

Studien zur spezifischen Detektion von Epitopen des MUC5AC-  
Proteins und ihrer perspektivischen Eignung als blutbasierter  
Tumoranzeiger mittels monozytärer Modellzellen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Jacob Torsten Hammer  
geboren am 18.10.1994 in Berlin

## Gutachter:innen

1. Prof. Dr. Karlheinz Friedrich, Institut für Biochemie II Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Ralf Mrowka, Klinik für Innere Medizin III Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. Hendrik Ungefroren, Medizinische Klinik I Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.03.2023

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>6</b>
2.1 Maligne Neoplasien im Rahmen des demografischen Wandels am Beispiel des Pankreaskarzinoms.....	6
2.2 Das EDIM-Assay, ein durchflusszytometrisches Messverfahren zur Detektion spezifischer Blutmarker.....	8
2.3 MUC5AC als möglicher Tumormarker zur Detektion des Pankreaskarzinoms.....	12
2.4 Phagozytose – ein fundamentaler Ablauf zur Antigenakkumulation in Monozyten. .	14
<b>3 Ziele der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>4 Material und Methodenteil</b>	<b>18</b>
4.1 Materialien.....	18
4.1.1 Bakterienstämme.....	18
4.1.2 Eukaryotische Zelllinien und Zellkulturmedien.....	18
4.1.3 Plasmide und Oligonukleotide.....	19
4.1.4 Antikörper.....	21
4.1.5 Chemikalien, Feinchemikalien, Kits.....	22
4.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	24
4.2 Molekularbiologische Verfahren.....	26
4.2.1 PCR-Techniken.....	26
4.2.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	26
4.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	27
4.2.4 Restriktionsverdau und Ligation.....	27

## Inhaltsverzeichnis

---

4.2.5	Transformation.....	27
4.2.6	Co-Transformation von pN-BLa-GFP und pC-BLa-GFP Konstrukten.....	28
4.2.7	Animpfen einer Bakteriensuspension.....	28
4.2.8	Plasmidisolierung aus Bakteriensuspensionen.....	28
4.2.9	Herstellen chemokompetenter Bakterien.....	28
4.3	Zellbiologische Verfahren.....	29
4.3.1	Kultivierung und Passagierung der Zelllinien.....	29
4.3.2	Inkulturnahme und Kryokonservierung von Zellen.....	30
4.3.3	Bestimmung der Zellzahl.....	30
4.3.4	Transiente Transfektion.....	30
4.3.4.1	Elektroporation/Nucleofection® .....	31
4.3.4.2	Komplexion.....	31
4.3.5	Herstellung stabiler Zelllinien für die Proteinproduktion.....	31
4.3.6	Herstellung von Ganzzelllysaten.....	32
4.3.7	Intrazelluläre Färbung eukaryotischer Zellen.....	32
4.3.8	Phagozytoseassay.....	33
4.3.9	Durchflusszytometrie.....	34
4.4	Proteinbiochemische Verfahren.....	34
4.4.1	SDS-PAGE.....	34
4.4.2	Westernblot.....	35
4.4.3	Immundetektion.....	36
4.4.4	Coomassie-Färbung.....	36
4.4.5	Silberfärbung.....	36
4.4.6	Bakterielle Proteinexpression von pMAL Konstrukten in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	37

4.4.7	Bakterielle Proteinexpression von N-BLa-GFP-C-BLa-GFP Konstrukten in <i>E. coli</i> JM 83.....	38
4.4.8	Inaktivierung von <i>E. coli</i> -Zellen.....	38
4.4.9	Pull-down-Assay eukaryotisch exprimierter Proteine.....	38
4.4.10	Aufreinigung eukaryotisch exprimierter Proteine.....	39
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
5.1	Produktion von rekombinanten Proteinfragmenten des MUC5AC.....	40
5.1.1	Generierung von Expressionskonstrukten für die rekombinante Proteinherstellung.....	40
5.1.2	Proteinexpression in stabilen HEK-293T-Zellen für die Proteinproduktion. .	44
5.2	Vorversuche zur Transfektion von THP-1-Zellen und zytometrischen intrazellulären Antigendetektion.....	46
5.2.1	Transfektion von THP-1-Zellen mit grün fluoreszierendem Protein.....	46
5.2.2	Anpassung des EDIM-Assays an das THP-1-Zellmodell.....	49
5.3	Epitop-Analyse des Antikörpers 45M1 mittels rekombinant hergestellter MUC5AC-Fragmente.....	52
5.3.1	Überprüfung der Detektierbarkeit der rekombinant hergestellten Proteinfragmente in Westernblotstudien.....	52
5.3.2	Überprüfung der Erkennung intrazellulär exprimierter MU5AC-Fragmente durch 45M1 mittels intrazellulärer Detektion in HEK-293T-Zellen.....	54
5.4	Durchführung des EDIM-Assays im THP-1-Zellmodell.....	54
5.4.1	Proteinexpression von antikörperreaktiven MU5AC-Fragmenten in THP-1-Zellen mit anschließender intrazellulärer Detektion.....	54
5.4.2	Versuche zur Aufnahme von MUC5AC-Antigenen in THP-1-Zellen durch Phagozytose.....	58
5.4.2.1	Fcγ-Rezeptor abhängige Phagozytose rekombinant hergestellter Proteinfragmente.....	58

## Inhaltsverzeichnis

---

5.4.2.2	Versuche zur Phagozytose von GFP-Fusionsprotein exprimierenden <i>E. coli</i> -Zellen durch THP-1-Zellen.....	60
5.4.2.3	Versuche zur Phagozytose von <i>E. coli</i> -Zellen, die das rekombinante MUC5AC-Fragment Cys2/3 exprimieren mit nachgeschaltetem EDIM-Assay.....	62
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>85</b>
9.1	DNA-Sequenzen.....	85
9.2	Plasmidkarten.....	85
9.3	Oligonukleotide.....	87
9.4	Gensequenzen der generierten Plasmiden.....	88
9.5	Tabellenverzeichnis.....	95
9.6	Abbildungsverzeichnis.....	95
9.7	Danksagung.....	97
9.8	Ehrenwörtliche Erklärung.....	98

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
91aa	91 Aminosäuren umfassendes Fragment des MUC5AC
AK	Antikörper
Bp/kBp	Basenpaare/Kilo-Basenpaare
BP	Bindeprotein
BLAST	<i>Basic local allignement tool</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CMV	Cytomegalie Virus
Cys2/3	Cysteinreiche Region 2 und 3 des MUC5AC
Cys9	Cysteinreiche Region 9 des MUC5AC
Da/kDa	Dalton/Kilodalton
DAMP	<i>Dammage associated molecular pattern</i>
DFG	DMEM-Medium mit FKS und Gentamicin
DNA	<i>Desoxy Ribonukleinacid</i>
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DZ	Durchflusszytometrie
EDIM	<i>Epitop detection in monocytes</i>
EGFP	<i>enhanced GFP</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunsorbent assay</i>
ER	Endoplasmatische Retikulum
FDG-PET-CT	Fluor-Desoxyglucose-Positronen-Emissionstomographie- Computertomographie
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
fwd	<i>forward</i>
g/mg/µg/ng/pg	Gramm/Milli-/Mikro-/Nano-/Pikogramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h/min/s	Stunde/Minute/Sekunde

---

HEK-293T-Zellen	<i>Human embryonal kidney 293T-Zelllinie</i>
HIS-Tag	Histidin-Tag
HRP	<i>Horse raddish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
l/ml/ $\mu$ l	Liter/Milli-/Mikroliter
LB Medium	<i>lysogeny broth</i> Medium
LPS	Lipopolysaccharid
M/mM/nM	Molar/Milli-/Nanomola
mA	Milliampere
mm/ $\mu$ m/nm	Milli-/Mikro-/Nanometer
<i>m</i>	<i>murin</i>
MUC	Muzin
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
MOI	<i>Multiplicity of infetiousness</i>
Nf $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math> B</i>
OD 600	optische Dichte (bei 600 nm gemessen)
P	Plasmid
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered salin</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
prim.	Primär
PSA	Prostata spezifisches Antigen
rev	<i>reverse</i>
RFG	RPMI-1630-Medium + FKS + Gentamicin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>sideward scatter</i>
sek.	sekundär

---

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TKT	Transketolase
TKTL	Transketolase like
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
T	Tween
t	Zeit
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
V	Volt
WB	Westernblot
v/v	<i>volume per volume</i>
vWD4	von-Willebrand-Domäne-4 des MUC5AC
w/v	<i>weight per volume</i>
XgeoMean	geometrisches Mittel auf der X-Achse aufgetragen

## 1 Zusammenfassung

Maligne Neoplasien des Pankreas stellen in Deutschland die vierthäufigste Tumorlokalisation der an Krebs erkrankten Bevölkerung dar. Aufgrund des meist zum Diagnosezeitpunkt schon vorangeschrittenen Tumorstadiums ist die Diagnose eines Pankreaskarzinoms häufig mit einer schlechten Prognose verbunden. Neben einer immer spezialisierteren Tumorthherapie ist die Krebsfrüherkennung, das so genannte Screening, ein wichtiges Instrument, um die Letalität von malignen Neoplasien zu reduzieren. MUC5AC stellt dabei einen Tumormarker des Pankreaskarzinoms dar, welcher *de novo* von malignen Zellen produziert und sogar schon von den Vorstufen des Pankreaskarzinoms exprimiert wird. Dadurch eignet sich dieser als potenzieller Proteinmarker, um in einer Screeningmethode verwendet zu werden. Im Zusammenhang mit Tumorfrüherkennung wurde das Verfahren der *epitop detection in monocytes* (EDIM) etabliert, welches von peripheren Blutmonozyten phagozytirtes Material mittels zytometrischer Analysen nachweist. Dieses Verfahren ist dabei sensitiver als direkte Messungen aus Vollblutproben, was in einem anderen Zusammenhang bei Untersuchungen mit dem Prostata spezifischen Antigen gezeigt werden konnte. Aufbauend auf dem EDIM-Verfahren wurde ein Tumormarkertest entwickelt, welcher auf zwei grundlegenden biologischen Mechanismen der Karzinogenese aufbaut. Die beiden Marker Apo10 und TKTL1 können mittels des EDIM-Assays intrazellulär in CD14<sup>+</sup>-CD16<sup>+</sup>-Monozyten detektiert werden und prinzipiell eine frühe Karzinogenese mit hoher Testgüte nachweisen. Jedoch ist es hierbei nicht möglich, Aussagen über die Tumorlokalisation zu treffen. MUC5AC ist ein möglicher Kandidat, das EDIM-Assay um einen mit dem Pankreaskarzinom assoziierten Marker zu erweitern. Ziel dieser Arbeit ist es, als Beitrag für die Entwicklung eines solchen Verfahrens, den Proteinmarker MUC5AC in einem monozytären Zellmodell, dem THP-1-Zellmodell, zu exprimieren und dann anschließend mit Hilfe des spezifischen Antikörpers 45M1 zytometrisch zu analysieren.

Aufgrund des hohen Molekulargewichtes von MUC5AC wurden unterschiedlich große und teilweise überlappende Fragmente des Proteins rekombinant hergestellt und nachfolgend auf Detektierbarkeit durch 45M1 untersucht. In Westernblotstudien und durch zytometrische Analysen intrazellulärer Expression konnten drei der vier erzeugten Fragmente spezifisch detektiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein 124 Aminosäuren umfassendes Proteinfragment das bisher kleinste beschriebene, von 45M1 erkannte Polypeptid darstellt.

Darauf aufbauend wurden Experimente durchgeführt, die von 45M1 gebundenen Fragmente in der Zelllinie THP-1 zu exprimieren. Trotz umfangreicher Optimierungsversuche konnte keine intrazelluläre Proteinexpression beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in einer posttranslationalen Proteindegradation.

In einem alternativen Ansatz wurde versucht, mittels Phagozytose ein MUC5AC-Fragment intrazellulär in THP-1-Zellen anzureichern. Dazu wurden die Zellen mittels PMA zu Makrophagen ausdifferenziert. Nachfolgend wurde der *E. coli* Stamm BL21, in welchem Cys2/3 prokaryotisch exprimiert wurde, mit den ausdifferenzierten Zellen inkubiert und anschließend mittels EDIM-Protokoll intrazellulär detektiert. Dabei konnte eine Zunahme der Fluoreszenzintensität verzeichnet werden, was eine Phagozytose der Proteinf Fragmente vermuten lässt. Jedoch benötigt das Phagozytoseassay weitere Optimierungsschritte, welche besonders die Ausdifferenzierung der THP-1-Zellen mit PMA sowie das Ablösen der Zellen nach der Inkubation mit den *E. coli*-Zellen betrifft. Des Weiteren lässt sich aus der rein zytometrischen Analyse nicht schließen, ob die Bakterien tatsächlich intrazellulär vorliegen. Dazu wäre eine konfokal-mikroskopische Analyse der Versuchsansätze indiziert. Als Ausblick wäre neben der Optimierung der Experimentierbedingungen eine Überprüfung der Ergebnisse mittels Patient:innenproben angedacht um zu evaluieren, ob MUC5AC sich auch bei Patient:innen, welche an dem Pankreaskarzinom erkrankt sind, mittels EDIM-Assay nachweisen lässt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Maligne Neoplasien im Rahmen des demografischen Wandels am Beispiel des Pankreaskarzinoms

Der umgangssprachliche Begriff Krebs und die mit ihm beschriebenen malignen Neoplasien, waren im Jahr 2019 für ein Viertel der Todesfälle in Deutschland ursächlich (Böhm 2021). In den vergangenen Jahren lag das mediane Erkrankungsalter bei ungefähr 70 Jahren (RKI und GEKID 2021). Somit sind maligne Neoplasien auch Erkrankungen der älteren Bevölkerung. Unter Berücksichtigung des demografischen Wandels in Deutschland lässt sich daraus schließen, dass die Erkrankungsfälle bedingt durch maligne Neoplasien in Zukunft zunehmen werden (Pritzkeleit *et al.* 2010). Neben immer innovativeren und individualisierten Therapieoptionen, welche im Rahmen der Tertiär- und Quartärprävention stattfinden, spielt die Sekundärprävention von Krebserkrankungen eine große Rolle (Wild *et al.* 2019). Bisher ist diese in der hausärztlichen oder fachärztlichen Krebsfrüherkennung für das Prostatakarzinom, das Kolorektale Karzinom, das Zervixkarzinom, das Mammakarzinom und das Melanom fest integriert (Starker *et al.* 2018). Die Sekundärprävention hat dabei den Fokus auf einer frühen Erkrankungsdiagnostik, sodass einem ungünstigen Verlauf und damit einhergehenden Komplikationen vorgebeugt werden kann. Ein gutes Beispiel für eine Erkrankung, die durch eine frühe Diagnostik besser behandelt und deren Verlauf dadurch begünstigt werden könnte, ist das Pankreaskarzinom. Mit einer Inzidenz von circa 19000 Neuerkrankungen pro Jahr bei stetiger Zunahme, zählt das Pankreaskarzinom zu der vierthäufigsten Krebserkrankung in Deutschland (Daten 2018). Dabei ist vor allem die Bevölkerung über 70 Jahre von der Erkrankung betroffen. Ein großes Problem stellt das zum Diagnosezeitpunkt schon fortgeschrittene Stadium dar, sodass eine kurative Therapieoption meist nicht mehr möglich ist (RKI und GEKID 2021, S3-Leitlinie Pankreaskarzinom 2021). Auch ist die Wahrscheinlichkeit von Komorbiditäten im Alter erhöht, die sowohl den Krankheitsverlauf als auch die Therapieoptionen negativ beeinflussen können. Bisher ist kein etabliertes Screening für das Pankreaskarzinom vorhanden. Ein Grund dafür ist, dass der gebräuchliche Tumormarker *Carbohydrate-Antigen 19.9* (CA 19.9), welcher vor allem zur Verlaufskontrolle verwendet wird, nicht als Screeningmarker empfohlen wird (S3-Leitlinie Pankreaskarzinom 2021). CA 19.9 ist ein Tetrasaccharid, das auf verschiedenen

Trägermolekülen, wie Muzinen, exprimiert wird. Die Testgüte zur Diagnostik des Pankreaskarzinoms wird in der Literatur mit einer mittleren Sensitivität von 79 % und einer mittleren Spezifität von 82 % angegeben (Goonetilleke *et al.* 2007). Ein Grund dafür ist, dass CA 19.9 auch bei benignen Erkrankungen des Pankreas erhöht im Serum messbar ist (Satake *et al.* 1985, Safi *et al.* 1987). Dadurch können vermehrt falsch-positive Testergebnisse auftreten. Des Weiteren ist die Expression von CA 19.9 von der Lewis-Blutgruppenzugehörigkeit abhängig. In einigen Lewis-negativen Individuen konnte bei bestätigtem Pankreaskarzinom keine CA 19.9-Elevation im Serum gemessen werden. Gegensätzlich zu der herkömmlichen Meinung, dass CA 19.9 in Lewis-negativen Individuen nicht exprimiert wird, trifft dies nicht für alle betroffenen Fälle zu. In einigen Fällen konnte trotz negativem Lewis-Blutgruppenstatus eine Erhöhung von CA 19.9 gemessen werden. Jedoch können durch die reduzierte Expression vermehrt falsch-negative Ergebnisse auftreten (Rosen *et al.* 1993, Luo *et al.* 2018). Aufgrund dieser beiden Aspekte eignet sich CA 19.9 nicht als adäquater Screening-Tumormarker für das Pankreaskarzinom.

Offensichtlich besteht der Bedarf nach weiteren Tumormarkern mit besserer Testgüte, um mit höherer Genauigkeit ein Pankreaskarzinom früh detektieren zu können. In der Literatur werden verschiedenste Ansätze für Tumormarker des Pankreaskarzinoms diskutiert, wobei sowohl auf Proteinmarker als auch auf *non-coding-RNA* und miRNA-Marker zurückgegriffen wird (Loosen *et al.* 2017). Dabei zeigte sich, dass vor allem miR-21, miR-155, miR-196a und miR-210 in Serumproben von an Pankreaskarzinom Erkrankten vermehrt messbar sind (Wang *et al.* 2009). Auch auf der Proteinebene wurden weitere Marker untersucht. Vor allem die Kombination verschiedener Marker mit CA 19.9 in Proteinpanels konnte eine erhöhte Testgüte erbringen. Diese wurde für die Kombination aus *osteopontin*, *tissue inhibitor of metalloproteinase I* (TIMP-1) und CA 19.9 mit einer Sensitivität von 87 % und einer Spezifität von 91 % erreicht (Poruk *et al.* 2013). Ähnliche Werte wurden für die Kombination aus *osteoprotegerin*, *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und CA 19.9 beschrieben (Brand *et al.* 2011).

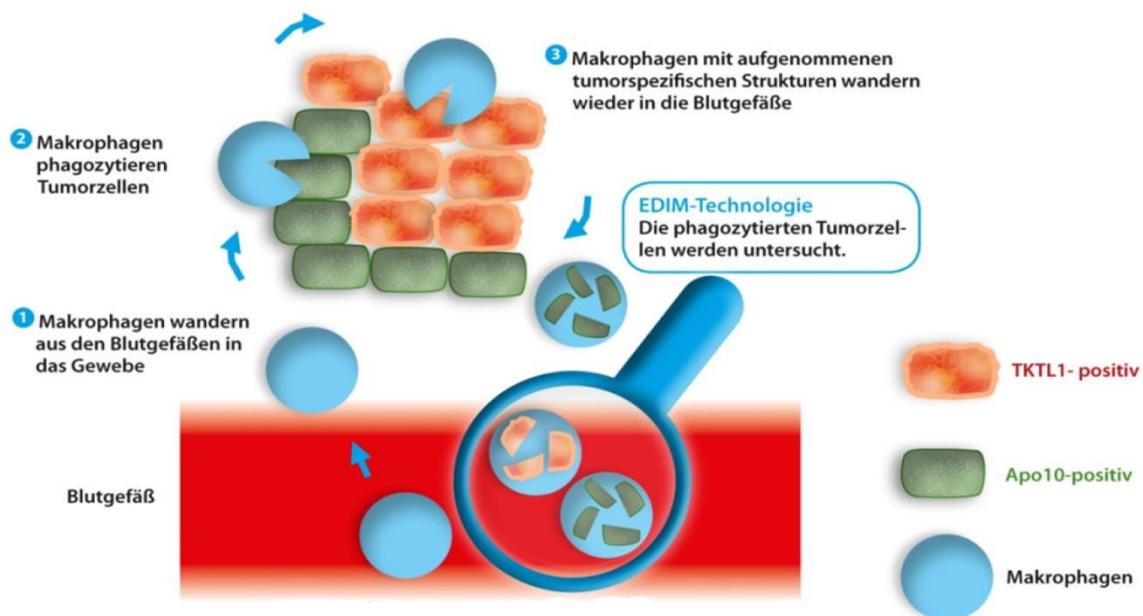
## 2.2 Das EDIM-Assay, ein durchflusszytometrisches Messverfahren zur Detektion spezifischer Blutmarker

Die Testgüte, das Maß, an welchem Labortests in ihrer Genauigkeit gemessen werden, ist neben dem zu untersuchenden Marker abhängig vom Testverfahren. In den oben beschriebenen Untersuchungen wurden Blutproben verwendet und dann auf Vorhandensein der Marker überprüft. Dabei spielt die Nachweisgrenze, die die Sensitivität bedingt, eine relevante Rolle (Fierz 2004). Bei der Bestimmung löslicher Antigene im Blut wird die Sensitivität durch die unter Umständen extrem geringe Antigenkonzentration limitiert. Einen alternativen Ansatz zur Umgehung dieses Problems stellt ein Verfahren dar, welches in phagozytischen Zellen akkumulierte Antigene misst, das sogenannte Verfahren der *epitop detection in monocytes* (EDIM). Dabei wird eine spezifische Subpopulation von Monozyten aus peripheren Blutproben isoliert. Monozyten sind Leukozyten myeloischen Ursprungs, die zum einen phagozytieren und dadurch zur Gewebemöostase beitragen und zum anderen Entzündungen im Körper triggern können. Dabei kann die Population der Monozyten anhand der Oberflächenmerkmale CD14 (Lipopolysaccharid Rezeptor) und CD16 (FcγRIII) grob klassifiziert werden (Wright *et al.* 1990). CD14 positive Monozyten bilden dabei mit 90 % den Großteil der Blutmonozyten. Diese haben vor allem eine erhöhte Phagozytoseaktivität. Dem gegenüber stehen die CD16 positiven Monozyten, welche ungefähr 10 % der peripheren Monozyten bilden (Passlick *et al.* 1989) und bei Malignomen vermehrt auftreten (Saleh *et al.* 1995). Für das EDIM-Assay wird ein weiterer Subtyp, der CD14 und CD16 an der Zelloberfläche koexprimiert, verwendet. Dieser weist einen proinflammatorischen Stoffwechsel auf und zeigt somit große Ähnlichkeit zu ausgereiften Makrophagen (Ziegler-Heitbrock *et al.* 1993, Frankenberger *et al.* 1996).

Durch die intrazelluläre Messung von Antigenen stellt das EDIM-Assay eine sehr sensitive Methode dar, da schon geringe Molekülmengen gemessen werden können. Grund dafür ist die intrazelluläre Akkumulation verglichen mit dem gelösten Zustand im Gesamtblut. Dadurch wird es prinzipiell möglich, Moleküle, die im Vollblut unterhalb der Nachweisgrenze liegen würden, nun zu detektieren. Dies konnte in Untersuchungen an dem prostataspezifischen Antigen (PSA) gezeigt werden, wobei unterhalb des *cut-offs* mittels Untersuchung von peripheren Monozyten eine signifikante Unterscheidung zwischen benignen Neoplasien,

Prostatitis und Prostatakarzinom gezeigt werden konnte (Herwig *et al.* 2004, Herwig *et al.* 2004).

Aufbauend auf der EDIM-Messmethode wurde ein Tumor-Test (PanTum Detect) entwickelt, der zwei grundlegende Tumormarker zur Frühdetektion von Malignomen nutzt: Apo10 und transketolase-like 1 (TKTL1). Mittels Oberflächenfärbung von CD14 und CD16 sowie intrazellulärer Färbung der Antigene TKTL1 und Apo10 werden Monozyten aus Blutproben markiert und mittels zytometrischer Analysen auf das Vorhandensein der beschriebenen Marker überprüft.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des EDIM-Assays**

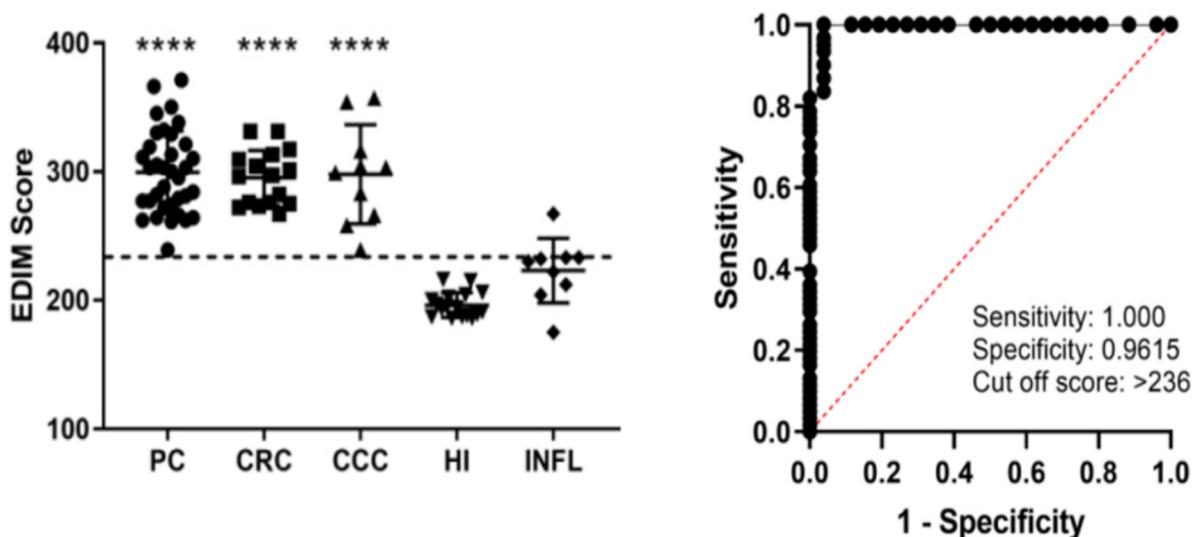
Details siehe Text; (Quelle: <https://rvinter.com/assets/files/RV-EDIM-Technologie.pdf>; 24.05.21, 23:54 Uhr)

Apo10 ist ein Epitop der DNaseX, dessen physiologische Funktion vor allem in der Apoptose wiederzufinden ist. Die Apoptose ist ein fundamentaler Prozess zum Erhalt der Zellintegrität, für welchen die Kernfragmentierung durch Nukleasen einen wichtigen Schritt darstellt (Kerr *et al.* 1972, Wyllie 1980). Im Falle des Funktionsverlustes dieser Enzyme oder deren verringerter Aktivität kommt es zu einer erhöhten und vor allem unkontrollierten Zellteilung, woraus die Entstehung von malignen Neoplasien resultieren kann (Brody 1958, Daoust *et al.* 1963, Fort *et al.* 1969). Die Nuklease DNaseX, welche auf dem Chromosomen Xq28 kodiert (Parrish *et al.* 1995, Coy *et al.* 1996), reichert sich in malignen Geweben an und ist, verglichen mit benignen Hyperplasien, sowohl in malignen Vorstufen als auch in Karzinomen

signifikant erhöht. Es wird ein Zusammenhang mit einer fehlerhaften Apoptose postuliert, wobei davon ausgegangen wird, dass das Enzym inhibiert wird und somit eine physiologische DNA Degradation nicht mehr stattfinden kann (Grimm *et al.* 2015, Coy 2017).

Neben atypischen Zellteilungsmechanismen weisen maligne Zellen spezialisierte Stoffwechselwege auf. Zum einen ist eine erhöhte anaerobe Glykolyse bei genügend Sauerstoffzufuhr zu beobachten. Zum anderen konnte neben diesem, als Warburg-Effekt beschriebenen Phänomen beobachtet werden, dass in Karzinomzellen ein erhöhter Pentose-Phosphat-Weg-Stoffwechsel auftritt (Patra *et al.* 2014). Eine Hemmung des Schlüsselenzyms seines nicht oxidativen Teils (Transketolase - TKT) führt zu einer Hemmung des Tumorwachstums (Raïs *et al.* 1999), während eine Stimulation der TKT zu einem Wachstum führt (Comín-Anduix *et al.* 2001). Neben TKT gibt es weitere *transketolase like-enzymes*, welche mitunter auf dem X-Chromosom kodiert werden (Coy *et al.* 1996, Coy *et al.* 2005). Die Variante TKTL1 ist in vielen malignen Zellen hoch reguliert und korreliert mit einem aggressiveren Wachstum, was in Urothel- und Kolonkarzinomen beobachtet wurde und den klinische Outcome dieser Erkrankungen beeinflusst (Langbein *et al.* 2006).

Diese beiden Marker wurden erstmals von Feyen *et al.* mittels des EDIM-Assays in einer Patient:innenkohorte mit bestätigten malignen Neoplasien verschiedenster Entitäten oder einem diesbezüglichen Verdacht, diagnostisch eingesetzt, für welche eine Stagingdiagnostik mittels FDG-PET-CT vorgesehen war. Als Kontrolle dienten Blutproben von gesunden Blutspender:innen. In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Übereinstimmung von 90 % zwischen EDIM-TKTL1-Apo10-Test und der Standard-Stagingmethode PET-CT zu verzeichnen war (Feyen *et al.* 2012). In darauffolgenden Studien konnte die erhöhte Testgüte des EDIM-TKTL1-Apo10-Bluttestes weiterhin bestätigt werden. Dabei sind Sensitivitäten und Spezifitäten von ungefähr 95 % erreicht worden (Grimm *et al.* 2013, Grimm *et al.* 2016). Auch für das Pankreaskarzinom konnte in einer weiteren Studie bei allen Patient:innen mit bestätigtem Karzinom TKTL1 und Apo10 in Kombination signifikant erhöht detektiert werden (siehe Abbildung 2). Des Weiteren war auch bei Pankreatitiden in 2 von 13 Fällen ein positives Signal für TKTL1 zu verzeichnen, woraus sich ein eventueller Zusammenhang zwischen TKTL1 und Entzündungen vermuten lässt (Saman *et al.* 2020). Bisher konnte in verschiedenen Publikationen das EDIM-TKTL1-Apo10 Verfahren überprüft werden, wobei eine hohe Testgüte ermittelt wurde. Diese Testgüte qualifiziert den Bluttest als mögliches Messprinzip zum Tumorscreening.



**Abbildung 2: Einsatz der EDIM-basierten Detektion von Apo10 und TKTL1 in unterschiedlichen Tumorentitäten**

links: Scatterplot des EDIM-Scores (Maß der kombinierten Positivität der beiden Marker) für die verschiedenen Tumorentitäten, PC: Pankreaskarzinom, CRC: Kolorektalkarzinom, CCC: Cholangiozelluläres Karzinom, HI: gesunde Kontrollgruppe, INFL: Entzündliche Erkrankungen (Kolitis, Pankreatitis, Cholangitis), gestrichelte Linie entspricht dem Cut-off von >236 des EDIM-Scores; rechts: *receiver-operating-curve* (ROC) des EDIM-Scores für alle 3 Entitäten, Darstellung der Sensitivität als Funktion der falsch Positiven (1-Spezifität); (Saman *et al.* 2020)

Die aus einem positiven Testergebnis gewonnenen Informationen können jedoch aufgrund des ubiquitären Auftretens der Marker TKTL1 und Apo10 in malignen Neoplasien keine Aussagen über die Lokalisation einer möglichen Tumorerkrankung zulassen. Durch die höhere Sensitivität im Vergleich zu herkömmlichen Stagingmethoden wäre im Falle eines positiven EDIM-TKTL1-Apo10-Ergebnisses und eines negativen PET-CT-Ergebnisses keine Aussage möglich, wo ein eventuell malignes Geschehen im Körper der betroffenen Person zu erwarten wäre. Da aus einem positiven EDIM-TKTL1-Apo10-Ergebnis keine Behandlung abgeleitet werden kann, stellt dies zusammen mit der vermutlichen Krebsdiagnose vor allem eine psychische Belastung für die Patient:innen dar.

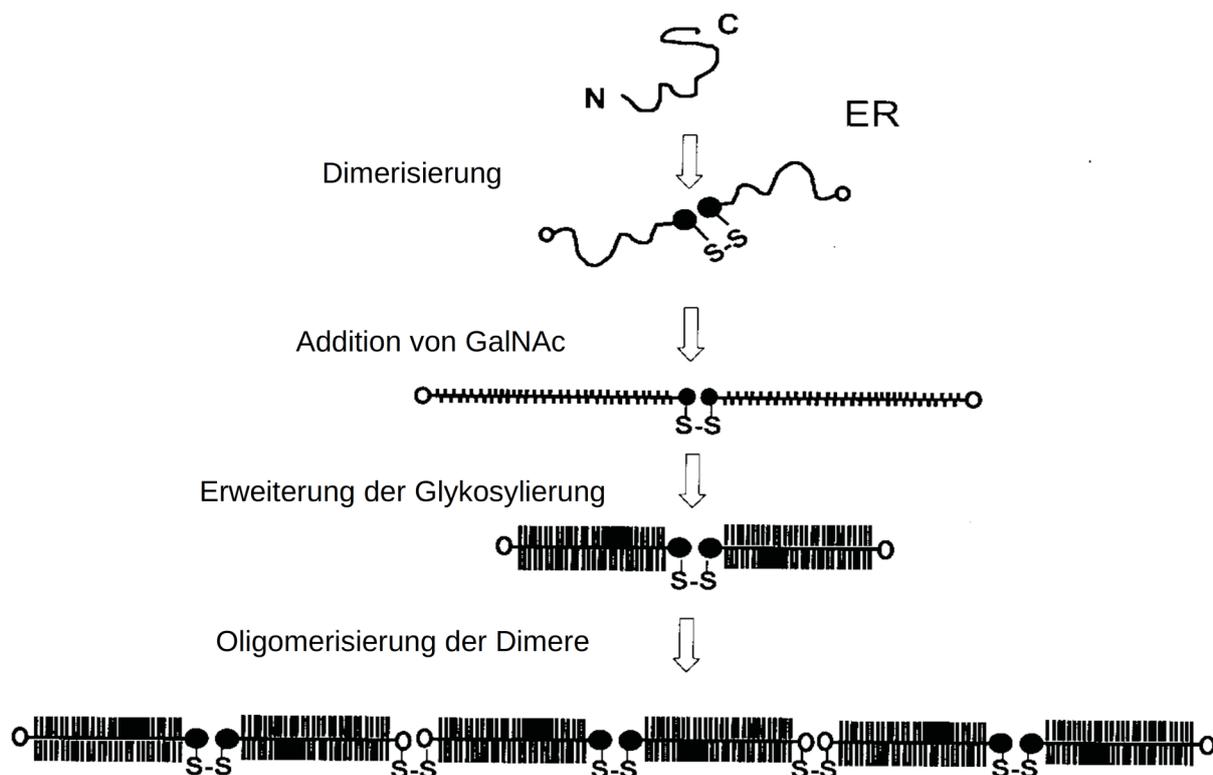
Somit ist es von großem klinischem Interesse, das EDIM-Assay um tumorentitätsspezifische Marker zu erweitern, sodass neben einem positiven EDIM-TKTL1-Apo10-Ergebnis eine Tumorlokalisierung zusätzlich angegeben werden kann.

### 2.3 MUC5AC als möglicher Tumormarker zur Detektion des Pankreaskarzinoms

Für eine frühe Diagnostik von malignen Neoplasien spielen vor allem Präkanzerosen, die im Rahmen einer malignen Transformation beispielsweise in ein Karzinom übergehen können, eine große Rolle. Hierbei können eventuelle Karzinome schon früh therapiert und somit einer schlechten Prognose entgegen gewirkt werden. Darauf baut zum Beispiel die Polypektomie im Rahmen der Kolonkarzinomfrüherkennung auf (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019). Auch für das Adenokarzinom des Pankreas sind präkanzeröse Vorstufen beschrieben. Diese umfassen *pancreatic intraepithelial neoplasie* (PanIN), *intraductal papillary mucinous neoplasm* (IPMN) und *mucinous cystic neoplasm* (MCN) (Hruban *et al.* 2007). Charakteristisch für Karzinome des Pankreas ist deren Mukusekretion, welche sogar in den eben genannten Vorstufen stattfindet. Diese wird durch verschiedene Muzine gebildet, die teilweise schon *de novo* von den pankreatischen Präkanzerosen sekretiert werden. Dabei spielt das Protein MUC5AC eine relevante Rolle, da es sowohl in den neoplastischen Vorstufen als auch den daraus folgenden Karzinomen gebildet wird, jedoch nicht im gesunden oder entzündeten Pankreas messbar ist (Yonezawa *et al.* 1999, Jonckheere *et al.* 2010).

Die Arbeitsgruppe um Gold *et al.* charakterisierten einen Antikörper, welcher zu 85 % Proben von Pankreaskarzinompatient:innen erkennt. Die Immunisierung erfolgte mit einem Muzin. Dabei war keine Reaktivität gegenüber entzündlichen Pankreaserkrankungen zu verzeichnen, woraus sich ein praktischer klinischer Nutzen ableiten ließe, welcher durch den herkömmlichen Tumormarker CA 19.9 so nicht existiert (Gold *et al.* 1994). In weiteren Untersuchungen wurde das Epitop des Antikörpers dem Protein MUC5AC zugeschrieben, weshalb dieses als möglicher Tumormarker für eine Frühdiagnostik des Pankreaskarzinoms zu diskutieren wäre (Gold *et al.* 2013a, Liu *et al.* 2015). Des Weiteren erhöhte die Kombination aus MUC5AC und CA 19.9 die Testgüte zur Detektion des Pankreaskarzinoms (Gold *et al.* 2013, Kaur *et al.* 2017, Zhang *et al.* 2020). Außerdem konnte bei einem Knockdown des MUC5AC mittels siRNA ein vermindertes Karzinomwachstum beobachtet werden. Somit wird neben der Sekretion durch pankreatische Vorläuferläsionen auch eine für die Tumorumgebung relevante Funktion des Glykoproteins diskutiert (Hoshi *et al.* 2011).

Das Glykoprotein MUC5AC ist ein *high molecular weight protein* der Proteinfamilien der Muzine und wird physiologisch vor allem im Magen, der Lunge und der Endozervix gebildet. Im gesunden Pankreas kommt es nicht vor. Es wird auf dem Chromosomen 11p15.5 kodiert, wo es in die Gensequenz MUC6-MUC5B-MUC5AC-MUC2 eingebettet ist. Muzine unterteilen sich in 2 große Gruppen, die sekretierten und die membranständigen Muzine. MUC5AC wird sekretiert und bildet zusammen mit MUC2 und MUC6 einen Hauptbestandteil des gastrointestinalen Mukus, der eine Schutzbarriere zwischen apikalem Zellpol und Lumen darstellt (Bolós *et al.* 1995, Rodríguez-Piñeiro *et al.* 2013). Die Sekretion findet als Dimer statt. Darauf folgt eine zunächst verstärkte Glykolykosisylierung durch N-Acetylgalaktosamin-Seitenketten, woran sich die Oligomerisierung der einzelnen Glykoproteinketten anschließt (Sheehan *et al.* 2004). Ein schematischer Überblick ist Abbildung 3 zu entnehmen. Aufgrund der hohen Glykosylierung ist das Molekulargewicht des MUC5AC je nach struktureller Anordnung und Oligomersisierung unterschiedlich. In der Monomerform beträgt dieses 2,2 MDa, wobei Größendetektionen bis zu 200 MDa beschrieben wurden (Sheehan *et al.* 2000). Dies ist auf den hohen Glykosylierungsanteil vor allem im mittleren Bereich des Proteins zurückzuführen (Strous *et al.* 1992).



**Abbildung 3: Darstellung der einzelnen MUC5AC-Oligomerisierungsschritte**

Erläuterung siehe Text

Die Arbeitsgruppe um Jacques Bara generierte und charakterisierte eine Vielzahl von Antikörpern, welche gegen ein von ihr zu Beginn als M1 bezeichnetes Epitop gerichtet sind. Das Antigen M1 ist dabei ein Bestandteil der gastrischen und intestinalen mukusproduzierenden Zellen. In den ersten Untersuchungen konnten die M1 Epitope sowohl in Kolonkarzinom- als auch in Pankreaskarzinomproben nachgewiesen werden (Bara *et al.* 1980, Bara *et al.* 1986, Sessa *et al.* 1990). In späteren Analysen konnte dann gezeigt werden, dass das M1-Gentranskript von dem MUC5AC-Gen kodiert wird (Bara *et al.* 1998). Unter der Vielzahl der Antikörper stellt 45M1, erstmals von Bara *et al.* 1991 isoliert und beschrieben, einen heute noch häufig verwendeten Antikörper zur Detektion des MUC5AC dar (Bara *et al.* 1991). Dabei wird 45M1 sowohl in proteinbiochemischen Methoden als auch für Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz verwendet.

## **2.4 Phagozytose – ein fundamentaler Ablauf zur Antigenakkumulation in Monozyten**

Die für den PanTum Detect-Test fundamentale intrazelluläre Anreicherung der Antigene geht auf einen grundlegenden immunologischen Prozess zurück, die Phagozytose. Somit stellt diese einen zentralen Mechanismus dar, welcher durch das EDIM-Assay genutzt wird. Die erstmalige Beschreibung des Phagozytoseprozesses fand im Jahre 1884 durch Elias Metschnikoff statt. Dieser inkubierte Milzbrandbakterien mit Leukozyten (von ihm bezeichnete Phagozyten) und fand anschließend heraus, dass die Pathogene intrazellulär in den Leukozyten vorliegen (Metschnikoff 1884). Die Phagozytose stellt einen körpereigenen Abwehrmechanismus dar, der Zellen dazu befähigt, Gewebe oder körperfremdes Material zu internalisieren und anschließend zu zersetzen, um es dadurch aus dem Körper zu entfernen. Dies geschieht im Rahmen von Infektionen, bei denen Phagozyten Pathogene erkennen und mittels intrazellulärer Degradation vernichten. Auch anorganische Stoffe wie Rußpartikel oder Asbestfasern können dadurch aufgenommen und aus den betroffenen Organen entfernt werden. Neben Reaktionen auf pathogene Reize kann über die Phagozytose apoptotisches, körpereigenes Material abgebaut werden, was vor allem für den Erhalt der Gewebemöostase von Relevanz ist. Phagozytose stellt hierbei eine spezialisierte Form der Endozytose dar, in welcher rezeptorabhängig über Aktin-Strukturen Partikel größer als 0,5 µm aufgenommen werden können (Rosales und Uribe-Querol 2017). Dabei können die Rezeptoren unterteilt werden in diese, welche *pathogen associated molecular patterns*

(PAMPs) erkennen und phagozytieren, sowie in jene Rezeptoren, welche durch vorherige Ligandenbindung opsonierte Moleküle erkennen und anschließend phagozytieren. Zu der Gruppe der PAMP-Rezeptoren zählen die Oberflächenmoleküle Dectin-1 und der Mannose-Rezeptor, welche Polysaccharidstrukturen von Hefen erkennen können, sowie der *scavenger-receptor A*, der prokaryotisches Lipopolysaccharid (LPS) erkennt. In allen Fällen erfolgt nach Ligandenbindung die Phagozytose der gebundenen Moleküle (Ezekowitz *et al.* 1990, Peiser *et al.* 2000, Herre *et al.* 2004). Zu der Gruppe der Opsonin-Rezeptoren zählen die Fc-Rezeptoren, wobei vor allem die Fc $\gamma$ -Rezeptoren eine relevante Rolle spielen, und die Komplementrezeptoren (Anderson *et al.* 1990, Ross *et al.* 1992). Nach erfolgter Internalisierung der Partikel und der daraus resultierenden Phagosomenbildung, schließt sich die Phagosomenreifung an. Dabei verändern sich vor allem die pH-Werte innerhalb der Vesikel sowie die intraluminale Enzyenausstattung. Direkt nach Vesikelbildung, den sogenannten reifen Phagosomen, kommt es durch Fusion mit den frühen Endosomen zur Bildung der frühen Phagosomen. Der intravesikuläre pH-Wert beträgt hierbei ungefähr 6,0. Darauf folgend bilden sich abhängig von unterschiedlichen Oberflächenmolekülen und damit verbundenen unterschiedlichen Enzyenausstattungen die intermediären und späten Phagosomen. Dabei spielen die Ras-GTPasen, die auch als Marker der Phagosomenreife genutzt werden, eine relevante Rolle. Im späten Phagosomen ist der pH-Wert deutlich niedriger. Dies wird vor allem durch membranöse Einlagerung von V-ATPasen ermöglicht, welche als Protonenpumpen fungieren. Im Anschluss können späte Phagosomen mit Lysosomen zu den Phagolysosomen verschmelzen, welche intraluminal neben einem pH-Wert von ca. 4,5 hydrolytische Enzyme und oxidative Moleküle aufweisen. In diesem letzten Reifungsprozess können Mikroben effektiv zersetzt werden (Flannagan *et al.* 2012). Da neben Mikroben auch apoptotisches Material phagozytiert werden kann, ist die Phagozytose ein im Körper ubiquitär auftretender Prozess. Jedoch können nicht alle Zellen, die prinzipiell Phagozytose durchführen, auch pathogene Organismen abwehren. Dafür hat sich eine als professionelle Phagozyten bezeichnete, spezialisierte Zell-Population gebildet. Zu ihnen zählen die Neutrophilen Granulozyten, die Monozyten, die Makrophagen und die Dendritischen Zellen. Diese Unterteilung wurde erstmals von Michel Rabinovitch vorgenommen, der die eben beschriebenen spezialisierten Phagozyten den nicht-professionellen Phagozyten gegenüberstellte. Nicht-professionelle Phagozyten sind Epithelzellen und Fibroblasten, die zur Gewebemöostase beitragen, aber keine

Mikroorganismen aufnehmen (Rabinovitch 1995). In neueren Untersuchungen wird noch eine dritte Population der Phagozyten, die spezialisierten Phagozyten, beschrieben, welche gewebespezifische Eigenschaften aufweisen und wie ausdifferenzierte Makrophagen postmitotische Zellen darstellen. Dazu zählen vor allem die Sertoli-Zellen im Hoden und die retinalen Pigmentepithelzellen im Auge (Arandjelovic *et al.* 2015). Im Rahmen des EDIM-Assays, welches die Phagozytose als zugrunde liegenden Mechanismus nutzt, werden professionelle Phagozyten, die Monozyten, detektiert.

Zur Untersuchung der Phagozytose ist es zum einen möglich, periphere Blutmonozyten zu isolieren und zum anderen monozytäre Zellmodelle zu verwenden. Die Zelllinie THP-1 wurde von Tsuchiya und Kollegen 1980 etabliert und gilt seitdem als häufig verwendetes Modell, um monozytäre Eigenschaften zu untersuchen (Tsuchiya *et al.* 1980). Gegenüber peripheren Blutmonozyten haben THP-1-Zellen einige Vorteile. Diese spiegeln sich zum einen in der technischen Handhabung der Zellen wider. Dazu zählen der Verdopplungszeitraum, Kultivierungsbedingungen und die Anfälligkeit gegenüber Infektionen. Zum anderen weisen die Zellen, da es sich um immortalisierte Zellen handelt, weniger interzelluläre Unterschiede auf, woraus eine bessere Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Experimenten resultieren kann (Chanput *et al.* 2014). Die Zellen können in Makrophagen ausdifferenziert werden (Cossu *et al.* 1982). Dabei stellen Phorbol-Ester die besten Stimuli für eine Ausdifferenzierung dar, von denen Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) am häufigsten in der Literatur beschrieben ist (Tsuchiya *et al.* 1982, Auwerx *et al.* 1988, Auwerx *et al.* 1992). In der Literatur wird die Zelllinie neben Untersuchungen zu monozytärem Differenzierungsverhalten oder in Zell-Modellen zur Pathogenese der Artherosklerose auch für Phagozytosemodelle verwendet (Qin 2012, Licona-Limón *et al.* 2015, Shiratori *et al.* 2017).

### 3 Ziele der Arbeit

Der auf dem EDIM-Assay aufbauende Tumortest PanTum Detect ist ein Verfahren, welches die Grundlage für eine Frühdiagnostik von malignen Neoplasien bilden kann. Jedoch ist es nicht möglich, anhand dieses Tests Aussagen über die Entität des Tumors zu treffen. Deshalb ist die Erweiterung dieses Verfahrens um spezifische Tumormarker ein möglicher Schritt zur Behebung dieses Problems. In der vorliegenden Arbeit soll in einem monozytären Modellzellensystem versucht werden, das EDIM-Verfahren nachzustellen und es mittels des mit dem Pankreaskarzinom assoziierten Antigen MUC5AC zu erweitern. Dabei soll die potenzielle Eignung von 45M1 als möglicher Antikörper für die Diagnostik des Pankreaskarzinoms unter Anwendung des EDIM-Assays evaluiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit werden Proteinfragmente, die Abschnitte des Vollängenproteins MUC5AC widerspiegeln, unter Zuhilfenahme von HEK-293T-Zellen rekombinant hergestellt. Anschließend können diese dann auf Detektierbarkeit durch 45M1 untersucht werden.

In weiteren Vorversuchen erfolgen Anpassungen der Transfektion und Proteinexpression sowie des Protokolls für den intrazellulären Antigennachweis an das THP-1-Modellzellensystem und es erfolgt eine Anpassung der zytometrischen Auswertung der THP-1-Zelllinie.

Im zweiten Teil der Arbeit werden dann die Proteinfragmente, welche von 45M1 erkannt werden, intrazellulär im Modellzellensystem exprimiert und anschließend detektiert. Für die intrazelluläre Anreicherung der Antigene werden dabei zwei Ansätze verfolgt: die Transfektion von zuvor erzeugten Expressionsplasmiden mit anschließender Proteinexpression und die Phagozytose von rekombinant hergestellten MUC5AC-Proteinfragmenten. Der Nachweis erfolgt analog zu den Vorversuchen mittels zytometrischer Auswertung durch das EDIM-Assay im THP-1-Zellmodell.

## 4 Material und Methodenteil

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet

**Tabelle 1: Verwendete Prokaryotische Stämme**

Stamm	Medium	Verwendung	Bezugsquelle
XL1-blue	LB-Medium	Plasmidamplifikation	Invitrogen AG
JM83	LB-Medium	Expression der N-BLa-C-BLa-GFP Konstrukte	Invitrogen AG
BL21	LB-Medium	Prokaryotische Proteinexpression	Invitrogen AG

#### 4.1.2 Eukaryotische Zelllinien und Zellkulturmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2, die dazugehörigen Zellkulturmedien in Tabelle 3 und die generierten stabilen Zelllinien in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 2: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Eigenschaften	Medium	Verwendung	Bezugsquelle
A-549	Lungenkarzinomzelllinie; Adhärentes Wachstum; Expression der MUC5AC mRNA	DFG-Medium	cDNA Synthese	Leibniz-Institut DSMZ GmbH, ACC 107
HEK-293T	Humane Nierenembryonalzelllinie; Adhärentes Wachstum		Proteinproduktion	Leibniz-Institut DSMZ GmbH, ACC 305
THP-1	humane akute monozyten Leukämie Zelllinie; Suspensionszellen; monozytäre Eigenschaften	RFG-Medium	Modellzellsystem für EDIM	KIM II des UKJ; Leibniz-Institut DSMZ GmbH, ACC 16

**Tabelle 3: Verwendete Zellkultur-Medien**

Name	Zusammensetzung
DFG	90 % DMEM + 10 % FKS + 73 µg/ml Gentamicin
DFG-Zeocin	90 % DMEM + 10 % FKS + 73 µg/ml Gentamicin + 150 µg/ml Zeocin
RFG	90 % RPMI + 10 % FKS + 73 µg/ml Gentamicin
Einfriermedium	70 % Vollmedium + 20 % FKS + 10 % DMSO

**Tabelle 4: Generiert stabile Zelllinien**

Zelllinie	Transfiziertes Plasmid	Eigenschaften	Medium
HEK-293T	pcDNA3.1-CD14- <i>mFc</i> -91aa-8xHis	Produktion des 91aa-Fragmentes	DFG-Zeocin
	pcDNA3.1-CD14- <i>mFc</i> -Cys9-8xHis	Produktion des Cys9-Fragmentes	
	pcDNA3.1-CD14- <i>mFc</i> -Cys2/3-8xHis	Produktion des Cys2/3-Fragmentes	
	pcDNA3.1-CD14- <i>mFc</i> -vWD4-8xHis	Produktion des vWD4-Fragmentes	

### 4.1.3 Plasmide und Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 5 und die generierten Plasmide zuzüglich der genutzten Primer sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 5: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Abkürzung	Verwendung	Bezugsquelle
pcDNA3.1-zeo(+)	pcDNA3.1	Basisvektor für die eukaryotische Proteinexpression	Invitrogen AG
pEGFP-N1	pGFP	Reportergen	Invitrogen AG
pMAL-p5X	pMAL	Basisvektor für die prokaryotische Proteinexpression	Invitrogen AG

<b>Plasmid</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
pN-BLa-GFP	N-BLa	Prokaryotische GFP-Expression	Martin Seiler, AG Friedrich
pC-BLa-GFP	C-BLa	Prokaryotische GFP-Expression	Martin Seiler, AG Friedrich

**Tabelle 6: Generierte Plasmide**

<b>Plasmid</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Primer</b>
pcDNA3.1-CD14- <i>mFc-91aa-8xHis</i>	pCD14SP- <i>mFc-45M1Epitop-8His_zeo</i>	45M1_ <i>mFcTag_fwd</i> 45M1_ <i>mFcTag_rev</i>
pcDNA3.1-CD14- <i>mFc-Cys9-8xHis</i>	pCD14SP- <i>mFc-45M1Epitop-Cys9-8His_zeo</i>	45M1_ <i>mFcTag_fwd</i> pcDNA14_45M1_ <i>Cys9_rev</i>
pcDNA3.1-CD14- <i>mFc-Cys2/3-8xHis</i>	pCD14SP- <i>mFc-MUC5AC-Cys3-8His_zeo</i>	Epitop1_ <i>Cys3_fwd</i> Epitop1_ <i>Cys3_rev</i>
pcDNA3.1-CD14- <i>mFc-vWD4-8xHis</i>	pCD14SP- <i>mFc-45M1Epitop-vWD4mutBamHI-8His_zeo</i>	45M1_ <i>mFcTag_fwd</i> pcDNA14_45M1vWD_ <i>rev</i>
pcDNA3.1-P5D4- <i>Cys9-8xHis</i>	pcDNA3.1-P5D4- <i>Cys9-HIS</i>	Cys9_ <i>intrazell_fwd</i> Cys9_ <i>intrazell_rev</i>
pcDNA3.1-P5D4- <i>Cys2/3-8xHis</i>	pcDNA3.1-P5D4- <i>MUC5AC_Cys3-His</i>	MUC5AC- <i>Cys3_Intra_fwd</i> MUC5AC- <i>Cys3_His_Intra_rev</i>
pcDNA3.1-P5D4- <i>vWD4-8xHis</i>	pcDNA3.1-P5D4- 45M1vWD4mutBamHI- <i>His</i>	Keine Primer, kein Insert Generierung mittels Gensynthese
pMAL-p5X-malE- 91aa	pMAL-p5X-45M1Epitop	pMal-p5X-45M1- <i>for</i> pMal-p5X-45M1- <i>rev</i>
pMAL-p5X-malE- <i>Cys2/3-8xHis</i>	pMAL-p5X- <i>MUC5AC-Cys3-His</i>	pMal-p5X- <i>MUC5AC-Cys3_for</i> pMal-p5X- <i>MUC5AC-Cys3_rev</i>

#### 4.1.4 Antikörper

Die für diese Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7: Verwendete Antikörper**

Bezeichnung	Epitop	Methode	Konzentration	Spezies	Quelle
45M1	MUC5AC	WB, DZ	1:50 bis 1:1000	Maus (m)	Invitrogen AG
anti-6xHis FITC	His-Tag	DZ	1:50	Maus (m)	Invitrogen AG
anti-His	His-Tag	WB	1:1000	Maus (m)	Quiagen
anti-P5D4-PE	P5D4-Tag	DZ	1:50	Maus (r)	Laborbestand AG Friedrich
<i>anti-IgGκ- Bindeprotein- HRP</i>	IgGκ-leichte Kette	WB	1:10000	Maus (r)	Santa Cruz Biotechnology
<i>goat-anti- mouse-PE</i>	<i>mouse-Fc-Teil</i>	DZ	1:100	Ziege (p)	ImmunoTools GmbH
<i>goat-anti- rabbit-FITC</i>	<i>rabbit-Fc-Teil</i>	DZ	1:200	Ziege (p)	ImmunoTools GmbH
C20	STAT3	DZ	1:100-1:200	Kaninchen (m)	Santa Cruz Biotechnology

(p) polyklonal, (m) monoklonal, (r) rekombinant

#### 4.1.5 Chemikalien, Feinchemikalien, Kits

2-β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
4-Iodophenylboronic acid (4-IPBA)	Sigma-Aldrich
Acrylamid-Bis-Lösung 30 % (Rotiphorese® Gel 40)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH + Co. KG
Agarose	Biozym Scientific GmbH
Albumin (BSA), Fraktion V	PAN-Biotech GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG
Aqua dest (Ampuwa®)	Fresenius Kabi AG
Biozym Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Biozym Scientific GmbH
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific
cOmplete™, Mini, Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blau	Carl Roth GmbH + Co. KG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG
dNTP-Mix (10 mM)	Biozym Scientific GmbH
dNTP-Mix (100 mM) (25x)	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN-Biotech GmbH
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol, rein oder vergällt	Nordbrand Nordhausen GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG
FastDigest™ Green Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
FastDigest™ Restriktionsenzyme (BamHI, NheI, XbaI, XhoI)	Thermo Fisher Scientific
Fetales Kälberserum (FKS)	PAN-Biotech GmbH
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Gentamicin 40 mg/ml	Ratiopharm GmbH
Glycerin	CHEMSOLUTE®

---

Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG
IGEPAL NP-40	Sigma-Aldrich
Imidazol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumphosphat (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG
Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific
Luminol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
Metafectene®	Biontex
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Midori Green Advance DNA Stain	Biozym Scientific GmbH
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumsuccinat	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ni-NTA-Superflow	QIAGEN
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel™
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel™
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel™
Opti-MEM® Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific
P3000™	Thermo Fisher Scientific
Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)	InvivoGen

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Reverse Transkriptase Random Primers (10x)	Thermo Fisher Scientific
Reverse Transkriptase Reaction Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
RPMI 1640	PAN-Biotech GmbH
S7 Fusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μl)	Biozym Scientific GmbH
S7 HF Puffer (5x)	Biozym Scientific GmbH
Salzsäure 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
T4 DNA Ligase (5 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
Taq-Puffer (10x)	Biozym Scientific GmbH
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tris-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Triton™ X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech GmbH
Trypton/ Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH + Co. KG
TurboFect™ Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific
Tween®20	Carl Roth GmbH + Co. KG
Wasserstoffperoxid 30 % (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG
Zeocin	Genaxxon bioscience GmbH

#### 4.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

ÄktaPurifier®	GE Healthcare Life Sciences
Bakterieninkubator INCU-Line®	VWR International
Bakterienschüttelinkubator	Infors HT
Celluloseacetat-Membranfilter	Advantec
CO <sub>2</sub> -Inkubator	NuAire
CryoPure Röhren	Sarstedt
Dialysierschläuche Visking (10 mm, 25 mm, 44 mm)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Durchflusszytometer CyFlow® Space	Sysmex Partec GmbH
Einkanal-Mikroliterpipette Transferpette® R	BRAND GmbH & co. KG

---

Elektrophorese- und Transferkammer Mini-PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories
Elektrophorese-Netzgerät PowerPac™ 200	Bio-Rad Laboratories
Elektroporationsküvetten	Biozym Scientific GmbH
Geldokumentationsgerät G:BOX	Syngene
Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories
Heizblock Dri-Block® DB-2A	Techne
HiTrap™ Protein G HP	GE Healthcare Bio-Science
Laborwaage TE412	Sartorius AG
Lichtmikroskop Motic AE21	Motic
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld Superior
Ni-NTA Superflow Cartridge	Qiagen
Nucleofector® I	Amara (heute Lonza Group AG)
PCR Soft Tubes (0,2 ml)	Biozym Scientific GmbH
Petrischalen	Sarstedt
pH-Meter 761 Calimatic®	Knick International
Pipettierhilfe accujet® pro	BRAND GmbH & co. KG
Reagiergefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Röhrchen (3,5 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Greiner Bio-One
Spektralphotometer NanoDrop™ 2000	PEQLAB GmbH
Standard-Zellkulturflaschen CELLSTAR®	Greiner Bio-One
Sterilwerkbank	NuAire
Suspensions-Zellkulturflaschen CELLSTAR®	Greiner Bio-One
Thermocycler 2720	Thermo Fisher Scientific
Tischzentrifuge 5414R	Eppendorf AG
Transfermembran Roti®-PVDF	Carl Roth GmbH + Co. KG
Transilluminator UV Fluo-Link	Biometra GmbH
UP100H Ultrasonic Processor	Hielscher Ultrasonics
Zellkultur-Mikroplatte, Flachboden	Greiner Bio-One
Zellkultur-Rollerflasche (1700 cm <sup>2</sup> )	Corning
Zentrifugationsfilter Amicon® Ultra-4 10K	Merck KGaA
Zentrifuge ROTINA 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG

## 4.2 Molekularbiologische Verfahren

### 4.2.1 PCR-Techniken

Zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen, welche dann in weiteren Schritten entweder zur molekularbiologischen Klonierung, zu Colony-PCR-Verfahren oder zur Überprüfung eines evtl. Mycoplasmenbefalls der Zellkultur dienen, wurde die *polymerase chain reaction* (PCR) genutzt. Dabei wird das zu untersuchende Template mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase mit dNTPs, Magnesium-Chlorid-Lösung sowie spezifischen Primern gemischt und anschließend in einen Thermalcycler amplifiziert. Je nach Anwendung wurden unterschiedliche Polymerasen eingesetzt. Die ersten Ansätze wurden immer mit taq-Polymerase durchgeführt. Bei fehlerhaften Sequenzen wurden die PCR-Experimente mit der S7-Fusion-Polymerase wiederholt, da diese *proof-reading* durchführen kann und somit genauere Ergebnisse liefert. Die Elongationstemperatur wurde der Schmelztemperatur der Primer angepasst, die Elongationszeit hingegen der Größe des zu untersuchenden DNA-Oligomers. Die einzelnen Versuchsansätze sind den Protokollen des Herstellers zu entnehmen.

Die cDNA, welche für die oben beschriebenen PCR-Techniken verwendet wurde, konnte mittels Reverse-Transkriptase-Reaktion aus mRNA gewonnen werden. Dazu wurde das *high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit* der Firma Thermofisher verwendet. Die Mengenangaben der Substanzen sowie die Cyclereinstellungen wurden dem Protokoll des Herstellers entnommen.

### 4.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur größenabhängigen Auftrennung von Nukleinsäuren dient die Agarose-Gelelektrophorese. Die Agarosemenge ist abhängig von der zu untersuchenden DNA-Länge, wobei in den meisten Versuchen Gele mit einem Agarosegehalt von 1 % [w/v] genutzt wurden. Dabei werden in 50 ml TAE-Puffer (50x TAE-Puffer (pH 8,0): 2 M TRIS; 5,7 % [v/v] Essigsäure; 50 mM EDTA) 0,5 g Agarose gegeben und zum Lösen mehrmals aufgekocht. Den noch flüssigen Gelen werden 3 µl DNA-Farbstoff *Midori-Green* hinzugefügt und zum Aushärten in die vorgefertigten Formen der Firma Bio-RAD gegossen. Die Auftrennung erfolgt konstant bei 100 V. Als Laufpuffer dient auch TAE-Puffer.

### 4.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach präparativen PCR-Ansätzen werden die Amplifikate weiterverwendet, wobei eine Extraktion aus dem Agarosegel notwendig ist. Die Aufreinigung wird mittels des *Gel-Extraction-Kits* der Firma Macherey Nagel<sup>TM</sup> nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

### 4.2.4 Restriktionsverdau und Ligation

Für molekulare Klonierungsansätze wird Fremd-DNA (Insert) in ein Vektorplasmid (Backbone) eingebaut. Dabei wird die Passgenauigkeit von sogenannten *sticky ends* genutzt. Mittels dieser lässt sich eine spezifische Religation (siehe unten) durchführen, bei der in 40 µl Ansätzen 5 µg der zu verdauenden DNA-Fragmente mit je 2 µl des spezifischen Restriktionsenzym und 4 µl 10-fach-Probenpuffer für 1 h bei 37 °C inkubiert werden. Die Erfolgskontrolle wird mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Die zu erwartenden Banden werden unter Blaulicht sichtbar und mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Es folgt eine DNA-Extraktion aus dem Gel mit anschließendem Restriktionsverdau mittels Endonukleasen. Durch die entstandenen *sticky ends* können Insert und Backbone unter Katalyse durch die T4 Ligase wieder eine Phosphodiesterbindung untereinander ausbilden. Die Durchführung erfolgte dabei nach Protokoll des Herstellers.

### 4.2.5 Transformation

Zur Vervielfachung des aus präparativen PCR-Ansätzen entstandenen Expressionskonstruktes wird dieses zunächst in *E. coli*-Zellen eingebracht und anschließend durch Zellteilung vermehrt.

Die vorher chemisch kompetent gemachten und bei - 80 °C gelagerten Bakterien werden für 10 min auf Eis aufgetaut. Danach werden max. 0,1 µg DNA in die Bakteriensuspension gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgen ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C sowie eine 5 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend werden 500 µl LB-Medium (1 % Hefe [w/v]; 1 % NaCl [w/v]; 0,5 % Pepton [w/v]) der Bakterien-DNA-Suspension zugefügt und für 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Es folgen das Zentrifugieren der Lösung für 5 min bei 4000 rpm und das Resuspendieren des entstandenen Pellets mit einer 1000 µl Pipette in 100 µl LB-Medium. Die Bakterien werden dann mittels Verdünnungsausstrich auf

antibiotikahaltigen Agarplatten, verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dabei ist die Resistenz abhängig vom Resistenzgen des Backbones.

#### **4.2.6 Co-Transformation von pN-BLa-GFP und pC-BLa-GFP Konstrukten**

Zur Verwendung der pN-BLa-GFP und pC-BLa-GFP Konstrukte wurde der Bakterienstamm JM83 verwendet, da dieser keine Arabinose verstoffwechselt. Der Ablauf erfolgte wie unter 4.2.5, jedoch wurden für jedes Plasmide 50 - 60 ng DNA verwendet.

#### **4.2.7 Animpfen einer Bakteriensuspension**

Nach erfolgter Transformation wurden die gewachsenen Klone jeweils mittels einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und in je ein Well einer 24-Well-Platte in 1 ml LB-Medium und dem dazugehörigen Selektionsantibiotikum überführt. Anschließend wurde die 24-Well-Platte bei 37 °C und 170 rpm für 5 - 6 h inkubiert.

#### **4.2.8 Plasmidisolierung aus Bakteriensuspensionen**

Um die durch exponentielle Zellteilung vervielfältigten Plasmide aus einer Bakterienkultur zu isolieren, wurden Kits der Firma Macherey Nagel<sup>TM</sup> verwendet. Für kleine Mengen, welche zur Sequenzanalyse verschickt wurden, wurde das Kit Mini-Prep verwendet, für große Mengen zur Plasmidvervielfältigung das Kit Midi-Prep. Die Durchführung fand nach Firmenprotokoll statt.

#### **4.2.9 Herstellen chemokompetenter Bakterien**

Um Fremd-DNA in Bakterien einzubringen, muss die Membran der verwendeten *E. coli*-Stämme für die Plasmide permeabel sein. Um das zu erreichen wurde von dem unaufgetauten Glycerolstock eine kleine Menge abgekratzt und in 10 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 170 rpm inkubiert. Je nach Stamm wurden Antibiotikazusätze zugegeben (XL-1 blue 1 µg/ml Tetracyclin, JM83 50 µg/ml Streptomycin). Aus der Vorkultur wurden 1 ml in 100 ml einer Hauptkultur angeimpft und bis zu einer  $OD_{660} = 0,3 - 0,4$  bei 37 °C und 170 rpm geschüttelt. Danach wurde diese in sterile 50 ml Falcons überführt und sofort auf Eis gestellt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm, 4 °C und 20 min. Nachdem der

Überstand abgenommen wurde, wurde das Pellet einer 50 ml Kultur in 15 ml TFB-I-Lösung (30 mM KAcetat; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 100 mM KCl; 15 % [v/v] Glycerin; mit Essigsäure auf pH = 5,8 einstellen) aufgenommen und gemischt. Es folgten eine Inkubation auf Eis (XL-1 blue 30 min, BL21-DE 120 min, JM83 45 min) und danach eine erneute Zentrifugation bei 2000 rpm, 4 °C für 20 min mit anschließendem Verwerfen des Überstandes. Das Pellet einer 50 ml-Kultur wurde dann in 2 ml TFB-II-Lösung (10 mM MOPS/NaOH pH = 7,0; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 15 % [v/v] Glycerin) aufgenommen und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Abschließend erfolgte eine letzte 20 minütige Inkubation auf Eis, wonach 150 µl Aliquots erstellt und sofort in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren wurden. Die Lagerung erfolgte bei - 80 °C.

### **4.3 Zellbiologische Verfahren**

#### **4.3.1 Kultivierung und Passagierung der Zelllinien**

Alle Arbeiten an eukaryotischen Zellen fanden bei sterilen Bedingungen unter einer Arbeitsbank statt. Die Zellen wurden in einem Zellinkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> sowie einer Luftfeuchtigkeit von 95 % aufbewahrt. Abhängig von den Wachstumsbedingungen wurden entweder Suspensionsflaschen oder Adhärenzflaschen verwendet.

HEK-293T-Zellen wurden in einer Adhärenzflasche kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen einmal in der Woche passagiert. Dazu wurden das überständige Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit 10 ml PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH = 7,2) gewaschen und mit 7 ml Trypsin bedeckt. Nach 5 minütiger Inkubation bei 37 °C wurden 7 ml Wachstumsmedium dazugegeben und die Zellen bei 500 *g* für 3 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte das Resuspendieren des entstandenen Zellpellets. Dabei wurde für die Weiterkultivierung 1/10 der resuspendierten Lösung in eine neue 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt.

THP-1-Zellen wachsen in Suspension und benötigen eine Mindestzelldichte von 2 x10<sup>5</sup> Zellen/ml Medium. Bei einer Dopplungszeit von 40 - 50 h wurden die Zellen alle 3 Tage gesplittet und nach Zellzahl ausgesät. Ab einer Passage von 25 wurde der Kulturansatz verworfen.

A549-Zellen wachsen adhären und wurden alle 3 - 4 Tage im Verhältnis 1 : 5 passagiert (siehe Passagierung von HEK-293T-Zellen)

### **4.3.2 Inkulturnahme und Kryokonservierung von Zellen**

Die bei - 80 °C gelagerten Zellen wurden mittels RT bis zum Herauslösen aus dem Kryotube aufgewärmt und dann sofort in Zellkulturmedium verdünnt. Um das zelltoxische Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 800 rpm für 3 min. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Bei der Inkulturnahme ist eine Regeneration der Zellen erforderlich, welche abhängig vom Zelltyp unterschiedlich lang dauern kann. Besonders bei THP-1-Zellen empfiehlt es sich, zu Beginn die Zellen in 2 ml Medium mit 20 % FKS in einer 12-Well-Platte auszusäen und das Wachstumsverhalten engmaschig zu kontrollieren, da die Zellen eine Mindest-Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml zum Wachsen benötigen.

Zur Kryokonservierung wurde eine vorgegebene Zellzahl geerntet, bei 1450 rpm für 5 min zentrifugiert und das entstandene Pellet in Einfriermedium resuspendiert (Nährmedium; 10 % [v/v] DMSO; 20 % [v/v] FKS). Danach wurden die gelösten Zellen in Kryogefäße aliquotiert und bei - 80 °C eingefroren

### **4.3.3 Bestimmung der Zellzahl**

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau-Lösung (0,5 % [w/v] Trypanblau in PBS) gemischt und 20 µl davon in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Durch die Trypanblaufärbung werden alle nicht-vitalen Zellen angefärbt. Unter dem Lichtmikroskop wurden alle leuchtenden Zellen in einem 4 x 4 Kammer-Quadranten gezählt und aus allen 4 Quadranten der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde die 1 : 1 Verdünnung verrechnet. Das Ergebnis entspricht  $n \times 10^4$  Zellen/ml.

### **4.3.4 Transiente Transfektion**

Mittels Transfektion werden Vektoren in eukaryotische Zellen eingebracht. Dabei wird zwischen Elektroporation und Komplexion unterschieden.

#### 4.3.4.1 Elektroporation/Nucleofection®

Prinzip der Elektroporation ist es, mittels hoher Spannungsimpulse die Zellmembranen durch Umpolung zu permeabilisieren. Bei diesem Verfahren wurde der Nucleofector® I der Firma AMAXA (heute Lonza) genutzt, welcher zusätzlich einen Gen-Transfer in die Nuklei ermöglicht. Dabei sind die zellspezifischen Programme auf der Firmenseite zu finden. In dieser Arbeit wurden für die THP-1-Zellen die Programme U-01, V-01 und X-01 genutzt und pro Ansatz  $10^6$  Zellen verwendet.

Zuerst wurden die Zellen bei 0,5 *g* für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Transfektionslösung V (90 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 90 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM NaSuccinat; pH = 7,2) aufgenommen, mit 0,5 µg der zu transfizierenden DNA gemischt und dann in speziellen Elektroporationsküvetten in den Nucleofector® gestellt. Nach erfolgtem Programmdurchlauf wurden die THP-1-Zellen in 1,5 ml RFG-Medium in 12-Well-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert.

#### 4.3.4.2 Komplexion

Mittels Komplexion wird die negativ geladene DNA durch positiv geladene Moleküle umhüllt und anschließend über Endozytose in die Zielzellen aufgenommen. Dabei wurden drei verschiedene Verfahren verwendet.

Um HEK-293T-Zellen zu transfizieren wurde die Turbofect®-Lösung verwendet. Der Ablauf erfolgte nach Firmenprotokoll.

Als alternative Komplexionsreagenzien wurden die beiden Verfahren Metafectene® und Lipofectamine 2000® genutzt, welche jedoch nur bei dem vergleichenden Ansatz bezüglich der Transfektionseffizienz von THP-1-Zellen verwendet wurden. Auch hier fand die Durchführung anhand des Herstellerprotokolls statt.

#### 4.3.5 Herstellung stabiler Zelllinien für die Proteinproduktion

Um höher prozessierte Proteine (z.B. Glycosylierung) zu synthetisieren, werden eukaryotische Plasmide verwendet und in HEK-293T-Zellen eingebracht. Dies geschieht mittels Transfektion durch die Turbofect®-Methode. Transfizierte Zellen werden unter Kontrolltransfektionsansätzen mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) in

5 ml DFG-Medium/Well einer 6 Well-Platte über Nacht inkubiert. Bei erfolgreicher Transfektion, welche bei einem positiven GFP-Signal wahrscheinlich ist, wird mittels Selektionsdruck durch Zugabe des Antibiotikums Zeozin (150 µg/ml DFG-Medium) das Herausbilden einer stabilen Zelllinie angestrebt.

#### **4.3.6 Herstellung von Ganzzelllysaten**

Um intrazellulär exprimierte Proteine aufzuschließen, wurden die transfizierten Zellen mittels Lyseverfahren geöffnet. Dabei wurden eine dichtbewachsene 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche nach Entfernen des Mediums einmal vorsichtig in PBS geschwenkt und anschließend die Zellen mit Trypsin in Suspension gebracht und bei 4 x10<sup>3</sup> rpm für 4 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 100 µl RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 1 % IGEPAL NP-40; 0,5 % [w/v] Natriumdesoxycholat; 0,1 % [w/v] SDS; 50 mM TRIS; pH = 8,0), welcher zuvor mit Protease-Inhibitor (cOmplete™ Mini, aus 10 fach Stock verdünnt) gemischt wurde, aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Ein weiterer Zentrifugationsschritt erfolgt bei 13,2 x10<sup>3</sup> rpm für 15 min bei 4 °C. Der erhaltene Überstand ist das Lysat und wird in 500 µl-Tubes bei - 20 °C gelagert.

#### **4.3.7 Intrazelluläre Färbung eukaryotischer Zellen**

Der auf dem EDIM-Verfahren aufbauende PanTum Detect-Test nutzt das Fap-Kit® der Firma Mab-Tag zur intrazellulären Detektion mittels Antikörper-Antigen Interaktion.

THP-1-Zellen wurden zuerst bei 450 g für 5 min zentrifugiert. Zur Fixierung der Zellen wurde das Pellet in 100 µl Fix-Lösung mittels vorsichtigem Klopfen resuspendiert, woran sich eine Inkubation von 20 min bei RT und Dunkelheit anschloss. Es folgte ein Waschschrift mit 500 µl PBS, bei welchem ca. 150 µl Überstand verbleiben sollten. In diesem wurden die Zellen mittels vorsichtigem Klopfen wieder resuspendiert und für 2,5 min bei Dunkelheit und RT inkubiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Abschließend wurde die Lösung durch vorsichtiges Pipettieren homogenisiert, wobei Blasenbildung zu vermeiden ist. Es wurden dann 100 µl Permeabilisierungslösung (50 µl PBS + 50 µl Perm-Lösung) zu der Zellsuspension gegeben und für 5 min inkubiert. Danach kam es zur Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern. Zwischen diesen beiden Inkubationsschritten wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und neu in 100 µl Permeabilisierungslösung

aufgenommen. Sollte der primäre Antikörper mit einem Fluorophor konjugiert sein, ist nur ein Inkubationsschritt notwendig. Am Ende wurden die Zellen noch zweimal mit PBS gewaschen und danach in 150 µl Überstand wieder mittels Klopfen resuspendiert. Es folgte eine 30 minütige Erholungsphase der Zellen, bevor diese dann in PBS zytometrisch vermessen werden konnten.

#### 4.3.8 Phagozytoseassay

Die zu phagozytierenden Antigene wurden zuvor mittels Transformation und anschließender Induktion in *E. coli* exprimiert. In einem ersten Schritt wurden in 6-Well-Platten pro Well  $5 \times 10^5$  THP-1-Zellen in 3 ml RFG-Medium ausgesät und mit einer PMA-Konzentration von 200 nM/Ansatz für 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden die induzierten Bakterien auf eine Anzahl von ca.  $2,8 \times 10^8$  verdünnt. Dabei entspricht eine  $OD_{660}=1,0$   $8 \times 10^8$  Bakterien pro ml Medium. Die Inaktivierung erfolgte durch Erhitzen der zu verwendenden Menge an Bakteriensuspension für 1 h bei 62 °C und Zentrifugieren bei 4000 rpm für 3 min. Das entstandene Pellet wurde in PBS gelöst. Um die Inaktivierung der Bakterien zu überprüfen, wurde das resuspendierte Pellet auf einer mit dem entsprechenden Resistenzantibiotikum versetzten Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Als Kontrolle diente dabei ein Ausstrich aus der nicht-inaktivierten Kultur.

In einem nächsten Schritt wurden die ausdifferenzierten THP-1-Makrophagen mit den inaktivierten Bakterien bei einer *multiplicity of Infectiousness* (MOI) von 500 inkubiert. Das entspricht 500 Bakterien/1 THP-1-Zelle. Die Inkubationszeiten betragen 15 min, 30 min, 1 h, 2 h 3 h und 4 h. Nach der Inkubation wurden der Überstand verworfen und die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst und nach 3 min Inkubation mit Hilfe eines Zellschabers wieder in Suspension gebracht. Die Reaktion wurde mit Medium gestoppt und die Zellen bei 350 g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit kaltem PBS + 1 % BSA und 1 mM EDTA gewaschen und nochmals bei 450 g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet konnte dann fixiert und gefärbt werden.

Umgang mit PMA: Aufgrund der Kanzerogenität des Stoffes wurden alle Kontaktmaterialien in 1M KOH oder 1M NaOH Lösung gegeben und für 24 h inkubiert, um das kanzerogene PMA zu inaktivieren. Danach konnte das Gemisch über den Abfluss entsorgt werden.

### 4.3.9 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie ist es möglich, einzelne Zellen mittels Antikörper zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde dabei die intrazelluläre Färbung genutzt, um zytoplasmatisch vorliegende Proteine zu bestimmen. Die Detektion findet hierbei mittels spezifischer Antikörper-Antigen-Interaktion statt, wobei fluorophorkonjugierte Antikörper mittels Laser angeregt werden und abhängig vom verwendeten Fluorophor eine Emission messbar ist. Das ermöglicht quantitative Aussagen über Zellsuspensionen.

Die Proben wurden nach erfolgter intrazellulärer Färbung in PBS aufgenommen und anschließend zytometrisch vermessen. Je nach Fluorophor wurden unterschiedliche Detektoren verwendet, wobei FL1 für Färbungen mit *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) und FL2 für Färbungen mit *Phycoerythrin* (PE) genutzt wurden. Als Datendarstellung wurden entweder Dotplotdiagramme oder Histogrammanalysen verwendet. Die Autofluoreszenz der Zellen wurde bei der Wahl der Negativkontrollen berücksichtigt, indem in der Dotplotdarstellung die autofluoreszierende Population immer im unteren linken Quadranten eingeschlossen ist. Eine Verschiebung des Fluoreszenzsignals entlang der Achsen wurde als spezifische Antikörperbindung interpretiert. Aufgrund der Logarithmischen Normalverteilung der Daten und des schwer zu objektivierenden Gatings wurden bei den Histogrammanalysen der  $X_{geoMean}$  als Vergleichsmaß der einzelnen Untersuchungen betrachtet. Dieser entspricht dem mittleren Maximum der Fluoreszenzintensität. Dabei wurde in den Histogrammdarstellungen immer die Differenz zwischen der zu untersuchenden Probe mit dem Leerwert und somit die Veränderung der Fluoreszenzmaxima ( $\Delta X_{geoMean}$ ) angegeben. Dabei wurden vorher keine Gates gesetzt, weshalb die dort angegebenen Werte sehr klein sind.

## 4.4 Proteinbiochemische Verfahren

### 4.4.1 SDS-PAGE

Um Proteine der Größe nach aufzutrennen, werden SDS-Polyacrylamidgele genutzt. SDS dient hierbei als Detergens, welche die Proteinladung überdeckt, die Proteine negativ lädt und dadurch eine Auftrennung im elektrischen Feld ermöglicht, welche nur durch die Proteingröße bestimmt ist. Je nach Proteingröße kann die Porengröße durch den Acrylamidanteil variiert

werden. Zur Untersuchung von Proteinen mit einer Molekülgröße von 55 kDa wurden 15 prozentige SDS-Gele verwendet. Das Gel besteht aus 2 Teilen, einem Sammelgel und einem Trenngel, welche sich chemisch unterscheiden: Sammelgelpuffer (0,65 M TRIS; pH = 6,8) und Trenngelpuffer (2,5 M TRIS; pH = 8,0). Die genaue Gelzusammensetzung ist Tabelle 8 zu entnehmen. Nach erfolgter Zubereitung der Gele werden diese in den dafür vorgesehenen Halterungen (BioRad) platziert und mit Elektrophoresepuffer (2 M Glycin; 0,25 M Tris; 35 mM SDS) übergossen. In die Taschen werden die zuvor mit Probenpuffer (33,3 % [v/v] SDS-Lösung (20 % SDS); 10 % [v/v] TRIS-Lösung (1 M pH=6,8); 33,3 % [v/v] Glycerol; 33,3 % [v/v] Mercaptoethanol; Spatelspitze Bromphenolblau) für 5 min bei 95 °C denaturierten Proben appliziert. Zur Durchquerung des Sammelgels wurde eine konstante Spannung von 150 V für ca. 20 min angelegt; danach erfolgte die Passage des Trenngels bei ca. 200 V für 90 min.

**Tabelle 8: Exemplarische Zusammensetzung von SDS-Gelelen**

Bestandteil	Trenngel		Sammelgel
	Geldichte		
	12,5 %	15 %	
Aqua dest	2,1 ml	1,3 ml	2 ml
Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer	2 ml	2 ml	1,3 ml
Acrylamidlösung (40 %)	3,7 ml	4,5 ml	0,7 ml
Glycerin (40 %)	4 ml	4 ml	1 ml
SDS (20 %)	50 µl	50 µl	25 µl
APS (10 %)	50 µl	50 µl	40 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

#### 4.4.2 Westernblot

Hierbei wurden zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, um einen spezifischen Proteinnachweis mittels Antikörperbindung zu ermöglichen. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der Proben wurde das SDS-Gel zum Bloten auf eine zuvor für 5 min in Methanol aktivierte

Membran gelegt und dann in die vorgesehene Apparatur von BioRad eingespannt. Mit 350 mA für 90 min kam es zur Übertragung der Proteine auf die Membran. Dies geschah in Transferpuffer (25 mM TRIS/HCl; 190 mM Glycin; 20 % [v/v] Ethanol; pH = 7,5).

#### 4.4.3 Immundetektion

Nach oben beschriebenem Blot wurde die Membran für 1 h in einer Milchpulverlösung (2 % [w/v] Milchpulver in TBS-T gelöst) inkubiert um nichtbesetzte Membranstellen zu blocken. Die folgenden Waschschrte wurden alle mit TBS-T-Puffer durchgeführt (154 mM NaCl; 130 mM TRIS; pH = 7,5; 0,1 % [v/v] Tween® 20 gelöst in H<sub>2</sub>O). Es folgten zwei fünfminütige Waschschrte sowie eine Inkubation über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (1:200 bis 1:1000 [v/v] in 0,003 % NaN<sub>3</sub> [w/v] gelöst in TBS-T). Dabei wurde die Antikörperkonzentration dem verwendeten Antikörper entsprechend angepasst.

Am nächsten Tag wurde nach fünf zehnminütigen Waschschrten mit TBS-T die Membran mit dem sekundären Antikörper (1:10000 [v/v] in TBS-T gelöst) für 1 h inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist mit dem Enzym *horse-raddish-peroxidase* (HRP) gekoppelt. Es folgten wieder drei fünfminütige Waschschrte.

Die Detektion erfolgte mittels 1 ml ECL-Lösung (22,1 mg Luminol; 6,6 ml 1,5 M TRIS (pH = 8,8); 2 ml 4-IPBA; 91,4 ml Aqua dest; 0,56 µl 20 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung) im Geldokumentationsgerät G:BOX.

#### 4.4.4 Coomassie-Färbung

Zur unspezifischen Proteinbestimmung nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurde die Coomassie-Färbung genutzt. Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteinproben wurden für 1 h in Coomassie-Lösung (0,25 % [w/v] Coomassie Brillant Blau; 45 % [v/v] Methanol; 45 % [v/v] Aqua dest; 10 % [v/v] Essigsäure) inkubiert. Danach erfolgte das Entfärben mittels mehrmaligem Aufkochen und Abkühlen des Gels in Wasser.

#### 4.4.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung ermöglicht eine unspezifische Proteindetektion von SDS-Polyacrylamidgelen, wobei dieses Nachweisverfahren sensitiver als die Coomassie Färbung ist. Alle Inkubationszeiten fanden bei RT statt, Rezepte siehe unten. Die Gele wurden

zuerst in einer Glas-Petrischale für 60 min mit Fixierlösung inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit zuerst 50 % Ethanol und anschließend 30 % Ethanol für je 15 min. Anschließend wurde das Gel direkt für genau 1 min in Natriumthiosulfat-Lösung geschwenkt und dreimal für 30 s mit Wasser gewaschen. Es folgten die Färbung mit Silbernitratlösung für 20 min und drei weitere Waschschrte mit Wasser. Zum Sichtbarmachen der Banden musste das Gel mit der Entwicklerlösung inkubiert werden, wobei ein häufiges Wechseln dieser Lösung die Hintergrundanfärbung reduziert. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Gel für 5 min mit 5 % Essigsäure inkubiert und anschließend nochmals zweimal für 10 min mit Wasser gewaschen.

#### Rezepte:

Natriumthiosulfat-Lösung:	0,02 % [w/v] $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
Silbernitratlösung:	100 mg $\text{AgNO}_3$ , 37 $\mu\text{l}$ 37 % Formaldehyd, 50 ml Aqua dest
Fixierlösung:	100 ml Methanol, 24 ml Essigsäure, 76 ml Aqua dest, 100 $\mu\text{l}$ 37 % Formaldehyd.
Entwicklerlösung:	12 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 80 $\mu\text{l}$ 0,1 % [w/v] $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 100 $\mu\text{l}$ 37 % Formaldehyd, 200 ml Aqua dest

#### **4.4.6 Bakterielle Proteinexpression von pMAL Konstrukten in *E. coli* BL21 (DE3)**

Nach erfolgter Transformation des Vektors wurden 6 Kolonien in 5 ml LB-Medium (mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin) gegeben und bei 180 rpm und 37 °C geschüttelt. Bei einer  $\text{OD}_{660} = 0,5 - 0,7$  wurden 1 ml je Probe im Kühlschrank für eine spätere Induktion gelagert. Die verbliebenen Proben wurden mit 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches als künstlicher Induktor des Lac-Operons eingesetzt wird, für 5 – 6 h bei 180 rpm und 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden je Probe 20  $\mu\text{l}$  mittels reduzierender SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung auf erfolgreiche Induktion überprüft.

Nach erfolgter Proteinexpression konnten die *E. coli*-Zellen für das Phagozytoseassay weiterverwendet werden.

#### **4.4.7 Bakterielle Proteinexpression von N-BLa-GFP-C-BLa-GFP Konstrukten in *E. coli* JM 83**

Die Proteinexpression der N-BLa-GFP-C-BLa-GFP-Konstrukten erfolgte in dem *E. coli* Stamm JM83, welcher nicht Arabinose verstoffwechseln kann. Dabei wurde anfangs wie unter 4.4.6 vorgegangen. Als Resistenzantibiotika wurden 34 µg/ml Chloramphenicol und 34 µg/ml Kanamycin verwendet. Nach generierter Vorkultur wurden diese mit 1,33 mM Arabinose und 0,3 mM IPTG für 5 - 6 h bei 180 rpm und 37 °C induziert. Die Proteinexpression wurde qualitativ über die GFP-Fluoreszenz mikroskopisch überprüft.

#### **4.4.8 Inaktivierung von *E. coli*-Zellen**

Um eine Inkubation von *E. coli*-Zellen in einem eukaryotischen Zellsystem zu ermöglichen, war eine vorherige Inaktivierung der prokaryotischen Zellen notwendig. Dazu wurde die benötigte Bakterienmenge für eine spätere MOI von 500 mittels der OD<sub>660</sub> ausgerechnet. Es wurde davon ausgegangen, dass bei *E. coli* eine OD<sub>660</sub> = 1,08 x10<sup>8</sup> Zellen/ml entspricht. Anschließend wurden die Bakterien für 1 h bei 62 °C auf dem Heizblock inaktiviert, was durch Ausstreichen auf Agarplatten und anschließend ausbleibendem Wachstum überprüft wurde. Für die Weiterverwendung wurden die Bakterien bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert und in PBS resuspendiert.

#### **4.4.9 Pull-down-Assay eukaryotisch exprimierter Proteine**

Mittels Histidin-Tag (His-Tag) ist es möglich, Proteine über Nickel-NTA-Agarose-Beats aus einem Gemisch zu isolieren. Dabei wurden in 5 ml Zellkulturüberstand 10 µl der Ni-NTA-Beat-Lösung gegeben und für 1 h bei RT geschwenkt. Nach erfolgter Zentrifugation bei 4000 rpm für 5 min wird das Pellet vorsichtig in 1 ml Waschpuffer A (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH = 7,4) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Zur Elution wurde das Pellet in 40 µl Elutionspuffer B (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol; pH = 7,4) vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der erhaltene Überstand konnte mittels reduzierendem SDS-PAGE und anschließendem WB und spezifischer Detektion mittels anti-His-Tag-AK auf Proteinexpression überprüft werden.

#### 4.4.10 Aufreinigung eukaryotisch exprimierter Proteine

Um die durch die stabilen HEK-293T-Zellen generierten Proteine aus dem Zellkulturüberstand zu gewinnen, wurden diese mittels *fast protein liquid chromatography* durch das System Äkta Purifier® aufgereinigt. Alle produzierten Proteine wiesen einen C-terminalen 8x His-Tag auf, wodurch diese sich spezifisch an Ni-NTA-Säulen binden. Dazu wurde das Proteingemisch zuerst für 24 h bei 4 °C gegen Natrium-Phosphat-Puffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH = 7,4) dialysiert, am nächsten Tag durch eine Cellulose-Acetat-Membran filtriert und anschließend der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Nach Vorwaschen und Equilibrieren der Chromatographie-Anlage mittels Waschpuffer A (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH = 7,4) konnte der vorbereitete Überstand auf die Säulen aufgetragen werden (Geschwindigkeit 2 ml/min). Nach erfolgtem Waschschrift konnte das gebundene Protein mittels eines imidazolhaltigen Elutionspuffers B (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol; pH = 7,4) von der Säule durch kontinuierliche Erhöhung des Elutionspuffers (0 – 100 % in 10 min, Flussgeschwindigkeit 1 ml/min) abgelöst werden. Dabei wurde der proteinhaltige Anteil durch Absorbanzänderung bei 280 nm Extinktionswellenlänge abgeschätzt. Die Elutionsfraktionen konnten anschließend mit Hilfe von Silberfärbung und WB auf Verteilung der spezifischen Proteinbanden überprüft werden. Die Fraktionen mit erhöhtem Zielproteingehalt wurden vereinigt und gegen PBS im Verhältnis 1:100 über Nacht dialysiert. Am darauffolgenden Tag konnten mittels Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm über die Absorbanzänderung die Proteinkonzentration bestimmt werden. Der erhaltene Wert musste anschließend noch durch den spezifischen Extinktionskoeffizienten, welcher sich aus der Primärstruktur des Proteins ableitet, geteilt werden, wobei hier davon ausgegangen wurde, dass alle Cysteine eine Disulfidbindung eingehen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Produktion von rekombinanten Proteinfragmenten des MUC5AC

Für die Durchführung des EDIM-Assays im Zellmodell, in welchem MUC5AC intrazellulär detektiert werden soll, müssen Proteine erzeugt werden, welche durch den Antikörper 45M1 detektierbar sind. Das Epitop des Antikörpers 45M1 ist auf Ebene der Primärstruktur bisher nicht beschrieben. In der Literatur sind bisher Eingrenzungen und Zuweisungen der Bindungsstelle zu einzelnen Domänen des Vollängenproteins veröffentlicht worden. Aufgrund des hohen molekularen Gewichts des Glykoproteins MUC5AC (siehe 2.3), ist die rekombinante Expression des Vollängenproteins technisch schwer durchführbar. Deswegen wurden in der folgenden Arbeit Polypeptidfragmente, welche Teile des MUC5AC widerspiegeln, rekombinant hergestellt, um später auf Interaktion mit dem Antikörper 45M1 überprüft werden zu können.

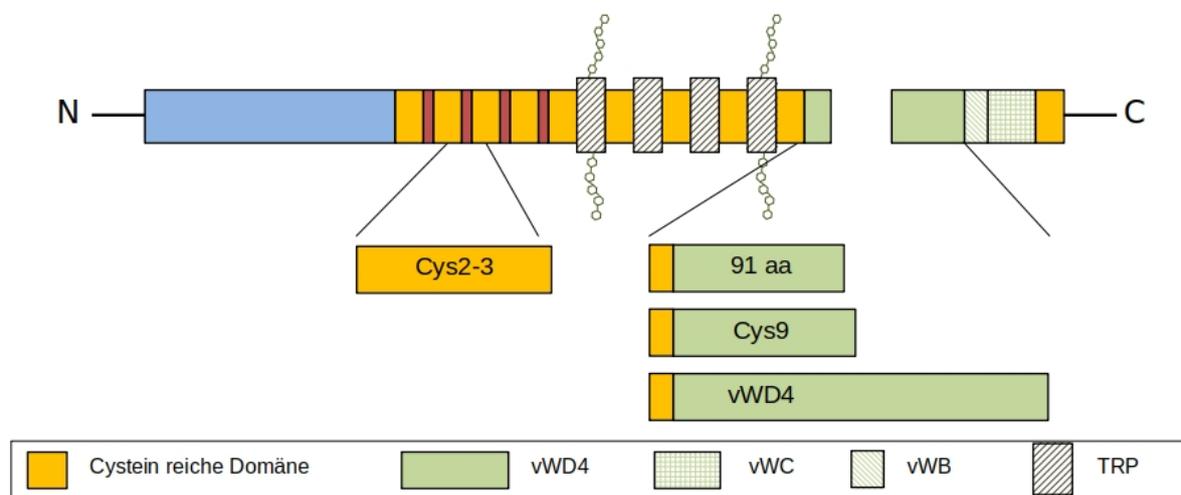
#### 5.1.1 Generierung von Expressionskonstrukten für die rekombinante Proteinherstellung

Stellvertretend für das Vollängenprotein wurden vier verschiedene Fragmente erstellt, welche unterschiedliche Sequenzen von MUC5AC widerspiegeln. Diese basieren auf in der Literatur bereits beschriebenen, mit 45M1 reaktiven Proteinfragmenten (Lidell *et al.* 2008, Liu *et al.* 2015).

Der C-Terminus des MUC5AC besteht aus hintereinander gereihten von-Willebrand-Domänen (Abbildung 4). Dabei ist eine einundneunzig Aminosäuren umfassende Sequenz im N-terminalen Bereich des C-Terminus relevant für die Bindung des Antikörpers (Lidell *et al.* 2008). Darauf aufbauend wurden zwei Proteinfragmente, die einundneunzig Aminosäuren umfassende Sequenz (91aa) und diese Sequenz erweitert um die benachbarte von-Willebrand-Domäne-4 (vWD4), rekombinant hergestellt. Die Inserts wurden per Auftragssynthese erstellt. Die Klonierungsabläufe werden im späteren Text detaillierter erläutert. Als Expressionsvektoren dienten dazu die Plasmide pcDNA3.1-CD14-*mFc*-Insert-His für extrazelluläre Expression und pcDNA3.1-P5D4-Insert-His für intrazelluläre Expression. Der P5D4-Tag (Kreis 1986) des zuletzt genannten Plasmides eignet sich dabei

vor allem als Expressionkontrolle in zytometrischen Versuchen, wobei der His-Tag vor allem in Westernblot-Studien verwendet wurde.

Basierend auf ihrer Publikation von 2015 zeigten Liu *et al.*, dass ein 331 Aminosäuren umfassendes rekombinant hergestelltes Protein durch 45M1 im Westernblot detektierbar ist und somit das kleinste in der Literatur beschriebene Proteinepitop darstellt. Bezogen auf das Vollängenprotein spiegelt dieses Teilfragment die cysteinreichen Regionen 2 und 3 (Cys2/3) des MUC5AC wider (Abbildung 4), welche im mittleren Bereich des Glykoproteins liegen.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Primärstruktur von MUC5AC und der für die Expressionsversuche in dieser Arbeit verwendeten Teilbereiche**

AS-Anzahl = 5654; vW = von-Willebrand-Domäne (D4, C und B), TRP = *tandem repeat region*; Die Glykosylierungsketten sind beispielhaft den TRP angehängt. Weitere Details siehe Text

In ihren Untersuchungen wurden zudem zwei in 128 Aminosäuren übereinstimmende Proteinfragmente exprimiert, welche beide vom Antikörper 45M1 in Westernblotstudien erkannt werden konnten. Darauf aufbauend wurde ein Vergleich der Aminosäuresequenzen mittels des *Protein-BLAST* (Altschul *et al.* 1990) durchgeführt, welcher eine 124 Aminosäuren (Cys9) umfassende und in diesen beiden Expressionskonstrukten übereinstimmende Proteinsequenz ergab. Dieser Sequenzbereich ist in der Primärstruktur von MUC5AC mit einzelnen Aminosäureabweichungen wiederkehrend und auch in den bisher klonierten Regionen des MUC5AC (91aa, vWD4 und Cys2/3) enthalten (Abbildung 5).

```

Cys2/3:      SSCLQELCTWTEWIDGSPAPGINGGDFDTFQNLRDEGYTFCESPRSVQCRAESFPNTPLADLGQDVICSHT
91aa Sequenz: -----
Cys9:       -----
vWD4:       -----
Cys2/3:      EGLICLNKNQLPPICYNYEIRIQCCETVNVCRDITRLPKTVATTRPTPHPTGAQTQTTFTHMPSASTEQTATS
91aa Sequenz: -----
Cys9:       -----
vWD4:       -----
Cys2/3:      RGGPTATSVTQGTHTTLVTRNCHPRCTI|WTKWFDVDFPSPGPHGGDKETYNNIIRSGEKICRRPEEITRLQCR
91aa Sequenz: -----HEKTTHSQPVTSDCHPLCA|WTKWFDVDFPSPGPHGGDKETYNNIIRSGEKICRRPEEITRLQCR
Cys9:       -----AKTTHSQPVTSDCHPLCA|WTKWFDVDFPSPGPHGGDKETYNNIIRSGEKICRRPEEITRLQCR
vWD4:       -----KTTTHSQPVTSDCHPLCA|WTKWFDVDFPSPGPHGGDKETYNNIIRSGEKICRRPEEITRLQCR
Cys2/3:      AKSHPEVSI|EHLGQVVQCSREEGLVCRNQDQQGPFKMCLNYEVRVLCCETPRGC|HM|TSTP|TEGLICLNKNQ
91aa Sequenz: AESHPEVNI|EHLGQVVQCSREEGLVCR-----
Cys9:       AESHPEVNI|EHLGQVVQCSREEGLVCRNQDQQGPFKMCLNYEVRVLCCETPRGC|PVT|SVTP|-----
vWD4:       AESHPEVNI|EHLGQVVQCSREEGLVCRNQDQQGPFKMCLNYEVRVLCCETPRGC|PVT|SVTP|YGTSPNTALY
Cys2/3:      LPPICYNYEIRIQCCETVNVCRDITRLPKTVATTRPTPHPTGAQTQTTFTHMPSASTEQTAT-----
91aa Sequenz: -----
Cys9:       -----
vWD4:       PSLSTSMVSASVASTSVASSSVASSVAYSTQTCFCNVADRLYPAGSTIYRHRDLAGHCYYALCSQDCQVVR
Cys2/3:      -----
91aa Sequenz: -----
Cys9:       -----
vWD4:       GVSDDCPSTTLPPAPATSPSISTSEPVTELGCPNAVPPRKKGETWATPNCSEATCEGNNVISLRPRTCPRVEK
Cys2/3:      -----
91aa Sequenz: -----
Cys9:       -----
vWD4:       PTCANGYPAVKVADQDGCCHYQCQCVCVSGWGDPHYITFDGTYTFLDNCTYVLVQQIVPVYGHFRVLVDN
Cys2/3:      -----
91aa Sequenz: -----
Cys9:       -----
vWD4:       YFCGAEDGLSCPRSIILEYHQDRVVLTRKPVHGVMTNEIIFNNKVVSPGFRKNGIVVSRIGVKMYATIPELGVQV
Cys2/3:      -----
91aa Sequenz: -----
Cys9:       -----
vWD4:       MFSGLIFSVEVPFSKFANNTGQCCTNDRKDECRTPRGT

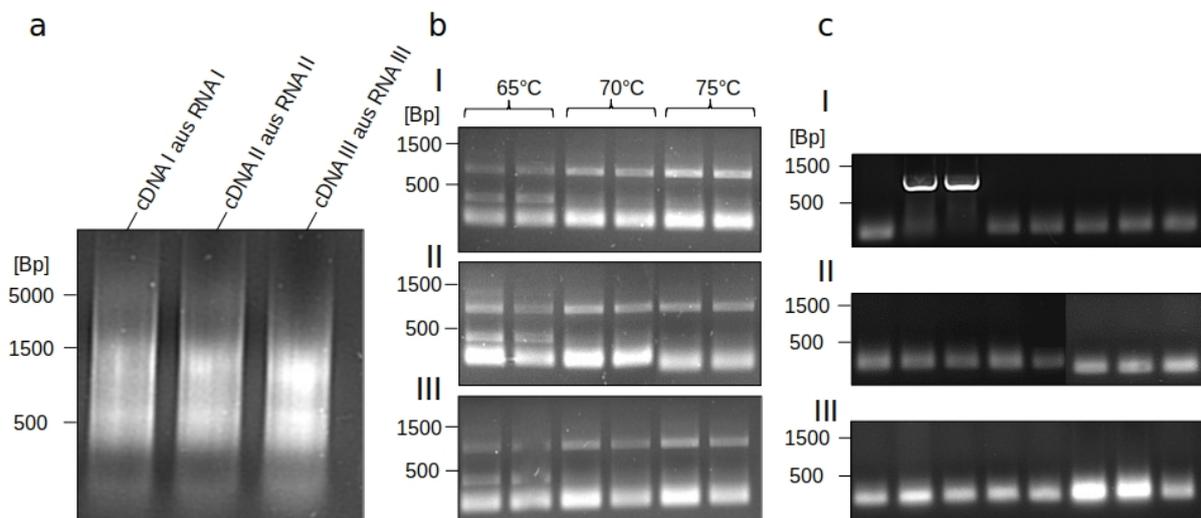
```

### Abbildung 5: Vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenzen der erstellten MUC5AC-Expressionskonstrukte

Dargestellt ist die Primärstruktur der vier Proteinfragmente. Die kursiv geschriebenen Abschnitte in den eckigen, roten Klammern spiegeln die sich im Volllängenprotein wiederholenden Sequenzbereiche wider. Diese haben eine hohe Ähnlichkeit untereinander und weichen in vereinzelt Aminosäuren ab. Diese Abweichungen sind rot markiert und unterstrichen. Der grün markierte Bereich umfasst die identischen Aminosäuresequenzen der dargestellten MUC5AC-Expressionskonstrukte.

Zur Generierung des Konstruktes Cys2/3 wurde aus der Lungenkarzinomzelllinie A549, welche die mRNA des MUC5AC exprimiert (Uhlen *et al.* 2017), mRNA isoliert und in cDNA umgewandelt (Abbildung 6a). Anschließend konnte mittels PCR das Insert amplifiziert und die notwendigen Restriktionsschnittstellen angefügt werden. Nach Verdau durch die Endonukleasen *Bam*HI und *Nhe*I wurde das Insert in den Vektor pcDNA3.1-CD14-mFc-Insert-His ligiert (Abbildung 6b). Zur Vermehrung der Plasmide wurde der *E. coli* Stamm XL1-Blue mit dem Ligationsansatz transformiert. Nach 24 h

Inkubation konnten die ersichtlichen Kolonien per Colony-PCR auf aufgenommene Inserts überprüft werden, welche in der Größenordnung von ca. 800 Bp zu verorten sind. Aus der Abbildung 6c wird ersichtlich, dass nur 2 Klone (aus cDNA I) ein Plasmid mit einem Insert enthalten, welches von den Primern, die auch schon für die Konstruktion des Inserts genutzt wurden, flankiert wird (Abbildung 6c). Um Mutationen und eventuell dadurch bedingte Aminosäureveränderungen in der Primärstruktur ausschließen zu können, wurden die Proben sequenziert und dadurch die Korrektheit der hergestellten Plasmide bestätigt. Das Cys9-Fragment wurde mittels spezifischer Primer auf Basis des vWD4-Plasmides als Template erstellt und wie eben beschrieben in den Expressionsvektor kloniert.



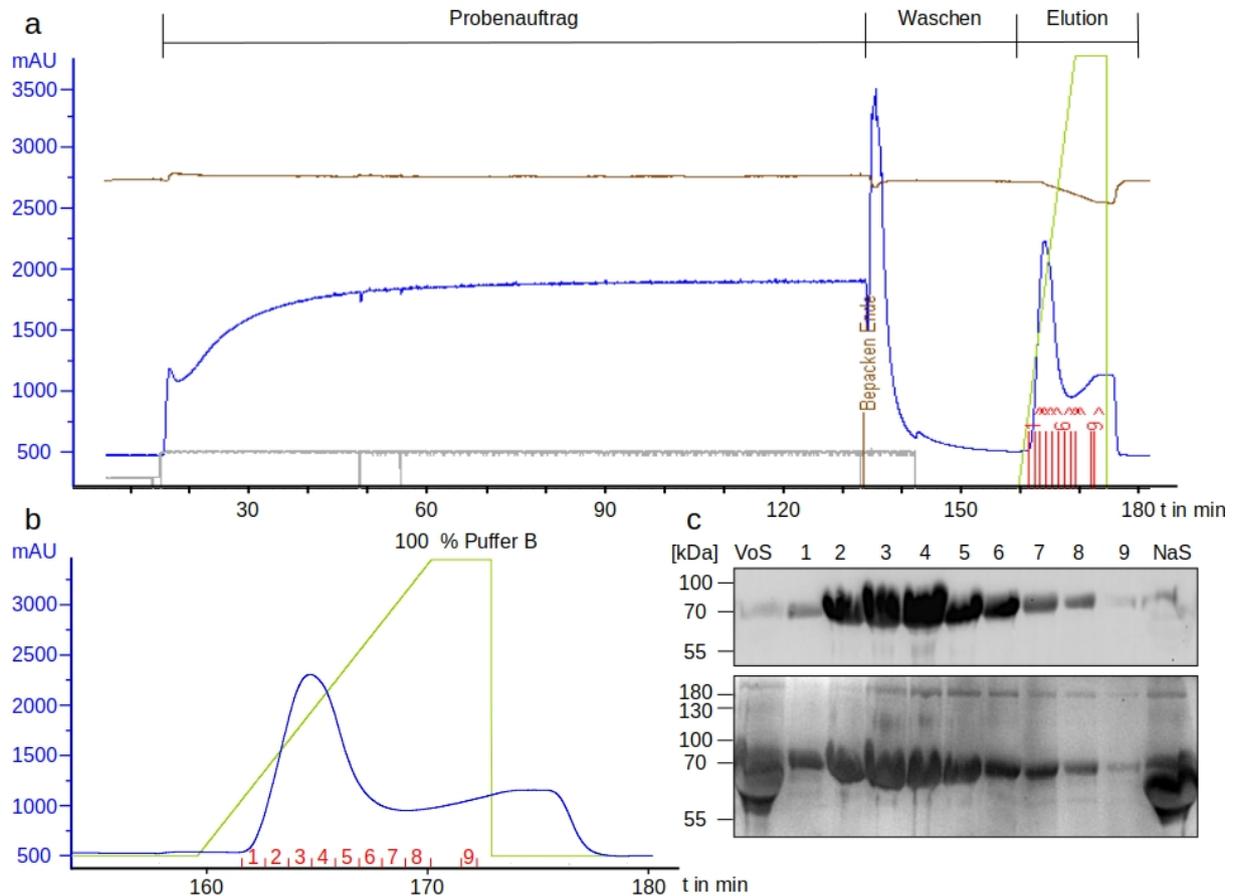
**Abbildung 6: Klonierung der Cys2/3 Domäne von MUC5AC**

Elektrophorese durch 1 % Agarosegele: die dargestellten Versuche entsprechen drei separaten Ansätzen; (a) cDNAs gewonnen durch Reverse-Transkriptase-Reaktion aus A549 mRNA (Auftrag: I = 939 ng; II = 467 ng; III = 663 ng); (b) PCR basierend auf den cDNAs I bis III als Template, Polymerase: S7 Phusion-Polymerase, Primer: Epitop1\_Cys3\_fwd und Epitop1\_Cys3\_rev, dabei wurden die angegebenen verschiedenen Annealing- Temperaturen verwendet, das generelle Protokoll ist Kapitel 4.2.1 zu entnehmen; (c) Colony-PCR nach Transformation von *E. coli* mit den Konstrukten I, II und III, welche durch die Ligation von den unter (b) generierten Inserts I 75 °C, II 75 °C und III 75 °C in den Vektor pcDNA3.1 erzeugt wurden.

### 5.1.2 Proteinexpression in stabilen HEK-293T-Zellen für die Proteinproduktion

Für die rekombinante Herstellung der MUC5AC-Fragmente wurden die unter 5.1.1 beschriebenen Konstrukte (Cys2/3, 91aa, Cys9 und vWD4) in HEK-293T-Zellen exprimiert. In den nachfolgenden Expressionsstudien wurden mittels anti-His-Tag-Antikörper die heterologen Proteine nachgewiesen.

Nach erfolgter transienter Transfektion von HEK-293T-Zellen mit den vier Plasmiden konnten mittels Selektion durch das Antibiotikum Zeocin stabile Zelllinien generiert werden. Dadurch kann das Variieren der durch die Proteinproduktion erhaltenen Proteinmenge, welche durch eine nicht hundertprozentige Transfektionseffizienz bedingt ist, umgangen werden. Durch den Selektionsprozess bekommen nur die Zellen mit aufgenommenem Plasmid einen Wachstumsvorteil. Somit kann davon ausgegangen werden, dass alle Zellen nach einem gewissen Zeitraum der Zeocinexposition das Plasmid enthalten und somit das Protein produzieren. Durch wöchentliche *pull-down*-Assays und nachgeschalteten Westernblotanalysen wurde die Proteinproduktion der Zellen überprüft und bestätigt (Daten nicht gezeigt). Je nach Wachstumsverhalten wurden die Zellen von beginnend 25 cm<sup>2</sup> Flaschen im Verlauf des Selektionsprozesses bis in 175 cm<sup>2</sup> Flaschen expandiert. Nach ungefähr einem Monat der Selektion war es möglich, die Zellen in Rollerflaschen zu überführen, um mit hohem Durchsatz Protein produzieren zu können. Der Überstand wurde wöchentlich geerntet, auf Proteinproduktion überprüft und bei - 20 °C gelagert. Anschließend konnten die Proteine mittels Nickel-Affinitäts-Chromatografie aufgereinigt werden. Abbildung 7 stellt beispielhaft die chromatografische Aufreinigung des MUC5AC-Fragmentes Cys2/3 aus dem gewonnenen Zellüberstand dar. Die gewonnenen Fraktionen 1 bis 8 wurden vereinigt und anschließend wurde eine Konzentration von 0,658 mg/ml bestimmt. Dabei beträgt die elektrophoretische Reinheit ca. 90 %. Die anderen drei Fragmente wurden analog nach dem eben beschriebenen Vorgang aufgereinigt. Auch hierbei wurden Ausbeuten von 1,635 mg/ml für Cys9, 0,035 mg/ml für vWD4 und 0,202 mg/ml für die 91aa Sequenz erzielt. Eine einheitliche elektrophoretische Darstellung aller vier Proteine ist in Abbildung 12a im Kapitel 5.3.1 zu sehen.



**Abbildung 7: Affinitätschromatografische Aufreinigung der Cys2/3 Domäne von MUC5AC aus dem Kulturüberstand von stabil transfizierten HEK-293T-Zellen**

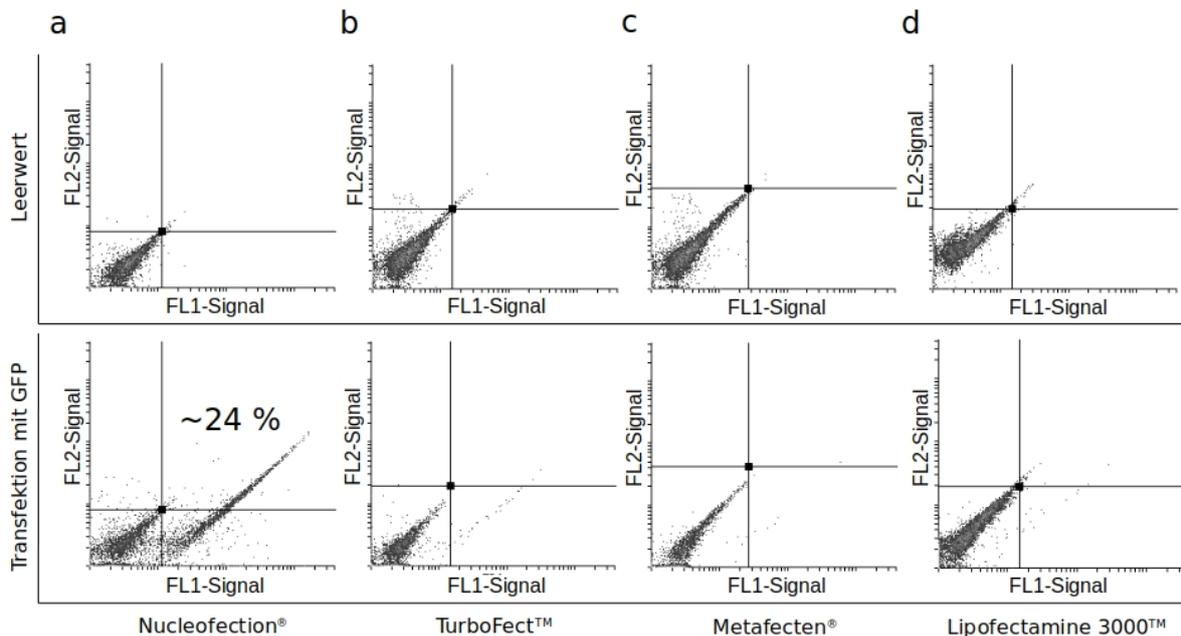
(a) Darstellung der chromatografischen Parameter im Verlauf der Aufreinigung der Cys2/3-Domäne: Abgebildet sind die Absorption bei 280 nm (blaue Linie) und der Widerstand (braune Linie) über die Zeit. Die grüne Linie stellt die Konzentration des Elutionspuffers (Puffer-B), die roten Striche stellen die Elutionsfraktionen dar. Der erste langsame Anstieg entspricht dem Auftrag des Proteinüberstandes, wobei die His-getagten Proteine an Ni-NTA-Säulen binden. Es schließt sich ein Waschschritt an, wobei die Absorbanz wieder auf den Anfangswert (entspricht 100 % Puffer A) absinkt. Zuletzt wurden die Proben mit Puffer B eluiert. (b) Ausschnittsvergrößerung des unter (a) gezeigten Chromatogramms im Bereich der Elution. Die Laufgeschwindigkeit betrug 1 ml/min wobei in jeder Fraktion 2 ml aufgefangen wurden. In den Fraktionen 2 – 5 wurde die höchste Proteinmenge eluiert, was sich in der starken Absorptionsänderung über diesem Bereich widerspiegelt. (c) reduzierende SDS-PAGE der unter (b) gezeigten Elutionsfraktionen mit WB-Detektion durch His-Tag-Antikörper 1:1000 (oben) und Silberfärbung (unten); VoS = Vorsäule (Proben vor dem Auftrag), NaS = Nachsäule (Proben aus dem Durchlauf während des Auftrages), Auftragsmengen jeweils 20 µl.

Es konnte in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden, dass die vier Fragmente des MUC5AC 91aa Sequenz, Cys2/3, Cys9 und vWD4 in den oben genannten Konstrukten in HEK-293T-Zellen exprimiert werden können. Die einzelnen, aufgereinigten Proteine können in nachfolgenden Versuchen auf Interaktion mit dem Antikörper 45M1 untersucht werden.

## 5.2 Vorversuche zur Transfektion von THP-1-Zellen und zytometrischen intrazellulären Antigendetektion

### 5.2.1 Transfektion von THP-1-Zellen mit grün fluoreszierendem Protein

Um Proteine in Zellen heterolog zu exprimieren, bedarf es einer vorherigen Transfektion. Dabei reagiert jede Zelllinie unterschiedlich auf die verwendete Transfektionsmethode. Deshalb wurden zuerst die Komplexionsmethoden TurboFect™, Metafectene®, Lipofectamine 3000™ und die Elektroporationsmethode Nucleofection® bezogen auf die Transfektionseffizienz in THP-1-Zellen miteinander verglichen. In Vorversuchen mit GFP wurde diese aus den Fluoreszenzsignalen abgeleitet. Da die gleichen Zellen und die gleichen Plasmide verwendet werden, ist es möglich, diese Variablen, welche die Proteinexpression beeinflussen können, hierbei zu vernachlässigen. Dabei zeigte sich, dass die Transfektionseffizienzen der Komplexionsmethoden unter 1 % liegen (Abbildung 8 b bis d).

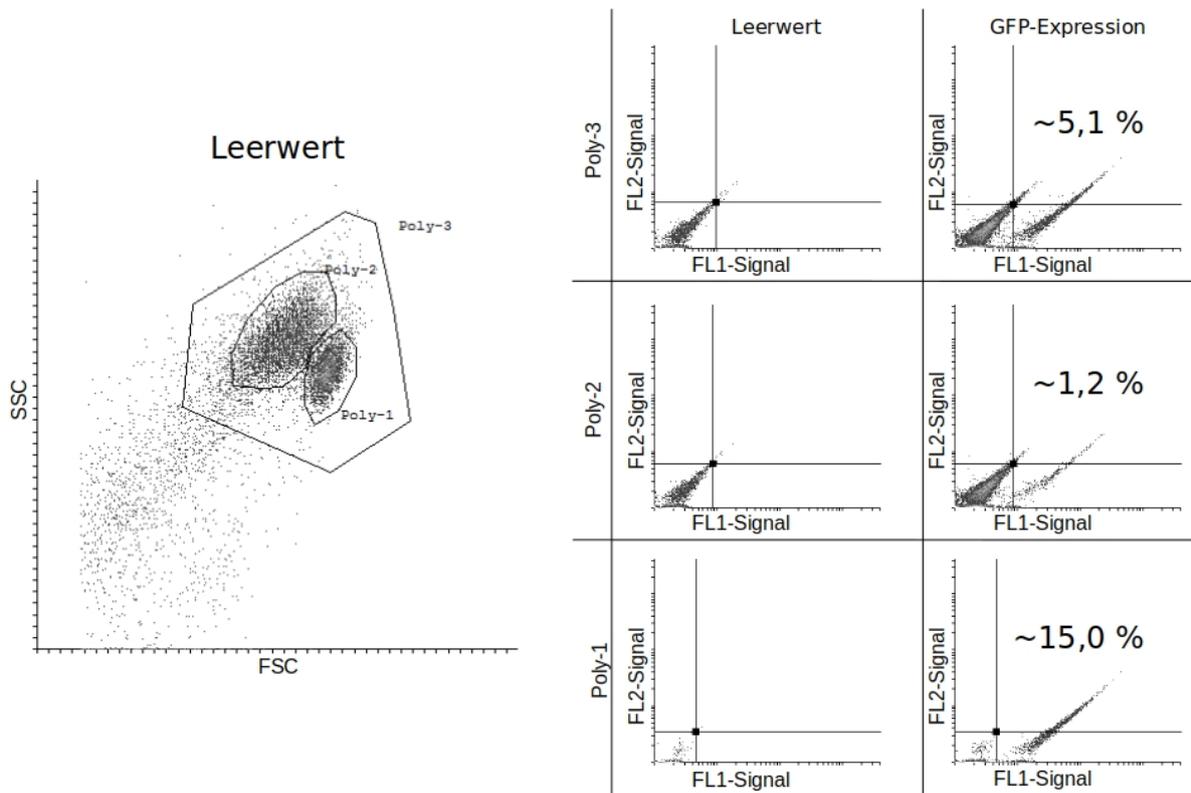


**Abbildung 8: Vergleich von verschiedenen Transfektionsmethoden für THP-1-Zellen**

Zytometrische Darstellung der GFP-Expression nach Transfektion des Vektors pEGFP-N1 in THP-1-Zellen unter Verwendung verschiedener Transfektionsmethoden: In den Dotplot-Diagrammen werden die Fluoreszenzwerte für die Detektoren FL1 (grünes Licht) und FL2 (gelbes Licht) gegenübergestellt. Jeder Punkt entspricht einem gemessenen Ereignis, in diesem Fall am ehesten einer gemessenen Zelle. Der Leerwert ist im unteren linken Quadranten dargestellt. Dabei entspricht eine Verschiebung der Population nach rechts bzw. oben einer GFP-spezifischen Fluoreszenzzunahme. Die obere Reihe entspricht den Leerwerten (untransfizierte THP-1-Zellen), die untere den transfizierten Zellen. (a) Nucleofection® mittels Nucleofector® I,  $10^6$  Zellen wurden mit  $0,5 \mu\text{g}$  DNA pro Ansatz transfiziert. (b bis d) Komplexionsmethoden, welche nach Herstellerprotokoll durchgeführt wurden. Die Prozentsätze geben die Fluoreszenzzunahme an, welche auf den Leerwert normiert ist.

Im Vergleich konnte mittels Nucleofection® in einem ersten Ansatz eine GFP-Expression von bis zu 24 % verzeichnet werden (Abbildung 8a). Aufgrund dieser eindeutigen Ergebnisse wurde auf eine Optimierung bei den Komplexionsmethoden verzichtet und die nachfolgenden Transfektionen mittels Nucleofection® durchgeführt. Dies deckt sich auch mit den Empfehlungen in der Literatur (Maeß *et al.* 2014).

In den zytometrischen Analysen der THP-1-Zellen wurden bei unfixierten Zellen zwei Populationen identifiziert. Diese unterscheiden sich sowohl in Größe (*FSC*) als auch Granularität (*SSC*). Bei nativen, untransfizierten THP-1-Zellen liegt das Gleichgewicht dieser Populationen auf Seite der größeren, weniger granulären Population (Abbildung 9).



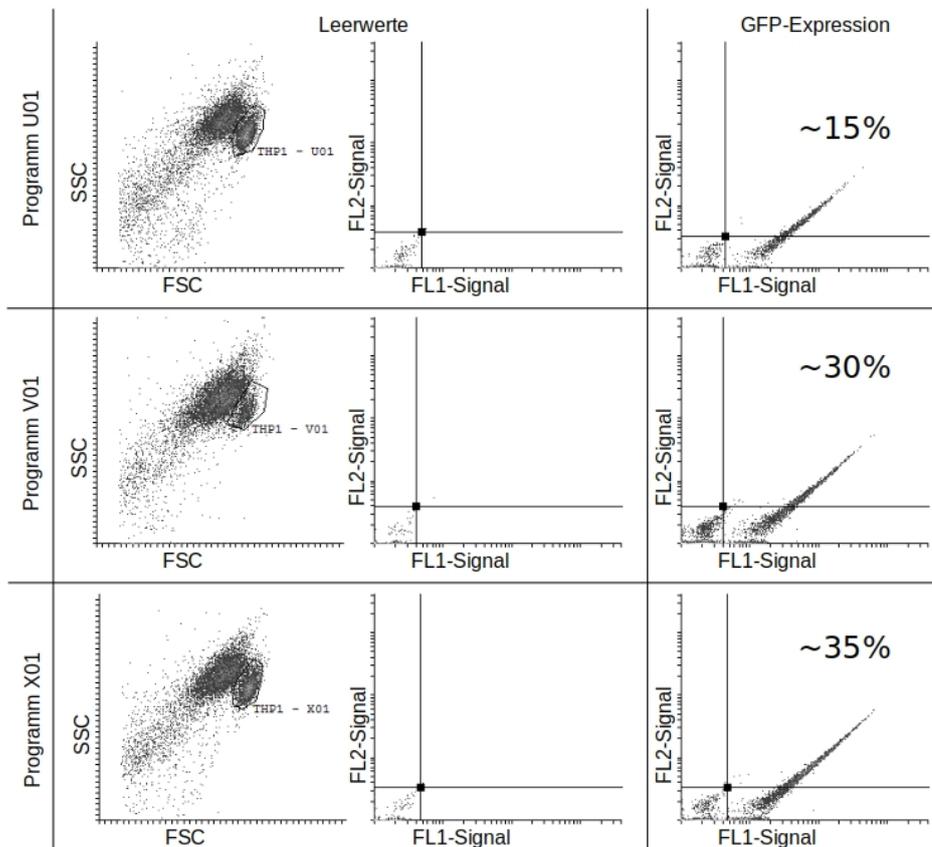
**Abbildung 9: Analyse der GFP-Expression von zytometrisch unterscheidbaren Populationen in THP-1-Zellen**

Zytometrische Darstellung von mit pEGFP-N1 transfizierten THP-1-Zellen in Dotplotdiagrammen. Der *forward-scatter* (*FSC*) dient als Maß für die Größe der Zellen und der *sideward-scatter* (*SSC*) als Maß für die Granularität. Links abgebildet sind die mit einem Leervektor transfizierten Zellen, welche das für THP-1-Zellen typische Erscheinungsbild von zwei unterschiedlich großen Populationen zeigen. Diese wurden mittels *gatings* eingegrenzt (Poly-1 bis Poly-3) und in den rechts stehenden Abbildungen das für jedes *gate* eigene Fluoreszenzverhalten in den Kanälen FL1 und FL2 gezeigt. Rechts abgebildet ist das GFP-Signal, welches in den Detektoren FL1 und FL2 gemessen werden kann; weitere Details siehe Abbildung 8, die Prozentsätze geben die GFP-spezifische Fluoreszenzzunahme an, welche auf den mit dem Leervektor erzielten Wert normiert ist.

Nach erfolgter Nucleofection® verändert sich dieses hin zu den kleineren, höher granulären Populationen. Im Vergleich der Proteinexpression, in diesem Fall die GFP-Fluoreszenzintensität, ist diese in Population 1 (Poly-1) stärker als in Population 2 (Poly-2), was in Abbildung 9 anhand der Prozentsätze zu erkennen ist. Wird die Gesamtheit der Zellpopulationen (Poly-3) auf GFP-Expression untersucht, in diesem Fall Populationen 1 und 2, so ist die Fluoreszenzintensität des GFP kleiner als in Population 1 und größer als in Population 2.

Werden die Zellen fixiert, was für die intrazelluläre Färbung unabdingbar ist, kann in den zytometrischen Messungen nur eine Population beobachtet werden, die in Größe und Granularität zwischen den oben beschriebenen Populationen 1 und 2 liegt. Dabei unterscheidet sich auch die Fluoreszenzintensität. Für die Analyse der GFP-Expression, bei der keine Fixierung der Zellen notwendig ist, wurde in den nachgeschalteten Versuchen die Population verwendet, welche in der Abbildung 9 der Population Poly-1 entspricht.

Zur Transfektionsoptimierung wurden verschiedene Nucleofector®-Programme, welche vom Hersteller empfohlen werden, auf GFP-Expression überprüft. In Abbildung 10 sind die drei effizientesten Programme dargestellt. Dabei konnte mit dem Programm X01 ein GFP-Signal von 35 % gemessen werden, wobei die exprimierende Population 33 % von der Gesamtpopulation beträgt (Abbildung 10 unten links). Für die anderen Programme beträgt der Anteil dieser Populationen von den Gesamtpopulationen für U01 40 % und für V01 12,5 % (Abbildung 10 linke Spalte). Es zeigt sich, dass die Nucleofection® die Zellviabilität beeinflusst. Dies ist vor allem auf die Stromstöße, welche zur Permeabilisierung der Zellmembranen notwendig sind, zurück zu führen. Aufgrund dessen wurde in weiteren Ansätzen der Einfluss der posttransfektionellen Zelldichte auf die GFP-Expression untersucht. Dazu wurden entweder  $10^6$  THP-1-Zellen nach erfolgter Nucleofection® in 5 ml/Well einer 6-Wellplatte oder in 1,5 ml/Well einer 12-Wellplatte ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde die GFP-Expression zytometrisch ausgelesen, wobei eine höhere Expression in den 1,5 ml/Well Ansätzen messbar war (Daten nicht gezeigt). In den nachfolgenden Versuchen wurden die THP-1-Zellen mit dem Programm X01 transfiziert und anschließend in 1,5 ml/Well einer 12-Well-Platte für 24 h inkubiert.



**Abbildung 10: Vergleichende Darstellung von zytometrischen Analysen unterschiedlicher GFP-Expressionen in Abhängigkeit der verwendeten Nucleofections®-Programme**

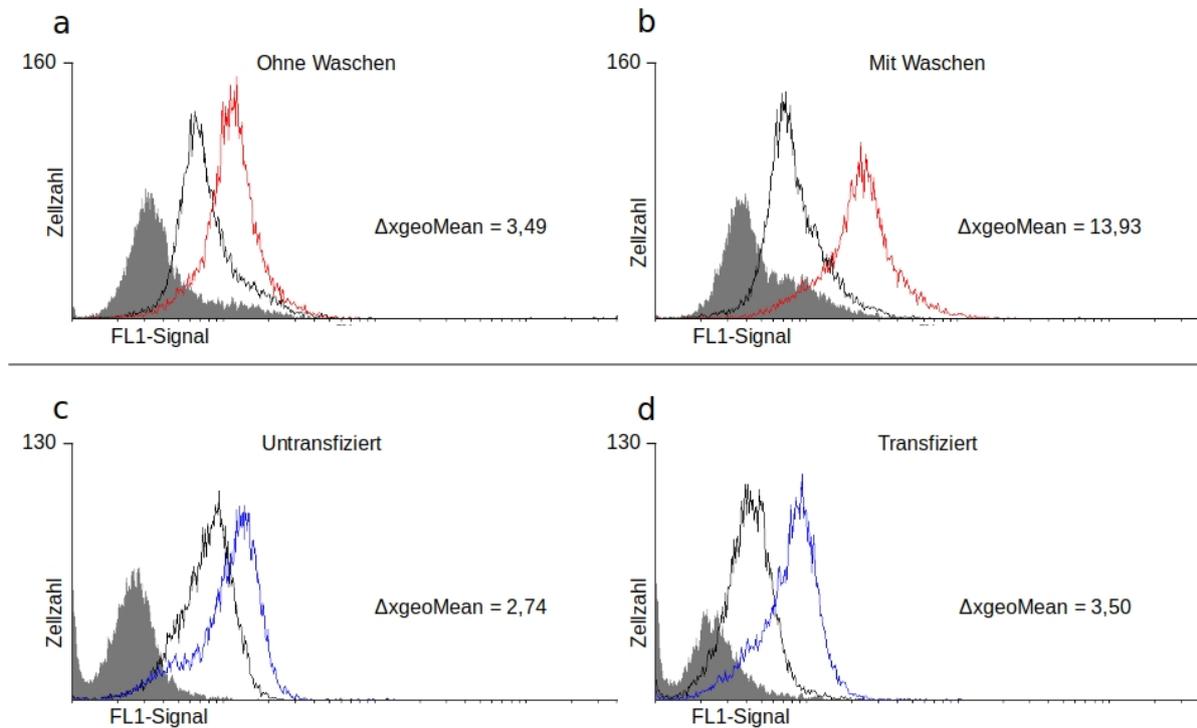
pEGFP-N1 wurde in THP-1-Zellen transfiziert und anschließend die GFP-Expression zytometrisch vermessen. Darstellung als Dotplotdiagramme: Links im Bild sind die mit einem Leervektor transfizierten Zellen, welche die für native THP-1-Zellen typischen Populationen zeigen, dargestellt. Die Prozentsätze entsprechen der auf den Leerwert normierten GFP-Expression. Weitere Details zur zytometrischen Auswertung siehe Abbildung 8 und 9.

### 5.2.2 Anpassung des EDIM-Assays an das THP-1-Zellmodell

Mittels des EDIM-Assays können intrazellulär vorliegende Antigene in Monozyten detektiert werden. Dazu werden die Zellen in einem ersten Schritt fixiert und anschließend zur Einschleusung der Antikörper permeabilisiert, wobei die verwendeten Zellen hierbei typischerweise primären Ursprungs aus Blutproben sind. Um das Verfahren mit tumorentitätsspezifischen Markern erweitern zu können, ist es sinnvoll, dieses dafür in Form eines Zellmodells nachzustellen. Aufgrund dessen wurde zuerst in Vorversuchen die Tauglichkeit der Methode für das verwendete THP-1-Zellmodell überprüft.

Die intrazelluläre Färbung wird mittels eines Kits durchgeführt. In diesen Vorversuchen wurden native, kontinuierlich intrazellulär exprimierte Proteine nachgewiesen, um die

Transfektionseinflüsse bzw. die Problematik der variablen Transfektionseffizienz vorerst nicht berücksichtigen zu müssen. Dazu diente der Transkriptionsfaktor *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) als Zielmolekül, welches zytosolisch exprimiert wird (Wohlmann *et al.* 2010). Aufgrund der Verwendung von unmarkierten Primärantikörpern bedarf es einer zweistufigen Inkubation und damit einhergehender zweimaliger Permeabilisierung. In diesem Zusammenhang wurden Waschschrte zwischen primärer und sekundärer Antikörperinkubation, Mengenverhältnisse der Permeabilisierungsreagenzien und die Antikörperkonzentrationen variiert. Die besten Ergebnisse konnten mit viermaligem Waschen nach der ersten Permeabilisierung, einem Mengenverhältnis der Permeabilisierungsreagenzien mit PBS von 1:1, sowie mit einer Antikörperkonzentration von 1:100 (prim. AK) und 1:200 (sek. AK) erreicht werden. In wiederholenden Versuchen wurde eine Veränderung der mittleren Fluoreszenzmaxima ( $\Delta x_{geoMean}$ ) von 3,49 auf 13,93 erreicht, was einer besseren Anfärbarkeit von STAT3 unter diesen Bedingungen entspricht (Abbildung 11a, b). Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern die Stromstöße der Elektroporation die Markierbarkeit von intrazellulären Antigenen in THP-1-Zellen beeinflusst. Dazu wurden THP-1-Zellen für 24 h in eine 6-Wellplatte ausgesät und im Vergleich die gleiche Zellzahl mit einem Leervektor transfiziert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde intrazelluläres STAT3 wie oben beschrieben detektiert. Dabei konnte sogar eine Zunahme der spezifischen STAT3-Bindung gemessen werden (Abbildung 11c, d).



**Abbildung 11: Intrazelluläre Detektion von STAT3 in THP-1-Zellen**

Zytometrische Analysen von THP-1-Zellen nach intrazellulärer Färbung dargestellt als Histogramme, in welchen für einen spezifischen Fluoreszenzkanal (hier FL1) die Häufigkeit der gemessenen Signale abgebildet ist. Dabei stellen der graue Graph den Leerwert ohne Antikörper, der schwarze den Leerwert mit unspezifischer Bindung des Sekundärantikörpers und der blaue/rote Graph die Bindung des prim. AK und des sek. AK dar. Die Verschiebung entlang der x-Achse entspricht einer Zunahme der Fluoreszenzintensität, die Verschiebung entlang der y-Achse entspricht einer Zunahme der gemessenen Ereignisse (Zellzahl).  $\Delta X_{geoMean}$  entspricht der Veränderung der mittleren Fluoreszenzintensität, welche auf den Leerwert normiert ist (eine genauere Erklärung ist 4.3.9 zu entnehmen). (a) kein zwischengeschalteter Waschschrift zwischen prim. und sek. Inkubation; (b) zwischengeschalteter Waschschrift zwischen prim. und sek. Inkubation; (c) untransfizierte THP-1-Zellen nach 24 h Inkubation; (d) mit 0,5  $\mu\text{g}$  des Leervektors transfizierte THP-1-Zellen nach 24 h Inkubation; prim. AK: C-20 anti STAT3 (1:100), sek. AK: *goat-anti-rabbit-FITC* (1:200). Das Protokoll für die intrazelluläre Detektion wurde in den späteren Versuchen sowohl für THP-1-Zellen als auch HEK-293-Zellen nach gleichem Ablauf durchgeführt.

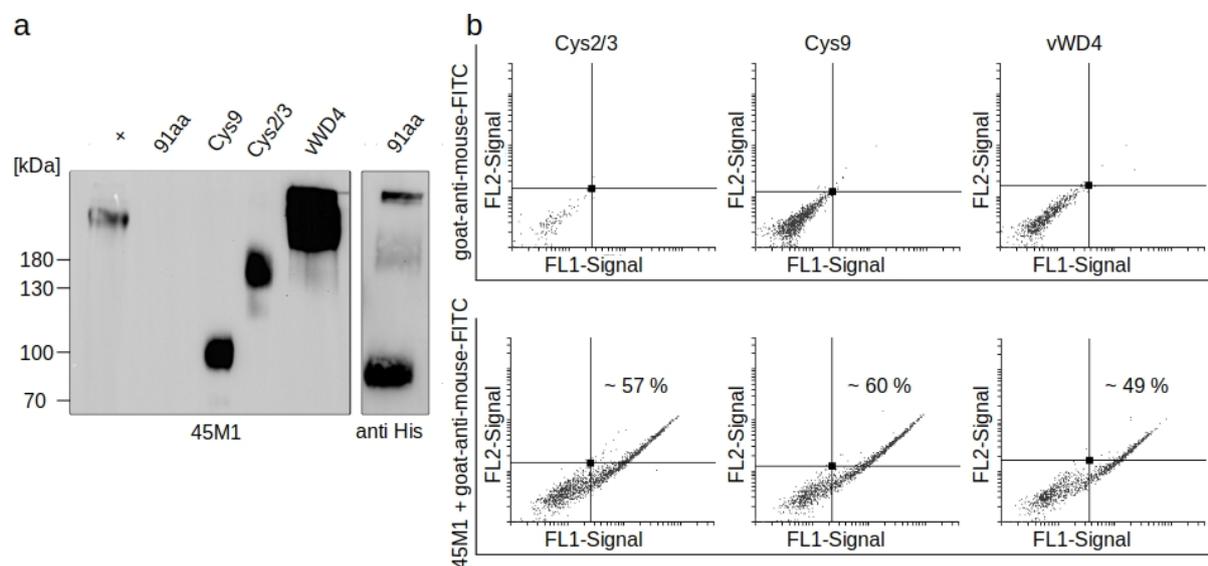
### 5.3 Epitop-Analyse des Antikörpers 45M1 mittels rekombinant hergestellter MUC5AC-Fragmente

#### 5.3.1 Überprüfung der Detektierbarkeit der rekombinant hergestellten Proteinfragmente in Westernblotstudien

Erste Untersuchungen zur Epitop-Analyse von 45M1 wurden von Lidell *et al.* durchgeführt, in welchen Expressionskonstrukte, die den C-Terminus des MUC5AC abbilden, generiert

wurden. Des Weiteren fand die Arbeitsgruppe heraus, dass die Bindung von 45M1 reduktionssensibel ist. Dies wurde den cysteinreichen Regionen, welchen das Epitop von 45M1 räumlich zugeordnet wird, zugeschrieben (Lidell *et al.* 2008). Darauf aufbauend konnten Liu *et al.* zeigen, dass auch rekombinant erzeugte Proteine, die den mittleren, cysteinreichen Teil des Muzins widerspiegeln, vom Antikörper 45M1 erkannt werden können (Liu *et al.* 2015). Die auf beiden Publikationen aufbauenden Proteinfragmente sind in Abbildung 4 in Kapitel 5.1.1 schematisch dargestellt.

Nach oben beschriebener Proteinexpression konnte im Westernblot die Bindung von 45M1 an die Proteinfragmente Cys2, Cys9 und vWD4 nachgewiesen werden. Das 91aa-Fragment wurde jedoch nicht erkannt. Die Westernblot-Experimente wurden mit His-Tag-AK als auch mit 45M1 durchgeführt (Abbildung 12a). Bei vorhandener Bindung durch 45M1 wurde in der Darstellung auf die Kontrollbanden des His-Tag-AK verzichtet. Aufgrund der Reduktionssensibilität wurde die SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen durchgeführt und vor dem Auftrag erhitzt.



**Abbildung 12: Darstellung der spezifischen Bindung des Antikörpers 45M1 an die generierten MUC5AC-Fragmente unter nativen und denaturierten Bedingungen**

(a) WB der aufgereinigten Proteinfragmente 91aa-Sequenz, Cys2/3, Cys9 und vWD4: SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (ohne 2-Mercaptoethanol) aber mit Erhitzen der Proben für 5 min bei 95 °C, prim. AK: 45M1 (1:1000) bzw. anti-His-Tag-AK (1:1000), sek. AK: anti-IgG $\kappa$ -BP-HRP-AK (1:10000), auf der rechten Seite ist für die 91aa-Sequenz die durch den anti-His-Tag-AK detektierte Bande gezeigt, welche als Kontrolle für das Vorhandensein des Proteins dient, als positiv-Kontrolle für 45M1 wurde *murines* Ileum-Lysat verwendet; (b) Zytometrische Analysen der in HEK-293T-Zellen intrazellulär exprimierten Proteine, prim. AK: 45M1 (1:50) und sek. AK: *goat-anti-mouse-FITC* (1:100), für die Leerwerte (oben im Bild) wurden transfizierte Zellen nur mit dem sek. AK gefärbt; die Prozentsätze geben die Fluoreszenzzunahme an, welche auf den Leerwert normiert ist, weitere Details zur zytometrischen Darstellung siehe Abbildung 8

### **5.3.2 Überprüfung der Erkennung intrazellulär exprimierter MU5AC-Fragmente durch 45M1 mittels intrazellulärer Detektion in HEK-293T-Zellen**

Bisher konnte mittels Westernblot demonstriert werden, dass die erzeugten Proteinfragmente des MUC5AC durch den Antikörper 45M1 erkannt werden. Jedoch ermöglicht diese Methode nur Aussagen über denaturiert vorliegende Proteine. Um herauszufinden, ob 45M1 auch das intrazellulär, in einer physiologischen Umwelt vorliegende Protein erkennt, wurden Expressionsplasmide für die drei Proteinfragmente Cys2, Cys9 und vWD4 transient in HEK-293T-Zellen transfiziert und intrazellulär exprimiert. Aufgrund der guten Eignung für die Proteinexpression wurden für diesen Zwischenschritt erneut HEK-293T-Zellen verwendet. Anschließend wurden die Zellen mittels des unter 4.3.7 beschriebenen Protokolls fixiert und durch 45M1 gebunden. Hierbei war es möglich, die drei Fragmente intrazellulär vorliegend nachzuweisen, wobei das Cys9-Fragment mit der höchsten Fluoreszenzintensität messbar ist (Abbildung 12b).

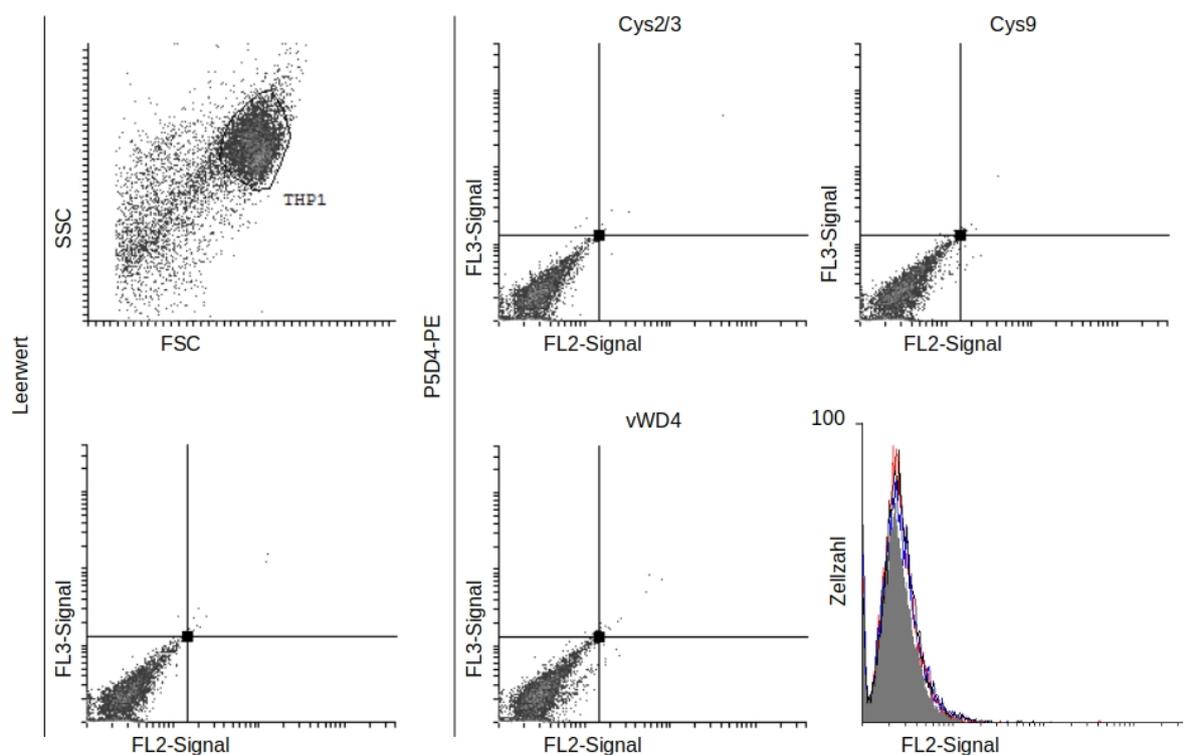
Zusammenfassend lässt sich für die 3 Konstrukte Cys2/3, Cys9 und vWD4 feststellen, dass diese sowohl nativ als auch unter denaturierten und nicht reduzierenden Bedingungen von dem Antikörper 45M1 erkannt werden und sich für die nachfolgenden Versuche als stellvertretende Zielstrukturen für den Nachweis des Proteins MUC5AC eignen können.

## **5.4 Durchführung des EDIM-Assays im THP-1-Zellmodell**

Für die Nachstellung des EDIM-Assays in THP-1-Zellen bedarf es einer intrazellulären Anreicherung der zu untersuchenden Antigene. Um dies zu ermöglichen wurden in den nachfolgenden Versuchen zwei Ansätze verfolgt: die Proteinexpression der durch 45M1 erkannten rekombinant erzeugten MUC5AC-Fragmente und die Phagozytose dieser.

### 5.4.1 Proteinexpression von antikörperreaktiven MU5AC-Fragmenten in THP-1-Zellen mit anschließender intrazellulärer Detektion

Basierend auf den Vorversuchen in Kapitel 5.3 wurden die Expressionskonstrukte Cys2/3, Cys9 und vWD4 mittels pcDNA3.1-Vektoren durch Nucleofection® in THP-1-Zellen eingebracht. Anschließend wurden die Zellen nach 24 h Inkubationszeit unter Einsatz des P5D4-PE Antikörpers intrazellulär gefärbt. Es gelang jedoch nicht ein PE-Signal, was für ein intrazelluläres Vorliegen der Antigene stehen würde, zu detektieren (Abbildung 13).



**Abbildung 13: EDIM nach Transfektion von Expressionskonstrukten der bezeichneten MUC5AC-Fragmente in THP-1-Zellen**

THP-1-Zellen wurden mittels Nucleofection® mit den Konstrukten Cys2/3, Cys9 und vWD4 transfiziert. Pro Ansatz wurden dazu  $10^6$  Zellen mit  $0,5 \mu\text{g}$  DNA verwendet und für 24 h inkubiert, mit P5D4-PE (1:50) intrazellulär gefärbt und zytometrisch analysiert. Links abgebildet sind die mit einem Leervektor transfizierten Zellen und rechts die mit den jeweiligen Konstrukten transfizierten Ansätze im FL2-FL3-Dotplot. Zudem wurden die 3 Ansätze als Histogrammdarstellung für den PE-Detektor FL2 unten rechts dargestellt. Das graue Histogramm entspricht der Transfektion mit dem leeren Vektorplasmid, die farbigen den einzelnen transfizierten Proteinansätzen; weitere Details zur zytometrischen Darstellung siehe Abbildungen 8, 9 und 11

In den unter 5.3.2 beschriebenen intrazellulären Färbungen der Proteinfragmente in HEK-293T-Zellen wurde für die gezeigten Ansätze jeweils eine Kontrollfärbung mit dem Antikörper P5D4-PE durchgeführt. Dabei konnten ähnlich intensive Signale vermessen

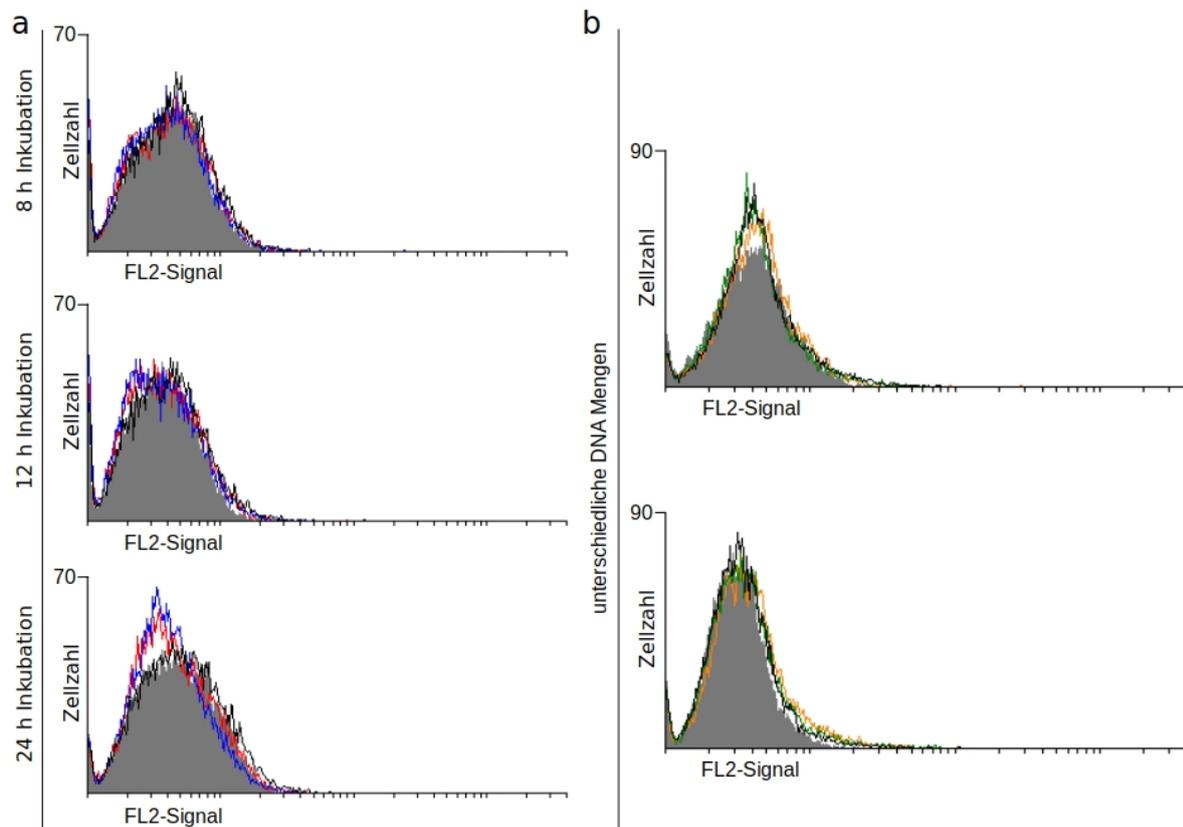
werden wie mit der Detektion durch 45M1 (Daten nicht gezeigt). Daran anschließend wurden die Versuche wiederholt und statt des P5D4-Antikörpers der MUC5AC-Antikörper 45M1 zur Detektion der Polypeptidfragmente verwendet. Auch hier war kein intrazellulärer Nachweis der Proteinfragmente möglich. Eine Verwendung alternativer Transfektionsprogramme (U01, V01 und X01) konnte nicht zu einer erkennbaren Proteinexpression beitragen.

In der anschließenden Fehleranalyse wurde das laut Hersteller empfohlene Transfektionsprogramm V01 verwendet, welches die höchste Transfektionseffizienz für GFP in THP-1-Zellen aufweist. Bisherige Versuche wurden mit dem Zellkulturmedium RPMI-1640 (10 % FKS, 300 mg/l L-Glutamin, 2 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 80 mg/l Gentamycin) durchgeführt. Für die Nucleofection<sup>®</sup> wird ein Medium, das 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat, 4,5 g/l Glucose, 10 mM HEPES und 1,5 g/l NaHCO<sub>3</sub> sowie ein Antibiotikum enthält, empfohlen. Die nachfolgenden Versuche wurden mit dem zuletzt genannten Medium durchgeführt. Zum Nachweise der Proteinexpression wurden die Zellen intrazellulär mit P5D4-Tag-Antikörper im Volumenverhältnis 1:50 inkubiert.

Anders als in den vorherigen EDIM-Detektionen wurden in den nachfolgenden Versuchen statt 50 µl jeweils 100 µl der jeweiligen Reagenz verwendet. In einem ersten Schritt wurden die DNA Mengen, welche laut Hersteller-Protokoll 0,5 µg pro Transfektionsansatz betragen sollen, variiert. Dafür wurden unterschiedliche DNA-Mengen bis zu 15 µg je Ansatz für die Transfektion verwendet. Jedoch konnten keine relevanten PE-Signale verzeichnet werden. Für die nachfolgenden Optimierungsschritte wurden für jedes Experiment 2 µg DNA verwendet. Als weiterer Parameter, welcher die Proteinexpression beeinflussen kann, gilt der Zeitpunkt nach der Transfektion, nach welchem die Zellen auf Proteinexpression überprüft werden. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden Transfektionsansätze zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführt und an einem gleichen Endpunkt fixiert und gefärbt. Die Inkubationszeiten betragen dabei 8 h, 12 h, 24 h und 48 h.

Die Verwendung eines mit mehr Supplementen angereicherten und zwei Puffern enthaltenen Mediums, konnte keinen positiven Effekt auf das Wachstumsverhalten der Zellen sowie die Proteinproduktion bewirken. Die Veränderung der posttransfektionellen Inkubationszeit (Abbildung 14a) und der DNA-Mengen (Abbildung 14b) bewirkten ebenso keine messbare intrazelluläre Proteinanreicherung. Nach umfassender Variation in den

Transfektionsparametern konnte jedoch keine intrazelluläre Proteinexpression detektiert werden.



**Abbildung 14: Versuche zur Optimierung der Transfektion von THP-1-Zellen mit MUC5AC-Expressionskonstrukten**

Zytometrische Darstellung unterschiedlicher Optimierungsansätze in Histogrammen: Dargestellt sind die Signale der drei Konstrukte (Farben im Text beschrieben) und des Leerwertes (grau) für den PE-spezifischen Detektor FL2. (a) die Konstrukte Cys2/3 (rot), Cys9 (blau) und vWD4 (schwarz) wurden mit konstanter DNA-Masse (2 µg) in jeweils  $10^6$  Zellen pro Ansatz transfiziert und anschließend unterschiedlich lang inkubiert. Zum Nachweis schloss sich die intrazelluläre Detektion mit P5D4-PE-AK (1:50) an. (b) Für einen konstanten Inkubationszeitraum (24 h) wurden unterschiedliche DNA-Massen verwendet: 1 µg (orange), 1,5 µg (grün) und 2 µg (schwarz) (Histogramm oben) und 5 µg (orange), 10 µg (grün) und 15 µg (schwarz) (Histogramm unten). Diese wurden jeweils in  $10^6$  THP-1-Zellen transfiziert und anschließend intrazellulär wie unter (a) nachgewiesen. Weitere Details zur zytometrischen Darstellung siehe Abbildungen 11

Es war somit nicht möglich, über den Weg der Proteinexpression mit vorangegangener Transfektion, die Konstrukte Cys2/3, Cys9 und vWD4 in THP-1-Zellen mithilfe eindiffundierter Antikörper intrazellulär nachzuweisen.

## 5.4.2 Versuche zur Aufnahme von MUC5AC-Antigenen in THP-1-Zellen durch Phagozytose

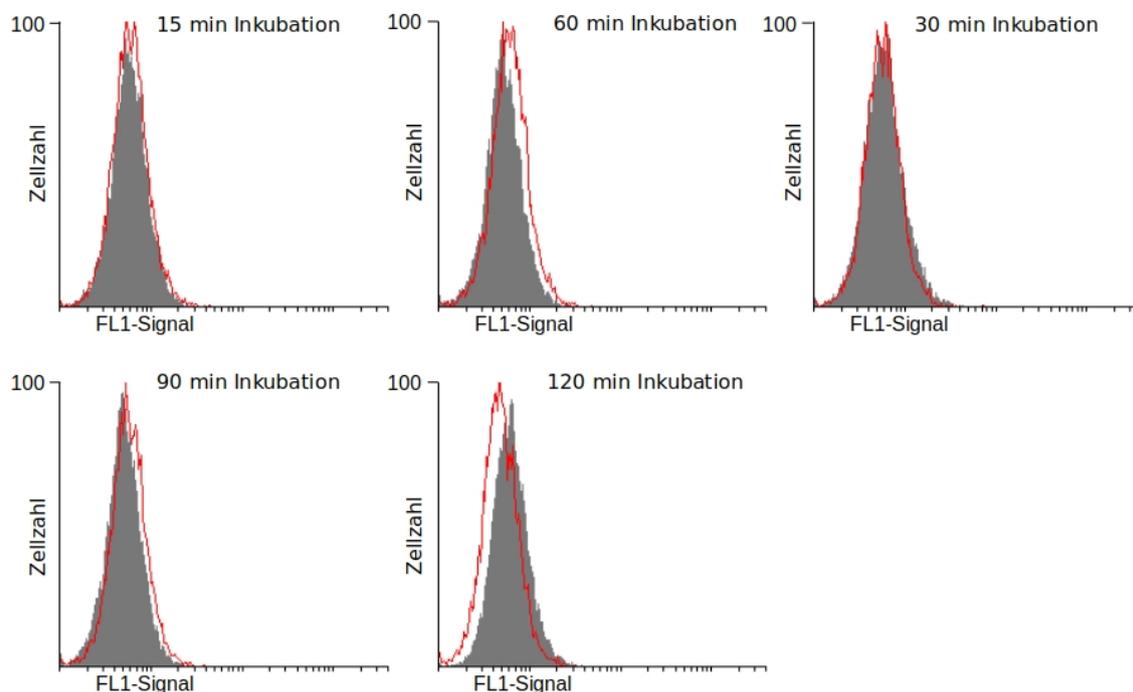
Weitere Versuche, die generierten Antigene intrazellulär in THP-1-Zellen zu exprimieren bestanden darin, diese über Phagozytose in die Zellen einzubringen. Da es bisher nicht möglich war, die MUC5AC-Proteinfragmente in THP-1-Zellen mittels Proteinbiosynthese zu exprimieren, wurde versucht, diese Proteine nach zuvor erfolgter Expression bzw. Aufreinigung von THP-1-Zellen phagozytieren zu lassen. Des Weiteren ist aufgrund der chemischen Differenzen zwischen zytosolischer Proteinexpression und lysosomalem Verdau in den Phagolysosomen der Phagozytoseweg ein möglicher vorteilhafter Ansatz gegenüber der Proteinexpression. Es wurde versucht, das unter 5.1.2 aufgereinigte Protein Cys9 über den Fc $\gamma$ -Rezeptor abhängigen Phagozytoseweg und das Cys2/3-Fragment mittels prokaryotischer Proteinexpression über den Pathogen assoziierten Phagozytoseweg in das THP-1-Zellmodell einzubringen.

### 5.4.2.1 Fc $\gamma$ -Rezeptor abhängige Phagozytose rekombinant hergestellter Proteinfragmente

Mittels Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) sind professionelle Phagozyten fähig, den Fc-Teil von Antikörpern zu binden und anschließend Phagozytose einzuleiten. Die unter 5.1.1 rekombinant hergestellten Proteinfragmente des MUC5AC Cys2/3, Cys9 und vWD4 weisen N-terminal einen *murinen* Fc-Tag des IgG2a Subtyps auf. Dieser wird von Fc $\gamma$ RIIa erkannt, welcher an der Oberfläche von THP-1-Zellen exprimiert wird (Fleit *et al.* 1991). Das aufgereinigte Protein bildet nativ Dimere, was sich in vergleichenden Westernblotanalysen unter sowohl reduzierenden als auch nichtreduzierenden Bedingungen zeigen ließ. Dabei entsprachen die Banden unter nichtreduzierenden Bedingungen einem doppelt so hohen Molekulargewicht wie unter reduzierenden Laufbedingungen. Die Dimer-Bildung spielt für die Bindung an den Fc $\gamma$ RIIa eine relevante Rolle, da dieser die Fc-Teile nicht in Monomerform erkennt und eine nachgeschaltete Phagozytose nicht ablaufen würde (Anderson *et al.* 1986). Anschließend wurden  $5 \times 10^5$  THP-1-Zellen/Well einer 6-Well-Platte in 3 ml Medium ausgesät und das aufgereinigte Protein mFc-Cys9-His in unterschiedlichen Konzentrationen für unterschiedliche Zeiten mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, fixiert und permeabilisiert, sodass die spezifischen

anti-His-Tag-Antikörper in die Zellen eindringen konnten. Der Bindungsnachweis erfolgte zytometrisch.

Es konnten keine Signale, welche ein intrazelluläres Vorliegen der Antigene vermuten lassen würden, gemessen werden (Abbildung 15). Der hier untersuchte, durch den Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytoseweg eignet sich offensichtlich unter den hier gewählten Bedingungen für eine intrazelluläre Anreicherung des Proteinfragmentes Cys9 nicht.



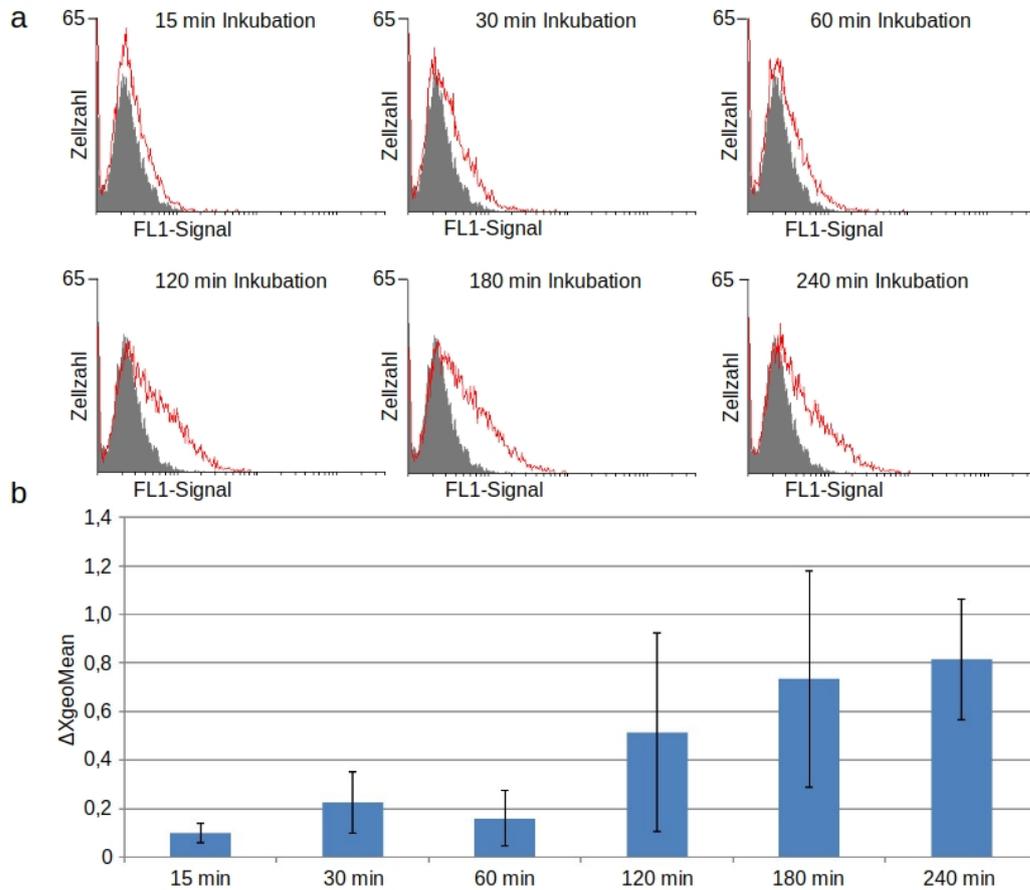
**Abbildung 15: Phagozytose von mFc-getagten MUC5AC-Proteinfragmenten durch undifferenzierte THP-1-Zellen**

Zytometrische Analyse der THP-1-Zellen nach Phagozytose des Proteins *mFc-Cys9-His* dargestellt in Histogrammdiagrammen für den FITC-spezifischen Detektor FL1: Undifferenzierten THP-1-Zellen wurde pro Ansatz 375 µg des Proteins *mFc-Cys9-His* zugefügt und anschließend für die angegebenen Zeitpunkte (30 min bis 120 min) inkubiert. Darauf folgt die intrazelluläre Färbung mit dem anti-His-FITC-AK (1:50). Das graue Histogramme stellt den Leerwert dar und entspricht THP-1-Zellen, welche nur mit PBS inkubiert wurden. Die roten Histogramme spiegeln die mit Protein inkubierten Zellen wider. Aufgrund der ausbleibenden Signalveränderung entlang der x-Achse wurde auf die Berechnung des  $\Delta X_{geoMean}$  verzichtet. Für weitere Details zur Histogrammanalyse siehe Abbildung 11.

#### 5.4.2.2 Versuche zur Phagozytose von GFP-Fusionsprotein exprimierenden *E. coli*-Zellen durch THP-1-Zellen

Monozyten sind in der Lage, *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) zu erkennen und nachfolgend die Phagozytose der PAMP-exprimierenden Strukturen, in diesem Fall *E. coli*-Bakterien, zu initiieren. Basierend auf einer Publikation von Ku und Kollegen, wurde das Phagozytoseassay anhand des der Publikation zu entnehmenden Protokolls durchgeführt und teilweise angepasst (Ku *et al.* 2019).

Um die Phagozytose von *E. coli*-Zellen durch THP-1-Zellen zu untersuchen, wurde zuerst der Stamm JM83 mit den Plasmiden pN-BLa-GFP und pC-BLa-GFP transformiert, wodurch dieser membranständige Fusionsproteine, bestehend aus Beta-Laktamase und GFP, ausbildete. Dabei kann das GFP-Signal direkt ohne vorherige Antikörperdetektion zytometrisch ausgelesen werden (Seiler 2021). Der induzierte Bakterienstamm wurde durch eine einstündige Inkubation bei 62 °C inaktiviert und anschließend in PBS aufgenommen. Anschließend wurden durch PMA ausdifferenzierte THP-1-Zellen mit dem inaktivierten Klon für unterschiedliche Zeiten bei einer MOI von 500 inkubiert (dies entspricht  $2,5 \times 10^8$  Bakterienzellen pro  $5 \times 10^5$  THP-1-Zellen). Zum Abstoppen der Phagozytose wurden die Zellen nach der Inkubation mit eiskaltem PBS dreimal gewaschen. Als nächster Schritt schloss sich das enzymatische Ablösen der Zellen mittels Trypsinbehandlung an, wobei schon nach drei Minuten Inkubationszeit eine verstärkte Zellaggregation zu beobachten war, welche sich vor allem nach dem Abstoppen der Trypsinbehandlung mit serumhaltigem Medium verstärkte. Nach erneutem Waschen und anschließender Fixierung wurden die Zellen zytometrisch auf GFP-Signale untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mit Zunahme der Inkubationszeit das GFP-Signal zunimmt (Abbildung 16). Dabei konnte jedoch eine erhöhte Variabilität innerhalb der einzelnen Experimente beobachtet werden, was sich in den Fehlerbalken (Abbildung 16b) widerspiegelt.



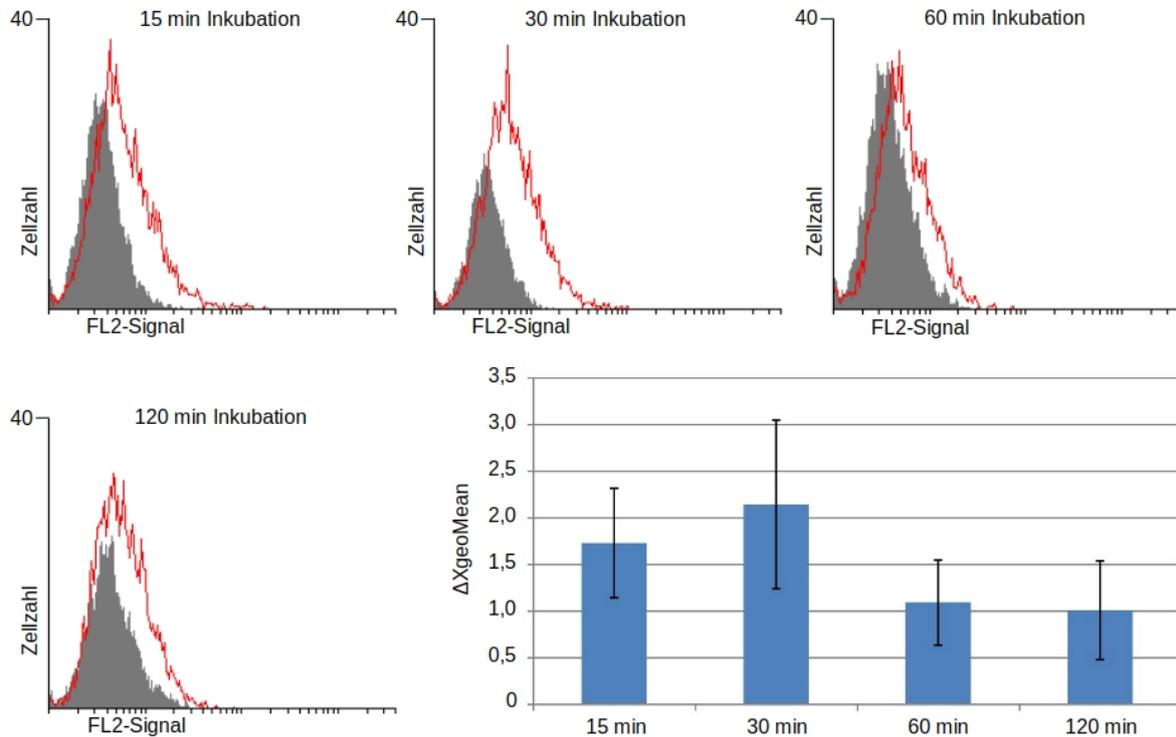
**Abbildung 16: Untersuchung zur Phagozytose von GFP exprimierenden *E. coli*-Zellen durch THP-1-Zellen**

Zytometrische Analysen der THP-1-Zellen nach dem Phagozytoseassay: pro Ansatz wurden  $10^6$  THP-1-Zellen verwendet welche mit  $5 \times 10^8$  inaktivierten *E. coli*-Zellen inkubiert wurden. (a) Histogrammdarstellung für den GFP-spezifischen Detektor FL1 für unterschiedliche Inkubationszeiten; grau: THP-1-Zellen welche mit nicht GFP-exprimierenden *E. coli*-Zellen inkubiert wurden und dem Leerwert entsprechen, rot: THP-1-Zellen inkubiert mit GFP-exprimierenden *E. coli*-Zellen; (b) Veränderung der mittleren Fluoreszenzintensität ( $\Delta X_{geoMean}$ ), welche auf den Leerwert normiert ist. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten und den dazugehörigen Standardfehlern; weitere Details zur Analyse siehe Abbildung 11.

### 5.4.2.3 Versuche zur Phagozytose von *E. coli*-Zellen, die das rekombinante MUC5AC-Fragment Cys2/3 exprimieren mit nachgeschaltetem EDIM-Assay

Nach den vielversprechenden Vorversuchen zur Phagozytose von GFP-Fusionsprotein exprimierenden *E. coli*-Zellen, wurde das Konstrukt Cys2/3, welches in den Vektor pMAL-p5X kloniert wurde (siehe 5.1.1), in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert. Nach erfolgter Test- und Hauptinduktion mit IPTG, welche durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung bestätigt werden konnten, wurde das Phagozytoseassay wie unter 5.4.2.2 durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mittels des intrazellulären Färbeprotokolls zuerst mit einem FITC-gelabelten anti-His-Tag-Antikörper markiert. Auch in diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzintensität über die Zeit zunimmt und ein Maximum bei ca. 15 % nach 4 h Inkubation aufweist (Daten nicht gezeigt). Dabei waren jedoch Probleme in der Ablösung der ausdifferenzierten THP-1-Zellen zu verzeichnen (dies zeigte sich auch schon unter 5.4.2.2). Nach der Inkubation und den folgenden Waschschritten kam es durch die Trypsinbehandlung teilweise zu vermehrter „Verklumpung“ der Zellen. Daraufhin wurde die Dauer der Trypsinbehandlung variiert, wobei makroskopisch bis etwa 3 min Inkubationszeit nur geringe Einflüsse oder Veränderungen der Zellanordnung ersichtlich waren. Zusätzlich wurde das Ablösen der Zellen mit einem Zellspatel unterstützt. Jedoch war auch unter diesen beiden Maßnahmen eine „Verklumpung“ der Zellen nicht zu verhindern, weshalb die Zellzahlen in den einzelnen Versuchsansätzen variierten.

Aufbauend auf dem Phagozytoseansatz, in welchem anschließend mittels His-Tag-Antikörper detektiert wurde, wurde das gleiche Experiment wiederholt und mit dem spezifischen MUC5AC-Antikörper 45M1 gefärbt. Da dieser Antikörper nicht direkt fluorophorkonjugiert ist, wurde in diesem Ansatz eine primäre Inkubation mit 45M1 und eine sekundäre Inkubation mit einem *goat-anti-mouse*-PE-Antikörper vollzogen. In der zytometrischen Analyse zeigte sich hierbei ein Fluoreszenzmaximum nach 30 min Inkubation, welches nach 2 h wieder abnahm. Aufgrund des frühen Maximums wurden für diese Ansätze Inkubationszeiten bis zu 2 h angesetzt (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Phagozytose von Cys2/3 exprimierenden *E. coli*-Zellen durch THP-1-Zellen**

Zytometrische Analysen der THP-1-Zellen nach dem Phagozytoseassay dargestellt in Histogrammdiagrammen: grau: sek. AK (1:50), rot: 45M1 (1:31) und sek. AK. Die Auswertung fand mittels des  $X_{geoMean}$  Wertes statt, wobei absolute Werte miteinander verglichen wurden.  $\Delta X_{geoMean}$  stellt dabei die Differenz der Fluoreszenzmaxima von prim. und sek. Antikörper subtrahiert mit dem Leerwert dar. Dabei wurde kein vorheriges Gating verwendet. In dem Diagramm rechts unten sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Versuchen und die dazugehörigen Standardfehler dargestellt, vergleiche Abbildung 16.

Für die unter 5.4.2.2 und 5.4.2.3 verwendeten Ansätze wurde eine anschließende Fluoreszenzmikroskopie, in der die intrazelluläre Anreicherung der Antigene verifiziert werden sollte, durchgeführt, welche sich aber aufgrund der sehr hohen Variabilität der einzelnen Ansätze als schwer zu beurteilen herausstellte (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend wurde in den Phagozytoseansätzen eine Zunahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit gemessen, welche je nach verwendetem Antikörper oder Fluorophor unterschiedliche Maxima aufwies. Daraus lässt sich vermuten, dass es realistisch ist, zuvor prokaryotisch exprimierte Proteine mittels ausdifferenzierter THP-1-Zellen aufzunehmen und anschließend intrazellulär mittels Antikörper zu detektieren und diese letztendlich zytometrisch zu analysieren. Dadurch konnte mithilfe dieses Zellmodells das EDIM-Verfahren soweit modellhaft nachgestellt werden, dass die wichtigen Parameter der Situation einer humanen Blutprobe ähneln.

## 6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den schon klinisch anwendbaren Tumortest PanTum Detect um tumorentitätsspezifische Marker zu erweitern. Dazu wurde in einem Zellmodell das EDIM-Verfahren nachgestellt, indem der Proteinmarker MUC5AC in das THP-1-Modellsystem eingebracht und dann mit dem anti-MUC5AC-Antikörper 45M1 nachgewiesen werden sollte. Aufgrund des großen Molekulargewichtes des Glykoproteins MUC5AC von 585 kDa in seiner monomeren Primärstruktur, wurden Abschnitte des Vollängenproteins, welche das Epitop von 45M1 aufzeigen, generiert, um stellvertretend für das Vollängenprotein im Modellsystem genutzt werden zu können.

Ein Teil der Arbeit war es, die Antikörperbindestelle von 45M1 zu untersuchen. Die komplette Primärstruktur des Epitops ist bisher nicht aufgeschlüsselt worden. Einen ersten Ansatz dazu lieferten Lidell *et al.*, indem sie in Westernblotuntersuchungen die Bindestelle dem C-Terminus des MUC5AC zuschrieben (Lidell *et al.* 2008). Es konnte in ihren Westernblotstudien gezeigt werden, dass ein die C-terminalen 1041 Aminosäuren umfassendes Proteinfragment von 45M1 erkannt wird. Weiterhin zeigten sie, dass eine N-terminale, 91 Aminosäuren umfassende Proteinsequenz dabei relevant für die Bindung des Antikörpers ist. Ein um diese 91 Aminosäuren kleineres Proteinfragment wurde hingegen nicht erkannt. Außerdem wird auch das Apo-Protein, welches unglykosyliert vorliegt, von dem Antikörper erkannt, wobei zu erwähnen ist, dass die Glykosylierungsstellen sich vor allem außerhalb der cysteinreichen Regionen des MUC5AC befinden (Abbildung 4). Darauf aufbauend wurden drei Expressionskonstrukte generiert, welche Teile des C-Terminus widerspiegeln: 91aa Sequenz, Cys9 und vWD4. Eine Publikation von Liu *et al.* 2015 zeigte zudem, dass 45M1 auch Fragmente des MUC5AC erkennt, welche dem mittleren Teil des Vollängenproteins zuzuordnen sind (Liu *et al.* 2015). Bezogen auf diese Veröffentlichung wurde das Konstrukt Cys2/3 generiert.

Sowohl unter denaturierenden aber nicht-reduzierenden als auch unter nativen Bedingungen kann 45M1 die Konstrukte Cys9, Cys2/3 und vWD4 detektieren, die 91aa-Sequenz wurde dabei nicht erkannt. Dies wurde mittels Westernblot und intrazellulärer Färbung mit angeschlossener zytometrischer Auswertung gezeigt. Außerdem wurde das Cys2/3-Fragment auch nach prokaryotischer Proteinexpression erkannt. Dabei waren die

Detektionsbedingungen die gleichen, wie bei der eukaryotischen Proteinexpression. Damit wird die oben genannte Aussage, dass das Epitop glykosylierungsunabhängig ist, bestätigt. Aus den Ergebnissen lässt sich die These aufstellen, dass die einzig kritische Komponente der Proteinfaltung, welche eine Relevanz für die Interaktion zwischen Epitop und Antikörper hat, die Disulfidbindung ist. Wären andere, die Tertiärstruktur stabilisierende Bindungen, wie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Aminosäureresten, Ionenbindungen oder intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen relevant für die Ausbildung des Epitops, dürften die Proteinfragmente im Westernblot nicht detektiert werden können. Vergleicht man die Primärstruktur der verwendeten Proteinfragmente, zeigt sich, dass eine Homologie zwischen den Konstrukten Cys2/3 und Cys9 besteht (Abbildung 5). Da das vWD4 Konstrukt die Sequenz von Cys9 enthält und diese um 340 Aminosäuren C-terminal erweitert ist, scheint es wahrscheinlich, dass das Epitop von 45M1 am ehesten dem Cys9 Fragment entspricht und vWD4 keine weiteren, für das Epitop relevanten Aminosäuren enthält. Dies lässt sich auch durch die strukturellen Unterschiede in der Aminosäuresequenz des vWD4-Fragmentes erklären, welche weniger cysteinreich ist. Das Epitop des Antikörpers ist reduktionssensibel, was sowohl aus der Literatur hervorgeht als auch im Westernblot verifiziert werden konnte. Vergleicht man die Konstrukte Cys9 und 91aa-Sequenz, so fällt auf, dass die Cys9 Struktur in ihren zusätzlichen C-terminalen 33 Aminosäuren vier Cysteine mehr aufweist. Auch das Cys2/3 Fragment stimmt in diesem Bereich mit Cys9 überein. Dies entspricht der grün markierten Sequenz in Abbildung 5. Es ist zu vermuten, dass dadurch eine zusätzliche Disulfidbindung eingegangen werden kann, wodurch eine Peptidsequenz evtl. in einer bestimmten räumlichen Anordnung exprimiert wird, welche das Epitop von 45M1 bildet. Dies entspricht auch der Vermutung von Lidell *et al.*, dass das Epitop abhängig von der Proteinkonformation gebildet wird. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass diese Cysteine nicht innerhalb des Cys9-Fragmentes kovalente Bindungen eingehen, sondern zur Anlagerung des weiter C-terminal nichtenzymatisch abgespaltenen MUC5AC-Fragmentes dienen (Lidell *et al.* 2006). Weiterhin wäre unter diesem Gesichtspunkt noch zu berücksichtigen, dass MUC5AC generell nach der Proteinbiosynthese Dimere bildet, die auch durch diese Disulfidbrücken stabilisiert werden könnten (Asker *et al.* 1998). Denkbar wäre auch, dass die zusätzlichen Cysteine gar keine Disulfidbindung eingehen und die zusätzlichen Aminosäuren des Cys9-Fragmentes in ihrer Tertiärstruktur relevante Aminosäuren enthalten, welche das Epitop bilden. In den Westernblotstudien zur Antikörper-Epitop-Interaktion liegen die

aufgereinigten Proteine als Dimer vor. Dies wird durch die N-terminalen *mFc*-Tags der sekretierten Proteine ermöglicht. Daraus lassen sich zwei Möglichkeiten für die Tertiärstruktur des Proteins ableiten. Entweder lagern sich die beiden Proteinketten nur an den *mFc*-Tags durch Disulfidbrücken an und der übrige, eigentliche Proteinteil faltet sich in sich, ohne dass beide Proteinketten miteinander interagieren, oder die beiden Proteinketten lagern sich linear aneinander und werden durch den hohen Gehalt an Cysteinen durch Disulfidbrücken stabilisiert. Würde letzteres zutreffen, wäre zu vermuten, dass der Antikörper 45M1 spezifisch die Sekundärstruktur detektiert. Dem gegenüber würden aber die Ergebnisse aus der intrazellulären Färbung der nativen Proteine stehen, da bei den intrazellulär vorliegenden Konstrukten keine N-terminalen *mFc*-Tags verwendet wurden. Jedoch ließe sich nicht ausschließen, dass die Proteine sich auch unter nativen Bedingungen linear anordnen. Um evaluieren zu können, ob die vier zusätzlichen Cysteine des Cys9-Konstruktes relevante Tertiärstruktureigenschaften haben, wären Mutationsanalysen notwendig, in denen diese zusätzlichen Cysteine durch strukturähnliche Aminosäuren wie beispielsweise Serin ersetzt werden. Dadurch ließe sich zumindest ausschließen, dass die in Cys9 zusätzlich enthaltenen Cysteinreste keine für das 45M1-Epitop relevanten Struktureigenschaften bezogen auf die Tertiärstruktur des MUC5AC haben.

Nachdem im ersten Teil der Arbeit MUC5AC-Proteinfragmente erzeugt wurden, welche von 45M1 erkannt werden, konnten diese für das EDIM-Modell-Assay weiterverwendet werden. Dazu war eine intrazelluläre Proteinanreicherung im THP-1-Modellsystem grundlegende Voraussetzung.

Zum Einbringen der entsprechenden Expressionsplasmide wurden verschiedene Transfektionsmethoden im Rahmen der Vorversuche an den THP-1-Zellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass auf Komplexionsmethoden basierende Transfektionen den Elektroporationsverfahren unterlegen waren. THP-1-Zellen werden als schwer zu transfizierende Zellen beschrieben, wobei für Komplexionsmethoden eine geringere Transfektionseffizienz berichtet wird (Maeß *et al.* 2014, Tang *et al.* 2018). In den unter 5.2.1 gezeigten durchflusszytometrischen Analysen wurde die Transfektionseffizienz indirekt aus den GFP-Signalen ermittelt. Als direkte Kontrolle dafür wäre eine qualitative PCR sinnvoll (Martinet *et al.* 2003). Bei Komplexionsmethoden (Turbofect™, Lipofectamine™, Metafectene®, etc.) wird die DNA durch Endozytose in die Zielzellen transferiert. Da THP-1-Zellen Monozyten sind, ist es wahrscheinlich, dass die Zellen die

DNA-Trägermolekülkomplexe phagozytieren und anschließend lysosomal abbauen. Bei der Nucleofection<sup>®</sup> werden durch Spannungsimpulse Poren in zellulären Membranen erzeugt, durch welche die Plasmide diffundieren können. Dabei gelangen diese direkt in den Nukleus und sind vor einem lysosomalen Verdau geschützt. Diese Überlegungen sind mit den Ergebnissen, welche in Abbildung 8 dargestellt sind, kompatibel.

Da das EDIM-Assay zytometrisch ausgelesen wird, wurden die THP-1-Zellen auch auf ihre Charakteristika bei der durchflusszytometrischen Analytik untersucht. Hierbei zeigen native THP-1-Zellen zwei Populationen im FSC-SSC-Dotplot, welche sich in Größe und Granularität unterscheiden (Abbildung 7). Es ist zu vermuten, dass die größere und etwas weniger granuläre Population die physiologisch vorkommenden THP-1-Zellen darstellen. Im Gegenzug bildet die kleinere aber mehr granuläre Population am ehesten tote oder früh apoptotische Zellen ab (Cossarizza *et al.* 2019). Dies lässt sich auch aus den Fluoreszenzsignalen der Zellen, die GFP exprimieren, schließen, welche in der vermeintlich lebenden Population am intensivsten sind. Nekrotische Zellen würden dabei keine GFP-Expression zeigen. Die schwachen GFP-Signale in der nekrotisch-apoptotischen Subpopulation lassen sich am ehesten durch das Zeitintervall begründen, welches zwischen Expression, Apoptose/Nekrose und Messzeitpunkt besteht. Zellen, welche unter physiologischen Bedingungen GFP exprimiert haben, könnten zum Messzeitpunkt schon nekrotisch oder apoptotisch sein, jedoch noch zytosolisches GFP aufweisen. Diese Interpretation wird durch publizierte Ergebnisse unterstützt, bei denen nach erfolgter Transfektion von GFP-Expressionsplasmiden schon nach wenigen Stunden erste Fluoreszenzsignale messbar sind (Martinet *et al.* 2003). Um genau überprüfen zu können, welche Zellpopulation vital, apoptotisch oder nekrotisch ist, wäre eine Färbung mittels Annexin-V (Apoptosemarker) und PI (Nekrosemarker) zielführend, da somit die nicht vitalen Zellen ausgeschlossen werden könnten.

Als zweite Vorversuchsreihe, welche für das EDIM-Zellmodell notwendig ist, wurde das intrazelluläre Färbeprotokoll angepasst. Um variable Transfektionseffizienzen und daraus folgende unterschiedliche Proteinexpressionen zu vermeiden, wurde zuerst ein nativ in den Zellen vorkommendes Protein, *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) zur Analytik verwendet. In den Untersuchungen zur Nachweisbarkeit von STAT3 in THP-1-Zellen zeigte sich eine Zunahme der spezifischen STAT3 Signale nach erfolgter Nucleofection<sup>®</sup> verglichen mit den Signalen ohne zwischengeschaltete Nucleofection<sup>®</sup>. Diese

Korrelation könnte kausal aus einer erhöhten Apoptose oder Nekrose der Zellen nach erfolgter Transfektion resultieren. Dafür spricht, dass durch die Nekrose *Damage associated molecular patterns* (DAMPs) abgegeben und von *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) erkannt werden. Als Initiator einer Entzündungsreaktion sind Monozyten in der Lage, in Reaktion auf solche Stimuli das proinflammatorische Zytokin Interleukin-6 (IL-6) zu sezernieren, welches durch Bindung an den IL-6-Rezeptor STAT3 aktiviert (Zhong *et al.* 1994). In THP-1-Zellen ist ein solcher Mechanismus vorstellbar, da diese den IL-6-Rezeptor exprimieren (Sanceau *et al.* 1991).

Aus intrinsischen Gründen beinhaltet dieser Versuch keinen parallelen Ansatz mit STAT3-negativen THP-1-Zellen, um eine eventuelle unspezifische Bindung des primären Antikörpers auszuschließen. Da STAT3 ein konstitutiv exprimiertes Molekül ist, wäre für eine mögliche Kontrolle beispielsweise ein siRNA Knockout von STAT3 denkbar, wobei zu überlegen ist, ob ein Ausschalten der STAT3 Funktion nicht mit einer Apoptose der Zellen einhergehen würde. Da das Experiment aber die Permeabilisierung und deren mögliche Behinderung durch eine vorangegangene Nucleofection® untersucht, ist dabei die spezifische oder unspezifische Bindung des Antikörpers zu vernachlässigen.

Aufbauend auf den oben genannten Vorversuchen wurde im zweiten Teil der Arbeit versucht, das EDIM-Assay mit dem THP-1-Zellmodell zu kombinieren. Im ersten Schritt wurde versucht die drei Fragmente Cys2/3, Cys9 und vWD4 in THP-1-Zellen zu exprimieren. Anschließend erfolgte der intrazelluläre Nachweis mittels P5D4-Tag-Antikörper. Grund für die Verwendung des P5D4-Antikörpers war, dass dieser direkt PE-konjugiert ist und damit nur eine einmalige Inkubation in der intrazellulären Detektion notwendig ist und technisch bedingte Verluste von Zellen minimiert werden können. Nach Standardprotokoll sowie auch nach Optimierungsversuchen war die Detektion in THP-1-Zellen nicht möglich. Maeß *et al.* beschreiben in ihrem Protokoll, dass die Speziesherkunft des verwendeten Serumzusatzes zum Nährmedium relevant für die Transfektion ist. Jedoch hatte die Verwendung von humanem Serum anstatt fetalem Kälberserum keinen Einfluss auf die intrazelluläre Detektion der Zielantigene. Es scheint unwahrscheinlich, dass die ausbleibende Detektierbarkeit der MUC5AC-Fragmente auf eine unzureichenden Transfektionseffizienz zurückzuführen ist, da Untersuchungen an GFP zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, mit dem verwendeten Nucleofections®-Verfahren THP-1-Zellen hinreichend effizient zu transfizieren.

Da es an dieser Stelle nicht eindeutig zu eruieren ist, an welchem Schritt von Transfektion bis zur Expression der Proteine ein Fehler auftritt, sollten weitere Untersuchungen stattfinden, um diesbezüglich genauere Informationen zu gewinnen. Zuerst gilt es, die Transfektion zu kontrollieren. Um genau evaluieren zu können, ob das Plasmid von den Zellen aufgenommen wurde, wäre nach erfolgter Transfektion eine Überprüfung der Zellen mittels qualitativer und quantitativer PCR sinnvoll, da nicht auszuschließen ist, dass das Einbringen des pcDNA3.1-Plasmides in die Zellen nur unzulänglich gelang (Martinet *et al.* 2003).

Monozyten sind aufgrund ihrer Phagozytoseeigenschaft sehr reaktiv gegenüber Fremdmaterial. Zytoplasmatische Enzyme, wie DNAsen sind somit in der Lage, fremde Nukleinsäuren zu zersetzen, wodurch eine intranukleäre Anreicherung gehemmt wird. Da anders als bei der Phagozytose bei der Nucleofektion<sup>®</sup> der Vektortransport direkt in den Nukleus stattfindet, ist hier eine vorherige Degradation eher unwahrscheinlich (Trompeter *et al.* 2003). Als nächstes ist die Transkription zu überprüfen, welche stark vom verwendeten Plasmid und dem darin enthaltenen Promoter, sowie von der Zelllinie abhängt (Qin *et al.* 2010). In THP-1-Zellen wird, solange diese sich im monozytären Status befinden, die Transkription von humanem Cytomegalie-Virus (hCMV) inhibiert. Durch Ausdifferenzierung unter Einfluss des NF- $\kappa$ B-Induktors PMA und damit einhergehender Änderung des Phänotyps zu Makrophagen kommt es zur Transkription des *CMV immediately early promoters* (Sinclair *et al.* 1992). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse, dass eine Expression mit dem pEGFP-N1 Konstrukt, welches auch der Regulation des CMV-Promoters unterliegt, hier beobachtet wurde. Dies sollte aber in der Zusammenschau aller möglicher Variablen, welche die zytometrische Detektierbarkeit der Proteinfragmente bedingen, interpretiert werden. GFP eignet sich als Indikator vor allem, weil es direkt nach der Biosynthese unter Anregung von blauem Licht fluoresziert. Dabei ist keine Fluoreszenzfärbung notwendig (Chalfie *et al.* 1994). Somit können die zytometrischen Messungen auf GFP normiert werden. Verglichen mit HEK-293T-Zellen ist die messbare GFP-Fluoreszenz in THP-1-Zellen geringer (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt). Dies würde die Hypothese bestärken, dass der CMV-Promoter in THP-1-Zellen inhibiert beziehungsweise reprimiert ist. Die zu messenden MUC5AC-Proteinfragmente müssen durch Fluorophor markierte Antikörper nachgewiesen werden. Da hierbei eine intrazelluläre Färbung notwendig ist, kann durch die begrenzte Sensitivität der Antikörperbindung das zu detektierende Protein unter der Nachweisgrenze liegen.

Als mögliche Kontrolle für eine relevante Transkription wäre ein Northernblot sinnvoll, wodurch gezeigt werden könnte, ob die die Proteinfragmente kodierende mRNA vorliegt. Außerdem könnte versucht werden, die MUC5AC-Fragmente durch eine direkte Transfektion mit *in-vitro* erzeugter mRNA zu exprimieren. Hierbei ist es möglich, eine unzulängliche Transkription zu umgehen (Martinet *et al.* 2003).

Einen weiteren kritischen Punkt in der Proteinbiosynthese stellt die Proteinfaltung nach erfolgter Translation dar. Aus den Untersuchungen an HEK-293T-Zellen ergibt sich, dass die MUC5AC-Fragmente intrazellulär exprimiert und auch detektiert werden können. HEK-293T-Zellen stellen eine Standard-Zelllinie für die effiziente Expression heterologer Proteine dar (Thomas *et al.* 2005). Auch in dieser Arbeit erwies sich diese Zelllinie als geeignet für diesen Zweck (siehe 5.1.1).

Proteine haben eine unterschiedliche intrazelluläre Halbwertszeit, was durch deren N-terminale Aminosäure bedingt ist (*N-end-rule*). Diese besagt, dass vor allem Proteine mit N-terminalem Aspartat, Asparagin, Lysin, Phenylalanin oder Arginin nur Halbwertszeiten von wenigen Stunden haben (Gonda *et al.* 1989). Die Primärstruktur der intrazellulären Konstrukte weist N-terminal nach dem durch das Startcodon synthetisierten Methionin ein Lysin auf. Dies würde aufgrund der *N-end-rule* sehr schnell degradiert werden und nach einer Inkubation von mindestens 8 Stunden wahrscheinlich nicht mehr nachweisbar sein (siehe 5.4.1). Andererseits war es aber möglich, in HEK-293T-Zellen nach 24 Stunden Inkubationszeit die Proteine intrazellulär zu detektieren. Möglicherweise hemmt hier das N-Terminale Methionin den Proteinabbau, da Lysin als zweite Aminosäure die Abspaltung von Methionin durch Methionin-Aminopeptidasen inhibiert (Boissel *et al.* 1985). Dieser Fakt würde die Vermutung widerlegen, dass die *N-end-rule* für den frühzeitigen Abbau in THP-1-Zellen ursächlich ist. Die unterschiedlichen Proteinbildungsraten in den beiden verwendeten Zelllinien könnten darauf zurückzuführen sein, dass in THP-1-Zellen posttranslationale Abbaumechanismen wie *ER-associated protein degradation* (ERAD) stärker ablaufen (Lippincott-Schwartz *et al.* 1988).

Schlussendlich muss das Nachweisverfahren überprüft werden. Die Vorversuche zur Detektion von STAT3 zeigen, dass das dafür angewendete Messprinzip auch im Modellsystem genutzt werden kann und somit eine insuffiziente Penetration der Antikörper unwahrscheinlich scheint.

Im letzten Teil der Arbeit wurde versucht, die intrazelluläre Proteinanreicherung mittels Phagozytose von zuvor rekombinant hergestellten Proteinfragmenten zu untersuchen. Dies würde dem Prinzip des PanTum Detect, welcher auf dem EDIM-Assay aufbaut, am ähnlichsten sein. Bei der Proteinbiosynthese besteht ein anderes chemisches Milieu für die generierten Proteine als bei der Phagozytose und nachgeschaltetem lysosomalem Verdau von Proteinen. Dies ist vor allem für die Verwendung des Antikörpers 45M1 relevant, da das Epitop wahrscheinlich von der Konformation des Proteins abhängt und dieses nach erfolgter Phagozytose verändert und dadurch evtl. nicht mehr für den Antikörper detektierbar vorliegt. Zuerst wurde die rezeptorvermittelte Phagozytose, welche über Fc-Teilen an Fc-Rezeptoren (FcR) bindet, in undifferenzierten THP-1-Zellen untersucht. Dabei konnte keine intrazelluläre Interaktion der Proteine detektiert werden. THP-1-Zellen exprimieren den FcγRII an der Oberfläche (Fleit *et al.* 1991). Dieser kann eine rezeptorvermittelte Phagozytose einleiten und erkennt auch *murine* Fc-Teile (Lubeck *et al.* 1985, Indik *et al.* 1991). Der verwendete *mFc*-Tag, welcher den Proteinen N-terminal angefügt ist, gehört zur Subgruppe der *murinen* IgG2a Antikörper. Diese bilden unter physiologischen Bedingungen Dimere aus. IgG2a bindet mit niedrigerer Affinität an FcγRIIa als IgG1 (Bruhns *et al.* 2009). Dies könnte ein Ausbleiben der Phagozytose am ehesten erklären. Des Weiteren wäre zu untersuchen, ob ein vorheriges Ausdifferenzieren zu Makrophagen die Aufnahme verbessert, obwohl die Fc-Rezeptor-Expression durch PMA-Behandlung nicht zunimmt (Fleit und Kobasiuk 1991).

Als zweiter Ansatz wurde die passive Phagozytose von Pathogenen untersucht. Dazu wurden das durch 45M1 detektierbare Proteinfragment Cys2/3 in *E. coli*-Zellen exprimiert und die abgetöteten Bakterien anschließend mit ausdifferenzierten THP-1-Zellen inkubiert (siehe 5.4.2.3). Bei der Inkubation mit dem Antikörper 45M1 zeigt sich ein Maximum nach ca. 30 Minuten und eine nachfolgende Abnahme der Fluoreszenzintensität. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Vorversuchen, in welchen nach der Phagozytose das MUC5AC-Fragment mittels anti-His-Antikörper detektiert wurde, ist zu bemerken, dass diese eine andere Fluoreszenzkinetik aufweisen. Hierbei nahm die Fluoreszenzintensität bis zu vier Stunden über die Zeit zu. Gleiches wurde auch in Versuchen, welche mit GFP-exprimierenden *E. coli*-Zellen durchgeführt wurden, beobachtet. Daraus ableitend lässt sich vermuten, dass das MUC5AC-Proteinfragment schon nach 15 Minuten aufgenommen wurde, jedoch seine intrazelluläre Interaktionsfähigkeit mit Veränderungen in der Tertiärstruktur einhergeht. Weil das Epitop von 45M1 konformationsabhängig ist, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die

Tertiärstruktur des Proteinfragmentes sehr schnell verloren geht. Ausdifferenzierte THP-1-Zellen lassen sich mittels Stimulation durch Lipopolysaccharid (LPS) in M1 Makrophagen polarisieren. Dies wird durch die vorzeitige Inkubation mit PMA zusätzlich unterstützt, da in beiden Fällen eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies zu beobachten ist (Johnston *et al.* 1978, Chanput *et al.* 2013). Daraus würde eine Destabilisierung der Tertiärstruktur resultieren und damit die Detektierbarkeit durch 45M1 verhindert werden. Dies ist aber ein zeitlicher Prozess, welcher sich im Rahmen der Phagosomenreifung vollzieht. Somit wäre es denkbar, dass zu Beginn der Bakterienaufnahme das Protein noch detektiert werden kann, dies aber im späteren Verlauf nicht mehr möglich ist. Dabei stellt sich die Frage, ob 45M1 aufgrund des eben beschriebenen Sachverhaltes überhaupt einen geeigneten Antikörper für eine klinische Durchführung des EDIM-Assays darstellt. Da dieses aber Monozyten misst, und nicht aktivierte Monozyten weniger intrazelluläre Radikalbildung aufweisen, wäre die oben beschriebene Epitop-Zerstörung wahrscheinlich geringer (Sasada *et al.* 1983).

Die Phagozytoseversuche waren in ihrer Reproduzierbarkeit variabel. Dies ist zum einen auf geringe Proteinexpression in den Bakterien zurückzuführen. Als kritischer Punkt des ganzen Verfahrens stellt sich die Ablösung der Zellen nach erfolgter Inkubation dar. Dies wurde mittels Trypsin-Behandlung erreicht. Da Trypsin aber recht aggressiv reagiert, kam es nach kurzer Inkubation schon zu Zellaggregaten. Diese wurden vor allem nach Abstoppen der Reaktion stärker. Wahrscheinlich kam es durch die Trypsinbehandlung zu Zellschäden, was in vermehrter DNA-Freisetzung mündet und zur Verklebung der einzelnen Zellen führt. Des Weiteren erhöht eine Trypsinbehandlung in THP-1-Zellen intrazellulär oxidative Enzyme (Johnston *et al.* 1981). In Kombination mit den weiter oben schon erwähnten Faktoren (PMA und LPS), welche diese oxidativen Reaktionen auch verstärken, kann davon ausgegangen werden, dass sich THP-1-Zellen zum Zeitpunkt des Ablösens unter oxidativem Stress befanden. Dieser würde einen Zellschaden zusätzlich begünstigen. Durch den beschriebenen Zellschaden kommt es dazu, dass die einzelnen Ansätze in ihrer Zellzahl unterschiedlich sind. Da bei der intrazellulären Detektion aber gleiche Mengen Antikörper verwendet wurden, variiert die Molekülmenge der Antikörper bezogen auf die Zellzahl von Ansatz zu Ansatz. Da dies auch für die mitgeführten Kontrollen zutrifft, erschwert sich die Vergleichbarkeit der Ansätze sowohl innerhalb eines Experimentes als auch zwischen verschiedenen Experimenten. Dies ist auch den unterschiedlich starken

Fluoreszenzintensitäten der Histogrammanalysen (siehe Abbildung 17) zu entnehmen. Maeß *et al.* beschreiben Acutase<sup>®</sup> als sanfte Alternative für Trypsin. Dies wäre für zukünftige Optimierungsversuche zu evaluieren. Des Weiteren können kommerziell erhältliche, mechanische Ablöseverfahren genutzt werden (Maeß *et al.* 2015). Im Rahmen einer Protokolloptimierung wäre auch zu evaluieren, ob geringere PMA-Konzentrationen für einen längeren Inkubationszeitraum eine Verbesserung sowohl der Phagozytose als auch der Zellablösung erreichen. Dies erklärt sich vor allem dadurch, dass THP-1-Zellen besser auf polarisierende Stimuli reagieren, wenn sie einer geringeren PMA-Konzentration ausgesetzt sind (Park *et al.* 2007, Maeß *et al.* 2014).

Aufbauend auf den Resultaten aus dem THP-1-Zellmodell in dieser Arbeit wäre zum einen eine klinische Evaluation der hier gezeigte Ergebnisse notwendig und zum anderen die Generierung von neuen, gegen das MUC5AC gerichteten Antikörpern indiziert. Zuerst könnte das EDIM-Assay mittels des Antikörpers 45M1 klinisch evaluiert werden. Dabei wäre zu untersuchen, ob Patient:innen mit Pankreaskarzinom vor Therapiebeginn in ihren Blutmonozyten MUC5AC aufweisen. Hier ist zu bemerken, dass sich direkt markierte Antikörper besser eignen, da somit ein technisch bedingter Zellverlust reduziert werden kann. Dies ist vor allem für die Genauigkeit der Messung relevant, da die CD14-CD16-positiven Monozyten nur eine kleine Subpopulation aufweisen und doppelte FärbeprozEDUREN die Population reduzieren könnten. Zudem ist das Epitop des Antikörpers 45M1 sensibel gegenüber Konformationsänderungen des Proteins. Dabei kann die chemische Umgebung der Phagolysosomen die Antikörperbindung behindern. Ein Antikörper, welcher das native Protein erkennt, jedoch kein konformationelles Epitop aufweist, wäre für dieses Vorhaben eventuell besser geeignet. Die in dieser Arbeit erstellten und aufgereinigten MUC5AC-Proteinfragmente würden als Antigene für eine Immunisierung dienen. Darauf aufbauend könnten Hybridoma-Zelllinien generiert werden, welche gegen die immunisierten Targets gerichtete Antikörper synthetisieren. Nach erfolgter Aufreinigung dieser wäre ein Screening der Antikörper notwendig, um deren Spezifität für das Volllängenprotein MUC5AC zu testen. Dabei könnten 45M1 und weiter anti-MUC5AC Antikörper als Kontrollantikörper dienen (Nollet *et al.* 2004). Nachdem Blut von Pankreaskarzinompatient:innen untersucht wurde, wäre eine Abgrenzung zu anderen soliden Tumoren notwendig. Vor allem weitere gastrointestinale Tumoren, welche eventuell auch eine MUC5AC-Erhöhung im Blut aufweisen, sollten dabei besonders beachtet werden.

## 7 Schlussfolgerungen

MUC5AC wird als mit dem Pankreaskarzinom assoziiertes Protein beschrieben, weshalb es als für eine entitätsspezifische Erweiterung des auf dem EDIM-Assay basierenden Tests PanTum Detect von Interesse ist. Der dazu verwendete Antikörper 45M1 weist ein bisher noch nicht komplett definiertes Epitop auf. Dazu konnte in dieser Arbeit mittels rekombinant erstellter MUC5AC-Proteinfragmenten das Epitop des Antikörpers auf ein 124 Aminosäuren langes C-terminal lokalisiertes Fragment (Cys9) eingeschränkt werden. Mittels generierter MUC5AC-Proteinfragmente wurde versucht, das EDIM-Assay modellhaft in monozytären THP-1-Zellen nachzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass das intrazelluläre Nachweisverfahren prinzipiell in dieser Zelllinie anwendbar ist. Jedoch war es in dieser Arbeit nicht möglich, mittels gängiger Expressionsvektoren die MUC5AC-Fragmente im THP-1-Zellmodell intrazellulär zu exprimieren. Neben verschiedenen Optimierungsansätzen wäre in zukünftigen Versuchen zu evaluieren, ob andere Expressionsplasmide mit anderen Promotern eine effizientere Proteinexpression ermöglichen. Des Weiteren könnten andere monozytäre Zelllinien, wie beispielsweise die Zellreihe U937, als Alternativ-Zellmodell für dieses Vorhaben untersucht werden.

Bei Phagozytoseversuchen unter Einsatz eines prokaryotisch erzeugten, rekombinanten MUC5AC-Proteinfragmentes erbrachten zytometrische Analysen Hinweise auf ein intrazelluläres Vorliegen. Dabei entsprechen diese Ergebnisse am ehesten einer Nachstellung des EDIM-Assays im THP-1-Zellmodell. Weil dieser Modellansatz der physiologischen Situation einer monozytären Antigenakkumulation am ehesten entspricht, wäre in weiteren Versuchen eine Optimierung des Verfahrens wichtig. Hierbei ist der Fokus besonders auf eine optimale PMA-Konzentration und eine ausreichend lange Inkubationszeit zu legen.

Weil in der Arbeit gezeigt werden konnte, dass der Antikörper 45M1 zur Detektion von intrazellulären MUC5AC-Fragmenten geeignet ist, wäre seine klinische Evaluation anzustreben. Dabei gilt es herauszufinden, ob MUC5AC sich im Blut von Pankreaskarzinom-Patienten mittels 45M1 nachweisen lässt und ob das Protein als tumorentitätsspezifischer Marker des Pankreaskarzinoms für eine Erweiterung des PanTum Detect in Frage kommt.

## 8 Literaturverzeichnis

- Altschul S F, Gish W, Miller W, Myers E W and Lipman D J. 1990. Basic local alignment search tool.. *Journal of molecular biology*, 3(215215):403 - 410
- Anderson C L and Loone R. 1986. Human leukocyte IgG Fc receptors. *Immunology Today*, 9(7):264-266
- Anderson C L, Shen L, Eicher D M, Wewers M D and Gill J K. 1990. Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes.. *Journal of Experimental Medicine*, 4(171):1333-1345
- Arandjelovic S and Ravichandran K S. 2015. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nature Immunology*, 9(16):907-917
- Asker N, Axelsson M A, Olofsson S O and Hansson G C. 1998. Human MUC5AC mucin dimerizes in the rough endoplasmic reticulum, similarly to the MUC2 mucin.. *The Biochemical journal*, 2(335):381-387
- Auwerx J, Staels B, Vaeck F V and Ceuppens J L. 1992. Changes in IgG Fc receptor expression induced by phorbol 12-myristate 13-acetate treatment of THP-1 monocytic leukemia cells. *Leukemia Research*, 3(16):317-327
- Auwerx J H, Deeb S, Brunzell J D, Peng R and Chait A. 1988. Transcriptional activation of the lipoprotein lipase and apolipoprotein E genes accompanies differentiation in some human macrophage-like cell lines. *Biochemistry*, 8(27):2651-2655
- Bara J, Chastre E, Mahiou J, Singh R L, Forgue-Lafitte M E, Hollande E and Godeau F. 1998. Gastric M1 mucin, an early oncofetal marker of colon carcinogenesis, is encoded by the MUC5AC gene.. *International journal of cancer*, 5(75):767-773
- Bara J, Gautier R, Daher N, Zaghouani H and Decaens C. 1986. Monoclonal Antibodies against Oncofetal Mucin M1 Antigens Associated with Precancerous Colonic Mucosae. *Cancer Research*, 8(46):3983-3989
- Bara J, Gautier R, Mouradian P, Decaens C and Daher N. 1991. Oncofetal mucin M1 epitope family: characterization and expression during colonic carcinogenesis.. *International journal of cancer*, 2(47):304-310

- Bara J, Loisillier F and Burtin P. 1980. Antigens of gastric and intestinal mucous cells in human colonic tumours. (41):209-221
- Boissel J P, Kasper T J, Shah S C, Malone J I and Bunn H F. 1985. Amino-terminal processing of proteins: hemoglobin South Florida, a variant with retention of initiator methionine and N alpha-acetylation.. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 24(82):8448-8452
- Bolós C D, Garrido M and Real F X. 1995. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. Gastroenterology, 3(109):723-734
- Böhm K. 2021. 9.1 Gesundheitszustand der Bevölkerung und Ressourcen der Gesundheitsversorgung. In: Statistisches Bundesamt (Destatis), Wissenschaftszentrum Berlin für Sozialforschung (WZB), Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung (BiB), Hrsg. Datenreport 2021: Ein Sozialbericht für die Bundesrepublik Deutschland. 17. Aufl. Sonstige: Bundeszentrale für politische Bildung, 331
- Brand R E, Nolen B M, Zeh H J, Allen P J, Eloubeidi M A, Goldberg M, Elton E, Arnoletti J P, Christein J D, Vickers S M, Langmead C J, Landsittel D P, Whitcomb D C, Grizzle W E and Lokshin A E. 2011. Serum Biomarker Panels for the Detection of Pancreatic Cancer. Clinical Cancer Research, 4(17):805-816
- Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi D A, Fernandez N, Jorieux S and Daëron M. 2009. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. Blood, 16(113):3716-3725
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W and Prasher D. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 5148(263):802-805
- Chanput W, Mes J J, Savelkoul H F J and Wichers H J. 2013. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. Food and Function, 2(4):266-276
- Chanput W, Mes J J and Wichers H J. 2014. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. International Immunopharmacology, 1(23):37-45

- Cossu G, Kuo A L, Pessano S, Warren L and Cooper R A. 1982. Decreased Synthesis of High-Molecular-Weight Glycopeptides in Human Promyelocytic Leukemic Cells (HL-60) during Phorbol Ester-induced Macrophage Differentiation. *Cancer Research*, 2(42):484-489
- Ezekowitz R A, Sastry K, Bailly P and Warner A. 1990. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells.. *Journal of Experimental Medicine*, 6(172):1785-1794
- Fierz W. 2004. Basic problems of serological laboratory diagnosis.. *Methods in molecular medicine*, 13(94):393-427
- Flannagan R S, Jaumouillé V and Grinstein S. 2012. The Cell Biology of Phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1(7):61-98
- Fleit H B and Kobasiuk C D. 1991. The Human Monocyte-Like Cell Line THP-1 Expresses FcγRI and FcγRII. *Journal of Leukocyte Biology*, 6(49):556-565
- Gold D V, Gaedcke J, Ghadimi B M, Goggins M, Hruban R H, Liu M, Newsome G and Goldenberg D M. 2013b. PAM4 enzyme immunoassay alone and in combination with CA 19-9 for the detection of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 3(119):522-528
- Gold D V, Lew K, Maliniak R, Hernandez M and Cardillo T. 1994. Characterization of monoclonal antibody PAM4 reactive with a pancreatic cancer mucin. *International Journal of Cancer*, 2(57):204-210
- Gold D V, Newsome G, Liu D and Goldenberg D M. 2013a. Mapping PAM4 (clivatuzumab), a monoclonal antibody in clinical trials for early detection and therapy of pancreatic ductal adenocarcinoma, to MUC5AC mucin. *Molecular Cancer*, 1(12):143
- Gonda D K, Bachmair A, Wüning I, Tobias J W, Lane W S and Varshavsky A. 1989. Universality and Structure of the N-end Rule. *Journal of Biological Chemistry*, 28(264):16700-16712
- Goonetilleke K and Siriwardena A. 2007. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 3(33):266-270

- Herre J, Marshall A S J, Caron E, Edwards A D, Williams D L, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Sousa C R e, Gordon S and Brown G D. 2004. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood*, 13(104):4038-4045
- Hoshi H, Sawada T, Uchida M, Saito H, Iijima H, Toda-Agetsuma M, Wada T, Yamazoe S, Tanaka H, Kimura K, Kakehashi A, Wei M, Hirakawa K and Wanibuchi H. 2011. Tumor-associated MUC5AC stimulates in vivo tumorigenicity of human pancreatic cancer. *International Journal of Oncology*, 3(38):
- Indik Z, Kelly C, Chien P, Levinson A I and Schreiber A D. 1991. Human Fc gamma RII, in the absence of other Fc gamma receptors, mediates a phagocytic signal.. *Journal of Clinica Investigation*, 5(88):1766-1771
- Johnston J R B, Godzik C A and Cohn Z A. 1978. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 1(148):115-129
- Johnston R B, Chadwick D A and Cohn Z A. 1981. Priming of macrophages for enhanced oxidative metabolism by exposure to proteolytic enzymes.. *Journal of Experimental Medicine*, 6(153):1678-1683
- Jonckheere N, Skrypek N and Seunigen I V. 2010. Mucins and Pancreatic Cancer. *Cancer*, 4(2):1794-1812
- Kaur S, Smith L M, Patel A, Menning M, Watley D C, Malik S S, Krishn S R, Mallya K, Aithal A, Sasson A R, Johansson S L, Jain M, Singh S, Guha S, Are C, Raimondo M, Hollingsworth M A, Brand R E and Batra S K. 2017. A Combination of MUC5AC and CA19-9 Improves the Diagnosis of Pancreatic Cancer: A Multicenter Study.. *The American journal of gastroenterology*, 1(112):172-183
- Kreis T. 1986. Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface.. *The EMBO Journal*, 5(5):931-941
- Ku Y-C, Lai M-H, Lo C-C, Cheng Y-C, Qiu J-T, Tarn W-Y and Lai M-C. 2019. DDX3 Participates in Translational Control of Inflammation Induced by Infections and Injuries.. *Molecular and cellular biology*, 1(39):e00285-18

- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 2.0, 2021, AWMF Registernummer: 032-010OL
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL
- Licona-Limón I, Garay-Canales C A, Muñoz-Paletta O and Ortega E. 2015. CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 1(98):85-98
- Lidell M E, Bara J and Hansson G C. 2008. Mapping of the 45M1 epitope to the C-terminal cysteine-rich part of the human MUC5AC mucin.. *The FEBS journal*, 3(275):481-489
- Lidell M E and Hansson G C. 2006. Cleavage in the GDPH sequence of the C-terminal cysteine-rich part of the human MUC5AC mucin.. *The Biochemical journal*, 1(399):121-129
- Lippincott-Schwartz J, Bonifacino J S, Yuan L C and Klausner R D. 1988. Degradation from the endoplasmic reticulum: Disposing of newly synthesized proteins. *Cell*, 2(54):209-220
- Liu D, Chang C-H, Gold D V and Goldenberg D M. 2015. Identification of PAM4 (clivatuzumab)-reactive epitope on MUC5AC: a promising biomarker and therapeutic target for pancreatic cancer.. *Oncotarget*, 6(6):4274-4285
- Loosen S H, Neumann U P, Trautwein C, Roderburg C and Luedde T. 2017. Current and future biomarkers for pancreatic adenocarcinoma. *Tumor Biology*, 6(39):1010428317692231
- Lubeck M D, Steplewski Z, Baglia F, Klein M H, Dorrington K J and Koprowski H. 1985. The interaction of murine IgG subclass proteins with human monocyte Fc receptors.. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2(135):1299-1304

- Luo G, Fan Z, Cheng H, Jin K, Guo M, Lu Y, Yang C, Fan K, Huang Q, Long J, Liu L, Xu J, Lu R, Ni Q, Warshaw A L, Liu C and Yu X. 2018. New observations on the utility of CA19-9 as a biomarker in Lewis negative patients with pancreatic cancer. *Pancreatology*, 8(18):971-976
- Maeß M B, Keller A-A, Rennert K, Mosig A and Lorkowski S. 2015. Optimization of the transfection of human THP-1 macrophages by application of Nunc UpCell technology. *Analytical Biochemistry*, (479):40-42
- Maeß M B, Wittig B, Cignarella A and Lorkowski S. 2014b. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *Journal of Immunological Methodes*, 1-2(402):76-81
- Maeß M B, Wittig B and Lorkowski S. 2014a. Highly efficient transfection of human THP-1 macrophages by nucleofection.. *Journal of Visualized Experiments*, 91e51960
- Martinet W, Schrijvers D M and Kockx M M. 2003. Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells.. *Biotechnology letters*, 13(25):1025-1029
- Metschnikoff E. 1884. Ueber die Beziehung der Phagocyten zu Milzbrandbacillen. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*, 3(97):502-526
- Nollet S, Escande F, Buisine M P, Forgue-Lafitte M E, Kirkham P, Okada Y and Bara J. 2004. Mapping of SOMU1 and M1 epitopes on the apomucin encoded by the 5' end of the MUC5AC gene.. *Hybridoma and hybridomics*, 2(23):93-99
- Park E K, Jung H S, Yang H I, Yoo M C, Kim C and Kim K S. 2007. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*, 1(56):45-50
- Peiser L, Gough P J, Kodama T and Gordon S. 2000. Macrophage Class A Scavenger Receptor-Mediated Phagocytosis of *Escherichia coli*: Role of Cell Heterogeneity, Microbial Strain, and Culture Conditions In Vitro. *Infection and Immunity*, 4(68):1953-1963

- Poruk K E, Firpo M A, Scaife C L, Adler D G, Emerson L L, Boucher K M and Mulvihill S J. 2013. Serum Osteopontin and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreas*, 2(42):193-197
- Pritzkeleit R, Beske F and Katalinic A. 2010. Demographischer Wandel und Krebserkrankungen in der Zukunft. *Onkologie*, 7(33):19-24
- Qin J Y, Zhang L, Clift K L, Huler I, Xiang A P, Ren B-Z and Lahn B T. 2010. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One*, 5(5):e10611
- Qin Z. 2012. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, 1(221):2-11
- Rabinovitch M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biology*, 3(5):85-87
- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Hrsg. 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. Berlin, 26-31 und 60-63
- Rodríguez-Piñeiro A M, Bergström J H, Ermund A, Gustafsson J K, Schütte A, Johansson M E V and Hansson G C. 2013. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 5(305):G348-G356
- Rosales C and Uribe-Querol E. 2017. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Research International*, (2017):9042851
- Rosen A V, Linder S, Harmenberg U and Pegert S. 1993. Serum Levels of CA 19-9 and CA 50 in Relation to Lewis Blood Cell Status in Patients with Malignant and Benign Pancreatic Disease. (8):160-165
- Ross G D, Reed W, Dalzell J G, Becker S E and Hogg N. 1992. Macrophage cytoskeleton association with CR3 and CR4 regulates receptor mobility and phagocytosis of iC3b-opsinized erythrocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 2(51):109-117

- Safi F, Roscher R, Bittner R, Schenkluhn B, Dopfer H-P and Beger H G. 1987. High Sensitivity and Specificity of CA 19-9 for Pancreatic Carcinoma in Comparison to Chronic Pancreatitis. Serological and Immunohistochemical Findings. 4(2):398-403
- Sanceau J, Wijdenes J, Revel M and Wietzerbin J. 1991. IL-6 and IL-6 receptor modulation by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in human monocytic cell line (THP-1). Priming effect of IFN-gamma. The Journal of Immunology, 8(147):2630-2637
- Sasada M, Pabst M J and Johnston R B. 1983. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase.. The Journal of Biological Chemistry, 16(258):9631-9635
- Satake K, Kanazawa G, Kho I, Chung Y and Umeyama K. 1985. Evaluation of serum pancreatic enzymes, carbohydrate antigen 19-9, and carcinoembryonic antigen in various pancreatic diseases. The American journal of gastroenterology, 8(80):630—636
- Seiler M. 2021. Untersuchungen zum Interaktionspotential von Transmembrandomänen des Thymic Stromal Lymphopoietin-Rezeptorkomplexes in einem bakteriellen Modellsystem [Masterarbeit]. Jena: Ernst-Abbe-Hochschule
- Sessa F, Bonato M, Frigerio B, Capella C, Solcia E, Prat M, Bara J and Samloff I. 1990. Ductal cancers of the pancreas frequently express markers of gastrointestinal epithelial cells. Gastroenterology, 6(98):1655-1665
- Sheehan J K, Brazeau C, Kutay S, Pigeon H, Kirkham S, Howard M and Thornton D J. 2000. Physical characterization of the MUC5AC mucin: a highly oligomeric glycoprotein whether isolated from cell culture or in vivo from respiratory mucous secretions.. The Biochemical journal, 1(347):37-44
- Sheehan J K, Kirkham S, Howard M, Woodman P, Kutay S, Brazeau C, Buckley J and Thornton D J. 2004. Identification of molecular intermediates in the assembly pathway of the MUC5AC mucin.. The Journal of biological chemistry, 15(279):15698-15705
- Shiratori H, Feinweber C, Luckhardt S, Linke B, Resch E, Geisslinger G, Weigert A and Parnham M J. 2017. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. Molecular Immunology, (88):58-68

- Sinclair J H, Baillie J, Bryant L A, Taylor-Wiedeman J A and Sissons J G. 1992. Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression in a monocytic cell line.. *The Journal of general virology*, 2(73):433-435
- Starker A, Buttman-Schweiger N, Krause L, Barnes B, Kraywinkel K and Holmberg C. 2018. Krebsfrüherkennungsuntersuchungen in Deutschland: Angebot und Inanspruchnahme. (61):1491-1499
- Strous G J and Dekker J. 1992. Mucin-Type Glycoproteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1-2(27):57-92
- Tang X, Aljahdali B, Alasiri M, Bamashmous A, Cao F, Dibart S and Salih E. 2018. A method for high transfection efficiency in THP-1 suspension cells without PMA treatment.. *Analytical biochemistry*, (544):93-97
- Thomas P and Smart T G. 2005. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 3(51):187-200
- Trompeter H-I, Weinhold S, Thiel C, Wernet P and Uhrberg M. 2003. Rapid and highly efficient gene transfer into natural killer cells by nucleofection.. *Journal of immunological methods*, 1-2(274):245-256
- Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T and Tada K. 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Research*, 4(42):1530-1536
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T and Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).. *International journal of cancer*, 2(26):171-176
- Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, Benfeitas R, Arif M, Liu Z, Edfors F, Sanli K, von Feilitzen K, Oksvold P, Lundberg E, Hober S, Nilsson P, Mattsson J, Schwenk J M, Brunnström H, Glimelius B, Sjöblom T, Edqvist P-H, Djureinovic D, Micke P, Lindskog C, Mardinoglu A and Ponten F. 2017. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*, 6352(357):eaan2507

- Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzesse J L, Frazier M L, Killary A M and Sen S. 2009. MicroRNAs in Plasma of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients as Novel Blood-Based Biomarkers of Disease. *Cancer Prevention Research*, 9(2):807-813
- Wild C P, Espina C, Bauld L, Bonanni B, Brenner H, Brown K, Dillner J, Forman D, Kampman E, Nilbert M, Steindorf K, Storm H, Vineis P, Baumann M and Schüz J. 2019. *Cancer Prevention Europe. Molecular Oncology*, 3(13):528-534
- Wohlmann A, Sebastian K, Borowski A, Krause S and Friedrich K. 2010. Signal transduction by the atopy-associated human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor depends on Janus kinase function. *Biological Chemistry*, 2-3(391):181-186
- Yonezawa S, Horinouchi M, Osako M, Kubo M, Takao S, Arimura Y, Nagata K, Tanaka S, Sakoda K, Aikou T and Sato E. 1999. Gene expression of gastric type mucin (MUC5AC) in pancreatic tumors: Its relationship with the biological behavior of the tumor. *Pathology International*, 1(49):45-54
- Zhang J, Wang Y, Zhao T, Li Y, Tian L, Zhao J and Zhang J. 2020. Evaluation of serum MUC5AC in combination with CA19-9 for the diagnosis of pancreatic cancer.. *World journal of surgical oncology*, 1(18):31
- Zhong Z, Wen Z and Darnell J. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 5155(264):95-98

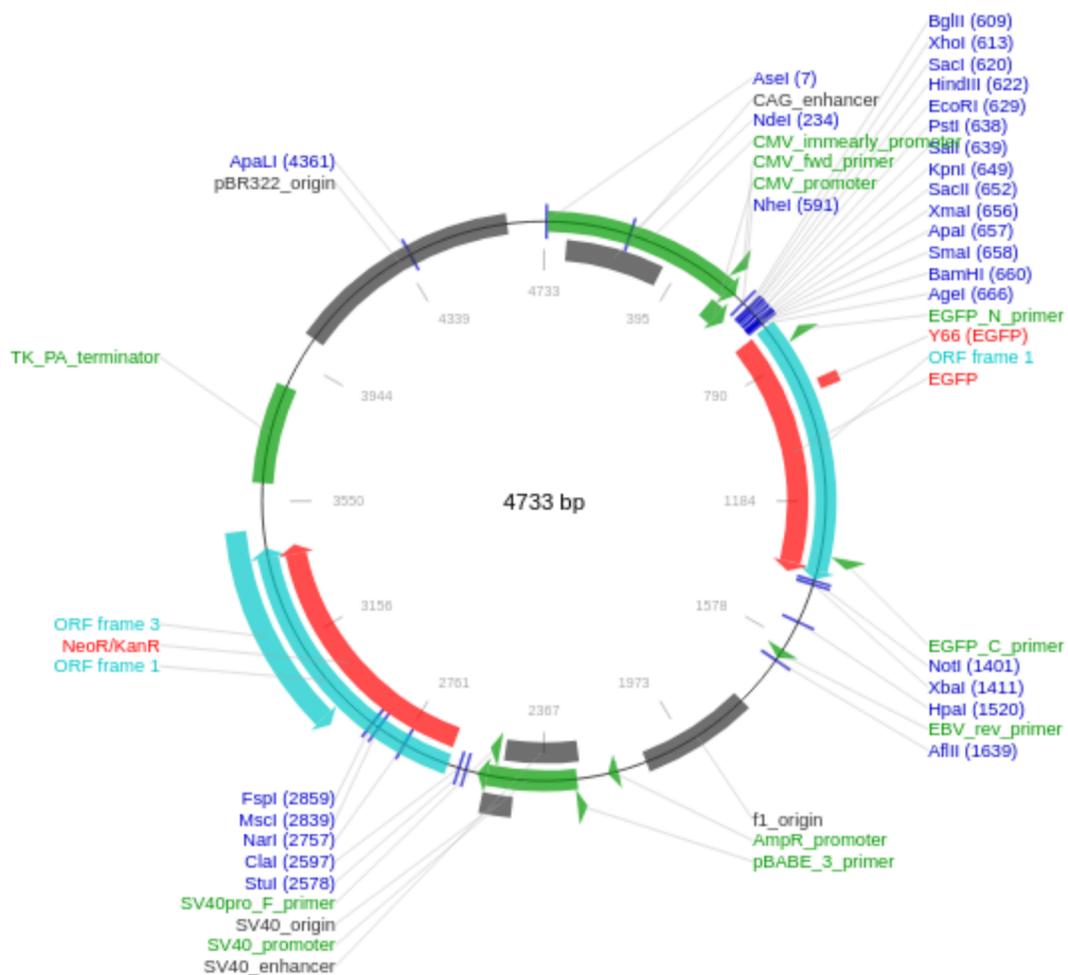
## 9 Anhang

### 9.1 DNA-Sequenzen

Die für die Klonierungsexperimente verwendete DNA Sequenz des MUC5AC wurde der GenBank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) unter der *Acession number*: NM\_001304359 entnommen.

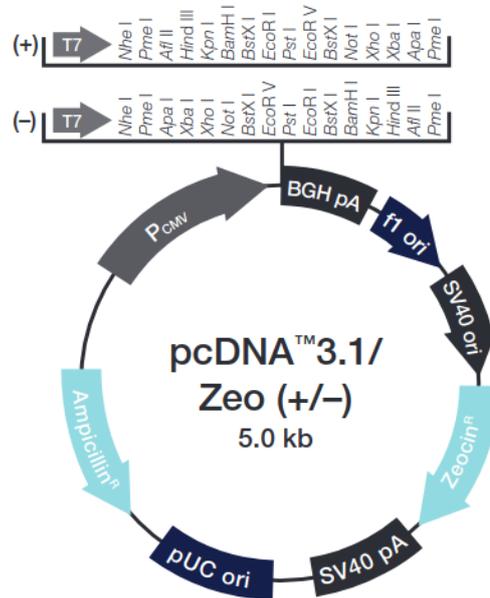
### 9.2 Plasmidkarten

pEGFP-N1



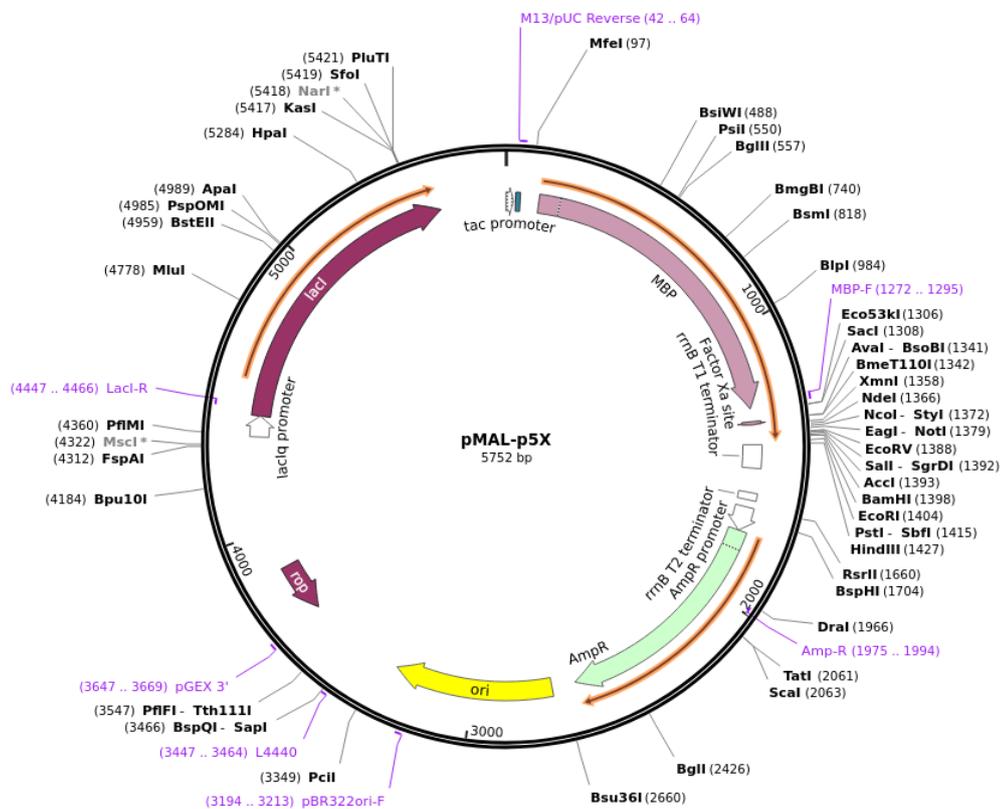
(Quelle: <https://www.addgene.org/vector-database/2491/> ; 04.04.2022, 14:28 Uhr)

pcDNA3.1/Zeo(+/-)



(Quelle: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Ftools.thermofisher.com%2Fcontent%2Ffs%2Fvectors%2Fpcdna3.1zeo\\_map.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Ftools.thermofisher.com%2Fcontent%2Ffs%2Fvectors%2Fpcdna3.1zeo_map.pdf) ; 19.02.2022, 18:22 Uhr)

pMAL-p5X



(Quelle: <https://www.addgene.org/browse/sequence/306372/> ; 20.02.2022, 18:05 Uhr)

### 9.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind rot und die 8xHis-Tags sind grün markiert.

**Tabelle 9: Verwendete Primer**

Name	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
45M1_mFcTag_fwd	GTAAAGCTAGCCACGAGAAGACAACCC	Nhe1
45M1_mFcTag_rev	TGATGGATCCCCGGCACACCAGGCC	BamH1
Cys9_intrazell_fwd	GTCCACTCGAGGCAAAGACAACCCACTCC	Xho1
Cys9_intrazell_rev	CTGCCCTAGACTATCAGTGATGGTGGTGATG ATGGTGATGAGATCCTGGGGTCACAGAGGTC ACCGGGC	Xba1
Epitop1_Cys3_fwd	GTAAAGCTAGCTCCTCCTGCCTGCAGGAGCT TTGCACCTGGACCG	Nhe1
Epitop1_Cys3_rev	TGATGGATCCAGGTGTGGAGGTCATGTGGC AGCCTCTGGG	BamH1
MUC5AC_Cys3_His_intra_rev	CTGCCCTAGACTATCAGTGATGGTGGTGATG ATGGTGATGAGATCCAGGTGTGGAGGTCATG TGGC	Xba1
MUC5AC_Cys3_intra_fwd	GTCCACTCGAGTCCTCCTGCCTGCAGGAGC	Xho1
pcDNA14_45M1vWD_rev	TGAGAGGATCCCGTCCCCCTAGGCGTG	BamH1
pcDNA14_45M1_Cys9_rev	TGATGGATCCTGGGGTCACAGAGGTCACCG GGC	BamH1
pMal-p5X-45M1-for	TTTCTGGATCCACGAGAAGACAACCCACTC CCAACC	BamH1
pMal-p5X-45M1-rev	TGGTTGAATCCCGGCACACCAGGCC	EcoR1

Name	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
pMal-p5X-MUC5AC-Cys3-for	TCGACGGATCCTCCTCCTGCCTGCAGG	BamH1
pMal-p5X-MUC5AC-Cys3-rev	GCAGGGAATTCCTATCAGTGATGGTGGTGATG ATGGTGATGAGATCCAGGTGTGGAGGTCATG TGGC	EcoR1

#### 9.4 Gensequenzen der generierten Plasmiden

Nachfolgend sind die Gensequenzen der Inserts der in dieser Arbeit generierten Plasmide aufgelistet. Rot markiert sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind rot markiert (Schreibweise 5' → 3') der Enzyme BamHI: **GGATCC**, EcoRI: **GAATTC**, NheI: **GCTAGC**, XbaI: **TCTAGA**, XhoI: **CTCGAG** und die einzelnen Sequenzabschnitte jeweils farbig unterstrichen.

##### pCD14SP-mFc-45M1Epitop-8His

ATGGAGCGCGCTCCTGCTTGTGCTGCTGCTGCCGCTGGTGCACGTCTCTGCTAGTGCACCCA  
GAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATC  
CGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTG  
TGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAG  
TACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCC  
TCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAGACC  
TCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATG  
TCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACT  
TCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACA  
CTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGA  
ACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGA  
CTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAGCTAGCAGGAGAGACAACCCACTCCAACCAGTCA  
CCAGTACTGTCATCCTCTGTGCGCCTGGACAAAGTGGTTTCGACGTGGACTTCCCATCCCCTGGACC  
CCACGGCGGGGACAAGGAAACCTACAACAACATCATCAGGAGTGGGGAAAAAATCTGCCGCCGAC  
CTGAGGAGATCACCAGGCTCCAGTGCCGAGCCGAGAGCCACCCGGAGGTGAACATTGAACACCTG  
GGTCAGGTGGTGCAGTGCAGCCGTGAAGAGGGCCTGGTGTGCCGGGGATCCATCACCATCATCAC  
CACCATCACTGA

CD14SP, mFc-Tag, 91aa-Sequenz, 8xHis-Tag

**pcDNA3.1-P5D4-Cys9-HIS**

ATGAATCGTCTTGAAAGCCGGGTCCA**CTCGAG**GCAAAGACAACCCACTCCCAACCAGTCACCAGT  
GACTGTCATCTCTGTGCGCCTGGACAAAGTGGTTCGACGTGGACTTCCCATCCCCTGGACCCACG  
GCGGGACAAGGAAACCTACAACAACATCATCAGGAGTGGGGAAAAAATCTGCCGCCGACCTGAG  
GAGATCACCAGGCTCCAGTGCCGAGCCGAGAGCCACCCGGAGGTGAACATTGAACACCTGGGTCA  
GGTGGTGCAGTGCAGCCGTGAAGAGGGCCTGGTGTGCCGGAACCAGGACCAGCAGGGACCCTTCA  
AGATGTGCCTCAACTACGAGGTGCGCGTGCTCTGCTGCGAGACCCCCAGAGGCTGCCCGGTGACCT  
CTGTGACCCAGGATCTCATCACCATCATCACCACCATCACTGATAG**TCTAGA**

P5D4-Tag, Cys9, 8xHis-Tag

**pCD14SP-mFc-45M1Epitop-Cys9-8His**

ATGGAGCGCGCTCCTGCTTGTGCTGCTGCTGCTGCCGCTGGTGCACGTCTCTGCTAGTGCACCCA  
GAGGGCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATC  
CGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTG  
TGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAG  
TACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCC  
TCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAGACC  
TCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATG  
TCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACT  
TCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACA  
CTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGA  
ACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCAAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGA  
CTAAGAGCTTCTCCCGACTCCGGGTAAA**GCTAGC**GCAAAGACAACCCACTCCCAACCAGTCACCA  
GTGACTGTCATCTCTGTGCGCCTGGACAAAGTGGTTCGACGTGGACTTCCCATCCCCTGGACCCCA  
CGGCGGGACAAGGAAACCTACAACAACATCATCAGGAGTGGGGAAAAAATCTGCCGCCGACCTG  
AGGAGATCACCAGGCTCCAGTGCCGAGCCGAGAGCCACCCGGAGGTGAACATTGAACACCTGGGT  
CAGGTGGTGCAGTGCAGCCGTGAAGAGGGCCTGGTGTGCCGGAACCAGGACCAGCAGGGACCCTT  
CAAGATGTGCCTCAACTACGAGGTGCGCGTGCTCTGCTGCGAGACCCCCAGAGGCTGCCCGGTGAC  
CTCTGTGACCCCA**GGATCC**CATCACCATCATCACCACCATCACTGA

CD14SP, mFc-Tag, Cys9, 8xHis-Tag

**pCD14SP-mFc-MUC5AC-Cys3-8His**

ATGGAGCGCGCGTCCTGCTTGTGCTGCTGCTGCTGCCGCTGGTGCACGTCTCTGCTAGTGCACCCA  
GAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATC  
CGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTG  
TGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAG  
TACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCC  
TCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGCCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACC  
TCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATG  
TCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACT  
TCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACA  
CTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGA  
ACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGA  
CTAAGAGCTTCTCCCGACTCCGGGTAAGCTAGCTCCTGCCTGCAGGAGCTTTGCACCTGGAC  
CGAGTGGATCGATGGCAGCTACCCTGCTCCTGGAATAAATGGTGGAGATTTTGACACATTTCAAAATT  
TGAGAGACGAAGGATACACATTCTGTGAAAGTCCTCGAAGCGTGCAGTGCCGGGCAGAGAGCTTCC  
CCAACACGCCGCTGGCAGACCTGGGGCAGGACGTCATCTGCAGCCACACAGAGGGGGCTGATTTGCC  
TGAACAAGAACCAGCTCCCACCCATCTGCTACAACATATGAGATCCGCATCCAGTGTGCGAGACGGT  
GAACGTGTGCAGAGACATCACCAGACTGCCAAAGACCGTCGCAACGACACGGCCGACTCCACATCC  
AACCGGAGCTCAGACCCAGACCACCTTACCACACACATGCCCTCGGCCTCCACAGAGCAACCCAC  
GGCAACCTCCAGGGGTGGGCCCACAGCAACCAGCGTCACACAGGGCACCCACACCACACTAGTCA  
CCAGAACTGTCATCCCCGGTGCACCTGGACAAAGTGGTTCGACGTGGACTTCCCGTCCCCCGGAC  
CCCATGGTGGAGACAAGGAAACCTACAACAACATCATCAGGAGTGGGGAAAAAATCTGCCGCCGAC  
CTGAGGAGATCACCAGGCTCCAGTGCCGAGCCAAGAGCCACCCAGAGGTGAGCATCGAACACCTG  
GGCCAGGTGGTGCAGTGCAGCCGGGAAGAGGGCCTGGTGTGCCGGAACCAGGACCAGCAGGGACC  
CTTCAAGATGTGCCTCAACTACGAGGTGCGTGTGCTCTGCTGCGAGACCCCCAGAGGCTGCCACAT  
GACCTCCACACCTGGATCCCATCACCATCATCACCACCATCACTGA

CD14SP, mFc-Tag, Cys3, 8xHis-Tag

**pCD14SP-mFc-45M1Epitop-vWD4mutBamHI-8His**

ATGGAGCGCGCGTCCTGCTTGTGCTGCTGCTGCTGCCGCTGGTGCACGTCTCTGCTAGTGCACCCA  
GAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATC  
CGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTG  
TGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAG  
TACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCC  
TCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGCCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACC  
TCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATG  
TCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACT  
TCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACA

CTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGA  
ACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCACTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGA  
CTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAAGCTAGCAAAGACAACCCACTCCCAACCAGTCACCAGTG  
ACTGTCATCCTCTGTGCGCCTGGACAAAGTGGTTCGACGTGGACTTCCCATCCCCTGGACCCACGG  
CGGGGACAAGGAAACCTACAACAACATCATCAGGAGTGGGGAAAAAATCTGCCGCCGACCTGAGG  
AGATCACCAGGCTCCAGTGCCGAGCCGAGAGCCACCCGGAGGTGAACATTGAACACCTGGGTGAG  
GTGGTGCAGTGCAGCCGTGAAGAGGGCCTGGTGTGCCGGAACCAGGACCAGCAGGGACCCTTCAA  
GATGTGCCTCAACTACGAGGTGCGCGTGCTCTGCTGCGAGACCCCAAGGCTGCCCGGTGACCTC  
TGTGACCCCATATGGGACTTCTCCTACCAATGCTCTGTATCCTTCCCTGTCTACTTCCATGGTATCCGC  
CTCCGTGGCATCCACCTCTGTGGCATCCAGCTCTGTGGCATCCAGCTCTGTGGCTTACTCCACCCAA  
ACCTGCTTCTGCAACGTGGCTGACCGGCTCTACCCTGCAGGGTCCACCATATACCGCCACAGAGACC  
TCGCTGGCCATTGCTATTATGCCCTGTGTAGCCAGGACTGCCAAGTGGTCAGAGGGGTTGACAGTGA  
CTGTCCGTCCACCACGCTGCCTCCTGCCCCAGCCACGTCCCCTTCAATATCCACCTCCGAGCCCGTC  
ACTGAGCTGGGATGCCCAAATGCGGTTCACCCAGAAAGAAAGGTGAGACCTGGGCCACACCCAA  
CTGCTCCGAGGCCACCTGTGAGGGCAACAACGTCTCTCCCTGCGCCCGCGCACGTGCCCGAGGGT  
GGAGAAGCCACTTGTGCCAACGGCTACCCGGCTGTGAAGGTGGCTGACCAAGATGGCTGCTGCCA  
TCACTACCAGTGCCAGTGTGTGTGCAGCGGCTGGGGTGACCCCACTACATCACCTTCGACGGCACC  
TACTACACCTTCTGGACAACCTGCACGTACGTGCTGGTGCAGCAGATTGTGCCCGTGTATGGCCACT  
TCCGCGTGCTCGTCGACAACCTTCTGCGGTGCGGAGGACGGGCTCTCCTGCCCGAGGTCCATCAT  
CCTGGAGTACCACCAGGACCGGTGGTGTGACCCGCAAGCCAGTCCACGGGGTGATGACAAACG  
AGATCATCTTCAACAACAAGGTGGTCAGCCCCGGCTTCCGGAAAAACGGCATCGTGGTCTCGCGCA  
TCCGCGTCAAGATGTACGCGACCATCCCGGAGCTGGGAGTCCAGGTCATGTTCTCCGGCCTCATCTT  
CTCCGTGGAGGTGCCCTTACAGCAAGTTTGCCAACAACACCGAGGGCCAGTGCGGCACTTGCACCAA  
CGACAGGAAGGATGAGTGCCGCACGCCTAGGGGGACGGGATCCCATCACCATCATCACCACCATCA  
CTGA

CD14SP, mFc-Tag, vWD4, 8xHis-Tag

### **pcDNA3.1-P5D4-45M1vWD4mutBamHI-His**

ATGAATCGTCTTGAAAAGCCGGGTCCACTCGAGAAGACAACCCACTCCCAACCAGTCACCAGTGAC  
TGTCATCCTCTGTGCGCCTGGACAAAGTGGTTCGACGTGGACTTCCCATCCCCTGGACCCACGGCG  
GGGACAAGGAAACCTACAACAACATCATCAGGAGTGGGGAAAAAATCTGCCGCCGACCTGAGGAG  
ATCACCAGGCTCCAGTGCCGAGCCGAGAGCCACCCGGAGGTGAACATTGAACACCTGGGTGAGGTG  
GTGCAGTGCAGCCGTGAAGAGGGCCTGGTGTGCCGGAACCAGGACCAGCAGGGACCCTTCAAGAT  
GTGCCTCAACTACGAGGTGCGCGTGCTCTGCTGCGAGACCCCAAGGCTGCCCGGTGACCTCTGT  
GACCCCATATGGGACTTCTCCTACCAATGCTCTGTATCCTTCCCTGTCTACTTCCATGGTATCCGCCTC  
CGTGGCATCCACCTCTGTGGCATCCAGCTCTGTGGCATCCAGCTCTGTGGCTTACTCCACCCAAACC  
TGCTTCTGCAACGTGGCTGACCGGCTCTACCCTGCAGGGTCCACCATATACCGCCACAGAGACCTCG  
CTGGCCATTGCTATTATGCCCTGTGTAGCCAGGACTGCCAAGTGGTCAGAGGGGTTGACAGTACTG

TCCGTCCACCACGCTGCCTCCTGCCCCAGCCACGTCCCCTTCAATATCCACCTCCGAGCCCGTCACT  
GAGCTGGGATGCCCAAATGCGGTTCCCCCAGAAAGAAAGGTGAGACCTGGGCCACACCCAATG  
CTCCGAGGCCACCTGTGAGGGCAACAACGTTCATCTCCCTGCGCCCGCGCACGTGCCCGAGGGTGA  
GAAGCCCACCTTGTGCCAACGGCTACCCGGCTGTGAAGGTGGCTGACCAAGATGGCTGCTGCCATCA  
CTACCAGTGCCAGTGTGTGTGCAGCGGCTGGGGTGACCCCACTACATCACCTTCGACGGCACCTAC  
TACACCTTCCTGGACAACCTGCACGTACGTGCTGGTGACGAGATTGTGCCCGTGTATGGCCACTTCC  
GCGTGCTCGTCGACAACCTACTTCTGCGGTGCGGAGGACGGGCTCTCCTGCCCGAGGTCCATCATCTT  
GGAGTACCACCAGGACCGCGTGGTGTGACCCGCAAGCCAGTCCACGGGGTGATGACAAACGAGA  
TCATCTTCAACAACAAGGTGGTCAGCCCCGCTTCCGGAAAAACGGCATCGTGGTCTCGCGCATCG  
GCGTCAAGATGTACGCGACCATCCCGGAGCTGGGAGTCCAGGTCATGTTCTCCGGCCTCATCTTCTC  
CGTGGAGGTGCCCTTACAGCAAGTTTGCCAACAACACCGAGGGCCAGTGCGGCACTTGCACCAACG  
ACAGGAAGGATGAGTGCCGCACGCCTAGGGGGACGGGATCTCATCACCATCATCACCACCATCACT  
GATAGTCTAGA

P5D4-Tag, vWD4, 8xHis-Tag

### **pcDNA3.1-P5D4-MUC5AC\_Cys3-His**

ATGAATCGTCTTGAAAGCCGGGTCCACTCGAGTCCTCCTGCCTGCAGGAGCTTTGCACCTGGACCG  
AGTGGATCGATGGCAGCTACCCTGCTCCTGGAATAAATGGTGGAGATTTTGACACATTTCAAAATTTG  
AGAGACGAAGGATACACATTTCTGTGAAAGTCTCGAAGCGTGCAGTGCCGGGCAGAGAGCTTCCCC  
AACACGCCGCTGGCAGACCTGGGGCAGGACGTTCATCTGCAGCCACACAGAGGGGCTGATTTGCCTG  
AACAAGAACCAGCTCCCACCCATCTGCTACAACCTATGAGATCCGCATCCAGTGTTCGAGACGGTGA  
ACGTGTGCAGAGACATCACCAGACTGCCAAAGACCGTCGCAACGACACGGCCGACTCCACATCCAA  
CCGGAGCTCAGACCCAGACCACCTTACCACACACATGCCCTCGGCCTCCACAGAGCAACCCACGG  
CAACCTCCAGGGGTGGGCCACAGCAACCAGCGTCACACAGGGCACCCACACCACACTAGTCACC  
AGAAACTGTCATCCCCGGTGCACCTGGACAAAGTGGTTCGACGTGGACTTCCCGTCCCCCGACCC  
CATGGTGGAGACAAGGAAACCTACAACAACATCATCAGGAGTGGGGAAAAAATCTGCCGCCGACCT  
GAGGAGATCACCAGGCTCCAGTGCCGAGCCAAGAGCCACCCAGAGGTGAGCATCGAACACCTGGG  
CCAGGTGGTGCAGTGCAGCCGGGAAGAGGGCCTGGTGTGCCGGAACCAGGACCAGCAGGGACCCCT  
TCAAGATGTGCCTCAACTACGAGGTGCGTGTGCTCTGCTGCGAGACCCCCAGAGGCTGCCACATGA  
CCTCCACACCTGGATCTCATCACCATCATCACCACCATCACTGATAGTCTAGA

P5D4-Tag, Cys3, 8xHis-Tag

**pMal-p5X-45M1Epitop**

ATGAAAATAAAAACAGGTGCACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAACGACGATGATGTTTTCCGCCTC  
GGCTCTCGCCAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGT  
CTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAATTAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATA  
AACTGGAAGAGAAATTCACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCAC  
ACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCA  
GGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATC  
GCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTATAACAAGATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAG  
AGATCCCGGCGCTGGATAAAGAAGCTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAG  
AACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAA  
GTACGACATTAAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCTGTTGA  
CCTGATTAAAAACAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAA  
GGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAAT  
TATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGCTGAGCG  
CAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAGAGTTCCTCGAAAACCTATCTGCTGA  
CTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACG  
AGGAAGAGTTGGTGAAAGATCCGCGTATTGCCGCCACTATGGAAAACGCCAGAAAGTGAAATCA  
TGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCCGTGATCAACGCCGCCAG  
CGGTCGTCAGACTGTTCGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAA  
CAATAACAATAACAACAACCTCGGGATCGAGGGAAGGATTCACATATGTCCATGGGCGGCCGCGAT  
ATCGTCGACGGATCCCACGAGAAGACAACCCACTCCCAACCAGTCACCAGTACTGTCATCCTCTGT  
GCGCCTGGACAAAGTGGTTCGACGTGGACTTCCCATCCCCTGGACCCACGGCGGGGACAAGGAA  
ACCTACAACAACATCATCAGGAGTGGGGAAAAAATCTGCCGCCGACCTGAGGAGATCACAGGCTC  
CAGTGCCGAGCCGAGAGCCACCCGGAGGTGAACATTGAACACCTGGGTCAGGTGGTGCAGTGCAG  
CCGTGAAGAGGGCCTGGTGTGCCGGGAATTCCCTGCAGGTAATTAA

malE, MCS, 91aa, MCS

**pMal-p5X-MUC5AC-Cys3-His**

ATGAAAATAAAAACAGGTGCACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAACGACGATGATGTTTTCCGCCTC  
GGCTCTCGCCAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGT  
CTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAATTAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATA  
AACTGGAAGAGAAATTCACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCAC  
ACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCA  
GGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATC  
GCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTATAACAAGATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAG  
AGATCCCGGCGCTGGATAAAGAAGCTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAG  
AACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAA  
GTACGACATTAAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCTGTTGA

CCTGATTAAAAACAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAA  
GGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAAT  
TATGGTGTAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGCTGAGCG  
CAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAGAGTTCCTCGAAAACCTATCTGCTGA  
CTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACG  
AGGAAGAGTTGGTGAAAGATCCGCGTATTGCCGCCACTATGGAAAACGCCCAGAAAGGTGAAATCA  
TGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCCGTACTGCCGGTATCAACGCCGCCAG  
CGGTCGTCAGACTGTGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAA  
CAATAACAATAACAACAACCTCGGGATCGAGGGAAGGATTTACATATGTCCATGGGCGGCCGCGAT  
ATCGTCGACGGATCCTCCTCCTGCCTGCAGGAGCTTTGCACCTGGACCGAGTGGATCGATGGCAGCT  
ACCTGCTCCTGGAATAAATGGTGGAGATTTTGACACATTTCAAAATTTGAGAGACGAAGGATACAC  
ATTCTGTGAAAGTCTCGAAGCGTGCAGTGCCGGGCAGAGAGCTTCCCAACACGCCGCTGGCAGA  
CCTGGGGCAGGACGTCATCTGCAGCCACACAGAGGGGCTGATTTGCCTGAACAAGAACCAGCTCCC  
ACCCATCTGCTACAACCTATGAGATCCGCATCCAGTGTTCGAGACGGTGAACGTGTGCAGAGACATC  
ACCAGACTGCCAAAGACCGTCGCAACGACACGGCCGACTCCACATCCAACCGGAGCTCAGACCCA  
GACCACCTTCACCACACACATGCCCTCGGCCTCCACAGAGCAACCCACGGCAACCTCCAGGGGTGG  
GCCCACAGCAACCAGCGTCACACAGGGCACCCACACCACACTAGTCACCAGAAACTGTCATCCCCG  
GTGCACCTGGACAAAGTGGTTCGACGTGGACTTCCCGTCCCCCGGACCCCATGGTGGAGACAAGGA  
AACCTACAACAACATCATCAGGAGTGGGGAAAAAATCTGCCGCCGACCTGAGGAGATCACCAGGCT  
CCAGTGCCGAGCCAAGAGCCACCCAGAGGTGAGCATCGAACACCTGGGCCAGGTGGTGCAGTGCA  
GCCGGGAAGAGGGCCTGGTGTGCCGGAACCAGGACCAGCAGGGACCCTTCAAGATGTGCCTCAAC  
TACGAGGTGCGTGTGCTCTGCTGCGAGACCCCCAGAGGCTGCCACATGACCTCCACACCTGGATCTC  
ATCACCATCATCACCACCATCACTGATAGGAATTC

malE, MCS, Cys3, 8xHis-Tag

## 9.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Prokaryotische Stämme.....	18
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien.....	18
Tabelle 3: Verwendete Zellkultur-Medien.....	19
Tabelle 4: Generiert stabile Zelllinien.....	19
Tabelle 5: Verwendete Plasmide.....	19
Tabelle 6: Generierte Plasmide.....	20
Tabelle 7: Verwendete Antikörper.....	21
Tabelle 8: Exemplarische Zusammensetzung von SDS-Gelen.....	35
Tabelle 9: Verwendete Primer.....	86

## 9.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des EDIM-Assays.....	9
Abbildung 2: Einsatz der EDIM-basierten Detektion von Apo10 und TKTL1 in unterschiedlichen Tumorentitäten.....	11
Abbildung 3: Darstellung der einzelnen MUC5AC-Oligomerisierungsschritte.....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Primärstruktur von MUC5AC und der für die Expressionsversuche in dieser Arbeit verwendeten Teilbereiche.....	41
Abbildung 5: Vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenzen der erstellten MUC5AC-Expressionskonstrukte.....	42
Abbildung 6: Klonierung der Cys2/3 Domäne von MUC5AC.....	43
Abbildung 7: Affinitätschromatografische Aufreinigung der Cys2/3 Domäne von MUC5AC aus dem Kulturüberstand von stabil transfizierten HEK-293T-Zellen.....	45
Abbildung 8: Vergleich von verschiedenen Transfektionsmethoden für THP-1-Zellen.....	46
Abbildung 9: Analyse der GFP-Expression von zytometrisch unterscheidbaren Populationen in THP-1-Zellen.....	47

---

Abbildung 10: Vergleichende Darstellung von zytometrischen Analysen unterschiedlicher GFP-Expressionen in Abhängigkeit der verwendeten Nucleofections <sup>®</sup> -Programme.....	49
Abbildung 11: Intrazelluläre Detektion von STAT3 in THP-1-Zellen.....	51
Abbildung 12: Darstellung der spezifischen Bindung des Antikörpers 45M1 an die generierten MUC5AC-Fragmente unter nativen und denaturierten Bedingungen.....	52
Abbildung 13: EDIM nach Transfektion von Expressionskonstrukten der bezeichneten MUC5AC-Fragmente in THP-1-Zellen.....	54
Abbildung 14: Versuche zur Optimierung der Transfektion von THP-1-Zellen mit MUC5AC-Expressionskonstrukten.....	56
Abbildung 15: Phagozytose von mFc-getagten MUC5AC-Proteinfragmenten durch undifferenzierte THP-1-Zellen.....	58
Abbildung 16: Untersuchung zur Phagozytose von GFP exprimierenden <i>E. coli</i> -Zellen durch THP-1-Zellen.....	60
Abbildung 17: Phagozytose von Cys2/3 exprimierenden <i>E. coli</i> -Zellen durch THP-1-Zellen.....	62

## 9.7 Danksagung

Ich bedanke mich besonders herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Karlheinz Friedrich für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Zeit der Dissertation. Während der experimentellen Phase im Labor, bei der Auswertung der Daten und nicht zuletzt zur geduldigen Korrektur der Arbeit stand er mir stets zur Verfügung. Dabei unterstützte und ermutigte er mich mit konstruktiven Ideen und stets sinnvollen Ratschlägen.

Weiterhin möchte ich mich sehr bei meinem Betreuer Dr. Andreas Wohlmann bedanken. Bei all meinen Fragen während der Laborarbeiten unterstützte er mich regelrecht und geduldig. Er half mir bei der Auswertung und Planung der Experimente mit seiner Expertise und Erfahrung und mit vielen kreativen Anregungen.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitenden des Institutes für Biochemie II für ein tägliches offenes Ohr und darüber hinaus währende Unterstützung. Hervorzuheben sind hierbei Dr. Juliane Reiche und Dr. Barbara Seise.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe für ein schönes und liebevolles sowie unterstützendes Miteinander bedanken, dies gilt Martin, Thai, Therese, Manel, Simon und Awo.

Bedanken möchte ich mich auch beim Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung des Universitätsklinikums Jena für die finanzielle Unterstützung durch das Forschungsstipendium.

Außerdem Danke ich meiner Mama für die redaktionelle Durchsicht der Arbeit.

Schlussendlich möchte ich meinen Freund:innen Clara, Carola, Victoria, Dylan, Frederick Marleen und Katrin danken, die mir in dieser Zeit und darüber hinaus zur Seite standen und mich durch schwere Momente getragen haben.

## 9.8 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Person bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat: Prof. Dr. Karlheinz Friedrich (Institut für Biochemie II, Universitätsklinikum Jena),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers