephritis und versterben schließlich an den Folgen des terminalen Nierenversagens (THEOFILOPOULOS und DIXON, 1985; ANDREWS *et al.*, 1978). Immunhistochemische Untersuchungen in der Niere von MRL/lpr-Mäusen zeigten eine massive Infiltration von mononukleären Leukozyten, die für die C5a- und C3a-Rezeptoren positiv waren (Abb. 3.29A-C). Diese Zellen wurden mittels anti-CD68-Antikörper und aufgrund ihrer Morphologie als Makrophagen identifiziert (Abb. 3.29D). Die Untersuchung des Nierengewebes bei diesen Mäusen ergab keinen Hinweis auf eine Expression der Anaphylatoxin-Rezeptoren auf Epithelzellen der proximalen Tubuli. Eine unspezifische Antikörperbindung wurde durch eine entsprechende Isotypkontrolle ausgeschlossen (Abb. 3.29E).



### Abbildung 3.29: C3aR-Expression in der Niere von MRL/lpr-Mäusen

Immunhistochemische Färbung von Nieren-Gefrierschnitten von MRL/lpr-Mäusen mit dem monoklonalen anti-mC5aR-Antikörper 10-92 (A), den monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpern (B, 1G4 und C, 14D4), anti-Maus CD68 (D) sowie Isotypkontrolle (E). Der C5aR und C3aR war nur in infiltrierenden Makrophagen exprimiert (offene Pfeile). Es wurde keine Expression von C5aR und C3aR auf Tubulusepithelien nachgewiesen (gefüllte Pfeile) (Vergrößerung 200x). Gezeigte Ergebnisse sind repräsentativ für Experimente, die mit vier Tieren durchgeführt wurden.

## 4 Diskussion

Das Komplementsystem ist ein wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems zur Abwehr eingedrungener Mikroorganismen. Im Laufe seiner Aktivierung werden die Anaphylatoxine C3a und C5a freigesetzt, die vielfältige biologische Wirkungen ausüben und auch als chemotaktisch wirksame Entzündungsmediatoren wirken. Die Wirkungen von C3a und C5a entstehen durch Bindung an spezifische Rezeptoren, den C3a- bzw. C5a-Rezeptor. Diese Rezeptoren bilden sieben transmembrane Domänen aus und gehören der G-Protein-gekoppelten Rhodopsin-Superfamilie an.

Hinsichtlich der Expression von Anaphylatoxin-Rezeptoren sind zahlreiche unterschiedliche, sich teilweise widersprechende Angaben publiziert worden. Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war, monoklonale Antikörper gegen den humanen C5aR herzustellen, um die Expression des C5aR in Gewebeschnitten genauer zu analysieren. Die verfügbaren polyklonalen Antikörper gegen diesen Rezeptor sind nur unzureichend zur Untersuchung seiner Expression, insbesondere im Gewebe, einsetzbar. Zum Rezeptornachweis sind monoklonale Antikörper auf Grund ihrer definierten Spezifität besser geeignet.

Über eine Expression des C3aR auf Zellen in der Maus liegen bisher keine fundierten Erkenntnisse vor, obwohl die Maus das am besten charakterisierte Tiermodell darstellt. Es sollten daher monoklonale Antikörper gegen den murinen Rezeptor für das Anaphylatoxin C3a hergestellt werden, um aus Erkenntnissen über die Expression dieses Rezeptors in der Maus auch Rückschlüsse auf seine Bedeutung im Menschen ziehen zu können.

### 4.1 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den humanen C5aR

Für die Generierung monoklonaler Antikörper mit hoher Affinität wurden in der Vergangenheit stabil transfizierte Zellen, die den nativen Rezeptor exprimieren, erfolgreich eingesetzt (CHUNTHARAPAI *et al.*, 1994; ROTHERMEL *et al.*, 1997b; ZAHN *et al.*, 1997; ZWIRNER *et al.*, 1999b; SORURI *et al.*, 2003a). Die Wahrscheinlichkeit, gegen verschiedene Epitope Antikörper zu erhalten, ist bei dieser Methode größer als mit

synthetischen Peptiden. Durch Immunisierung von Lou/C-Ratten mit C5aR-exprimierenden RBL-2H3 Zellen gelang es im Rahmen dieser Dissertation, neue monoklonale Antikörper gegen den humanen C5aR zu generieren. Das Screening der Kulturüberstände mit einer Mischung von RBL-hC5aR- und RBL-hC3aR-Transfektanten ermöglichte die frühzeitige Identifizierung der Hybridome, die nur gegen den hC5aR gerichtet waren, nicht jedoch gegen konstitutiv exprimierte Antigene auf RBL-2H3 Zellen (Abb. 3.1). Durch Verwendung humaner Monozyten wurde danach die Spezifität der Kulturüberstände für den endogen vorhandenen C5aR durchflusszytometrisch überprüft (Abb. 3.2). Zwei chimäre C5a-Rezeptoren auf der Oberfläche von Transfektanten standen ebenfalls zur Epitopenalyse mittels Durchflusszytometrie zur Verfügung. Mit dem chimären C5aR-Ex1hu-rat konnte die Reaktivität der Kulturüberstände gegen die N-terminale Region des C5aR nachgewiesen werden. Bei 32 Kulturüberständen wurde eine Bindung festgestellt, während 12 Kulturüberstände ein Signal mit chimären C5aR-Ex1/2rat-hu Zellen zeigten. Deren chimärische Rezeptoren waren lediglich in ihrer C-terminalen Hälfte humanen Ursprungs (Tab. 3.2, 3.4). Für den Nachweis des C5aR in Gefrierschnitten mittels immunhistochemischer Untersuchungen wurde zunächst humanes Lebergewebe verwendet. Von den bereits erwähnten 44 Kulturüberständen waren acht in der Lage, die Makrophagen der Lebersinusoiden (Kupffer'sche Sternzellen) zu erkennen. Von diesen Antikörpern erkannten alle die N-terminale Region des C5aR. Keiner der gegen den C-terminalen Anteil des humanen C5aR gerichteten Antikörper war in der Lage, ein immunhistochemisches Signal zu erzeugen. Ein möglicher Grund für diese Befunde könnten Unterschiede in der Zugänglichkeit des C5aR-N-Terminus verglichen mit anderen Rezeptoranteilen in Gefrierschnitten sein.

#### **4.2 Expression der Rezeptoren für die Anaphylatoxine C5a und C3a in der humanen Niere**

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der C5aR-Expression im normalen menschlichen Nierengewebe durch selbst hergestellte monoklonale Antikörper. Die C5aR-Expression in der Niere wurde auf Proteinebene bisher mittels solcher poly- und monoklonaler Antikörper untersucht, die durch Immunisierung mit einem aminoterminalen Peptid des C5aR generiert worden waren. FAYYAZI *et al.* (2000) verwendeten die monoklonalen Antikörper P12/1 und D12/1 für die Detektion des C5aR mittels immunhistochemischer Methoden in der normalen humanen Niere. Sie zeigten eine

konstitutive Expression des C5aR auf proximal tubulären Zellen. ABE *et al.* untersuchten 2001 normale und erkrankte Nierengewebe mittels Immunhistochemie unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers W17/1. Sie berichteten, dass der C5aR in der normalen Niere und bei einer MCNS-Erkrankung (*minimal change nephrotic syndrome*) nur in proximal tubulären Zellen exprimiert sei, während bei einer MN (*membranous nephropathy*) und mesGN (*mesangial proliferative glomerulonephritis*) der C5aR auch in Mesangiumzellen, glomerulären Endothel- und Epithelzellen, der Bowman Kapsel, vaskulären Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur sowie proximal tubulären Zellen detektiert wurde. Mögliche Gründe und Folgen der C5aR-Hochregulation in fast allen Nierenzellen bei diesen Erkrankungen wurden jedoch nicht diskutiert. In einer Arbeit von ZAHEDI *et al.* (2000) wurde die Expression des C5aR in Epithelzellen der proximalen Nierentubuli gezeigt. Allerdings verwendete diese Forschergruppe ein polyklonales Antiserum für ihre immunhistochemischen Untersuchungen, welches durch Immunisierung von Kaninchen mit einem synthetischen Peptid gewonnen wurde.

Die von FAYYAZI *et al.* (2000) und ABE *et al.* (2001) verwendeten monoklonalen Antikörper (P12/1, D12/1 und W17/1) sowie der in dieser Arbeit untersuchte monoklonale Antikörper S5/1 wurden durch Immunisierung von Mäusen mit einem synthetischen Peptid, das die Aminosäuren 1-31 des N-terminalen C5aR repräsentiert, hergestellt (OPPERMANN *et al.*, 1993; WERFEL *et al.*, 1996b). Alle diese Antikörper wurden aus derselben Fusion gewonnen und zeigen eine ähnliche Reaktivität mit den N-terminalen Peptiden REX1 und XAL, wie aus Daten der Epitopanalyse zu erkennen ist (Tab. 3.5). Unerwartet war die immunhistochemische Untersuchung mit dem monoklonalen Antikörper 61, der sich nur an Gewebemakrophagen in den Nieren anlagerte, während die Zellen der proximalen Tubuli negativ blieben (Abb. 3.9E). Der Antikörper 61 wurde durch Immunisierung von Mäusen mit hC5aR-exprimierenden RBL-2H3-Tansfektanten hergestellt und erkennt das N-terminale Peptid REX1, nicht jedoch XAL (Tab. 3.5), was darauf hindeutet, dass das von ihm erkannte Epitop sich von dem der bereits erwähnten monoklonalen Antikörper unterscheidet. Wir hielten es deshalb für nicht ausgeschlossen, dass es sich bei der beschriebenen Reaktivität der anti-C5aR monoklonalen Antikörper P12/1, D12/1 und W17/1 (FAYYAZI *et al.*, 2000; ABE *et al.*, 2001) sowie der polyklonalen Antikörper (ZAHEDI *et al.*, 2000) mit humanen Tubuluszellen der Niere um die Bindung an ein unbekanntes Protein, nicht jedoch den C5aR handeln könnte.

Zur Klärung der Frage der C5aR-Expression in der normalen humanen Niere und zum besseren Verständnis dieser kontroversen Ergebnisse wurden die neu hergestellten acht

monoklonalen Antikörper gegen den N-terminalen Anteil des humanen C5aR, die den Rezeptor in Gewebeschnitten erkennen, eingesetzt. Zu unserem Erstaunen färbten die neuen monoklonalen Antikörper sehr deutlich gewebeständige Leukozyten/Makrophagen an, während andere Zellarten einschließlich tubulärer Zellen nicht erkannt wurden (Abb. 3.9B-D). Das Expressionsmuster aller monoklonalen Antikörper war identisch mit dem des monoklonalen Antikörpers 61. Gewebemakrophagen sind Zellen myeloider Abstammung und exprimieren den C5aR (FAYYAZI *et al.*, 2000). Mittels Peptid-ELISA wurden die acht monoklonalen Rattenantikörper auf ihre Reaktivität gegen die Peptide REX1 und XAL überprüft (Tab. 3.3). Die monoklonalen Antikörper 15C4 und 15F10 reagierten mit dem Peptid REX1 und XAL ähnlich wie die monoklonalen Antikörper P12/1, W17/1 und S5/1; bei den drei monoklonalen Antikörpern 8D6, 14F6 und 15H2 wurde eine Bindung an das Peptid REX1 festgestellt, ähnlich wie beim monoklonalen Antikörper 61. Drei monoklonale Antikörper (12F1, 12F7, 9C12) erkannten keines der beiden Peptide (Tab. 3.5). Dies könnte bedeuten, dass die letzte Gruppe ein konformationelles Epitop erkennt, das durch die Aufarbeitung des Gewebes bei der Präparateherstellung zerstört wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass N-terminale Aminosäuren zwischen den Positionen 32-40 erkannt werden, da die RBL-2H3-Transfektante C5aR-Ex1hu-rat die 40 N-terminalen Aminosäuren des humanen C5aR enthält. Ihre unterschiedliche Reaktivität gegen die N-terminalen Peptide gilt für uns als Beleg dafür, dass die acht monoklonalen Rattenantikörper an drei verschiedene Epitope der N-terminalen Region des C5aR binden. Die Befunde einer selektiven Anfärbung von Gewebemakrophagen stehen in klarem Widerspruch zu Untersuchungen von FAYYAZI *et al.* (2000), ABE *et al.* (2001) sowie ZAHEDI *et al.* (2000), in denen eine konstitutive Expression des C5aR auf proximal tubulären Zellen der menschlichen Niere nachgewiesen worden war.

Interessanterweise wurde bereits eine Kreuzreaktivität der monoklonalen anti-C5aR-Antikörper P12/1, D12/1 und W17/1 von WERFEL *et al.* (1996b) demonstriert. Diese Forschergruppe zeigte, dass alle gegen die N-terminale Region des C5aR-Moleküls gerichteten monoklonalen Antikörper nicht nur an CD117<sup>+</sup>-perivaskuläre Mastzellen und CD14<sup>+</sup>-Makrophagen binden, sondern auch mit desmosomalen Epitopen epidermaler Keratinozyten reagieren. Die Bindung der monoklonalen Antikörper an diese Zellen schien vordergründig spezifisch zu sein, da das REX1-Peptid, welches zur Immunisierung der Mäuse verwendet worden war, die Bindung des Antikörpers blockierte. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch eine Kreuzreaktivität des anti-C5aR-Antikörpers. Die

Gründe dafür waren: 1.) Die Bindung der Antikörper an epidermale Zellen und die epidermale Zelllinie HaCat konnte durch Vorinkubation mit REX1-Peptid, nicht jedoch durch rekombinantes C5a verdrängt werden; 2.) Es wurde eine Bindung nur an Mastzellen und CD14<sup>+</sup> Zellen durch FITC-gekoppeltes C5a gezeigt, nicht jedoch an epidermale Zellen; 3.) Eine Calcium-Freisetzung wurde nur durch C5a-Stimulation von CD14<sup>+</sup> und CD117<sup>+</sup> dermalen Zellen beobachtet, nicht jedoch von epidermalen Zellen; 4.) Trotz 40fachem cDNA-Überschuss aus epidermalen Zellen im Vergleich zu cDNA aus neutrophilen Granulozyten konnte lediglich eine sehr schwache C5aR-mRNA-Bande mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Da keine mRNA-Expression in primären kultivierten Keratinozyten oder HaCat Zellen nachgewiesen wurde, konnte eine Kontamination durch Leukozyten hier nicht ausgeschlossen werden. WERFEL *et al.* (1996b) rieten deshalb dazu, die verfügbaren Antikörper nur für die Untersuchungen des C5aR an hämatopoietischen Zellen zu verwenden. Untersuchungen an Epithelzellen sollten nur unter Vorbehalt ausgewertet und möglichst durch weitergehende Methoden bestätigt werden.

Kreuzreaktivitäten monoklonaler sowie polyklonaler Antikörper treten nicht nur beim C5aR auf, sondern wurden auch bei anderen Antigenen berichtet. UTSUNOMIYA *et al.* (2004) zeigten bei immunhistochemischen Untersuchungen an BAX-Antigen (*BCL-2-Associated X Protein*) mittels polyklonaler anti-BAX-Antikörper (SCBAX), dass sowohl pro-apoptotisches BAX-Protein (mitochondriales Protein) als auch MECA-Antigen (*Multi-Endocrine Cellular Antigen*) erkannt werden. Dieses Antigen wird in verschiedenen endokrinen Organen exprimiert. Bei Verwendung monoklonaler anti-BAX-Antikörper blieb es ungefärbt. Eine weitere Gruppe (FREEMAN *et al.*, 1998) untersuchte die Expression des B7-1-(CD80) Antigens mit dem monoklonalen Antikörper BBL. B7-1 ist der Rezeptor für CD28- und CTLA-4-Moleküle, die eine regulatorische Rolle bei der T-Zell-Aktivität spielen. Es wurde festgestellt, dass bei der Verwendung des BBL-Antikörpers im Vergleich mit anderen monoklonalen anti-B7-1-Antikörpern unterschiedliche Ergebnisse auftraten. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der BBL-Antikörper zusätzlich das Antigen CD74 (*MHC II-Associated Invariant Chain*) erkennt, welches nicht mit B7-1 verwandt ist und nur wenig Homologie aufweist. Die unspezifische Bindung des BBL-Antikörpers führte für sehr lange Zeit zu einer falschen Charakterisierung des Rezeptors für CD28/CTLA-4-Antigene.

POTGENS *et al.* (2002) zeigten die unspezifische Bindung des kommerziell erhältlichen monoklonalen anti-CD133-Antikörpers (CD133-2/AC141) an Zytokeratin 18. CD133-Antigen wird in hämatopoietischen Stamm- oder Vorläuferzellen und einigen Epithelzellen exprimiert. Die unspezifische Bindung des Antikörpers bei den immunhistochemischen Untersuchungen an Zytokeratin führte zu einer Anfärbung vorwiegend von Epithelzellen. Diese Befunde lassen zusammen mit unseren darauf schließen, dass Daten, die auf der Verwendung eines einzigen Antikörpers beruhen, zu falschen Ergebnissen führen können und deshalb möglichst durch einen zweiten Antikörper, welcher ein anderes Epitop erkennt, bestätigt werden sollten.

Die Bindung der poly- und monoklonalen anti-C5aR-Antikörper für den C5aR könnte auch durch post-translationale Modifikationen des C5aR, z.B. N-glykosidische Bindung unterschiedlicher Kohlenhydratgruppen an Tyrosin-Reste in der Position 5 der N-terminalen Domäne des C5aR oder O-Sulfatierung der Tyrosine in den Positionen 11 und 14, beeinflusst werden (FARZAN *et al.*, 2001; GERARD und GERARD, 1994). Über eine post-translationale Modifikation des C5aR, die spezifisch für tubuläre Zellen der Niere im Gegensatz zu Gewebemakrophagen wäre, wurde jedoch nie berichtet. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die O-Sulfatierung der Tyrosine eine funktionelle Bedeutung bei der Bindung des C5a an C5aR hat, und deshalb vermutlich überall vorkommt. Der C5aR ohne Sulfat-Reste ist unfähig zum Auslösen der intrazellulären Signaltransduktion einschließlich Calcium-Freisetzung. Es sollte allerdings auch beachtet werden, dass die post-translationale Modifikation des C5aR nicht für das Ausbleiben der Bindung der monoklonalen Rattenantikörper 15C4 und 15F9 an tubuläre Zellen der Niere, die ein Epitop ähnlich dem von P12/1, D12/1, W17/1 und S5/1 erkennen, verantwortlich sein kann.

Es wurde berichtet, dass einige kultivierte Epithelzellen, die unter physiologischen Bedingungen keinen C5aR tragen, nach einer IL-6- oder IL-1 $\beta$ -Stimulation den C5aR exprimieren können, wie z.B. C5aR-Induktion nach IL-6-Stimulation auf Hepatozyten (SCHIEFERDECKER *et al.*, 2000; KOLEVA *et al.*, 2002; SCHLAF *et al.*, 2003). Auch auf mikrovaskulären Endothelzellen der Maus wurde eine C5aR-Expression durch IL-6 induziert (LAUDES *et al.*, 2002). Eine IL-1 $\beta$ -vermittelte Expression des C5aR konnte auf humanen artikulären Chondrozyten und mononukleären Leukozyten (MNL) gezeigt werden (ONUMA *et al.*, 2002; TAKABAYASHI *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit

durchgeführte RT-PCR-Untersuchungen zum Nachweis der mRNA von C5aR in Primärzellkulturen humaner proximaler Tubuluszellen aus der Niere konnten keine relevante Expression von C5aR-mRNA auch unter Stimulationbedingungen (Zugabe von IL-1 $\beta$  und IL-6) zeigen (Abb. 3.11). ZAHEDI *et al.* (2000) demonstrierten die C5aR-Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR in Primärzellkulturen humaner proximaler Tubuluszellen der Niere. Diese Daten konnten von uns nicht bestätigt werden. Unter IL-1 $\beta$ -Stimulation wurde mittels RT-PCR eine sehr schwache Expression der C5aR-mRNA gezeigt, jedoch hatte IL-6 keinen erkennbaren Effekt auf die C5aR-mRNA-Expression. Diese sehr niedrige mRNA-Menge entsprach nicht den starken immunhistochemischen Färbungssignalen, die mittels polyklonaler anti-C5aR-Antikörper erhalten wurden.

ZAHEDI *et al.* (2000) beschrieben weiterhin eine C5aR-Expression auf Proteinebene in RPTEC Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums und mittels durchflusszytometrischer Analyse unter Verwendung des monoklonalen W17/1 Antikörpers. Diese Befunde stehen in Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die mittels Immunzytochemie auf der Basis hoch spezifischer monoklonaler Antikörper erzielt wurden (Abb. 3.10). Die durchflusszytometrische Analyse der RPTEC Zellen verlief ebenfalls negativ (Abbildung nicht gezeigt).

Nachdem wir keinen Beleg für eine C5aR-Expression auf humanen proximal tubulären Zellen fanden, wurde die C3aR-Expression in der humanen Niere untersucht (KIAFARD *et al.*, 2007). BRAUN *et al.* (2004) berichteten von einer C3aR-Expression auf proximal tubulären Zellen normaler Nieren unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 8H1 in immunhistochemischen Untersuchungen. Allerdings sollte nicht unerwähnt bleiben, dass bei diesen Experimenten das endogene Biotin offenbar nicht blockiert wurde, obwohl der Nachweis der Antikörperbindung durch ein TAS-Biotin-System durchgeführt wurde.

Der monoklonale Antikörper 8H1 wurde von SOHNS *et al.* (1998) in Rahmen ihrer Diplomarbeit gegen ein rekombinantes Protein der zweiten extrazellulären Schleife des humanen C3aR hergestellt. Diesen Antikörper verwendete unsere Arbeitsgruppe ebenfalls zur immunhistochemischen Untersuchung der humanen Niere und durchflusszytometrischen Analyse (KIAFARD *et al.*, 2007). Erstaunlicherweise konnten die Gewebemakrophagen mittels 8H1 nicht detektiert werden, während wir eine Anfärbung proximal tubulärer Zellen bestätigen konnten. Unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers hC3aRZ8, der gegen RBL-hC3aR Zellen hergestellt wurde und eine Bindung an die zweite extrazelluläre Schleife des C3aR aufweist (SORURI *et al.*, 2003a), stellten

sich hingegen ausschließlich interstitielle Makrophagen als C3aR positiv dar. Dieses C3aR-Expressionsmuster war identisch mit dem des C5aR bei Verwendung der monoklonalen Ratten-anti-hC5aR-Antikörper. Zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse wurde eine durchflusszytometrische Analyse humaner Monozyten und RBL-C3aR Zellen durchgeführt. Es wurde ein deutlich schwächeres Bindungssignal durch 8H1 im Vergleich zum monoklonalen Antikörper hC3aRZ8 erhalten (KIAFARD *et al.*, 2007).

Eine Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers 8H1 ist in der Dissertation von B. SOHNS beschrieben. Während der Charakterisierung des 8H1 erwiesen sich mittels durchflusszytometrischer Analyse die SW1573-Zelllinien (humanes squamöses Lungenkarzinom) und die SK-N-SH-Zelllinie (humane Neuroblastomazelllinie aus einer Knochenmarksmetastase eines vierjährigen Mädchens) als C3aR positiv. Diese Daten konnten mittels Northern-Blot-Analysen allerdings nicht bestätigt werden. Immunhistochemische Untersuchungen ausdifferenzierter humaner Plazenta-Zellen mit dem 8H1 zeigten, dass arterielle Endothelzellen, die Synzytiotrophoblastenschicht und die phagozytischen Hofbauerzellen angefärbt waren. Zusätzliche Untersuchungen mittels zweier monoklonaler anti-C3aR-Antikörper konnten diese Ergebnisse, mit Ausnahme der Anfärbung der Hofbauerzellen, jedoch nicht bestätigen (B. SOHNS, Dissertation, 2000). SOHNS berichtete auch von durch den monoklonalen Antikörper 8H1 falsch positiv angefärbten Amnionzellen. Zusammengenommen stellen diese Befunde die Spezifität des 8H1 beim C3aR-Nachweis stark in Frage.

#### **4.3 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den murinen C3aR**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue monoklonale Antikörper gegen den murinen C3aR generiert und charakterisiert. Dies ermöglichte uns zum ersten Mal die Identifizierung des C3aR auf Mauszellen der Bauchhöhle und des Knochenmarks sowie in Geweben durch durchflusszytometrische und immunhistochemische Untersuchungen. Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper gegen den mC3aR wurden zunächst RBL-2H3 Zellen produziert, die permanent den mC3aR exprimierten. J774A.1 Zellen wurden zur mRNA-Isolierung mit anschließender cDNA-Herstellung eingesetzt. Diese Zelllinie weist viele Gemeinsamkeiten mit reifen *in vivo*-Makrophagen auf (RALPH und NAKOINZ, 1975; SNYDERMAN *et al.*, 1977).

Für die Existenz eines Rezeptors für das Anaphylatoxin C3a auf diesen Zellen liegen eindeutige Befunde vor. ZWIRNER *et al.* (1998b) konnten einen Anstieg des intrazellulären Calciums nach C3a-Stimulation zeigen, ebenso wie eine C3a-vermittelte Wanderung. Darüber hinaus banden J774A.1 Zellen FLUOS-markiertes rekombinantes C3a.

Nach der Transfektion von mC3aR-cDNA in RBL-2H3 Zellen wurde der mC3aR über die spezifische Bindung des C3a an seinen Rezeptor nachgewiesen (Abb. 3.12 und 3.14). Da humanes C3a an den murinen C3aR mit hoher Affinität bindet (ZWIRNER *et al.*, 1998b; TORNETTA *et al.*, 1997; HSU *et al.*, 1997; HOLLMANN *et al.*, 1998), wurde in der vorliegenden Arbeit nur rekombinantes humanes C3a benutzt. Um sowohl eine schnelle Aufreinigung des C3a-Moleküls über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie als auch eine Detektion der C3a-Bindung an C3aR zu ermöglichen, wurden am N-Terminus des C3a sechs Histidine angefügt. Mit einem monoklonalen Antikörper gegen diesen Histidin-Tag (Maximilian) konnte eine C3a-Bindung durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Die stabil transfizierten RBL-mC3aR Zellen wurden Ratten injiziert und deren Milzzellen zur Antikörper-Selektion mit der Maus-Myelomzelllinie Ag8 fusioniert. Für den durchflusszytometrischen Nachweis der Bindung spezifischer monoklonaler anti-mC3aR-Antikörper wurden im ersten Schritt J774A.1 Zellen verwendet (Abb. 3.15).

Unterschiedliche RBL-2H3-Transfektanten (RBL-mC5aR und RBL-mC3aR Zellen) wurden danach zum Nachweis der mC3aR-Spezifität der ausgewählten monoklonalen Antikörper eingesetzt. Hier konnte überprüft werden, ob die Antikörper nur an RBL-mC3aR Zellen, nicht jedoch an RBL-mC5aR Zellen binden (Abb. 3.18). Schließlich dienten uns Internalisierungsversuche als eine weitere Bestätigung dafür, dass tatsächlich der C3aR spezifisch erkannt wird. Eine Reduktion der Antikörperbindung konnte nach Vorinkubation der J774A.1- bzw. RBL-mC3aR Zellen mit einem Überschuss des rhC3a-Liganden beobachtet werden (Abb. 3.17 und 3.19; Tab. 3.8 und 3.9). Die Internalisierung von Rezeptoren aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (mit sieben transmembranen Domänen) durch substimulatorische Ligand-Gaben ist ein gut charakterisiertes Phänomen und wurde auch für den C3aR belegt (SETTMACHER *et al.*, 1999).

Nach Durchführung des Spezifitätsnachweises wurden insgesamt sechs monoklonale Antikörper (1G4, 15H2, 2E10, 14G8, 4D8, 14D4) zum Nachweis von murinem C3aR etabliert. Mit Kompetitions-Experimenten konnten mindestens zwei verschiedene Gruppen

von monoklonalen Antikörpern definiert werden, die unterschiedliche Epitope erkennen (Abb. 3.23; Tab. 3.12). Des Weiteren wurden Verdrängungsversuche durchgeführt, um die eventuelle Blockade der Ligandbindungsstelle durch monoklonale Antikörper zu erkennen. Es wurden keine monoklonalen Antikörper identifiziert, die eine inhibitorische Rolle bei der C3a-C3aR-Interaktion spielen, da eine Reduktion der rhC3a<sup>FLUOS</sup>-Bindung an RBL-mC3aR Zellen durch mC3aR-spezifische monoklonale Antikörper nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.20; Tab. 3.10). Umgekehrt wurde die Bindung von FLUOS-markierten monoklonalen Antikörpern durch rhC3a auch nicht verdrängt (Abb. 3.22; Tab. 3.11).

Ein blockierender Antikörper gegen den C3aR wurde bisher nicht beschrieben. ZWIRNER *et al.* (1999b) entwickelten monoklonale Antikörper gegen zwei verschiedene Epitope der dritten extrazellulären Domäne des humanen C3aR. Sie verwendeten zwei Methoden zur Immunisierung von Mäusen. Die erste Gruppe erhielt ein rekombinant hergestelltes C3aR-Protein, die zweite Gruppe RBL-2H3 Zellen, die den humanen hC3aR exprimierten. Nach Immunisierung mit dem rekombinanten C3aR wurden zwei monoklonale Antikörper (hC3aRZ1 und hC3aRZ2) produziert. Diese erkannten eine in der dritten extrazellulären Domäne (proximaler Bereich der zweiten Schleife) des C3aR lokalisierte Aminosäuresequenz (Aminosäuren 219-225). Mit RBL-hC3aR Zellen als Immunogen wurden die monoklonalen Antikörper hC3aRZ3 und hC3aRZ4 erhalten, deren Bindungsepitop die Aminosäuren 231-237 darstellten. Mit zwei monoklonalen Antikörpern (hC3aRZ1 und hC3aRZ3) führten diese Autoren Verdrängungsversuche durch. Keiner der beiden Antikörper war in der Lage, die Bindung von rhC3a<sup>FLUOS</sup> an hC3aR-exprimierende RBL-2H3 Zellen zu inhibieren. Eine Blockade der Ligandbindungsstelle konnte somit nicht festgestellt werden und eine Rolle der von den Antikörpern erkannten Epitope der dritten extrazellulären Domäne des Rezeptors bei der C3a-Bindung ausgeschlossen werden. HAWLISCH *et al.* (1998) erhielten ähnliche Ergebnis hinsichtlich der Erkennung der Ligandbindungsstelle durch rekombinante Antikörper aus scFv-Phagen-Bibliotheken (*single chain Fv*). Die Bibliotheken wurden aus BALB/c-Mäusen gewonnen, die mit einer an Glutathion-S-Transferase (GST) fusionierten zweiten extrazellulären Schleife des humanen C3aR immunisiert worden waren. Für diese Antikörper wurden ebenfalls nach Epitopanalyse zwei verschiedene Bindungsstellen identifiziert. Sie lagen im Bereich der dritten extrazellulären Domäne innerhalb der Aminosäuren 185-193 und 218-226. Auch von HAWLISCH *et al.* (1998) wurden keine blockierenden Antikörper beschrieben. Mit drei unterschiedlichen Methoden, die von zwei Forschergruppen verwendet wurden,

konnten demnach Antikörper generiert werden, die einerseits gegen die dritte extrazelluläre Domäne des C3aR gerichtet waren, andererseits keine Wirkung auf die Bindung des C3a an seinen Rezeptor zeigten. Es scheint daher, dass die dritte extrazelluläre Domäne des C3aR immunogene Antigenbindungsstellen enthält, die jedoch nicht die Ligandbindungsstelle darstellen. Für die monoklonalen Antikörper gegen den mC3aR wurde in der vorliegenden Arbeit keine Epitopkartierung durchgeführt. Trotzdem liegt die Vermutung nahe, dass auch diese Antikörper ein Epitop der dritten extrazellulären Domäne des murinen C3aR erkennen, an das wiederum C3a nicht bindet.

#### **4.4 Charakterisierung der C3aR-Expression auf myeloischen und lymphoiden Zellen der Maus**

Der Nachweis der Expression des murinen C3aR auf myeloischen und lymphoiden Zellen ist von großer Bedeutung zur Klärung der Rolle des Rezeptors bei der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen. Für humane Zelltypen wurde die C3aR-Expression bereits mittels Ligand-Bindungsstudien und monoklonaler Antikörper sowie funktionell mittels Calcium-Influxexperimenten untersucht (siehe Einleitung). Bei Zellen der Maus wurde eine C3aR-Expression in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal durchgeführt.

Auf murinen Makrophagen konnte die C3aR-Expression unter Verwendung von J774A.1 Zellen (Abb. 3.15), mit M-CSF aus Knochenmarksvorläuferzellen differenzierten Makrophagen (Abb. 3.16) sowie Peritoneal-Makrophagen mit Hilfe neu generierter monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3.24). Die C3aR-Expression auf humanen Makrophagen der normalen Haut war bereits durch Funktionsexperimente von ZWIRNER *et al.* (1997) demonstriert worden. Dabei konnte bei aufgereinigten CD14<sup>+</sup>-Makrophagen eine spezifische Calcium-Freisetzung mit rekombinatem C3a gezeigt werden. Das Signal des Calcium-Einstroms nach C3a-Stimulation bei CD14<sup>+</sup>-Makrophagen war nur halb so groß wie nach C5a-Stimulation. Diese Daten sprechen für eine niedrigere C3a-Rezeptordichte auf dermalen Makrophagen. In den hier dargestellten durchflusszytometrischen Untersuchungen konnte eine schwächere Fluoreszenzintensität bei Verwendung von anti-mC3aR-Antikörpern im Vergleich zum monoklonalen anti-mC5aR-Antikörper 20-70 auf murinen Makrophagen gezeigt werden (Abb. 3.24). Diese Ergebnisse sprechen wiederum für eine niedrigere Anzahl von C3a- im Vergleich zu C5a-Rezeptoren auf Makrophagen der Maus.

Da C3aR auf humanen neutrophilen Granulozyten im Menschen exprimiert wird (MARTIN *et al.*, 1997; HAWLISCH *et al.*, 1998; ZWIRNER *et al.*, 1999b), wurde die Untersuchung auf diese Zellpopulation in normalen BALB/c-Mäusen mit Hilfe der neu generierten monoklonalen Antikörper ausgedehnt. Mittels durchflusszytometrischer Analysen konnte der C3aR auf Granulozyten des murinen Knochenmarks nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.25).

Für humane neutrophile Granulozyten wurde von MARTIN *et al.* (1997) mittels <sup>125</sup>I-C3a Bindungsstudien eine Rezeptordichte von etwa 24000 pro Zelle ermittelt, die mit den durch monoklonale Antikörperbindung ermittelten Rezeptorzahlen von etwa 3100 pro Zelle (ZWIRNER *et al.*, 1999b) nicht übereinstimmten. Eine starke Fluoreszenzintensität bei der von MARTIN *et al.* (1997) durchgeführten Untersuchung neutrophiler Granulozyten unter Verwendung eines polyklonalen, gegen die zweite extrazelluläre Schleife gerichteten Antiserums stand ebenso im Widerspruch zu Daten von ZWIRNER *et al.* (1999b). Ein Grund für die Diskrepanz könnte hier die Verwendung polyklonaler Antikörper bei MARTIN *et al.* (1997) sein, da die Fluoreszenzintensität des Kontrollserums eines nicht immunisierten Kaninchens ebenfalls sehr hoch war. Bei murinen neutrophilen Granulozyten könnte die Anzahl der C3a-Rezeptoren sehr gering und damit unterhalb der Nachweisgrenze des Durchflusszytometers sein. In der Zukunft sollten weitere Untersuchungen (z.B. mittels RT-PCR) und funktionelle Experimente durchgeführt werden, um eine eventuell geringe Rezeptorexpression bei neutrophilen Granulozyten der Maus nachzuweisen.

In einer Untersuchung von CECIC *et al.* (2006) über vermehrt eingewanderte neutrophile Granulozyten nach Photodynamik-Behandlung (*Photodynamic Therapy*, PDT) bösartiger und nicht onkologischer Läsionen in der Maus wurde eine C3a-induzierte Wanderung dieser Zellen aus dem Knochenmark beschrieben. Nach Zerstörung der Läsionen durch lichtaktivierte Medikamente in Folge einer PDT-Behandlung phagozytieren neutrophile Granulozyten apoptotische Zellen (CECIC *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2002). Allerdings beruhen die Ergebnisse dieser Studie auf einem polyklonalen Antikörper, der gegen die C-terminalen Aminosäuren (183-482) des humanen C3aR generiert wurde. Der Antikörper soll mit C3aR von Ratte, Maus und Mensch reagieren. Nach Blockierung des C3aR mit Hilfe dieses Antikörpers wurde eine Reduktion der Wanderung der neutrophilen Granulozyten nach PDT-Behandlung gezeigt. Weiterhin sollen auch alle myeloischen und lymphoiden Zellen der Maus nach einer PDT-Behandlung den C3aR exprimieren.

Allerdings kann die Richtigkeit dieser Befunde nicht als belegt angesehen werden, da die Spezifität des verwendeten polyklonalen Antiserums nicht untersucht wurde.

Des Weiteren wurde die C3aR-Expression auf dendritischen Zellen aus dem murinen Knochenmark untersucht. Dendritische Zellen sind Schlüsselzellen für die Auslösung und Aufrechterhaltung einer erworbenen („*adaptiven*“) Immunantwort. Die wichtigste Aufgabe dieser Zellen ist die Aufnahme von Antigenen am Entzündungsort und Migration zu regionären Lymphknoten, wo sie die spezifische Immunantwort durch Präsentation der Antigene gegenüber naiven T-Lymphozyten auslösen (BANCHEREAU *et al.*, 1998). Da das Anaphylatoxin C3a neben C5a als chemotaktisch wirksamer Entzündungsmediator wirkt, wurde die C3aR-Expression auf murinen dendritischen Zellen aus dem Knochenmark untersucht. Die Zellen wurden durch Expression von DC-verknüpften Membranmolekülen wie CD80, CD86 und MHC-Klasse II I-E<sup>K</sup> als unreife DC charakterisiert. Es konnte eine schwache C3aR-Expression mittels der neu generierten monoklonalen Antikörper auf diesen Zellen beobachtet werden (Abb. 3.26). Das Expressionsniveau auf kultivierten DC war jedoch deutlich geringer als das auf kultivierten Makrophagen. Dieser Befund spricht eher für eine untergeordnete Rolle des C3aR auf DC. KAWAMOTO *et al.* (2004) berichteten über die Produktion von IL-12 in DCs der Maus nach C3a-Stimulation, was zu einer Herunterregulation der TH2-Immunantwort gegenüber einem epikutan verabreichten Antigen führte. Von SORURI *et al.* (2003a) wurde gezeigt, dass differenzierte dendritische Zellen, die aus humanen Monozyten generiert worden waren, C3a-Rezeptoren exprimieren und entlang eines Konzentrationsgradienten von C3a *in vivo* wandern.

Auf unreifen humanen DCs, die ebenfalls aus Blutmonozyten differenziert wurden, zeigten GUTZMER *et al.* (2004) eine C3aR-Expression. Nach Hochregulation in Gegenwart von Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) und Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) konnte eine funktionelle Rolle für den Rezeptor gezeigt werden, wie z.B. F-Aktin-Polymerisation und ein chemotaktischer Effekt in Richtung eines C3a-Gradienten. KIRCHHOFF *et al.* (2001) demonstrierten an aus humanen Monozyten gewonnenen DCs eine C5a- und C3a-Rezeptorexpression, die zur Freisetzung von Calcium fähig waren. Diese Zellen befanden sich in einem unreifen Stadium. Nach ihrer Ausreifung waren keine Anaphylatoxin-Rezeptoren mehr nachweisbar. Auch auf dendritischen Zellen, welche aus der Haut isoliert worden waren und sich in einem Zwischenstadium der Reifung befanden, wurde die Expression der beiden Rezeptoren nachgewiesen. Schließlich konnten GUTZMER *et al.* (2006) zeigen, dass

humane unreife plasmazytoide DCs den C3aR exprimieren, allerdings erst nach Kultivierung *in vitro*. Zusammenfassend stützen die vorliegenden Ergebnisse die Annahme, dass Rezeptoren für inflammatorische Mediatoren ausschließlich an unreifen DCs exprimiert werden (DIEU-NOSJEAN *et al.*, 1999).

Mittels der neu hergestellten monoklonalen Antikörper wurde die C3aR-Expression auf murinen lymphoiden Zellen näher untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass der C3aR auf Milzzellen und Thymozyten aus BALB/c-Mäusen nicht exprimiert wird (Abb. 3.27A, B). Diese Befunde bestätigten die Ergebnisse von MARTIN *et al.* (1997), HAWLISCH *et al.* (1998) und WERFEL *et al.* (2000), die auf normalen humanen T-Lymphozyten ebenfalls keine C3aR-Expression feststellen konnten. WERFEL *et al.* (2000) zeigten jedoch eine C3aR-Expression auf Typ-I-Interferon aktivierten T-Lymphozyten und T-Lymphozyten von Patienten mit schweren systemischen Hauterkrankungen. Es ist allerdings noch nicht geklärt, welche biologischen Effekte das Anaphylatoxin C3a in C3aR-tragenden T-Lymphozyten auslösen kann. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte eine C3aR-Expression auf Lymphozyten der Milz und auf Thymozyten, die mit PMA und Ionomycin stimuliert worden waren, nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.27C, D).

Auf B-Lymphozyten aus der Milz von BALB/c-Mäusen konnte ebenfalls keine C3aR-Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). FISCHER und HUGLI (1997) demonstrierten eine humane C3aR-Expression auf normalen und aktivierten tonsillären B-Lymphozyten nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* und IL-12 mittels polyklonaler Antikörper. Sie zeigten eine Unterdrückung der polyklonalen Immunantwort und Hemmung der Zytokin-Synthese, wie z.B. von TNF- $\alpha$  (*Tumour Necrosis Factor alpha*) und IL-6 (Interleukin-6) nach C3a- und C3a(desArg)-Stimulation, die durch C3aR vermittelt sein sollte. Diese Daten konnten von ZWIRNER *et al.* (1999b) nicht bestätigt werden, obwohl sie B-Lymphozyten aus dem Blut sowie normale oder aktivierte tonsilläre B-Lymphozyten verwendeten. Ferner wurde bei Untersuchungen von FISCHER und HUGLI eine ähnliche Aktivität von C3a und C3a(desArg) bei der Modulation der Zytokin-Synthese gezeigt. Dass C3a(desArg) funktionell inaktiv ist, konnte jedoch durch viele Untersuchungen bestätigt werden (ZWIRNER *et al.*, 1998b; eL-LATI *et al.*, 1994; KLOS *et al.*, 1992; MORGAN, 1987). In einer Arbeit von ZWIRNER *et al.* (1998b) konnte eine chemotaktische Migration von RBL-2H3 Zellen, die stabil den C3aR exprimierten, nur

nach C3a-, nicht jedoch nach C3a(desArg)-Stimulation gezeigt werden. Eine Bindung von C3a(desArg) konnte auf diesen Zellen ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Eine unspezifische Bindung von C3a und C3a(desArg), die starke kationische Eigenschaften haben, an anionische Zellmembranbestandteile von B-Lymphozyten könnten bei den Untersuchungen von FISCHER und HUGLI zu den falsch positiven Ergebnissen geführt haben (JOHSWICH *et al.*, 2006).

Der von ROGLIC *et al.* (1996) durchgeführte durchflusszytometrische Nachweis der C3aR-Expression auf humanen, von einem Burkitt Lymphom abstammenden Raji Zellen konnte von MARTIN *et al.* (1997) nicht bestätigt werden. Der Grund dafür könnte der von ROGLIC *et al.* (1996) verwendete polyklonale Antikörper mit hoher Konzentration (1:200 Verdünnung) im Vergleich zu einer 1:4000 Verdünnung bei MARTIN *et al.* (1997) sein.

#### **4.5 Expression der Rezeptoren für die Anaphylatoxine C5a und C3a in der murinen Niere**

Die immunhistochemischen Untersuchungen in der murinen Leber belegten die Fähigkeit der sechs neu etablierten monoklonalen anti-mC3aR-Antikörper zum Erkennen der natürlichen Rezeptoren in Gefrierschnitten. Eine mC3aR-Expression konnte nur auf mononukleären Phagozyten (Kupffer'schen Sternzellen) in der Leber detektiert werden (Abbildungen nicht gezeigt).

Für den Nachweis muriner C5aR-Expression verwendeten wir den monoklonalen Antikörper 10/92 (SORURI *et al.*, 2003b). Dieser Antikörper wurde in Ratten durch Immunisierung mit Rezeptor-tragenden RBL-2H3-Transfektanten gewonnen und ermöglichte den Nachweis des C5aR in Gefrierschnitten (KIAFARD *et al.*, 2007). Es wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt, um die C5aR-Expression in der Niere von gesunden Tieren, beim Entzündungsprozess nach LPS-Behandlung und bei an Nephritis erkrankten Tieren (MRL/lpr-Mäuse) auf renalen Tubuluszellen näher zu beleuchten.

Die MRL/Mp-*Tnfrsf6*<sup>lpr/lpr</sup>-Maus (MRL/lpr) wird als meistuntersuchtes Tiermodell für die Lupus-ähnliche Glomerulonephritis verwendet. Durch die retrovirale Insertion des Lymphoproliferations (lpr)-Gens im *Tnfrsf6* (Fas)-Gen kommt es bei diesen Mäusen zu einer fehlerhaften Expression des Membranmoleküls Fas/Apo-1. Dies führt zu reduzierter Apoptose und Entwicklung einer Autoimmunität durch inadäquate Eliminierung autoreaktiver Zellen (COHEN und EISENBERG, 1991). Viele Krankheitssymptome, die

bei MRL/lpr-Lupus-Mäusen auftreten, scheinen genau widerzuspiegeln, was im humanen SLE entsteht. Dies zeigt sich bei der Produktion von Autoantikörpern gegen verschiedene körpereigene Proteine, z.B. gegen doppelsträngige DNA (dsDNA) (ANDREWS *et al.*, 1978). Als Folge bilden sich Immunkomplexe, welche das Komplementsystem aktivieren. Die Ablagerung der Komplementfragmente in den Glomeruli weist auf eine Komplementaktivierung in der Niere hin, die für die Pathogenese der Glomerulonephritis/Glomerulosklerose, welche bei MRL/lpr-Mäusen als Haupttodesursache angesehen werden kann, wesentlich verantwortlich ist.

Mittels polyklonaler Antikörper mit Spezifität für die N-terminale Region des murinen C5aR zeigten BAO *et al.* (2005b) eine C5aR-Expression auf Tubuluszellen der normalen Niere der Maus. Eine noch stärkere Expression wurde auf diesen Zellen bei MRL/lpr-Mäusen demonstriert.

Die C5aR-Blockade durch einen Antagonisten (zyklisches Hexapeptid) führte zur Reduktion der Mortalitätsrate der Mäuse mit Inhibition der Infiltration neutrophiler Granulozyten und Makrophagen, wie die histopathologische Untersuchung zeigte. Auch RIEDEMANN *et al.* (2002a) verwendeten einen polyklonalen Antikörper zur immunhistochemischen Untersuchung der C5aR-Expression in der Niere bei Mäusen, die nach CLP (*Cecal Ligation and Puncture*) eine Sepsis entwickelten. Sie zeigten eine starke C5aR-Expression auf proximal und distal tubulären Zellen der Niere. Um die Rolle von C5aR und C5a im Verlauf der Erkrankung zu untersuchen, verwendeten sie polyklonale anti-C5a-Antikörper. Es wurde wiederum eine verbesserte Überlebensrate der Mäuse präsentiert, ohne einen Hinweis auf die Rolle der C5aR-Expression auf proximal und distal tubulären Zellen der Niere bei einer Sepsis zu liefern. Eine ähnliche Untersuchung mittels polyklonalem Antikörper führten DE VRIES *et al.* (2003) in einem *in vivo* Ischämie/Reperfusion-Modell bei Mäusen durch. Hier wurde ebenfalls über eine stärkere C5aR-Expression auf Epithelzellen von Nierentubuli während der I/R-Behandlung berichtet. Über die pathophysiologische Rolle des C5a bei der I/R-vermittelten Nierenerkrankung wurde vermutet, dass die C5a-C5aR-Interaktion auf Nierentubuluszellen eine lokale Entzündung induzieren und dies zu einer Störung der Zellfunktion führen könnte. Die Behandlung der Mäuse mit einem C5aR-Antagonisten reduzierte den Verlust der Nierenfunktion. Im Widerspruch zu diesen Daten konnte in der hier vorgelegten Arbeit die C5aR-Expression auf tubulären Zellen in der normalen murinen Niere und unter Entzündungsbedingungen nicht bestätigt werden. Dafür zeigten aber die infiltrierenden Leukozyten eine hohe C5aR-Expression (Abb. 3.28A und 3.29A).

Einer der Hauptgründe für die Diskrepanzen zwischen unseren Daten und denen anderer Arbeitsgruppen liegt wahrscheinlich in der Verwendung unterschiedlicher Antikörper. Es ist von anderen Autoren bereits auf die Gefahr falsch positiver Ergebnisse und Kreuzreaktivitäten hingewiesen worden, wenn ausschließlich weniger gut charakterisierte, polyklonale Antiseren zum Nachweis einzelner Mitglieder der großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranen Domänen Verwendung finden (HANCOCK *et al.*, 2000).

Da eine C5aR-Expression im murinen Nierentubulus somit nicht bestätigt werden konnte, wurden auch Untersuchungen zum C3aR-Nachweis in der Niere normaler BALB/c-Mäuse durchgeführt. Die immunhistochemischen Färbungen an Nierenschnitten mittels der sechs neu etablierten monoklonalen Antikörper zeigten eine C3aR-Expression nur auf Makrophagen. Untersuchungen an BALB/c-Mäusen nach Behandlung mit LPS zeigten ebenfalls keine C3aR-Expression auf nicht-myeloischen Zellen im Nierengewebe. In Analogie zu den Ergebnissen in der menschlichen Niere konnte eine prominente Rezeptorexpression nur auf Makrophagen nachgewiesen werden. Hierbei war bedeutend, dass die monoklonalen Antikörper 1G4 und 14D4, die gegen zwei verschiedene Epitope des murinen C3aR gerichtet sind, bei der immunhistochemischen Färbung das gleiche Muster zeigten (Abb. 3.28B, C).

Untersuchungen von MRL/lpr-Mäusen mit den monoklonalen anti-mC3aR-Antikörpern gaben die Möglichkeit, weitere Aussagen hinsichtlich der Induzierbarkeit der C3a-Rezeptorexpression unter Entzündungsbedingungen *in vivo* zu machen. Eine deutliche Expression des C3aR wurde wiederum nur auf infiltrierenden Leukozyten beobachtet, die auch mit einem anti-CD68-Antikörper anfärbbar waren (Abb. 3.29B-D). Das ähnliche Färbungsmuster von C3aR-, C5aR- und CD68-Expression zeigte, dass eingewanderte Makrophagen die Hauptpopulation Anaphylatoxin-exprimierender Zellen darstellen.

In einer Arbeit von BAO *et al.* (2005a) wurde die Rolle des C3aR bei MRL/lpr-Mäusen untersucht. Es wurde eine Hochregulation des C3aR nur auf der mRNA-Ebene mittels *in situ*-Hybridisierung in tubulären Zellen und Epithelzellen der Glomeruli sowie auf infiltrierenden Zellen gezeigt. Auf Proteinebene wurden nur Western-Blot-Untersuchungen durchgeführt, so dass keine Zuordnung der C3aR-Expression auf einen bestimmten Zelltyp möglich war. Auch die Reduktion der Mortalitätsrate durch den C3aR-Antagonisten konnte nicht als direkter Hinweis auf eine C3aR-Expression auf tubulären Zellen gewertet werden.

Wie bei der unspezifischen Reaktivität von anti-C5aR-Antikörpern auf tubulären Zellen bereits erwähnt wurde, ist es nicht auszuschließen, dass eine post-translationale Modifikation des C3aR in tubulären Zellen im Vergleich zu Makrophagen die Bindung von Antikörpern an die C3a-Rezeptoren beeinflussen könnte. Eine Sulfatierung von Tyrosinen wurde beispielsweise für die zweite extrazelluläre Domäne des C3aR beobachtet (GAO *et al.*, 2003). Die Sulfatierung von Tyrosin, z.B. in der Position 174, war für die C3a-C3aR-Interaktion unerlässlich und kommt deshalb wahrscheinlich überall vor (GAO *et al.*, 2003). Hinweise auf eine Zelltyp-spezifische Tyrosinsulfatierung liegen nicht vor. Die große zweite extrazelluläre Schleife des C3aR enthält zusätzlich mehrere mögliche Glykosylierungsstellen (TORNETTA *et al.*, 1997). Die immunhistochemischen Ergebnisse, die mit hoch spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen den C3aR zweier verschiedener Spezies (Mensch und Maus) und im Falle der Maus auch mit monoklonalen Antikörpern gegen zwei verschiedene Epitope erhoben wurden, sprechen gegen eine Wirkung post-translationaler Modifikationen auf die Bindung der anti-C3aR-Antikörper an den C3aR.

Basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen Befunden konnte eine C3aR- bzw. C5aR-Rezeptorexpression in tubulären Zellen der Niere auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Andererseits wurde auch von einer C5aR-mRNA-Expression in den renal tubulären Zellen von FAYYAZI *et al.* (2000), ABE *et al.* (2001), DROUIN *et al.* (2001) und DE VRIES *et al.* (2003), und einer C3aR-mRNA-Expression von DROUIN *et al.* (2001) und BRAUN *et al.* (2004) sowie BAO *et al.* (2005a) mittels in-situ-Hybridisierung berichtet. Da die Frage der mRNA-Expression im Nierengewebe nicht in den Aufgabenbereich der gegenwärtigen Studie fiel, können keine Beweise gegen diese Befunde aufgeführt werden. Dies muss Gegenstand einer eigenen Studie sein.

Eine wichtige Schlussfolgerung dieser Arbeit ist, dass die vermutete Expression von Anaphylatoxin-Rezeptoren in nicht-myeloischen Zellen anderer Organe ebenfalls erneut untersucht werden sollte. In Übereinstimmung mit dieser Forderung konnte in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von THANGAM *et al.* (2005) die Expression der Anaphylatoxin-Rezeptoren in glatten Muskelzellen der Lunge von Maus und Mensch nicht bestätigt werden, obwohl dies in anderen Arbeiten postuliert worden war (DROUIN *et al.*, 2001; FREGONESE *et al.*, 2005). Unter Verwendung der monoklonalen Antikörper, wie in dieser Arbeit beschrieben, konnte eine C3a- und C5a-Rezeptorexpression auf nicht-

myeloischen Zellen in einem Maus-Modell mit Lungenentzündung ebenfalls nicht detektiert werden (TSCHERNING *et al.*, im Druck).

Zusammenfassend legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf der Basis hochspezifischer monoklonaler Antikörper gegen den humanen und murinen C5a- bzw. C3a-Rezeptor nahe, dass diese auf Zellen des phagozytären Systems exprimiert werden. Insbesondere die ubiquitäre Expression der Anaphylatoxin-Rezeptoren, wie sie für die Niere beschrieben wurde, konnte durch Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Folglich muss eine bedeutende Rolle nicht-myeloischer Zellen in Anaphylatoxin-vermittelten Entzündungen der Niere in Frage gestellt werden. Ferner stellt, wie bei Anaphylatoxin-Rezeptoren in dieser Arbeit demonstriert wurde, die Kreuzreaktivität von Antikörpern ein weitgehend unterschätztes Problem bei immunhistochemischen Untersuchungen dar.

## **5 Zusammenfassung**

Anaphylatoxine sind potente Entzündungsmediatoren, die ihre biologische Wirkung durch eine hochaffine Bindung an spezifische, zelluläre Rezeptoren entfalten. Aufgrund der widersprüchlichen Angaben in der Literatur über die Expression der Anaphylatoxin-Rezeptoren sollten in der vorliegenden Arbeit neue, hochspezifische monoklonale Antikörper gegen den humanen C5aR und erstmals solche Reagenzien gegen den Maus-C3aR hergestellt werden. Mit Hilfe dieser neu generierten monoklonalen Antikörper sollte die Expression sowohl des C5a- als auch des C3a-Rezeptors im normalen und pathologisch veränderten Nierengewebe untersucht werden.

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den humanen C5aR wurden RBL-2H3-Transfektanten eingesetzt, die den Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren. Nach Bestimmung der Rezeptorspezifität wurden acht monoklonale Antikörper identifiziert, die den C5aR immunhistochemisch erkannten. Anhand ihrer Reaktivität gegen zwei unterschiedliche Peptide wurden sie in drei Gruppen eingeteilt, die an verschiedene Epitope der N-terminalen Domäne des C5aR binden. Monoklonale Antikörper aller drei Gruppen ließen eine deutliche C5aR-Expression in Gefrierschnitten der menschlichen Niere erkennen, die allerdings auf Zellen des mononukleär-phagozytären Systems beschränkt blieb.

Mono- sowie polyklonale Antikörper, die durch Immunisierung mit C5aR-Peptiden generiert worden waren, hatten in der Vergangenheit eine C5aR-Expression auch in tubulären Zellen der menschlichen Niere nachgewiesen. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit mittels der neu hergestellten monoklonalen Antikörper nicht bestätigt werden. Eine immunzytochemische Untersuchung sowie die RT-PCR-Analyse zum Nachweis von C5aR-mRNA in kultivierten proximal tubulären Zellen der Niere erbrachten ebenfalls keinen Hinweis auf eine C5aR-Expression.

Für die Generierung monoklonaler Antikörper gegen den murinen C3aR wurden zunächst stabil transfizierte RBL-2H3 Zellen, die den murinen C3aR exprimieren, hergestellt. Mit diesen wurden Lou/C-Ratten immunisiert. Insgesamt konnten sechs monoklonale

Antikörper generiert und charakterisiert werden, die zum Nachweis des C3aR sowohl auf Zelloberflächen als auch in den Gefrierschnitten eingesetzt wurden. Mittels Kreuz-Kompetitions-Experimenten konnten mindestens zwei Gruppen von monoklonalen Antikörpern definiert werden, die unterschiedliche Epitope erkennen.

Die durchflusszytometrische Untersuchung muriner Zellen mit den neu generierten monoklonalen Antikörpern wies nach, dass der C3aR auf Peritoneal-Makrophagen und auf Makrophagen, die mittels M-CSF aus Knochenmarksvorläuferzellen differenziert wurden, exprimiert wird. Auf neutrophilen Granulozyten konnte keine C3aR-Expression nachgewiesen werden. Dendritische Zellen aus murinem Knochenmark zeigten eine schwache C3aR-Expression. Die Untersuchung von Milzzellen und Thymozyten der Maus belegte, dass der C3aR weder auf T-Lymphozyten noch auf B-Lymphozyten exprimiert wird.

Die immunhistochemische Untersuchung von Gefrierschnitten der Niere LPS-behandelter oder an Lupus-Nephritis erkrankter Tiere (MRL/lpr-Mäuse) zeigte, dass beide Anaphylatoxin-Rezeptoren ausschließlich in residenten und infiltrierenden Makrophagen exprimiert werden. Es konnte keine Expression von Anaphylatoxin-Rezeptoren in proximal tubulären Zellen normaler oder entzündlich veränderter Nieren nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ziehen eine Beteiligung nicht-myeloischer Zellen an Anaphylatoxin-vermittelten Entzündungsreaktionen in der Niere in Zweifel. Ferner haben unsere Ergebnisse eine über Anaphylatoxin-Rezeptoren hinausgehende Bedeutung, da sie die generelle Notwendigkeit einer kritischen Beurteilung immunhistochemisch erzielter Ergebnisse hervorheben.

## 6 Literaturverzeichnis

**Abe K., Miyazaki M., Koji T., Furusu A., Nakamura-Kurashige T., Nishino T., Ozono Y., Harada T., Sakai H., Kohno S. (2001).**

Enhanced expression of complement C5a receptor mRNA in human diseased kidney assessed by in situ hybridization. *Kidney Int* **60**: 137-146.

**Albrecht E. A., Chinnaiyan A. M., Varambally S., Kumar-Sinha C., Barrette T. R., Sarma J. V., Ward P. A. (2004).**

C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol* **164**(3): 849-859.

**Allen-Gipson D. S., Floreani A. A., Heires A. J., Sanderson S. D., MacDonald R. G., Wyatt T. A. (2005).**

Cigarette smoke extract increases C5a receptor expression in human bronchial epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **314**(1): 476-482.

**Ames R. S., Li Y., Sarau H. M., Nuthulaganti P., Foley J. J., Ellis C., Zeng Z., Su K., Jurewicz A. J., Hertzberg R. P., Bergsma D. J., Kumar C. (1996).**

Molecular cloning and characterization of human anaphylatoxin C3a receptor. *J Biol Chem* **271**: 20231-20234.

**Andrews B. S., Eisenberg R. A., Theofilopoulos A. N., Izui S., Wilson C. B., McConahey P. J., Murphy E. D., Roths J. B., Dixon F. J. (1978).**

Spontaneous murine lupus-like syndromes: Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med* **148**(5): 1198-1215.

**Banchereau J., Steinman R. M. (1998).**

Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**(6673): 245-252.

**Bao L., Osawe I., Haas M., Quigg R. J. (2005a).**

Signaling through up-regulated C3a receptor is key to the development of experimental lupus nephritis. *J Immunol* **175**(3): 1947-1955.

**Bao L., Osawe I., Puri T., Lambris J. D., Haas M., Quigg R. J. (2005b).**

C5a promotes development of experimental lupus nephritis which can be blocked with a specific receptor antagonist. *Eur J Immunol* **35**(8): 2496-2506.

**Bischoff S. C., Brunner T., De Weck A. L., Dahinden C. A. (1990a).**

Interleukin 5 modifies histamine release and leukotriene generation by human basophils in response to diverse agonists. *J Exp Med* **172**(6): 1577-1582.

**Bischoff S. C., de Weck A. L., Dahinden C. A. (1990b).**

Interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor render human basophils responsive to low concentrations of complement component C3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(17): 6813-6817.

**Boulay F., Mery L., Tardif M., Brouchon L., Vignais P. (1991).**

Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. *Biochemistry* **30**(12): 2993-2999.

**Boyum A. (1964).**

Separation of white blood cells. *Nature* **204**: 793-794.

**Braun M., Davis A. E. 3rd. (1998).**

Cultured human glomerular mesangial cells express the C5a receptor. *Kidney Int* **54**(5): 1542-1549.

**Braun M. C., Reins R. Y., Li T. B., Hollmann T. J., Dutta R., Rick W. A., Teng B. B., Ke B. (2004).**

Renal expression of the C3a receptor and functional responses of primary human proximal tubular epithelial cells. *J Immunol* **173**: 4190-4196.

**Cain S. A., Monk P. N. (2002).**

The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J Biol Chem* **277**(9): 7165-7169.

**Campbell W. D., Lazoura E., Okada N., Okada H. (2002).**

Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N. *Microbiol Immunol* **46**(2): 131-134.

**Cecic I., Parkins C. S., Korbelik M. (2001).**

Induction of systemic neutrophil response in mice by photodynamic therapy of solid tumors. *Photochem Photobiol* **74**(5): 712-720.

**Cecic I., Sun J., Korbelik M. (2006).**

Role of complement anaphylatoxin C3a in photodynamic therapy-elicited engagement of host neutrophils and other immune cells. *Photochem Photobiol* **82**(2): 558-562.

**Chao T. H., Ember J. A., Wang M., Bayon Y., Hugli T. E., Ye R. D. (1999).**

Role of the second extracellular loop of human C3a receptor in agonist binding and receptor function. *J Biol Chem* **274**(14): 9721-9728.

**Chenoweth D. E., Hugli T. E. (1978).**

Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(8): 3943-3947.

**Chenoweth D. E., Goodman M. G., Weigle W. O. (1982).**

Demonstration of a specific receptor for human C5a anaphylatoxin on murine macrophages. *J Exp Med* **156**(1): 68-78.

- Chu G., Hayakawa H., Berg P. (1987).**  
Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res* **15**(3): 1311-1326.
- Chuntharapai A., Lee J., Burnier J., Wood W. I., Hebert C., Kim K. J. (1994).**  
Neutralizing monoclonal antibodies to human IL-8 receptor A map to the NH2-terminal region of the receptor. *J Immunol* **152**(4): 1783-1789.
- Cohen P. L., Eisenberg R. A. (1991).**  
Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* **9**: 243-269.
- Coller H. A. and Coller B. S. (1983).**  
Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. In: Langone JJ, Van Vunakis H (eds) *Methods Enzymol* **121**: Academic Press, New York 412-417.
- Crass T., Ames R. S., Sarau H. M., Tornetta M. A., Foley J. J., Kohl J., Klos A., Bautsch W. (1999).**  
Chimeric receptors of the human C3a receptor and C5a receptor (CD88). *J Biol Chem* **274**(13): 8367-8370.
- Crass T., Raffetseder U., Martin U., Grove M., Klos A., Kohl J., Bautsch W. (1996).**  
Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells. *Eur J Immunol* **26**(8): 1944-1950.
- Daffern P. J., Pfeifer P. H., Ember J. A., Hugli T. E. (1995).**  
C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J Exp Med* **181**(6): 2119-2127.
- Davoust N., Jones J., Stahel P. F., Ames R. S., Barnum S. R. (1999).**  
Receptor for the C3a anaphylatoxin is expressed by neurons and glial cells. *Glia* **26**(3): 201-211.
- De Vries B., Kohl J., Leclercq W. K., Wolfs T. G., van Bijnen A. A., Heeringa P., Buurman W. A. (2003).**  
Complement factor C5a mediates renal ischemia-reperfusion injury independent from neutrophils. *J Immunol* **170**(7): 3883-3889.
- Dieu-Nosjean M. C., Vicari A., Lebecque S., Caux C. (1999).**  
Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* **66**(2): 252-262.
- DiScipio R. G., Daffern P. J., Jagels M. A., Broide D. H., Sriramarao P. (1999).**  
A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Immunol* **162**(2): 1127-1136.

**Drouin S. M., Kildsgaard J., Haviland J., Zabner J., Jia H. P., McCray P. B., Jr., Tack B. F., Wetsel R. A. (2001).**

Expression of the complement anaphylatoxin C3a and C5a receptors on bronchial epithelial and smooth muscle cells in models of sepsis and asthma. *J Immunol* **166**(3): 2025-2032.

**Ehrengruber M. U., Geiser T., Deranleau D. A. (1994).**

Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. *FEBS Lett* **346**(2-3): 181-184.

**el-Lati S. G., Dahinden C. A., Church M. K. (1994).**

Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J Invest Dermatol* **102**(5): 803-806.

**Elsner J., Oppermann M., Czech W., Dobos G., Schopf E., Norgauer J., Kapp A. (1994a).**

C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *Eur J Immunol* **24**(3): 518-522.

**Elsner J., Oppermann M., Czech W., Kapp A. (1994b).**

C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood* **83**(11): 3324-3331.

**Ember J. A., Sanderson S. D., Hugli T. E., Morgan E. L. (1994).**

Induction of interleukin-8 synthesis from monocytes by human C5a anaphylatoxin. *Am J Pathol* **144**(2): 393-403.

**Farzan M., Schnitzler C. E., Vasilieva N., Leung D., Kuhn J., Gerard C., Gerard N. P., Choe H. (2001).**

Sulfated tyrosines contribute to the formation of the C5a docking site of the human C5a anaphylatoxin receptor. *J Exp Med* **193**(9): 1059-1066.

**Fayyazi A., Sandau R., Duong L. Q., Götze O., Radzun H. J., Schweyer S., Soruri A., Zwirner J. (1999).**

C5a receptor and interleukin-6 are expressed in tissue macrophages and stimulated keratinocytes but not in pulmonary and intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* **154**(2): 495-501.

**Fayyazi A., Scheel O., Werfel T., Schweyer S., Oppermann M., Götze O., Radzun H. J., Zwirner J. (2000).**

The C5a receptor is expressed in normal renal proximal tubular but not in normal pulmonary or hepatic epithelial cells. *Immunology* **99**(1): 38-45.

**Fernandez H. N., Hugli T. E. (1978).**

Primary structural analysis of the polypeptide portion of human C5a anaphylatoxin. Polypeptide sequence determination and assignment of the oligosaccharide attachment site in C5a. *J Biol Chem* **253**(19): 6955-6964.

**Fischer W. H., Hugli T. E. (1997).**

Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response. *J Immunol* **159**(9): 4279-4286.

**Fischer W. H., Jagels M. A., Hugli T. E. (1999).**

Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a(desArg). *J Immunol* **162**(1): 453-459.

**Floreani A. A., Heires A. J., Welniak L. A., Miller-Lindholm A., Clark-Pierce L., Rennard S. I., Morgan E. L., Sanderson S. D. (1998).**

Expression of receptors for C5a anaphylatoxin (CD88) on human bronchial epithelial cells: enhancement of C5a-mediated release of IL-8 upon exposure to cigarette smoke. *J Immunol* **160**(10): 5073-5081.

**Foreman K. E., Vaporciyan A. A., Bonish B. K., Jones M. L., Johnson K. J., Glovsky M. M., Eddy S. M., Ward P. A. (1994).**

C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest* **94**(3): 1147-1155.

**Freeman G. J., Cardoso A. A., Boussiotis V. A., Anumanthan A., Groves R. W., Kupper T. S., Clark E. A., Nadler L. M. (1998).**

The BB1 monoclonal antibody recognizes both cell surface CD74 (MHC class II-associated invariant chain) as well as B7-1 (CD80), resolving the question regarding a third CD28/CTLA-4 counterreceptor. *J Immunol* **161**(6): 2708-2815.

**Fregonese L., Swan F. J., van Schadewijk A., Dolhnikoff M., Santos M. A., Daha M. R., Stolk J., Tschernig T., Sterk P. J., Hiemstra P. S., Rabe K. F., Mauad T. (2005).**

Expression of the anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is increased in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol* **115**(6): 1148-1154.

**Füreder W., Agis H., Willheim M., Bankl H. C., Maier U., Kishi K., Müller M. R., Czerwenka K., Radaszkiewicz T., Butterfield J. H., Klappacher G. W., Sperr W. R., Oppermann M., Lechner K., Valent P. (1995).**

Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells. Evidence for mast cell heterogeneity and CD88/C5aR expression on skin mast cells. *J Immunol* **155**(6): 3152-3160.

**Gao J., Choe H., Bota D., Wright P. L., Gerard C., Gerard N. P. (2003).**

Sulfation of tyrosine 174 in the human C3a receptor is essential for binding of C3a anaphylatoxin. *J Biol Chem* **278**(39): 37902-37908.

**Gao H., Neff T. A., Guo R. F., Speyer C. L., Sarma J. V., Tomlins S., Man Y., Riedemann N. C., Hoesel L. M., Younkin E., Zetoune F. S., Ward P. A. (2005).**

Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. *FASEB J* **19**(8): 1003-1005.

**Gasque P., Chan P., Fontaine M., Ischenko A., Lamacz M., Götze O., Morgan B. P. (1995).**

Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor on human astrocytes. *J Immunol* **155**(10): 4882-4889.

- Gasque P., Singhrao S. K., Neal J. W., Götze O., Morgan B. P. (1997).**  
Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am J Pathol* **150**(1): 31-41.
- Gasque P., Singhrao S. K., Neal J. W., Wang P., Sayah S., Fontaine M., Morgan B. P. (1998).**  
The receptor for complement anaphylatoxin C3a is expressed by myeloid cells and nonmyeloid cells in inflamed human central nervous system: analysis in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *J Immunol* **160**(7): 3543-3554.
- Gerard C., Gerard N. P. (1994).**  
C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu Rev Immunol* **12**: 775-808.
- Gerard N. P., Gerard C. (1991).**  
The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* **349**(6310): 614-617.
- Gerard N. P., Lu B., Liu P., Craig S., Fujiwara Y., Okinaga S., Gerard C. (2005).**  
An anti-inflammatory function for the complement anaphylatoxin C5a-binding protein, C5L2. *J Biol Chem* **280**(48): 39677-39680.
- Gerardy-Schahn R., Ambrosius D., Saunders D., Casaretto M., Mittler C., Karwarth G., Gorgen S., Bitter-Suermann D. (1989).**  
Characterization of C3a receptor-proteins on guinea pig platelets and human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol* **19**(6): 1095-1102.
- Glovsky M. M., Hugli T. E., Ishizaka T., Lichtenstein L.M., Erickson B. W. (1979).**  
Anaphylatoxin-induced histamine release with human leukocytes: studies of C3a leukocyte binding and histamine release. *J Clin Invest* **64**(3): 804-811.
- Goldstein I. M., Weissmann G. (1974).**  
Generation of C5-derived lysosomal enzyme-releasing activity (C5a) by lysates of leukocyte lysosomes. *J Immunol* **113**: 1583-1588.
- Götze O., Müller-Eberhard H. J. (1976).**  
The alternative pathway of complement activation. *Adv Immunol* **24**: 1-35.
- Gutzmer R., Kother B., Zwirner J., Dijkstra D., Purwar R., Wittmann M., Werfel T. (2006).**  
Human Plasmacytoid Dendritic Cells Express Receptors for Anaphylatoxins C3a and C5a and Are Chemoattracted to C3a and C5a. *J Invest Dermatol* **126**(11): 2422-2429.
- Gutzmer R., Lisewski M., Zwirner J., Mommert S., Diesel C., Wittmann M., Kapp A., Werfel T. (2004).**  
Human monocyte-derived dendritic cells are chemoattracted to C3a after up-regulation of the C3a receptor with interferons. *Immunology* **111**(4): 435-443.

- Hancock W. W., Gao W., Faia K. L., Csizmadia V. (2000).**  
Chemokines and their receptors in allograft rejection. *Curr Opin Immunol* **12**(5): 511-516.
- Hartmann K., Henz B. M., Kruger-Krasagakes S., Kohl J., Burger R., Guhl S., Haase I., Lippert U., Zuberbier T. (1997).**  
C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood* **89**(8): 2863-2870.
- Haviland D. L., McCoy R. L., Whitehead W. T., Akama H., Molmenti E. P., Brown A., Haviland J. C., Parks W. C., Perlmutter D. H., Wetsel R. A. (1995).**  
Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J Immunol* **154**(4): 1861-1869.
- Hawlich H., Frank R., Hennecke M., Baensch M., Sohns B., Arseniev L., Bautsch W., Kola A., Klos A., Köhl J. (1998).**  
Site-directed C3a receptor antibodies from phage display libraries. *J Immunol* **160**(6): 2947-2958.
- Hollmann T. J., Haviland D. L., Kildsgaard J., Watts K., Wetsel R. A. (1998).**  
Cloning, expression, sequence determination, and chromosome localization of the mouse complement C3a anaphylatoxin receptor gene. *Mol Immunol* **35**(3): 137-148.
- Honzarenko M., Ratajczak M. Z., Nicholson-Weller A., Silberstein L. E. (2005).**  
Complement C3a enhances CXCL12 (SDF-1)-mediated chemotaxis of bone marrow hematopoietic cells independently of C3a receptor. *J Immunol* **175**(6): 3698-3706.
- Hsu M. H., Ember J. A., Wang M., Prossnitz E. R., Hugli T. E., Ye R. D. (1997).**  
Cloning and functional characterization of the mouse C3a anaphylatoxin receptor gene. *Immunogenetics* **47**(1): 64-72.
- Huber-Lang M. S., Sarma J. V., Rittirsch D., Schreiber H., Weiss M., Flierl M., Younkin E., Schneider M., Suger-Wiedeck H., Gebhard F., McClintock S. D., Neff T., Zetoune F., Bruckner U., Guo R. F., Monk P. N., Ward P. A. (2005).**  
Changes in the novel orphan, C5a receptor (C5L2), during experimental sepsis and sepsis in humans. *J Immunol* **174**(2): 1104-1110.
- Huber-Lang M. S., Sarma J. V., Zetoune F. S., Rittirsch D., Neff T. A., McGuire S. R., Lambris J. D., Warner R. L., Flierl M. A., Hoesel L. M., Gebhard F., Younger J. G., Drouin S. M., Wetsel R. A., Ward P. A. (2006).**  
Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* **12**(6): 682-687.
- Huber-Lang M. S., Younkin E. M., Sarma J. V., Riedemann N., McGuire S. R., Lu K. T., Kunkel R., Younger J. G., Zetoune F. S., Ward P. A. (2002).**  
Generation of C5a by phagocytic cells. *Am J Pathol* **161**(5): 1849-1859.
- Hugli T. E. (1981).**  
The structural basis for anaphylatoxin and chemotactic functions of C3a, C4a, and C5a. *Crit Rev Immunol* **1**(4): 321-366.

**Inaba K., Inaba M., Romani N., Aya H., Deguchi M., Ikehara S., Muramatsu S., Steinman R. M. (1992).**

Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**(6): 1693-1702.

**Johnson A. R., Hugli T. E., Muller-Eberhard H. J. (1975).**

Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a. *Immunology* **28**(6): 1067.

**Johswich K., Martin M., Thalmann J., Rheinheimer C., Monk P. N., Klos A. (2006).**

Ligand specificity of the anaphylatoxin C5L2 receptor and its regulation on myeloid and epithelial cell-lines. *J Biol Chem* **281**(51): 39088-39095.

**Kacani L., Banki Z., Zwirner J., Schennach H., Bajtay Z., Erdei A., Stoiber H., Dierich M. P. (2001).**

C5a and C5a(desArg) enhance the susceptibility of monocyte-derived macrophages to HIV infection. *J Immunol* **166**(5): 3410-3415.

**Kawamoto S., Yalcindag A., Laouini D., Brodeur S., Bryce P., Lu B., Humbles A. A., Oettgen H., Gerard C., Geha R. S. (2004).**

The anaphylatoxin C3a downregulates the Th2 response to epicutaneously introduced antigen. *J Clin Invest* **114**(3): 399-407.

**Kiafard Z., Tschernig T., Schweyer S., Bley A., Neumann D., Zwirner J. (2007).**

Use of monoclonal antibodies to assess expression of anaphylatoxin receptors in tubular epithelial cells of human, murine and rat kidneys. *Immunobiol* **212**(2): 129-139.

**Kildsgaard J., Hollmann T. J., Matthews K. W., Bian K., Murad F., Wetsel R. A. (2000).**

Cutting edge: targeted disruption of the C3a receptor gene demonstrates a novel protective anti-inflammatory role for C3a in endotoxin-shock. *J Immunol* **165**(10): 5406-5409.

**Kirchhoff K., Weinmann O., Zwirner J., Begemann G., Götze O., Kapp A., Werfel T. (2001).**

Detection of anaphylatoxin receptors on CD83+ dendritic cells derived from human skin. *Immunology* **103**(2): 210-217.

**Klos A., Bank S., Gietz C., Bautsch W., Köhl J., Burg M., Kretzschmar T. (1992).**

C3a receptor on dibutyryl-cAMP-differentiated U937 cells and human neutrophils: the human C3a receptor characterized by functional responses and <sup>125</sup>I-C3a binding. *Biochemistry* **31**(46): 11274-11282.

**Köhler G., Milstein C. (1975).**

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.

**Koleva M., Schlaf G., Landmann R., Götze O., Jungermann K., Schieferdecker H. L. (2002).**

Induction of anaphylatoxin C5a receptors in rat hepatocytes by lipopolysaccharide in vivo: mediation by interleukin-6 from Kupffer cells. *Gastroenterology* **122**(3): 697-708.

**Kretzschmar T., Jeromin A., Gietz C., Bautsch W., Klos A., Kohl J., Rechkemmer G., Bitter-Suermann D. (1993).**

Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. *Eur J Immunol* **23**(2): 558-561.

**Kupp L. I., Kosco M. H., Schenkein H. A., Tew J. G. (1991).**

Chemotaxis of germinal center B cells in response to C5a. *Eur J Immunol* **21**(11): 2697-2701.

**Laemmli U. K. (1970).**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

**Laemmli U. K. and Favre M. (1973).**

Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol* **80**: 575-599.

**Laudes I. J., Chu J. C., Huber-Lang M., Guo R. F., Riedemann N. C., Sarma J. V., Mahdi F., Murphy H. S., Speyer C., Lu K. T., Lambris J. D., Zetoune F. S., Ward P. A. (2002).**

Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *J Immunol* **169**(10): 5962-5970.

**Livingston D. M. (1974).**

Immunoaffinity Chromatography of proteins. *Methods Enzymol* **34**: 723-731.

**Marder S. R., Chenoweth D. E., Goldstein I. M., Perez H. D. (1985).**

Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement-derived peptides C5a and C5a des Arg. *J Immunol* **134**: 3325-3331.

**Martin U., Bock D., Arseniev L., Tornetta M. A., Ames R. S., Bautsch W., Köhl J., Ganser A., Klos A. (1997).**

The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B and T lymphocytes. *J Exp Med* **186**(2): 199-207.

**Mollnes T. E., Brekke O. L., Fung M., Fure H., Christiansen D., Bergseth G., Videm V., Lappégard K. T., Kohl J., Lambris J. D. (2002).**

Essential role of the C5a receptor in *E coli*-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood* **100**: 1869-1877.

**Monsinjon T., Gasque P., Chan P., Ischenko A., Brady J. J., Fontaine M. C. (2003).**

Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* **17**(9): 1003-1014.

- Morelli A., Larregina A., Chuluyan I., Kolkowski E., Fainboim L. (1996).**  
Expression and modulation of C5a receptor (CD88) on skin dendritic cells. Chemotactic effect of C5a on skin migratory dendritic cells. *Immunology* **89**(1): 126-134.
- Morgan E. L. (1987).**  
The role of prostaglandins in C3a-mediated suppression of human in vitro polyclonal antibody responses. *Clin Immunol Immunopathol* **44**(1): 1-11.
- Mulligan M. S., Schmid E., Till G. O., Hugli T. E., Friedl H. P., Roth R. A., Ward P A. (1997).**  
C5a-dependent up-regulation in vivo of lung vascular P-selectin. *J Immunol* **158**(4): 1857-1861.
- Nataf S., Davoust N., Ames R. S., Barnum S. R. (1999a).**  
Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *J Immunol* **162**(7): 4018-4023.
- Nataf S., Stahel P. F., Davoust N., Barnum S. R. (1999b).**  
Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends Neurosci* **22**(9): 397-402.
- Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. (1982).**  
Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* **1**(7): 841-845.
- Nilson B., Bjorck L., Akerstrom B. (1986).**  
Detection and purification of rat and goat immunoglobulin G antibodies using protein G-based solid-phase radioimmunoassays. *J Immunol Methods* **91**(2): 275-281.
- Nilsson G., Johnell M., Hammer C. H., Tiffany H. L., Nilsson K., Metcalfe D. D., Siegbahn A., Murphy P. M. (1996).**  
C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway *J Immunol* **157**(4): 1693-1698.
- Norgauer J., Dobos G., Kownatzki E., Dahinden C., Burger R., Kupper R., Gierschik P. (1993).**  
Complement fragment C3a stimulates Ca<sup>2+</sup> influx in neutrophils via a pertussis-toxin-sensitive G protein. *Eur J Biochem* **217**(1): 289-294.
- Ohno M., Hirata T., Enomoto M., Araki T., Ishimaru H., Takahashi T. A. (2000).**  
A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol Immunol* **37**(8): 407-412.
- Okinaga S., Slattery D., Humbles A., Zsengeller Z., Morteau O., Kinrade M. B., Brodbeck R. M., Krause J. E., Choe H. R., Gerard N. P., Gerard C. (2003).**  
C5L2, a nonsignaling C5a binding protein. *Biochemistry* **42**(31): 9406-9415.

**Okusawa S., Dinarello C. A., Yancey K. B., Endres S., Lawley T. J., Frank M. M., Burke J. F., Gelfand J. A. (1987).**

C5a induction of human interleukin 1. Synergistic effect with endotoxin or interferon-gamma. *J Immunol* **139**(8): 2635-2640.

**Okusawa S., Yancey K. B., van der Meer J. W., Endres S., Lonnemann G., Hefter K., Frank M. M., Burke J. F., Dinarello C. A., Gelfand J. A. (1988).**

C5a stimulates secretion of tumor necrosis factor from human mononuclear cells in vitro. Comparison with secretion of interleukin 1 beta and interleukin 1 alpha. *J Exp Med* **168**(1): 443-448.

**Onuma H., Masuko-Hongo K., Yuan G., Sakata M., Nakamura H., Kato T., Aoki H., Nishioka K. (2002).**

Expression of the anaphylatoxin receptor C5aR (CD88) by human articular chondrocytes. *Rheumatol Int* **22**(2): 52-55.

**Oppermann M., Raedt U., Hebell T., Schmidt B., Zimmermann B., Götze O. (1993).**

Probing the human receptor for C5a anaphylatoxin with site-directed antibodies. Identification of a potential ligand binding site on the NH<sub>2</sub>-terminal domain. *J Immunol* **151**: 3785-3794.

**Otonello L., Corcione A., Tortolina G., Airoidi I., Albesiano E., Favre A., D'Agostino R., Malavasi F., Pistoia V., Dallegri F. (1999).**

rC5a directs the in vitro migration of human memory and naive tonsillar B lymphocytes: implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues. *J Immunol* **162**(11): 6510-6517.

**Peake P. W., O'Grady S., Pussell B. A., Charlesworth J. A. (1999).**

C3a is made by proximal tubular HK-2 cells and activates them via the C3a receptor. *Kidney Int* **56**(5): 1729-1736.

**Peters J. H., Baumgarten H. (1990).**

Monoklonale Antikörper. *Springer Verlag* Berlin.

**Potgens A. J., Schmitz U., Kaufmann P., Frank H. G. (2002).**

Monoclonal antibody CD133-2 (AC141) against hematopoietic stem cell antigen CD133 shows crossreactivity with cytokeratin 18. *J Histochem Cytochem* **50**(8): 1131-1134.

**Rahpeymai Y., Hietala M. A., Wilhelmsson U., Fotheringham A., Davies I., Nilsson A. K., Zwirner J., Wetsel R. A., Gerard C., Pekny M., Pekna M. (2006).**

Complement: a novel factor in basal and ischemia-induced neurogenesis. *EMBO J* **25**(6): 1364-1374.

**Ralph P., Nakoinz I. (1975).**

Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature* **257**(5525): 393-394.

**Ratajczak J., Reza R., Kucia M., Majka M., Allendorf D. J., Baran J. T., Janowska-Wieczorek A., Wetsel R. A., Ross G. D., Ratajczak M. Z. (2004).**

Mobilization studies in mice deficient in either C3 or C3a receptor (C3aR) reveal a novel role for complement in retention of hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow. *Blood* **103**(6): 2071-2078.

**Reca R., Mastellos D., Majka M., Marquez L., Ratajczak J., Franchini S., Glodek A., Honczarenko M., Spruce L. A., Janowska-Wieczorek A., Lambris J. D., Ratajczak M. Z. (2003).**

Functional receptor for C3a anaphylatoxin is expressed by normal hematopoietic stem/progenitor cells, and C3a enhances their homing-related responses to SDF-1. *Blood* **101**(10): 3784-3793.

**Regal J. F., Eastman A. Y., Pickering R. J. (1980)**

C5a induced tracheal contraction: a histamine independent mechanism. *J Immunol* **124**(6): 2876-2878.

**Riedemann N. C., Guo R. F., Gao H., Sun L., Hoesel M., Hollmann T. J., Wetsel R. A., Zetoune F. S., Ward P. A. (2004).**

Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils. *J Immunol* **173**(2): 1355-1359.

**Riedemann N. C., Guo R. F., Neff T. A., Laudes I. J., Keller K. A., Sarma V. J., Markiewski M. M., Mastellos D., Strey C. W., Pierson C. L., Lambris J. D., Zetoune F. S., Ward P. A. (2002a).**

Increased C5a receptor expression in sepsis. *J Clin Invest* **110**(1): 101-108.

**Riedemann N. C., Guo R. F., Sarma V. J., Laudes I. J., Huber-Lang M., Warner R. L., Albrecht E. A., Speyer C. L., Ward P. A. (2002b).**

Expression and function of the C5a receptor in rat alveolar epithelial cells. *J Immunol* **168**(4): 1919-1925.

**Roglic A., Prossnitz E. R., Cavanagh S. L., Pan Z., Zou A., Ye R. D. (1996).**

cDNA cloning of a novel G protein-coupled receptor with a large extracellular loop structure. *Biochem Biophys Acta* **1305**: 39-43.

**Rothermel E., Rolf O., Götze O., Zwirner J. (1997a).**

Nucleotide and corrected amino acid sequence of the functional recombinant rat anaphylatoxin C5a. *Biochim Biophys Acta* **1351**(1-2): 9-12.

**Rothermel E., Zwirner J., Vogt T., Rabini S. Götze O. (1997b).**

Molecular cloning and expression of the functional rat C5a receptor. *Mol Immunol* **34**(12-13): 877-886.

**Sacks T., Moldow C. F., Craddock P. R., Bowers T. K., Jacob H. S. (1978).**

Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An in vitro model of immune vascular damage. *J Clin Invest* **61**: 1161-1167.

**Schakel K., Kannagi R., Kniep B., Goto Y., Mitsuoka C., Zwirner J., Soruri A., von Kietzell M., Rieber E. (2002).**

6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* **17**(3): 289-301.

- Scheid C. R., Webster R. O., Henson P. M., Findlay S. R. (1983).**  
Direct effect of complement factor C5a on the contractile state of isolated smooth muscle cells. *J Immunol* **130**(5): 1997-1999.
- Schieferdecker H. L., Schlaf G., Koleva M., Götze O., Jungermann K. (2000).**  
Induction of functional anaphylatoxin C5a receptors on hepatocytes by in vivo treatment of rats with IL-6. *J Immunol* **164**(10): 5453-5458.
- Schlaf G., Schmitz M., Rothermel E., Jungermann K., Schieferdecker H. L., Götze O. (2003).**  
Expression and induction of anaphylatoxin C5a receptors in the rat liver. *Histol Histopathol* **18**(1): 299-308.
- Schmutzler W., Bolsmann K., Zwadlo-Klarwasser G. (1995).**  
Comparison of histamine release from human blood monocytes, lymphocytes, adenoidal and skin mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* **107**(1-3): 194-196.
- Scholz W., McClurg M. R., Cardenas G. J., Smith M., Noonan D. J., Hugli T. E., Morgan E. L. (1990).**  
C5a-mediated release of interleukin 6 by human monocytes. *Clin Immunol Immunopathol* **57**(2): 297-307.
- Schumacher W. A., Fantone J. C., Kunkel S. E., Webb R. C., Lucchesi B. R. (1991).**  
The anaphylatoxins C3a and C5a are vasodilators in the canine coronary vasculature in vitro and in vivo. *Agents Actions* **34**: 345-349.
- Settmacher B., Bock D., Saad H., Gartner S., Rheinheimer C., Kohl J., Bautsch W., Klos A. (1999).**  
Modulation of C3a activity: internalization of the human C3a receptor and its inhibition by C5a. *J Immunol* **162**(12): 7409-7416.
- Shushakova N., Tkachuk N., Dangers M., Tkachuk S., Park J. K., Zwirner J., Hashimoto K., Haller H., Dumler I. (2005).**  
Urokinase-induced activation of the gp130/Tyk2/Stat3 pathway mediates a pro-inflammatory effect in human mesangial cells via expression of the anaphylatoxin C5a receptor. *J Cell Sci* **118**(12): 2743-2753.
- Siciliano S. J., Rollins T. E., DeMartino J., Konteatis Z., Malkowitz L., Van Riper G., Bondy S., Rosen H., Springer M. S. (1994).**  
Two-site binding of C5a by its receptor: an alternative binding paradigm for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1214-1218.
- Snyderman R., Pike M. C., Fischer D. G., Koren H. S. (1977).**  
Biologic and biochemical activities of continuous macrophage cell lines P388D1 and J774.1. *J Immunol* **119**(6): 2060-2066.
- Sohns B. (2000).**  
Untersuchungen zur Expression des humanen C3a-Rezeptors. *Dissertation*, Institut für Medizinische Mikrobiologie der MH Hannover.

- Sohns B., Westermann J., Frank R., Grove M., Kohl J., Klos A., Bautsch W. (1998).**  
A murine monoclonal antibody against the human C3a-receptor: high expression on non-myeloid cells of human placenta [Abstract Q5]. *Immunobiol.* **199** (3-5): 630.
- Soruri A., Kiafard Z., Dettmer C., Riggert J., Kohl J., Zwirner J. (2003a).**  
IL-4 down-regulates anaphylatoxin receptors in monocytes and dendritic cells and impairs anaphylatoxin-induced migration in vivo. *J Immunol* **170**(6): 3306-3314.
- Soruri A., Kim S., Kiafard Z., Zwirner J. (2003b).**  
Characterization of C5aR expression on murine myeloid and lymphoid cells by the use of a novel monoclonal antibody. *Immunol Lett* **88**(1): 47-52.
- Soruri A., Riggert J., Schlott T., Kiafard Z., Dettmer C., Zwirner J. (2003c).**  
Anaphylatoxin C5a induces monocyte recruitment and differentiation into dendritic cells by TNF-alpha and prostaglandin E2-dependent mechanisms. *J Immunol* **171**(5): 2631-2636.
- Sozzani S., Sallusto F., Luini W., Zhou D., Piemonti L., Allavena P., Van Damme J., Valitutti S., Lanzavecchia A., Mantovani A. (1995).**  
Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol* **155**(7): 3292-3295.
- Sun J., Cecic I., Parkins C. S., Korbelik M. (2002).**  
Neutrophils as inflammatory and immune effectors in photodynamic therapy-treated mouse SCCVII tumours. *Photochem Photobiol Sci* **1**(9):690-695.
- Takabayashi T., Shimizu S., Clark B. D., Beinborn M., Burke J. F., Gelfand J. A. (2004).**  
Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery* **135**(5): 544-454.
- Takabayashi T., Vannier E., Burke J. F., Tompkins R. G., Gelfand J. A., Clark B. D. (1998).**  
Both C3a and C3a(desArg) regulate interleukin-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* **177**(6): 1622-1628.
- Takabayashi T., Vannier E., Clark B. D., Margolis N. H., Dinarello C. A., Burke J. F., Gelfand J. A. (1996).**  
A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis. *J Immunol* **156**(9): 3455-3460.
- Takafuji S., Tadokoro K., Ito K., Dahinden C. A. (1994).**  
Degranulation from human eosinophils stimulated with C3a and C5a. *Int Arch Allergy Immunol* **104** Suppl 1(1): 27-29.
- Thangam E. B., Venkatesha R. T., Zaidi A. K., Jordan-Sciutto K. L., Goncharov D. A., Krymskaya V. P., Amrani Y., Panettieri R. A. Jr., Ali H. (2005).**  
Airway smooth muscle cells enhance C3a-induced mast cell degranulation following cell-cell contact. *FASEB J* **19**(7): 798-800.

**Theofilopoulos A. N., Dixon F. J. (1985).**

Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* **37**: 269-390.

**Tornetta M. A., Foley J. J., Sarau H. M., Ames R. S. (1997).**

The mouse anaphylatoxin C3a receptor: molecular cloning, genomic organization, and functional expression. *J Immunol* **158**(11): 5277-5282.

**Tschernig T., Kiafard Z., Dibbert C, Neumann D, Zwirner J. (im Druck).**

Use of monoclonal antibodies to assess expression of anaphylatoxin receptors in rat and murine models of lung inflammation. *Exp Toxicol Pathol*.

**Utsunomiya K., Watanabe J., Takamori Y., Kataoka Y., Kurokawa K., Yamada H. (2004).**

Crossreaction with an anti-Bax antibody reveals novel multi-endocrine cellular antigen. *J Histochem Cytochem* **52**(6): 805-812.

**Van Beek J., Bernaudin M., Petit E., Gasque P., Nouvelot A., MacKenzie E. T., Fontaine M. (2000).**

Expression of receptors for complement anaphylatoxins C3a and C5a following permanent focal cerebral ischemia in the mouse. *Exp Neurol* **161**(1): 373-382.

**Van Epps D. E., Chenoweth D. E. (1984).**

Analysis of the binding of fluorescent C5a and C3a to human peripheral blood leukocytes. *J Immunol* **132**(6): 2862-2867.

**Walport M. J. (2001).**

Complement. First of two parts. *N Engl J Med* **344**(14): 1058-1066.

**Watanabe-Fukunaga R., Brannan C. I., Copeland N. G., Jenkins N. A., Nagata S. (1992).**

Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**(6367): 314-317.

**Weinmann O., Gutzmer R., Zwirner J., Wittmann M., Langer K., Lisewski M., Mommert S., Kapp A., Werfel T. (2003).**

Up-regulation of C5a receptor expression and function on human monocyte derived dendritic cells by prostaglandin E2. *Immunology* **110**(4): 458-465.

**Welch T. R., Frenze M., Witte D., Davis A. E. (2002).**

C5a is important in the tubulointerstitial component of experimental immune complex glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* **130**(1): 43-48.

**Wenderfer S. E., Ke B., Hollmann T. J., Wetsel R. A., Lan H. Y., Braun M. C. (2005).**

C5a receptor deficiency attenuates T cell function and renal disease in MRL/lpr mice. *J Am Soc Nephrol* **16**(12): 3572-3582.

**Werfel T., Kirchhoff K., Wittmann M., Begemann G., Kapp A., Heidenreich F., Götze O., Zwirner J. (2000).**

Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor. *J Immunol* **165**(11): 6599-6605.

- Werfel T., Oppermann M., Butterfield J. H., Begemann G., Elsner J., Götze O., Zwirner J. (1996a).**  
The human mast cell line HMC-1 expresses C5a receptors and responds to C5a but not to C5a(desArg). *Scand J Immunol* **44**(1): 30-36.
- Werfel T., Oppermann M., Schulze M., Krieger G., Weber M., Götze O. (1992).**  
Binding of fluorescein-labeled anaphylatoxin C5a to human peripheral blood, spleen, and bone marrow leukocytes. *Blood* **79**: 152-160.
- Werfel T., Zwirner J., Oppermann M., Sieber A., Begemann G., Drommer W., Kapp A., Götze O. (1996b).**  
CD88 antibodies specifically bind to C5aR on dermal CD117+ and CD14+ cells and react with a desmosomal antigen in human skin. *J Immunol* **157**(4): 1729-1735.
- Wilken H. C., Rogge S., Götze O., Werfel T., Zwirner J. (1999).**  
Specific detection by flow cytometry of histidine-tagged ligands bound to their receptors using a tag-specific monoclonal antibody. *J Immunol Meth* **226**: 139-145.
- Williams T. J., Jose P. J. (1981).**  
Mediation of increased vascular permeability after complement activation. Histamine-independent action of rabbit C5a. *J Exp Med* **153**(1): 136-153.
- Wilmer W. A., Kaumaya P. T., Ember J. A., Cosio F. G. (1998).**  
Receptors for the anaphylatoxin C5a (CD88) on human mesangial cells. *J Immunol* **160**(11): 5646-5652.
- Wittmann M., Zwirner J., Larsson V. A., Kirchhoff K., Begemann G., Kapp A., Götze O., Werfel T. (1999).**  
C5a suppresses the production of IL-12 by IFN-gamma-primed and lipopolysaccharide-challenged human monocytes. *J Immunol* **162**(11): 6763-6769.
- Wyatt T. A., Heires A. J., Sanderson S. D., Floreani A. A. (1999).**  
Protein kinase C activation is required for cigarette smoke-enhanced C5a-mediated release of interleukin-8 in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**(2): 283-288.
- Yang D., Chen Q., Stoll S., Chen X., Howard O. M., Oppenheim J. J. (2000).**  
Differential regulation of responsiveness to fMLP and C5a upon dendritic cell maturation: correlation with receptor expression. *J Immunol* **165**(5): 2694-2702.
- Zahedi R., Braun M., Wetsel R. A., Ault B. H., Khan A., Welch T. R., Frenzke M., Davis A. E. (2000).**  
The C5a receptor is expressed by human renal proximal tubular epithelial cells. *Clin Exp Immunol* **121**(2): 226-233.
- Zahn S., Zwirner J., Spengler H. P., Götze O. (1997).**  
Chemoattractant receptors for interleukin-8 and C5a: expression on peripheral blood leukocytes and differential regulation on HL-60 and AML-193 cells by vitamin D3 and all-trans retinoic acid. *Eur J Immunol* **27**(4): 935-940.

**Zwirner J., Fayyazi A., Götze O. (1999a).**

Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in non-myeloid cells. *Mol Immunol* **36**(13-14): 877-784.

**Zwirner J., Götze O., Begemann G., Kapp A., Kirchhoff K., Werfel T. (1999b).**

Evaluation of C3a receptor expression on human leucocytes by the use of novel monoclonal antibodies. *Immunology* **97**: 166-172.

**Zwirner J., Götze O., Moser A., Sieber A., Begemann G., Kapp A., Elsner J., Werfel T. (1997).**

Blood- and skin-derived monocytes/macrophages respond to C3a but not to C3a(desArg) with a transient release of calcium via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *Eur J Immunol* **27**(9): 2317-2322.

**Zwirner J., Götze O., Sieber A., Kapp A., Begemann G., Zuberbier T., Werfel T. (1998a).**

The human mast cell line HMC-1 binds and responds to C3a but not C3a(desArg). *Scand J Immunol* **47**(1): 19-24.

**Zwirner J., Werfel T., Wilken H. C., Theile E., Götze O. (1998b).**

Anaphylatoxin C3a but not C3a(desArg) is a chemotaxin for the mouse macrophage cell line J774. *Eur J Immunol* **28**(5): 1570-1577.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörg Zwirner für die Überlassung des Themas, seine außerordentlich gute und freundliche Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft und sein Interesse am Gelingen der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die externe Betreuung dieser Arbeit und Frau PD Dr. Sigrid Hoyer-Fender für die Bereitschaft das Koreferat zu übernehmen.

Mein großer Dank gilt Sandra Henke, Olga Walter für die sehr gute technische Assistenz und Ines Heine für die angenehme Zusammenarbeit.

Besondere Anerkennung verdienen Frau Ingrid Teuteberg und Beatrix Pollok-Kopp für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für die Bereitstellung humaner Monozyten bedanke ich mich bei Claudia Dettmer-Richardt.

Bei Friederike Hüttenrauch und Maren Wüstefeld möchte ich mich für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Techniken bedanken.

Gabriele Sonntag danke ich für ihre freundlicher Art und die Hilfsbereitschaft.

Ich danke Frau Elisabeth Munk (Institut für Humangenetik, Abteilung Tierzucht) für die Unterstützung bei der Immunisierung der Ratten.

Für das gute und freundliche Arbeitsklima bedanke ich mich bei allen Kollegen in der Abteilung.

## Publikationen

- Tschernig T., Kiafard Z., Dibbert C, Neumann D, Zwirner J. (im Druck).**  
Use of monoclonal antibodies to assess expression of anaphylatoxin receptors in rat and murine models of lung inflammation. *Exp Toxicol Pathol*.
- Kiafard Z., Tschernig T., Schweyer S., Bley A., Neumann D., Zwirner J. (2007).**  
Use of monoclonal antibodies to assess expression of anaphylatoxin receptors in tubular epithelial cells of human, murine and rat kidneys. *Immunobiol* **212**(2): 129-139.
- Kassiotis G., Gray D., Kiafard Z., Zwirner J., Stockinger B. (2006).**  
Functional specialization of memory Th cells revealed by expression of integrin CD49b. *J Immunol* **177**(2): 968-975.
- Ohl L., Mohaupt M., Czeloth N., Hintzen G., Kiafard Z., Zwirner J., Blankenstein T., Henning G., Forster R. (2004).**  
CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* **21**(2): 279-288.
- Ritter U., Wiede F., Mielenz D., Kiafard Z., Zwirner J., Korner H. (2004).**  
Analysis of the CCR7 expression on murine bone marrow-derived and spleen dendritic cells. *J Leukoc Biol* **76**(2): 472-476.
- Soruri A., Riggert J., Schlott T., Kiafard Z., Dettmer C., Zwirner J. (2003).**  
Anaphylatoxin C5a induces monocyte recruitment and differentiation into dendritic cells by TNF-alpha and prostaglandin E2-dependent mechanisms. *J Immunol* **171**(5): 2631-2636.
- Soruri A., Kim S., Kiafard Z., Zwirner J. (2003).**  
Characterization of C5aR expression on murine myeloid and lymphoid cells by the use of a novel monoclonal antibody. *Immunol Lett* **88**(1): 47-52.
- Soruri A., Kiafard Z., Dettmer C., Riggert J., Kohl J., Zwirner J. (2003).**  
IL-4 down-regulates anaphylatoxin receptors in monocytes and dendritic cells and impairs anaphylatoxin-induced migration in vivo. *J Immunol* **170**(6): 3306-3314.
- Thinnes F. P., Walter G., Hellmann K. P., Hellmann T., Merker R., Kiafard Z., Eben-Brunnen J., Schwarzer C., Gotz H., Hilschmann N. (2001).**  
Gadolinium as an opener of the outwardly rectifying Cl(-) channel (ORCC). Is there relevance for cystic fibrosis therapy? *Pflugers Arch* **443** Suppl 1: 111-116.
- Reymann S., Kiafard Z., Rohm B., Strutz N., Hesse D., Kratzin H. D., Zimmermann B., Thinnes F. P., Hilschmann N. (1999).**  
Purification procedure and monoclonal antibodies: two instruments for research on vertebrate porins. *Anal Biochem* **274**(2): 289-295.

## Lebenslauf

**Name:** Kiafard  
**Vorname:** Ziba  
**Geb.-Datum:** 21.03.1961  
**Geb. Ort:** Täbriz, Iran  
**Familienstand:** Verheiratet, ein Kind

**Schulen:** 1967-1979 Grundschule/ Orientierungsstufe/ Gymnasium in Täbriz  
Abschluss mit dem Reifezeugnis

**Studium:** 1979-1985 Staatliche Aufnahmeprüfung für das Studium der  
medizinischen Laborwissenschaften an der Universität  
Täbriz; Abschluss mit dem wissenschaftlichen Grad (B. Sc)

1985-1990 Diagnostizierende Laborantin im Universitätsklinikum  
Urmia/Iran

1990 Anfangs des Studiums der Laboratoriumsmedizin an der  
medizinischen Fakultät/Universität Täbriz

1994 Abschluss des Studiums mit Promotion und dem  
wissenschaftlichen Grad (Laborärztin), Thema der Dissertation:  
*Antibacterial activities of ciprofloxacin, ofloxacin,  
trimethoprim-sulfamethoxazole, nalidixic acid and  
nitrofurantoin in urine of healthy volunteers*

1995 Deutschkurs an der Volkshochschule Göttingen

09.-10.1995 Arbeit als Gastwissenschaftlerin im Institut für Humangenetik  
der Universität Göttingen

01.1996-12.1998 Arbeit als Stipendiatin im Max-Planck-Institut für  
experimentelle Medizin (Abteilung Immunchemie), Göttingen

10.1999-12.2006 Arbeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Zentrum für  
Hygiene und Humangenetik der Universität Göttingen  
(Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie)

04.2005-05.2007 Dissertation in der Abteilung Zelluläre und Molekulare  
Immunologie der Universität Göttingen, Thema der  
Dissertation: „Herstellung und Charakterisierung monoklonaler  
Antikörper gegen die Anaphylatoxin-Rezeptoren“