

Het opzetten van een ELISA om auto-antistoffen tegen
Factor H te detecteren
&
De ontwikkeling van een stabiele ELISA standaard door
middel van de chimerisatie van een anti-Factor H mAb

Student:	Bastiaan van Aalst
Studentnummer:	s1084473
Stageinstituut:	Immunopathologie Research, Sanquin, Amsterdam
Stagebegeleiders:	Ing. Angela Kamp Dr. Diana Wouters Dr. Kyra Gelderman
Onderwijsinstelling:	Hogeschool, Leiden
Collegejaar:	2015-2016

Titel:

Het opzetten van een ELISA om auto-antistoffen tegen Factor H te detecteren & de ontwikkeling van een stabiele ELISA standaard door middel van de chimerisatie van een anti-Factor H mAb

Status: Afstudeerverslag

Student: Bastiaan van Aalst

Studentnummer: s1084473

Datum: 24 Augustus 2016

Onderwijsinstelling: Hogeschool Leiden

Opleiding: Biologie & Medisch Laboratoriumonderzoek

Afstudeerrichting: Laboratoriumgeneeskunde (LG)

Afstudeermentor: Dr. Tom Smeets

Stageinstituut: Immunopathologie Research, Sanquin,
Plesmanlaan 125,
1066 CX, Amsterdam

Stagebegeleiders: Ing. Angela Kamp
Dr. Diana Wouters
Dr. Kyra Gelderman

Periode: Februari 2016 – Augustus 2016

Abstract

Since Factor H is the main regulator of the complement system, any dysregulation may result in either uncontrolled complement activation or inhibition. Auto-antibodies against Factor H inhibit the protective function of Factor H on host cells, which are now sensitive for complement activation. It is known that kidney cells are extremely sensitive for complement activation when the function of Factor H is lacking, caused by either genetic Factor H deficiencies or auto-antibodies. These auto-antibodies are associated with several complement-related diseases like aHUS, MPGN, or C3GN. In most cases patients will develop end-stage renal disease by early adolescence. Therefore, an anti-Factor H ELISA is developed to measure auto-antibodies against Factor H in serum. A first attempt was based on anti-Factor H ELISA's described in literature, where Factor H was directly coated on an ELISA plate. Since this was not working at our lab, due to measuring a lot of aspecific signals in healthy donors, Factor H was caught indirectly by coating an anti-Factor H monoclonal antibody. Due to the fact that these aFH-antibodies are relatively "rare" in patients, a representative and stable standard was lacking. For that reason, we tried to chimerize a mouse anti-Factor H monoclonal antibody. We ligated aFH light- and heavy -chains constructs in a pcDNA3.1 plasmid. After transformation into Top 10F' E. coli, multiple transfections were performed into HeK293T cells. However, we were not able to detect any chimeric mAb in the HeK293T supernatant. To continue, a new transfection will be performed with sequences of either light- and heavy -chains which have different signal peptides than previously ordered. When the chimerisation is completed successful, aFH chimeric antibodies can be used as a stable standard in the aFH ELISA. Furthermore, patients whom are clinically suspected for anti-Factor H presence will be tested in this aFH ELISA, as well as a C3NeF positive patient cohort.

Inhoudsopgave

Afkortingen en Begrippen	4
Inleiding	6
Materiaal en Methoden	10
Serum	10
Autoantistoffen tegen Factor H ELISA op Factor H coat	10
Autoantistoffen tegen Factor H ELISA op aFH16 coat.....	11
Aantonen aFH autoantistoffen op Westernblot	11
Chimeriseren aFH07 monoklonale antilichaam	12
Chimerisatie buffers en medium:.....	16
Westernblot HeK293T supernatant:	17
Grafieken en berekeningen	17
Resultaten	18
aFH ELISA om auto-antistoffen tegen Factor H te detecteren Coat: Factor H.....	18
Westernblot: Specificiteit aFH pos serum en normale donor.....	19
aFH ELISA om auto-antistoffen tegen Factor H te detecteren Coat: mAb aFH16).....	20
Chimeriseren aFH07 monoklonale antilichaam	22
Discussie	30
Conclusie	32
Referenties	33
Dankwoord	34
Bijlagen	35
Bijlage 1: aFH monoklonale antistoffen in hemolytische assay	35

Afkortingen en Begrippen

ADA	Anti Drug Antibodies
Adalimumab / Humira	Therapeutisch anti TNF-alfa Monoklonale Antistof
aHUS	Atypisch Hemolytisch Uremisch Syndroom
C1, C2, enz.	Complement Component 1, Complement Component 2, enz.
C3bBb	C3 Convertase
C3bBbC3b	C5 Convertase
C3bBbP	C3 Convertase met Properdine (Factor P)
C3GN	C3 Glomerulonefritis
C3H2O	Gehydrolyseerd C3
C3H2OBb	Fluid Fase C3 convertase
C3NeF	C3 Nephritic Factor – Autoantistof tegen C3bBb
C3NeF HA	C3NeF Hemolytische Assay
C5b-9 / MAC	Membrane Attack Complex
CD55	Cluster of Differentiation 55
CDR	Complementarity Determining Regions
CR1	Complement Receptor 1
DDD	MPGN type II / Dense Deposit Disease
Eculizumab	Therapeutisch anti C5 Monoklonale Antistof
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
FDA	Food and Drug Administration
GA29	Anti-Granzym A monoklonale antistof
H ₂ O ₂	Waterstofperoxide
H ₂ SO ₂	Zwavelzuur
HeK293T	Human Embryonic Kidney T cells
HPE-Buffer	High Performance ELISA Buffer
HRP	Horse Radish Peroxidase
IL-6	Interleukine 6
LB-buffer	Lysogeny Broth buffer
mAb	Monoklonale antistof
MBL	Mannose Binding Lectine
MgCl ₂	Magnesiumchloride
MH16	Muis anti Humaan-FC monoklonale antistof
MH19	Muis anti Humaan-Kappa monoklonale antistof
MPGN	Membranoproliferative Glomerulonefritis
Muromonab	Therapeutisch anti CD3 Monoklonale Antistof
NaCl	Natriumchloride
NHPS	Normal Human Pool Serum
NK	Natural Killer cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-EDTA	PBS-Ethyleen-Diamino-Tetra-Acetaat

PCR	Polemerase Chain Reaction
RM19	Rat anti Muis monoklonale antistof
TAE-buffer	Tris-Acetaat-EDTA buffer
TMB	3.3', 5.5' Tetramethyl Benzidine
VB Mg-EGTA	Veronalbuffer Magnesium-Ethyleen-Glycol-Tetra-Acetaat
<u>VH</u> ¹	Muis Variabele Heavy-Chain
<u>VL-IgG1_CL</u> ²	Muis Variabele Light-Chain en Humane Constante Light Chain
his-pcDNA3.1-Nhe1(-) ³	Plasmide gebruikt voor Light-Chain ligatie
IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-) ⁴	Plasmide gebruikt voor Heavy-Chain ligatie
<u>VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)</u> ⁵	Muis Variabele Light-Chain en Humane Constante Light Chain in his-pcDNA3.1-Nhe1(-) ³ plasmide
<u>VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)</u> ⁶	Muis Variabele Heavy-Chain en Humane Constante Heavy-Chain in IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-) ⁴ plasmide
<u>VH-IgG1_CH</u> ⁷	Muis Variabele Heavy-Chain en Humane Constante Heavy Chain
<u>VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)</u> ⁸	Muis Variabele Heavy-Chain en Humane Constante Heavy-Chain in his-pcDNA3.1-Nhe1(-) ³ plasmide

Inleiding

Het complement systeem is een cruciaal onderdeel van het aangeboren immuunsysteem en bestaat uit zowel plasma- als membraan gebonden –eiwitten. Het complement systeem kan onderverdeeld worden in de Klassieke route, Lectine-route (MBL-route) en Alternatieve route. Activatie van één of meerdere complement routes, induceert een cascade waarbij het ene eiwit het volgende eiwit activeert. Meestal gebeurt dit door het eiwit te knippen in een enzymatisch actief product, welke op zijn beurt het volgende eiwit kan knippen, en een biologisch actief product dat bijvoorbeeld een ontstekingsreactie teweeg kan brengen. De klassieke route wordt geactiveerd door binding van de eerste component C1 aan antilichamen die gebonden zijn op een oppervlak. De lectine route wordt geactiveerd door het herkennen van mannose residuen op het celoppervlak door MBL. De alternatieve route kan geactiveerd worden door herkenning van een lichaamsvreemd oppervlak door C3b, bijvoorbeeld dat van een bacterie. Een kleine hoeveelheid van Complement component C3 (C3), circuleert in gehydrolyseerde vorm in

serum ($C3_{H_2O}$). Gehydrolyseerd C3 is in staat om Factor B te binden, waarna Factor D het Factor B knipt in Bb en Ba. Bb blijft gebonden aan C3b waarna het gevormde fluid-fase $C3_{H_2O}Bb$ in staat is om C3 te knippen in C3a en C3b. Dit wordt tick-over genoemd en zorgt voor een voortdurende activatie van de alternatieve route op laag niveau. C3a functioneert als anafylatoxine. C3b bindt aan een activerend oppervlak waarop Factor B wederom zal binden en geknipt wordt tot Bb.

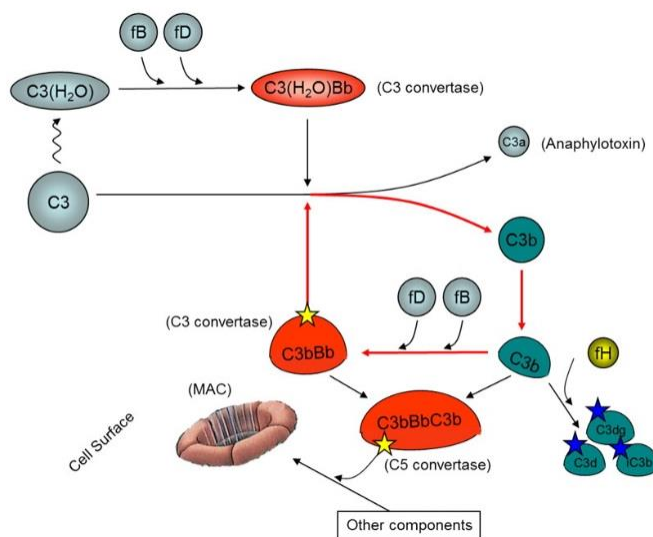


Fig. 1: Alternatieve en terminale complement route (fluid fase en op cel oppervlak) (Fridkis-Hareli et al. 2011)

Het C3bBb convertase kan eveneens C3 knippen; dit is dus een amplificatiestap binnen de alternatieve route. C3b zal binden aan het C3-convertease, wat resulteert in C3bBbC3b op het activerend oppervlak. Dit enzym wordt het C5-convertease genoemd. C5b bindt aan het oppervlak, C6, C7 en C8 binden en incorporeren in de membraan. Hierna binden meerdere C9 moleculen: dit complex wordt het C5b-9 of Membrane Attack Complex (MAC) genoemd en induceert lysis van de cel of pathogeen (Ricklin et al. 2010). Lichaamseigen cellen worden, onder anderen door Factor H, beschermd tegen complement activatie. Factor H remt de amplificatielooop door enerzijds te voorkomen dat Factor B zal binden aan $C3_{H_2O}$ en anderzijds door te binden aan C3b op het celoppervlak waardoor Factor B wederom niet kan binden. Factor H functioneert ook als co-factor voor Factor I welke de afbraak van C3b

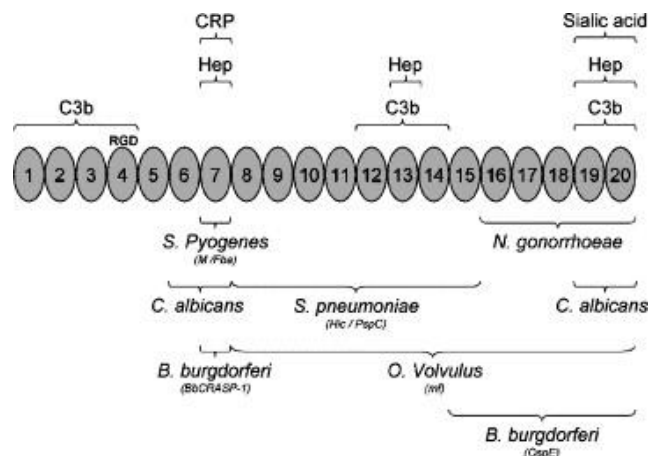
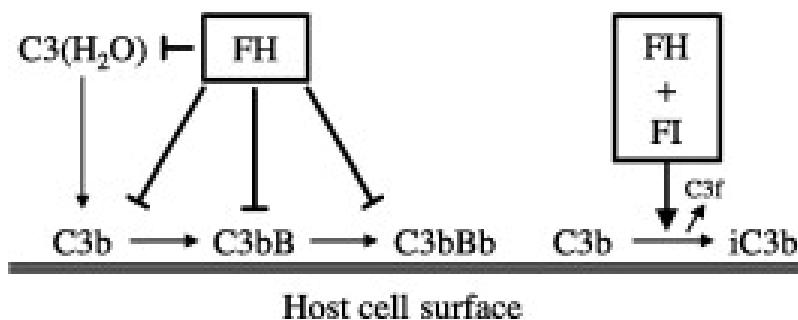


Fig. 2: Factor H domeinen en bindingsplaatsen (Rodríguez de Córdoba et al. 2004)

tot inactief C3b (iC3b) bevorderd. Factor H is een door de lever geproduceerd eiwit en bestaat



uit twintig domeinen (Fig. 2). Domeinen 1 t/m 4 binden aan C3b op het celoppervlak. Dit is dezelfde bindingsplaats waar Factor B aan kan binden. Domeinen 19 en 20 binden zowel aan C3b op het celoppervlak als aan C3_{H₂O} (Pouw et al. 2015).

Fig. 3: Fluid fase en membraan gebonden complement inhibitie door Factor H (Pouw et al. 2015)

In de literatuur worden autoantistoffen tegen Factor H geassocieerd met Atypisch Hemolytisch Uremisch Syndroom (aHUS), Membranoproliferatieve Glomerulonephritis (MPGN) C3 Glomerulonephritis. Antistoffen tegen Factor H in aHUS patiëntensera binden voornamelijk aan de C terminus van Factor H (domein 19-20), wat resulteert in een verminderde Factor H functie op het celoppervlak. Antistoffen tegen Factor H in MPGN patiënten binden juist aan de N terminus van Factor H (domein 1-4), waarbij vooral de fluid fase functie van Factor H beïnvloed wordt (Blanc et al. 2015; Goodship et al. 2012).

C3NeF, een autoantistof gericht tegen het C3 convertase, zorgt voor ongeremde activatie van de alternatieve route en wordt aangetroffen in serum van 80% van de patiënten met Membranoproliferatieve Glomerulonephritis type II (MPGN II). Normaal gesproken heeft C3bBb een halfwaardetijd van ongeveer 90 seconden op 37°C. Properdine (Factor P) kan deze halfwaardetijd tot tien maal verlengen (Fearon & Austen 1975). Indien C3NeF aanwezig is, zal deze een binding aangaan met C3bBb, C3bBbP of C3_{H₂O}Bb en het convertase stabiliseren. Dit zorgt voor een verlenging van de halfwaardetijd (> 50 maal) en verhoogde ongevoeligheid voor complementremmers Factor H, CD55 en CR1. Stabilisatie van het C3bBb (of C3_{H₂O}Bb) door C3NeF verdringt Factor H in de binding aan het C3 convertase. Hierdoor zal ongeremde complementactivatie optreden, zowel in de fluid fase, als op lichaamseigen cellen. Dit leidt tot ongecontroleerde activatie van de alternatieve route. C3NeFs zijn geassocieerd met nierziekten en zijn aanwezig in 20-50% van de patiënten met MPGN type I en type III (Cruz Corchado & JH Smith 2007; Appel et al. 2005), in 40% van de patiënten met C3 Glomerulonephritis (C3GN), in 80% van de patiënten met Dense Deposit Disease (DDD of MPGN II) en in mindere mate bij patiënten met partiële lipodystrofie, poststreptococcal glomerulonephritis en meningococcal meningitis (Walport et al. 1994). Ondanks de associatie van C3NeF met voornamelijk nierziekten is het tot op heden nog onduidelijk welke rol het antilichaam speelt in het ziekteproces. De titer van (fluid fase) C3NeF correleert niet met ernst en niet altijd met C3 consumptie. Verder is het niet duidelijk of C3NeF een oorzaak of gevolg is van de verschillende ziektebeelden. De aanwezigheid van C3NeF geeft een handvat voor de behandeling, van onder andere MPGN type II, die bestaat uit plasmaferese of tegenwoordig ook het toedienen van de biological Eculizumab (anti-C5). Recentelijk zijn twee assay's ontwikkeld om zowel de aanwezigheid alsmede de functionele activiteit van C3NeF te meten in patiënten serum. De aanwezigheid van C3NeF resulteert in veel gevallen tot onherstelbare nierschade door ongecontroleerde complementactivatie. Eén van deze assays betreft een functionele hemolytische assay waarbij gekeken wordt naar C3bBb stabilisatie door C3NeF op schapenerythrocyten. Normaal gesproken zal Factor H uit patiëntensera de schapenerythrocyten beschermen tegen complementactivatie tijdens de eerste incubatiestap

en zal geen lysis plaatsvinden. Na incubatie wordt een was stap uitgevoerd in PBS-EDTA en zal Factor H loslaten van C3b op de schapenerytrocyten. Na toevoeging van Normaal Rat Serum, zal de aanwezigheid van C3NeF resulteren in het vormen van het MAC en het lyseren van de schapenerytrocyten. Een aantal patiëntensera, welke een negatieve C3NeF uitslag gaven in de C3NeF ELISA, induceerden lysis tijdens de eerste incubatiestap met schapenerytrocyten. In theorie kunnen antistoffen tegen Factor H hier verantwoordelijk voor zijn. Tevens is C3NeF aangetoond in verschillende case-reports waarbij ook antistoffen tegen Factor H aanwezig zijn.

In 1986 is de eerste biological Muromonab (anti CD3 monoklonale antistof) goedgekeurd door de FDA als therapeutische antistof voor de behandeling van acute afstotingsreacties van transplantaten (Leavy 2010). In de daaropvolgende jaren is veel onderzoek uitgevoerd naar het ontwikkelen en verbeteren van therapeutische antistoffen. Muromonab is een voorbeeld van een muis monoklonale antistof en bestaat uit 100% muis origine. Al snel werd duidelijk dat patiënten die behandeld werden met muis antistoffen, een zeer hoge kans hebben om vroeg of laat zogenaamde Anti Drug Antibodies (ADA) aan te maken. Dit resulteert in het 'klaren' van de therapeutische antistoffen door ADA met als gevolg dat deze niet meer kan functioneren. In het begin van de jaren '90 ontstond een doorbraak in de ontwikkeling van therapeutische antistoffen. Met behulp van moleculaire biologie was het mogelijk om IgG genen te kloneren in vectoren met eucaryotische oorsprong. Dit betekende dat het vanaf dat moment mogelijk was om recombinante monoklonale antistoffen te produceren in cellijnen. Kort daarna werd het mogelijk om muis variabele domeinen van zowel de heavy- als de light –chain, welke verantwoordelijk zijn voor de binding aan het antigeen, te fuseren met humane constante heavy- en light –chain domeinen. Deze groep therapeutische antistoffen worden chimere genoemd en zijn voor

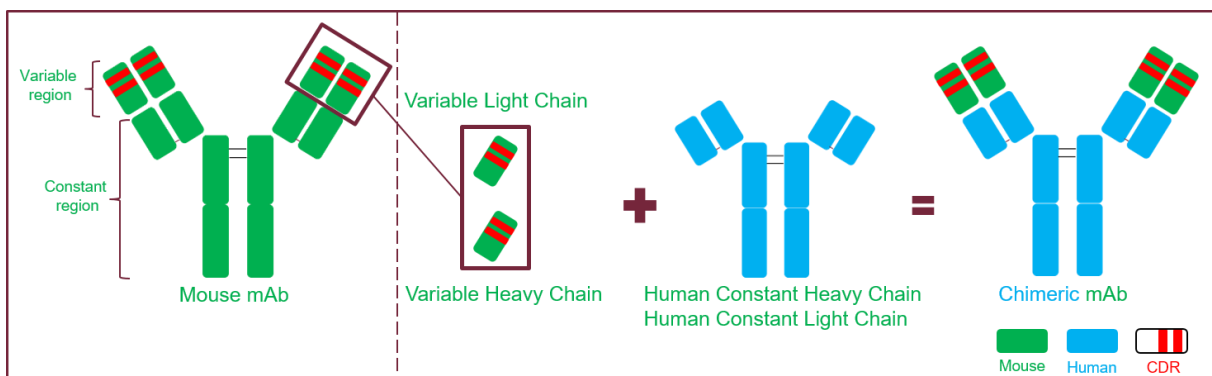


Fig. 4: Chimeer monoclonale antistoffen, bestaande uit: muis variabele light- en heavy -chains en humane constante light- en heavy -chains

70% humaan. Een groot voordeel van chimeer antistoffen is dat het humane FC domein in staat is om te reageren met humane effector cells en het complement systeem. Tegenwoordig bestaan ook gehumaniseerde antistoffen en deze zijn voor 85-90% humaan. Hierbij zijn de muis hypervariabele loops (CDR's) vervangen door humane hypervariabele loops. Het humaniseren van antistoffen is een stuk ingewikkelder en gecompliceerder dan het maken van chimeer antistoffen. Daarnaast heeft een gehumaniseerde antistof vaak een lagere affiniteit voor het antigeen. Om deze reden zijn niet alle therapeutische antistoffen gehumaniseerd en wordt nog veelvuldig gebruik gemaakt van het ontwikkelen, produceren en behandeling van/met chimere (Chames et al. 2009).

Naast het gebruik van chimere als therapeutische antistoffen, zijn deze zeer geschikt om gebruikt te worden als standaard of positieve controle in verscheidene laboratorium assay's. Enerzijds binden de muis variabele light- en variabele heavy –chains aan het epitoom van

interesse en anderzijds wordt het humane FC staart gedetecteerd door hetzelfde conjugaat dat ook gebruikt wordt als detectie voor antistoffen in patiëntenserum. Dit maakt de chimeer zeer toepasbaar als standaard/ controle in, onder andere, Westernblots en ELISA's.

Tijdens deze afstudeerstage is een ELISA ontwikkeld om auto-antistoffen tegen Factor H aan te tonen in patiëntenserum. Aangezien het hebben van antistoffen tegen Factor H in serum relatief zeldzaam is, zijn er wereldwijd weinig diagnostische laboratoria die een anti-Factor H assay aanbieden. Desalniettemin, kan het bepalen van de aan- of afwezigheid van deze antistof helpen bij het stellen of uitsluiten van een diagnose door een arts. Ook kan de arts aan de hand van de anti-Factor H uitslag een eventuele behandeling starten. Om een betrouwbare anti-Factor H assay aan te bieden, is een stabiele standaard / positieve controle noodzakelijk. Daarom is naast het ontwikkelen van een anti-Factor H assay geprobeerd om een muis anti-Factor H monoklonaal antistof te chimeriseren. Ook is gekeken naar aanwezigheid van anti-Factor H autoantistoffen in patiënten met C3NeF.

Materiaal en Methoden

Serum

Serum van gezonde individuen is verkregen via het buisjesdonoren cohort van Sanquin, Amsterdam, Nederland. Patiëntensera zijn verkregen via het Immunochemie Diagnostisch laboratorium op Sanquin, Amsterdam, Nederland. Zowel vers aangeleverde patiëntensera, als ingevroren gearhiveerde patiëntensera zijn gebruikt. Patiënten hebben bij afname niet aangegeven bezwaar te hebben tegen gebruik van restmateriaal voor het optimaliseren en opzetten van diagnostische assays.

Autoantistoffen tegen Factor H ELISA op Factor H coat

Een ELISA-plaat (Nunc maxisorb; Nalgenunc Int., Rodkilde, Denmark) werd gecoat met 1µg/ml Factor H (Complement Technology, Inc., Texas, VS) in PBS gedurende O/N op kamertemperatuur. De wells zijn 5x gewassen met PBS/0.02% Tween. 1:10 verdund Patiëntensera is getitreerd in High Performance ELISA Buffer (HPE buffer) (Sanquin) en toegevoegd aan de Factor H coat en 1 uur schuddend geïncubeerd op kamertemperatuur (eindvolume is 100µl). De wells zijn vervolgens 7x gewassen met PBS/0.02% Tween. 100µl HRP gelabeld anti humaan IgG monoklonaal MH16 (0.25 µg/ml) (Sanquin, Amsterdam, Nederland) in HPE Buffer is toegevoegd en 1 uur schuddend geïncubeerd op kamertemperatuur. Na 5x wassen met PBS/0.02% Tween is 100µg/ml 3,3', 5,5' Tetramethyl Benzidine (TMB) in 0.11M Natrium-acetaat (pH 5.5) met 0.003% v/v H₂O₂ toegevoegd om de kleurreactie plaats te laten vinden. De substraat omzetting is gestopt met 100µl 2M H₂SO₄. De absorptie is gemeten bij 450/540nm met een BioTek Synergy 2™ spectrofotometer (BioTek, Winooski, Vermont, US). Blanco metingen zijn uitgevoerd door 100µl High Performance ELISA Buffer (Sanquin) toe te voegen aan de Factor H coat. Een aFH positief patiëntenserum (als gift verkregen van Dr. P. Sánchez-Corral, Unidad de Investigación, Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ, Madrid, Spain) is gebruikt als positieve controle (aFH pos serum).

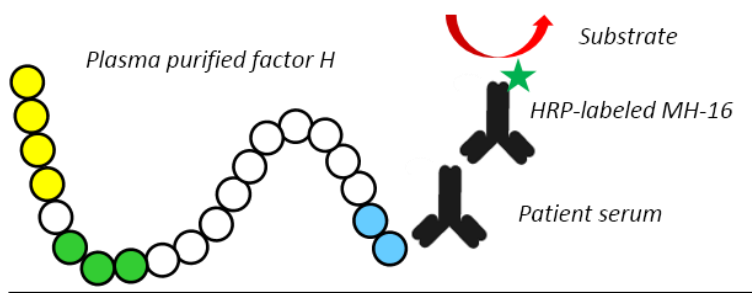


Fig. 5: Schematische voorstelling aFH ELISA met Factor H coat.

Autoantistoffen tegen Factor H ELISA op aFH16 coat

Een ELISA-plaat (Nunc maxisorb; Nalgenunc Int., Rodkilde, Denmark) werd gecoat met 1 µg/ml gezuiverd monoklonale antistof aFH16 (Sanquin) in PBS gedurende O/N op kamertemperatuur. De wells zijn 5x gewassen met PBS/0.02% Tween. 1 µg/ml Factor H (Complement Technology, Inc) is toegevoegd aan de coat en 1 uur geïncubeerd op kamertemperatuur. Het vervolg van de ELISA is uitgevoerd volgens dezelfde procedure als beschreven in 'Autoantistoffen tegen Factor H ELISA op Factor H coat'. Serum van 36 gezonde buisjesdonoren (Sanquin, Amsterdam, Nederland) zijn gemeten in de aFH16 ELISA (aFH16) (1:100 verdund). De relatieve concentratie aFH auto-antistoffen is berekend ten opzichte van het aFH pos serum, welke op 100 AU/ml gesteld is. Correctie voor aspecifiek signaal is uitgevoerd door patiëntensera (1:100 verdund in HPE Buffer) toe te voegen aan een ELISA-plaat met een irrelevante GA29 coat (anti-granzym A IgG).

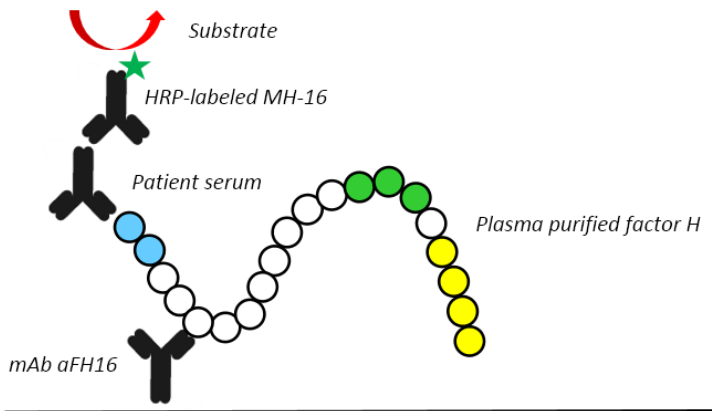


Fig. 6: Schematische voorstelling aFH ELISA met aFH16 coat.

Aantonen aFH autoantistoffen op Westernblot

2 µl gezuiverd Factor H (1mg/ml) (Complement Technology, Inc.) is verdund met 4x Novex® sample buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Verenigde Staten) en PBS. Na 10 minuten incuberen op 70°C, is 200 ng Factor H geladen op een 4-12% polyacrylamide gel (Invitrogen® NuPage) in MOPS buffer (Invitrogen®) in een Invitrogen XCell Sure Lock Mini-Cell Electrophoresis System (Invitrogen®). Na 50 minuten runnen op 200V is de SDS-page gel gebloed met behulp van een iBlot system (Invitrogen®) (8 minuten). De blot is 1 uur geblocked met 1:10 verdund Western Blocking Reagents (Roche®, Basel, Zwitserland) bij kamertemperatuur. De Westernblot is daarna in strookjes geknipt en geïncubeerd met 200 µl in PBS verdund aFH pos serum (1:100), verdund serum van buisjesdonor 13 (1:100) of een aFH09 monoklonaal antistof (positieve controle) (1:100) gedurende 1 uur op kamertemperatuur. Na incubatie zijn de strookjes 1x 10 minuten gewassen met PBS, 3x 10 minuten gewassen met PBS 0.1% Tween en 1x 10 minuten gewassen met PBS. Vervolgens is 200 µl in PBS verdund MH-16-HRP (1 µg/ml) toegevoegd aan de strookjes welke geïncubeerd zijn met aFH pos serum en serum van normale buisjesdonor 13. 200 µl in PBS verdund RM19 (1 µg/ml) is toegevoegd aan het strookje wat geïncubeerd is aFH09 monoklonaal antistof. Na 1 uur incubatie op kamertemperatuur zijn de strookjes 1x 10 minuten gewassen met PBS, 3x 10 minuten gewassen met PBS 0.1% Tween en 1x 10 minuten gewassen met PBS. De blots zijn met 2ml Pierce™ ECL 2 Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) ontwikkeld voor 30 seconden op kamertemperatuur. Foto's zijn verkregen met een Bio-Rad ChemiDoc™ MP imaging system (Bio-Rad, Hercules, Californië, VS) en bewerkt met Image Lab™ Software (Bio-Rad).

Chimeriseren aFH07 monoklonale antilichaam

Sequentie:

Sanquin Immunopathologie beschikt over een aantal muis anti Factor H monoklonale antistoffen. Eén van deze monoklonale antistoffen is aFH07 welke bindt op domein 18 op Factor H. De aFH07 IgG1 variabele heavy- en light-chain zijn gesequenced. De verkregen nucleotide- en aminozuur sequentie met aanwezige regio's zijn weergegeven in figuur 7.

Mouse aFH07 Variabele Light Chain-Kappa: Signal peptide 57 ATGGATTTCAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGTCT M D F Q V Q I F S F L L I S A Framework regions 102 TCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCA S V I M S R G Q I V L S Q S P 147 ACATTCTGTCTGCATCTCCAGGTGAGAAGGTCACAGTGACTTGC T F L S A S P G E K V T V T C CDR 192 AGGGCCAGTTCAAGTGTCAAATACATGCACTGGTATCAGCAGAAA R A S S S V K Y M H W Y Q Q K CDR 237 CCAGGAGCCTCCCCAAACCCTGGATTGTTTGGCACATCCAACTG P G A S P K P W I F A T S N L 282 GCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACC A S G V P A R F S G S G S G T 327 TCTTATTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCC S Y S L T I S R V E A E D A A CDR J-Region 372 ACTTATTACTGTCAGCAGTGGAGTATTATCCACCCACGTTCTGGT T Y Y C Q Q W S I I P P T F G 417 AATGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACT N G T K L E L K R A D A A P T 462 GTATCCATCTTCCACCATTCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGTG V S I F P P S S E Q L T S G V 507 CCTCAGTCGTGTGCTTCTTGA 527 P Q S C A S *	Mouse aFH07 Variabele Heavy Chain: Signal peptide 31 ATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCTGCCTGGTGACATTCCTCAAGC M A V L G L L F C L V T F P S Framework regions 76 TGTGCTCATCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAAGACCTGGCCTA C V L S Q V Q L Q Q S G P G L 121 GTGCAGCCCTCTCAGAGCCTGTCCATTACCTGCACAGTCTCTGAT V Q P S Q S L S I T C T V S D CDR 166 TTCTCATTAGCTAGGTATGGTGTACACTGGATTTCGCCAGTCTCCA F S L A R Y G V H W I R Q S P CDR 211 GGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGAACC G K G L E W L G V I W S G G T 256 GCAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAACATCAACAAG A D Y N A A F I S R L N I N K 301 GACAATTCCAAGAGCCAAGTTTCTTTTAAATGAACAGTCTCCAA D N S K S Q V F F K M N S L Q CDR J-Region 346 GCTAATGACACAGCCATATATTACTGTGCCAGAAATTTGGTAAC A N D T A I Y Y C A R N F G N 391 TACGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCA 423 Y A V D Y W G Q G T S
--	--

Fig. 7: Nucleotide- en aminozuur sequenties van aFH07 variabele light chain en aFH07 variabele heavy chain.

Voor de expressie van de light- en heavy –chains zijn de framework regions, CDR's en J-region benodigd. De aanwezige signaalpeptide in de variabele light chain sequentie is vervangen door een geoptimaliseerde signaalpeptide:

ATGGCCTGCCCTGGATTTCTGTGGGCCCTCGTGATCAGCACCTGTCTGGAATTTTCCATGGCC
M A C P G F L W A L V I S T C L E F S M A

De geoptimaliseerde signaalpeptide geeft volgens de SignalP 4.1 tool (CBS) een hogere verwachting op expressie dan het huidige signaalpeptide in de variabele light chain sequentie. De aanwezige signaalpeptide in de variabele heavy chain sequentie geeft een hogere verwachting op expressie dan de geoptimaliseerde signaalpeptide en is dus niet vervangen. De geoptimaliseerde signaalpeptide nucleotide sequentie verschilt enigszins van de nucleotide sequentie die geplaatst is in de variabele light chain sequentie. Dit komt omdat een codon optimalisatie is uitgevoerd. De uiteindelijke aminozuur sequentie verandert hierdoor niet. Na het sequencen van de variabele heavy chain bleek dat de J-region sequentie niet volledig gesequenced was. De aminozuur sequentie: **FGNYAVDYWGQGS** komt het meest overeen met de IGHJ4 sequentie: **YYAMDYWGQGSVTVSS**. De niet volledige J-region sequentie is daarom vervangen voor de IGHJ4 sequentie. Verder zijn restrictiesites **HinDIII**: **AAGCTT** (voor) en **EcoR1**: **GAATTC** (na) toegevoegd aan de light chain sequentie en **HinDIII**: **AAGCTT** (voor) en **Nhe1**: **GCTAGC** toegevoegd aan de heavy chain sequentie. Ook zijn Kozak sequenties: **GCCGCCACC** en extra random nucleotides: **GTCCTTGACACG** (voor) en **TTTTTGCAAAAG** (na)

toegevoegd aan zowel de light- als heavy –chain sequenties. Tot slot is de IgG1 constante light chain-Kappa toegevoegd aan de variabele light chain sequentie:

```
GGACCGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGG
TGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCA
ACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCA
AGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGA
GCTTCAACAGGGGCGAGTGCTGA*
```

De uiteindelijk bestelde aFH07 light- en heavy –chains nucleotide sequenties zijn weergegeven in figuur 8 en 9.

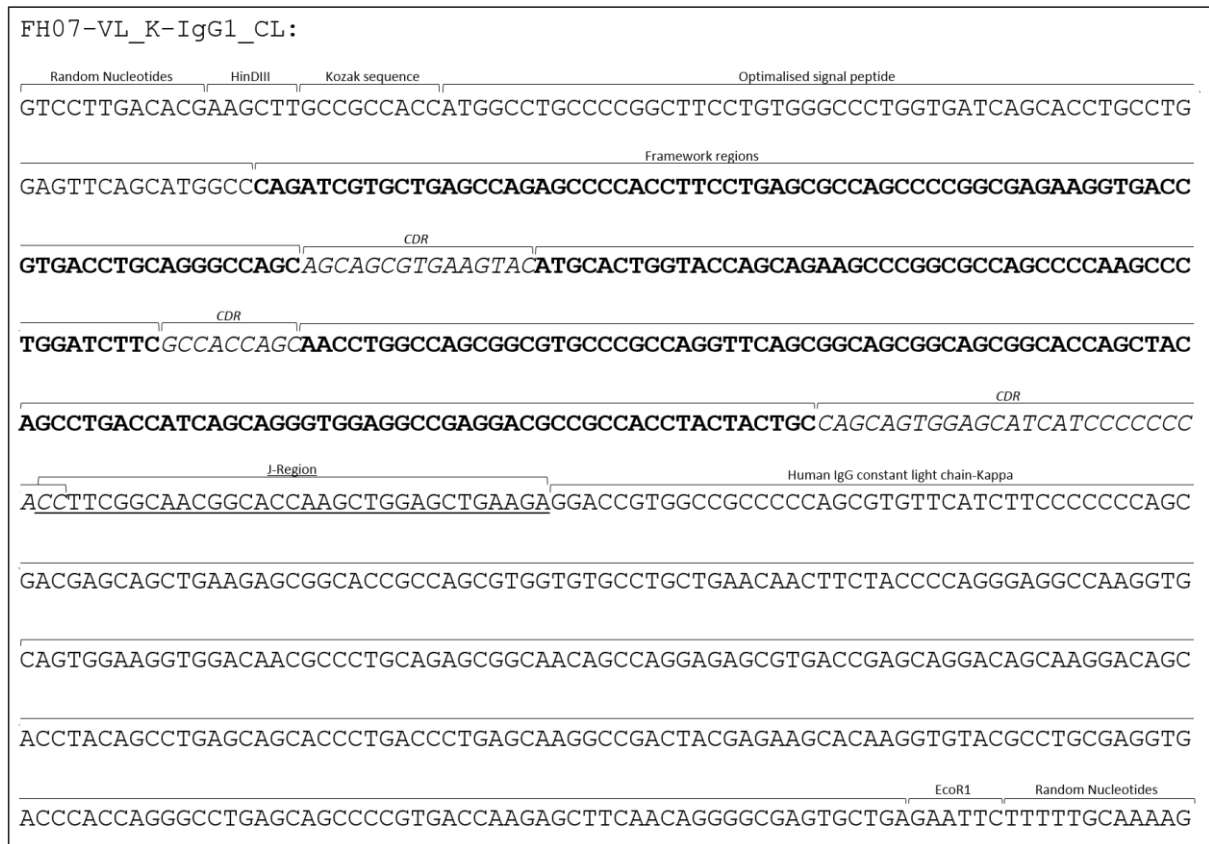


Fig. 8: Bestelde nucleotide sequentie aFH07_VL-K-IgG1_CL

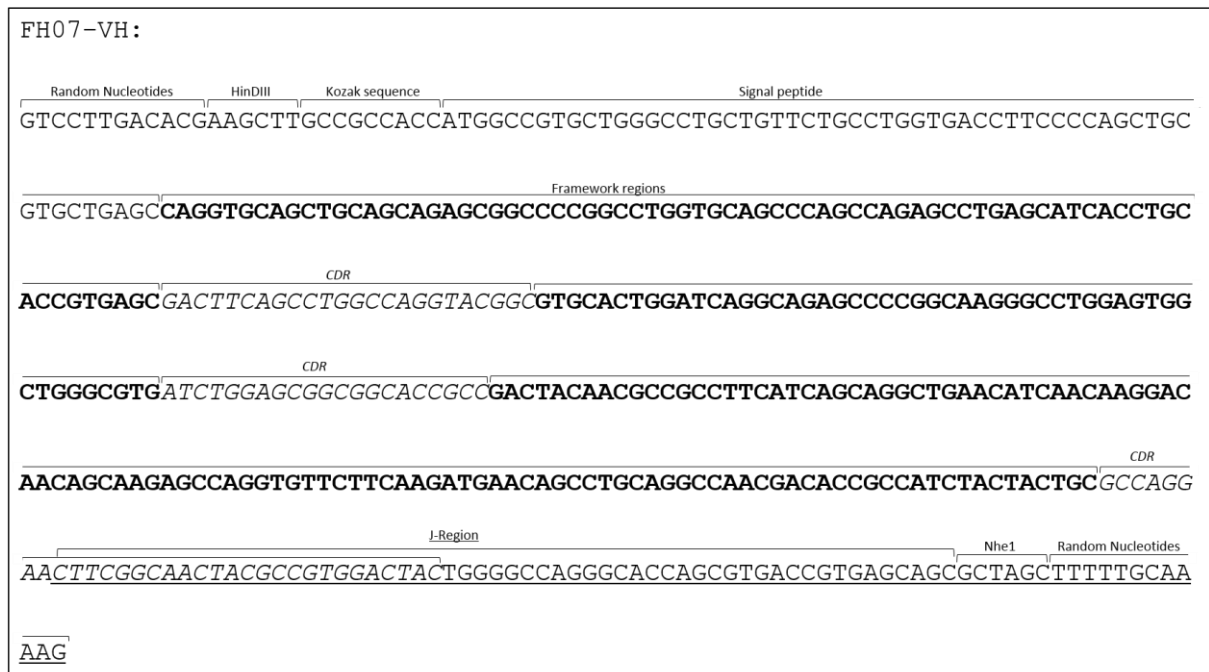


Fig. 9: Bestelde nucleotide sequentie aFH07_VH

Ligatie:

DNA constructen van Anti-Factor-H07 variabele Heavy Chain (VH¹) en variabele light chain + humane constante light chain (VL-IgG1_CL²) (500ng) (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, VS) zijn opgelost in steriel water tot 10ng/μl. Voor het ligeren van variabele light chain + humane constante light chain is gebruik gemaakt van een his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ plasmide. Voor de ligatie van de variabele heavy chain is gebruik gemaakt van een IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴ plasmide, waar het humane constante heavy chain insert (IgG1_CL) al aanwezig is.

Digestie:

De pcDNA3.1-Nhe1(-)³ plasmide is gedigesteerd met restrictie-enzymen: HindIII (1000 U/ml) (New England Biolabs®, Ipswich, Massachusetts, VS) en EcoR1 (1000 U/ml) (Invitrogen®, Carlsbad, Californië, VS). De IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴ plasmide is gedigesteerd met restrictie-enzymen HindIII en Nhe1 (Bioabs®). De gedigesteerde plasmiden en aFH07 inserts zijn geladen op een 1% agarose gel (Invitrogen®) in 1x TAE buffer) en een gelelectroforese is uitgevoerd met een Invitrogen XCell Sure Lock Mini-Cell Electrophoresis System (Invitrogen®). Een gel extractie is uitgevoerd met een NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Duitsland) om de plasmiden en inserts te zuiveren uit de agarosegel.

Transformatie:

Een ligatie van de plasmiden en inserts is uitgevoerd en 5μl van beide ligatieproducten zijn toegevoegd aan 50μl One Shot® TOP10F' Chemically Competent E. coli (Thermo Fisher Scientific) en voor 30 minuten geïncubeerd op ijs. Na een heat-shock (30 sec, 42°C) zijn de getransformeerde Top10F E.coli voor 2 minuten op ijs geïncubeerd. 750μl voorverwarmd LB-medium is toegevoegd en vervolgens is voor 1 uur geïncubeerd op 37°C. Verdund Carbamicine (50 μg/ml) (Sigma-Aldrich) is toegevoegd. De bacteriesuspensie is uitgeplaat op LB selectieplaten en overnacht geïncubeerd op 37°C. De volgende dag zijn drie kolonies met VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ en drie kolonies met VH_IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ plasmiden aangeprikt en overgebracht in 3ml LB-medium.

Plasmid isolatie:

Na overnacht incuberen op 37°C zijn de plasmiden geïsoleerd met behulp van de MiniPrep NucleoSpin Plasmid EasyPure kit (Macherey-Nagel). Met een controle digestie is gecontroleerd of de plasmiden daadwerkelijk volledig in de TOP10F E. coli zijn opgenomen. Hierbij is restrictieenzym PST1 (1000 U/ml) (Invitrogen®) gebruikt als controle op de VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ en VH_IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ plasmide, welke knipt op twee restrictie sites in de Light Chain/Heavy Chain insert en op één restrictie site na het insert. De controle digesties zijn geladen op een 1% agarose gel. 500μl van beide overnacht culturen (heavy chain en light chain) zijn overgebracht in 250 ml LB-medium met Carbamicine (50 μg/ml). Na overnacht incuberen bij 37°C is een MaxiPrep NucleoSpin Plasmid EasyPure kit (Macherey-Nagel) uitgevoerd op de culturen.

Transfectie:

18.8μg VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ plasmide, 15.7μg VH_IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ plasmide (LC:HC ratio= 1 : 0.8) en 66.5μl Fectine (Invitrogen®) zijn samengevoegd in 3267μl Freestyle® medium (Thermo Fisher Scientific). Na 20 minuten incubatie op kamertemperatuur zijn de verdunde plasmiden toegevoegd aan HeK293T cellen (50 * 10⁶ HeK 293T) (en aangevuld met Freestyle® medium tot 50ml. Na 4 uur is 500μl Penicilline / Streptomycine (10.000 U/ml) (Gibco®, Waltham, Massachusetts, Verenigde Staten)

toegevoegd en voor 5 dagen geïncubeerd bij 37°C. Het supernatant van de getransfecteerde HeK293T cellen is geoogst en gefilterd met een 0.45µm Whatman filter (Sigma-Aldrich). Het supernatant is gezuiverd over een Prot A kolom (Sigma-Aldrich) en het eluaat is opgevangen in zes fracties.

Om een hogere IgG opbrengst te krijgen van de tot expressie gebrachte anti-Factor H plasmiden, is een tweede transfectie uitgevoerd waar een tien-voudige overmaat VH_IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)² plasmide is toegevoegd (LC:HC ratio= 1 : 8).

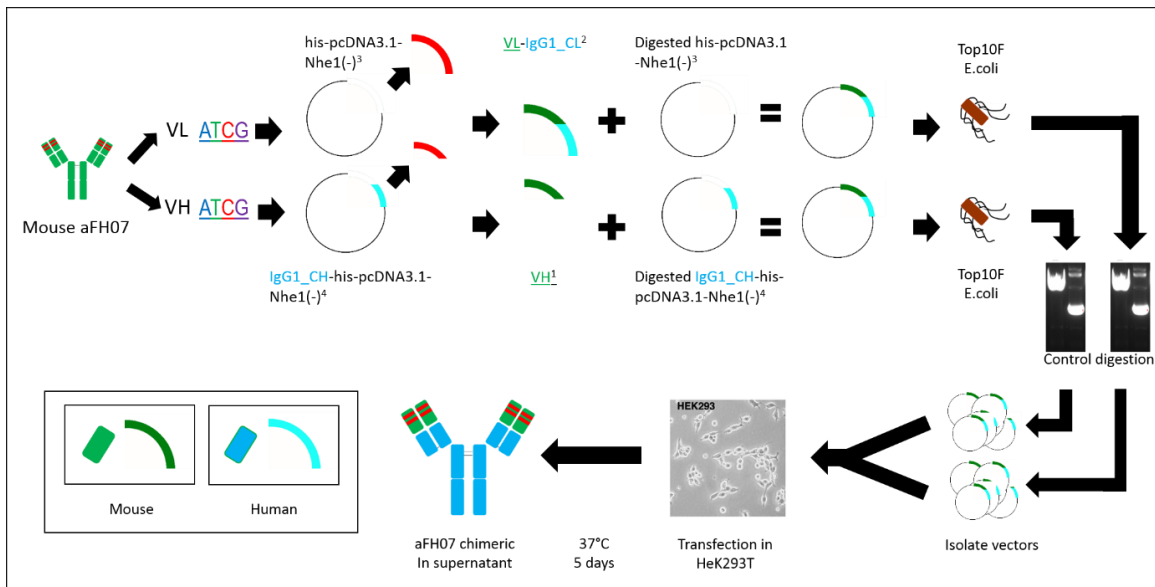


Fig. 10: Schematisch overzicht chimerisatie aFH07 monokonaal antilichaam

Een tweede ligatie van aFH07 VH-IgG1_CH⁷ is uitgevoerd in dezelfde his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ plasmide als gebruikt is voor het ligen van aFH07 VL-IgG1_CL². Om het VH-IgG1_CH⁷ insert uit de VH-IgG1_CL-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ plasmide te digesteren is gebruik gemaakt van restrictie-enzymen HindIII (1000 U/ml) en EcoR1 (1000 U/ml). Ook de VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ plasmide is met dezelfde restrictie-enzymen gedigesterd. Het VH-IgG1_CH⁷ insert is in de gedigesterde his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ plasmide geligeerd. Na transformatie in 50µl One Shot® TOP10F⁺ Chemically Competent E. coli is de bacteriesuspensie uitgeplaat op LB selectieplaten en overnacht geïncubeerd op 37°C. De volgende dag zijn 5 kolonies met VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁸ aangeprikt en overgebracht in 3ml LB-medium. Na overnacht incuberen op 37°C zijn de plasmiden uit het bacterielysaat geïsoleerd met behulp van de MiniPrep NucleoSpin Plasmid EasyPure kit (Macherey-Nagel). Met een controle digestie is gecontroleerd of de plasmiden volledig in de TOP10F E. coli zijn opgenomen. Hierbij is restrictie-enzym PST1 (1000 U/ml) gebruikt, welke knipt op twee restrictie sites in het VH-IgG1_CH⁷ insert en op één restrictie site na het insert. Ook is tweede controle digestie uitgevoerd met restrictie-enzym Xmn1 (1000 U/ml) (Biolabs®), welke knipt op één restrictie site in het VH-IgG1_CH⁷ insert en op twee restrictie site na het insert. De controle digesties zijn geladen op een 1% agarose gel.

Chimerisatie buffers en medium:

LB-medium: 10g/L Trypton (Sigma-Aldrich), 10g/L NaCl (Merck), 5g/L Yeast extract (Sigma-Aldrich) in MilliQ water

100 ml 1xTAE-buffer: 2ml 50X TAE Buffer (Tris-acetate-EDTA) (Thermo Fisher Scientific) in Milli Q water

Westernblot HeK293T supernatant:

Het supernatant van de getransfecteerde HeK293T cellen, positieve chimeer controle: Humira (Adalimumab) (Abbvie, North Chicago, Illinois, VS), Prot A fracties en een negatieve controle (supernatant na transfectie zonder IgG) zijn verdund met 4x Novex® sample buffer en 10 minuten geïncubeerd bij 70°C. De monsters zijn geladen op een 4-12% polyacrylamide gel (Invitrogen® NuPage) in MOPS buffer (Invitrogen®) in een Invitrogen XCell Sure Lock Mini-Cell Electrophoresis System (Invitrogen®). Na 50 minuten runnen op 200V is de agarosegel geblot op een iBlot system (Invitrogen®) (8 minuten). De blot is 1 uur geblocked met 1:10 verdund Western Blocking Reagents (Roche®, Basel, Zwitserland) bij kamertemperatuur. 3ml in PBS verdund MH 19-1-HRP (0.33µg/ml) (muis anti humaan IgG1 FC) (Sanquin) en MH 16-1-HRP (muis anti humaan IgG1 Kappa) (Sanquin) met 1:20 Western Blocking Reagents zijn toegevoegd aan de blot en voor 1 uur geïncubeerd op kamertemperatuur. Na 1 uur incubatie op kamertemperatuur, zijn de blots 1x 10 minuten gewassen met PBS, 3x 10 minuten gewassen met PBS 0.1% Tween en 1x 10 minuten gewassen met PBS. De blots zijn met 2ml Pierce™ ECL 2 Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) ontwikkeld voor 30 seconden op kamertemperatuur. Foto's zijn verkregen met een Bio-Rad ChemiDoc™ MP imaging system (Bio-Rad, Hercules, Californië, VS) en bewerkt met Image Lab™ Software (Bio-Rad).

Grafieken en berekeningen

Alle in dit verslag getoonde en besproken grafieken zijn verkregen met Graphpad Prism 6.

Resultaten

aFH ELISA om auto-antistoffen tegen Factor H te detecteren
Coat: Factor H

De eerste setup voor een aFH ELISA was gebaseerd op aFH assay's van Moore et al. 2010 en Goodship et al. 2012. Een aFH pos serum (gekregen van Dr. P. Sánchez-Corral), serum van twee normale donoren, een C3NeF positief patiëntensерum (Diag. PT 1) en Normaal Humaan Pool Serum (NHPS) zijn getitreerd op een Factor H coat. In figuur 11 is te zien dat het aFH pos serum een hoog signaal geeft. Serum van donoren 1 en 2, C3NeF positief patiëntensерum en NHPS geven een lager signaal. Tussen het signaal van het aFH pos serum en C3NeF positief patiëntensерum zit een factor 72 verschil. De blanco geeft een laag signaal.

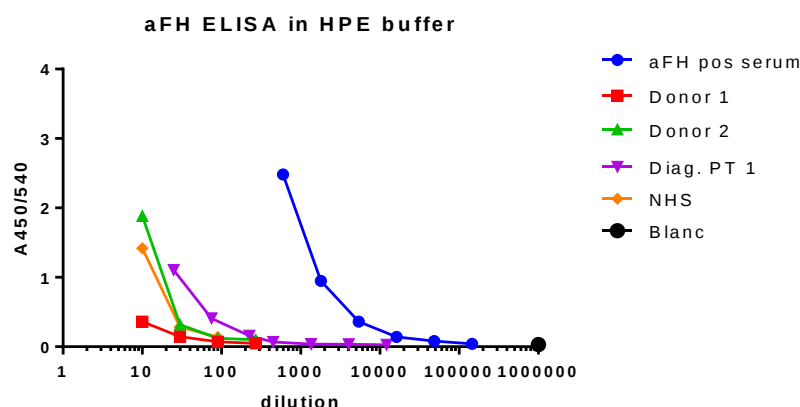


Fig. 11: aFH auto-antistoffen in aFH pos serum, sera van gezonde donoren, een C3NeF positief serum en NHPS gemeten op een Factor H coat. Het aFH pos serum geeft een hoger signaal dan donoren 1 en 2, het C3NeF positief serum en het NHPS.

Vervolgens zijn meer sera van normale donoren gemeten in de aFH ELISA. Een nieuwe batch Factor H is gebruikt als coat (alle toekomstige resultaten zijn uitgevoerd met deze batch Factor H). In figuur 12 is te zien dat het aFH pos serum een hoog signaal geeft en uittreert tot het signaal van de blanco. Een aantal sera van normale donoren titreren parallel aan het aFH pos serum. Tussen het signaal van het aFH pos serum en het serum van de normale donoren zit een factor 43 verschil. Dit verschil is kleiner dan in de vorige ELISA en geeft aan dat de sera van de normale donoren nu een hoger signaal geven. De blanco geeft wederom een laag signaal.

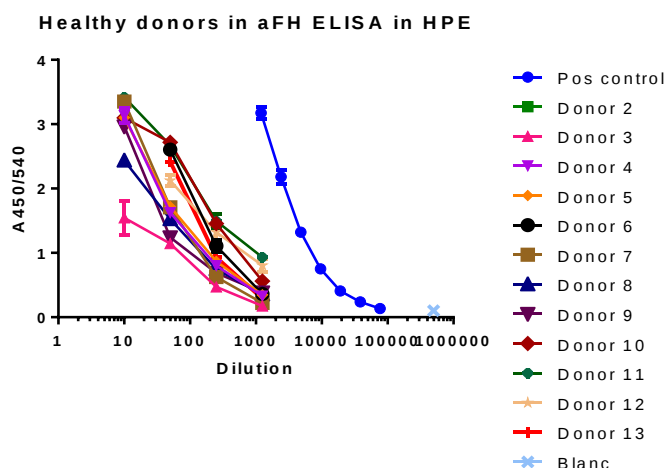


Fig. 12: aFH pos serum en serum van normale donoren gemeten in de aFH ELISA. Alle sera van normale donoren laten een hoger signaal zien dan in de hiervoor uitgevoerde aFH ELISA

Om aan te tonen of het signaal van aFH pos serum en sera van normale donoren specifiek of aspecifiek is, zijn aFH pos serum en serum van donor 13 getitreerd op drie concentraties Factor H coat (1.0, 0.5 en 0.1 $\mu\text{g/ml}$). In figuur 13 is te zien dat het signaal van het aFH pos serum lager wordt naarmate een lagere concentratie Factor H als coat gebruikt is. Ook is te zien dat het signaal van het aFH pos serum aanzienlijk lager is dan in voorgaande aFH ELISA's. Serum van donor 13 geeft hetzelfde signaal op alle coat condities. Dit is een indicatie op aspecifieke binding van sera van normale donoren in de ELISA.

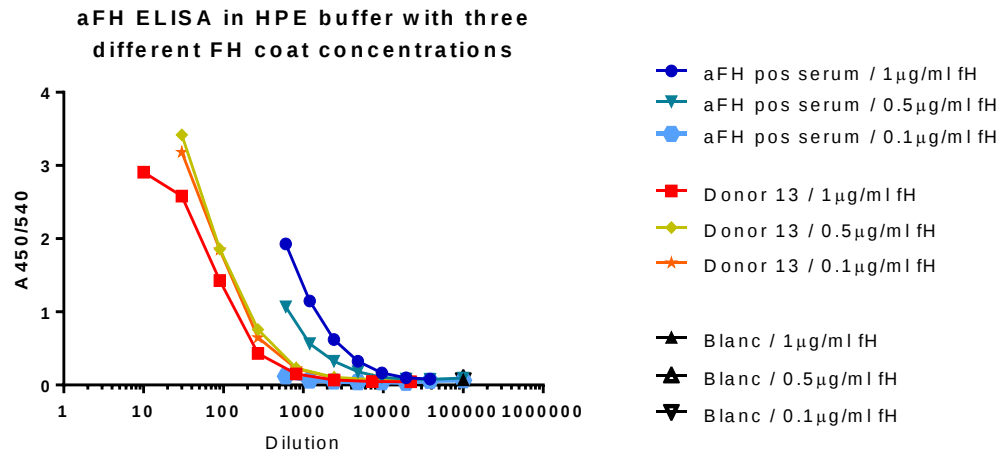


Fig. 13: aFH pos serum en serum van donor 13 gemeten in aFH ELISA op drie verschillende Factor H coat concentraties (1.0, 0.5 en 0.1 $\mu\text{g/ml}$). Het signaal van het aFH pos serum wordt lager wanneer een lagere coat conditie gebruikt wordt. Donor 13 geeft hetzelfde signaal voor alle Factor H coat concentraties.

Westernblot: Specificiteit aFH pos serum en normale donor

Naast de Factor H coat titratie is een Westernblot uitgevoerd om de specificiteit van het aFH pos serum en serum van donor 13 te onderzoeken (fig. 14). Factor H geeft op een SDS-page gel een bandje op $\pm 140\text{kD}$. Een monoklonale antilichaam tegen Factor H (aFH09) is gebruikt als positieve controle. Te zien is dat zowel aFH09 als het aFH pos serum een bandje geven rond 140kD. Het serum van donor 13 geeft geen bandje en wijst op de afwezigheid van- of niet te detecteren -anti-Factor H antistoffen.

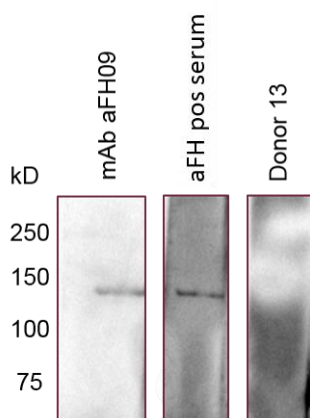


Fig. 14: aFH westernblot. mAb aFH09 (positieve controle) en aFH pos serum geven een bandje op $\pm 140\text{kD}$ (Factor H). Het serum van donor 13 geeft geen bandje.

aFH ELISA om auto-antistoffen tegen Factor H te detecteren
Coat: mAb aFH16)

Aangezien normale buisjesdonoren op een nieuwe batch Factor H coat veel aspecifiek signaal geven en het specifieke signaal een stuk lager is, is gekozen om Factor H indirect te coaten via een monoklonale antistof tegen Factor H (aFH16). In figuur 15 is te zien dat het aFH pos serum een hoog signaal geeft. Alle sera van de donoren en NHPS serum geven een aanzienlijk lager signaal dan wanneer gemeten wordt op direct gecoat Factor H. Het serum van Donor 13 geeft een hoger signaal dan het serum van donor 2 en NHPS. Tussen het signaal van het aFH pos serum en het serum van donor 13 zit een factor 160 verschil en dit geeft aan dat de sera van de normale donoren een lager signaal geven op een aFH16 (+Factor H) coat vergeleken met een ELISA waarbij Factor H direct gecoat is. Zowel de blanco met- en zonder -Factor H geven een laag signaal.

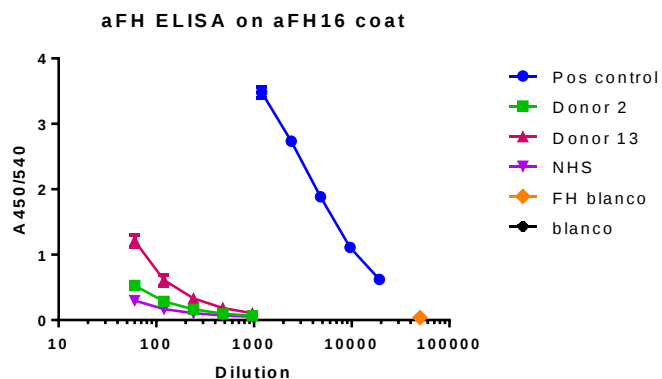


Fig. 15: aFH pos serum, serum van donor 2 serum van, donor 13 en NHPS gemeten in aFH ELISA (aFH16 + Factor H) Het aFH pos serum geeft een hoog. Beide donoren en NHPS geven een laag signaal vergeleken met het aFH pos serum.

Om de specificiteit van het aFH pos serum op een aFH16 coat te bepalen is deze uitgetitreerd op een aFH16 coat (+Factor H), op een GA29 coat (irrelevant IgG monoklonale antistof) en op een plaat zonder coat. In figuur 16 is te zien dat het aFH pos serum een hoog signaal geeft op een aFH16 + Factor H coat en uittitreert tot het signaal van de blanco. Het aFH pos serum geeft geen signaal op een GA29 coat of op een ELISA plaat zonder coat. Dit laat zien dat het signaal van het aFH pos serum op een aFH16 coat specifiek is.

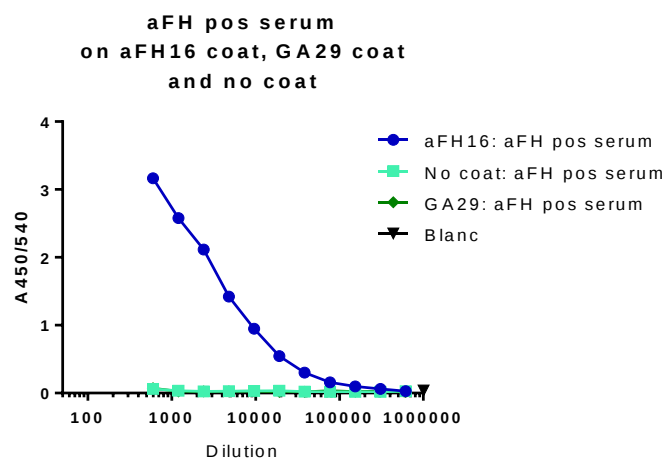


Fig. 16: aFH pos serum gemeten op aFH16 (+Factor H) coat, GA29 coat en op een ELISA plaat zonder coat. Op de aFH16 (+Factor H) coat titreert aFH pos serum uit tot het signaal van de blanco. Op een ELISA plaat met GA29 en zonder coat geeft het aFH pos serum geen signaal.

Om een eerste indruk te krijgen over de relatie tussen C3NeF en anti-Factor H antistoffen in patiëntensera, is 1:100 verdund serum van zesentwintig patiënten met een positieve C3NeF (ELISA) uitslag in HPE gemeten in de anti-Factor H ELISA (fig. 17). C3NeF concentraties zijn niet weergegeven aangezien de C3NeF titer niet correspondeert met de ernst van de ziekte. De zwarte balkjes geven het signaal weer van de patiëntensera op een aFH16 coat (+factor H). In het grijs is het signaal weergegeven van de patiëntensera op een irrelevante coat (GA29). Te zien is dat C3NeF PT 4 en 5 een aanzienlijk hoger signaal geven op de aFH16 coat ten opzichte van de GA29 coat. Dit zou een aanwijzing kunnen zijn voor de aanwezigheid van anti-Factor H antistoffen in het serum. C3NeF PT 3, 8 en 14 geven een hoog signaal op beide coats, vermoedelijk door aspecifieke binding. Het serum van patiënt 2 geeft een hoger signaal op de GA29 coat ten opzichte van de aFH16 coat (aspecifieke binding). Alle andere C3NeF PT sera geven een laag signaal op beide coats en hebben zeer waarschijnlijk geen antistoffen tegen Factor H in het serum.

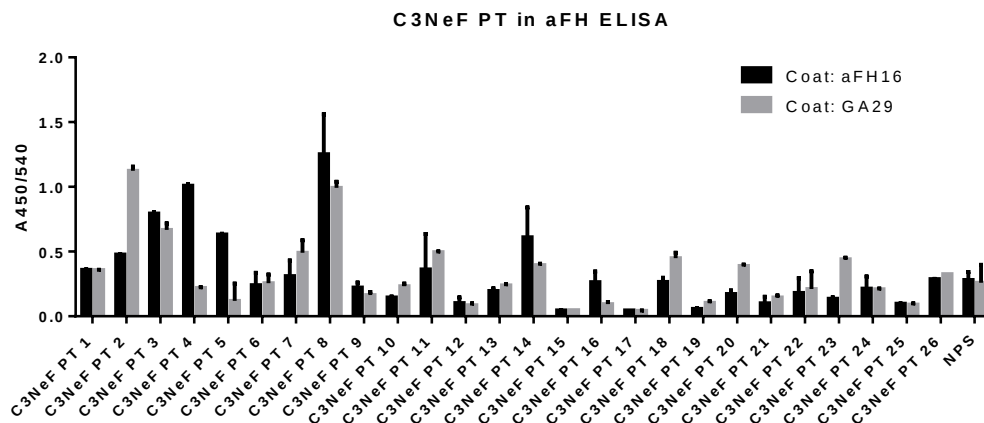


Fig. 17:: Zesentwintig C3NeF patiëntensera gemeten op zowel een aFH16 coat, als op een irrelevantie coat in de anti-Factor H ELISA (1:100). Alleen serum van C3NeF PT 4, 5 en 14 geven een aanzienlijk hoger signaal op de aFH16 coat vergeleken met het signaal op de GA29 coat.

Tot slot zijn zesendertig sera van normale donoren (1:100 in HPE-buffer) gemeten in de anti-Factor H ELISA. De concentraties aFH zijn berekend ten opzichte van het aFH pos serum, welke op 100 AU/ml gesteld is. In figuur 18 is te zien dat de concentraties aFH in de normale donoren zeer laag zijn in verhouding tot het aFH pos serum. Aangezien de gemeten sera nauwelijks tot geen signaal gaven op een irrelevante GA29 coat, is geen correctie voor aspecifiek signaal uitgevoerd. De stippellijn geeft het gemiddelde + 2x de standaarddeviatie weer.

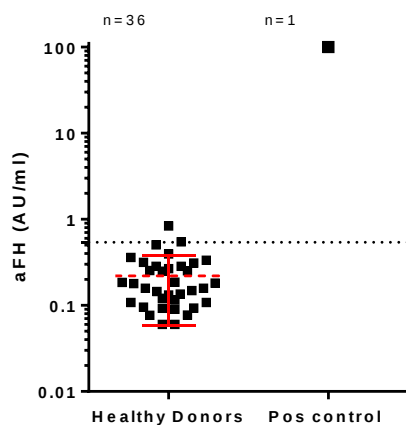


Fig. 18: Sera van zesendertig normale donoren in de anti-Factor H ELISA (1:100). Concentraties aFH zijn berekend ten opzichte van het aFH pos serum (100 AU/ml)

Voordat begonnen kon worden met het ligeren van de aFH07 Light- en Heavy –chain insert, moesten de niet gewenste inserts verwijderd worden uit de plasmiden. Plasmide IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴ is met restrictieenzymen HindIII en Nhe1 gedigesteerd (fig. 19a) en plasmide his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ is met restrictieenzymen HindIII en EcoRI gedigesteerd (fig. 19b).

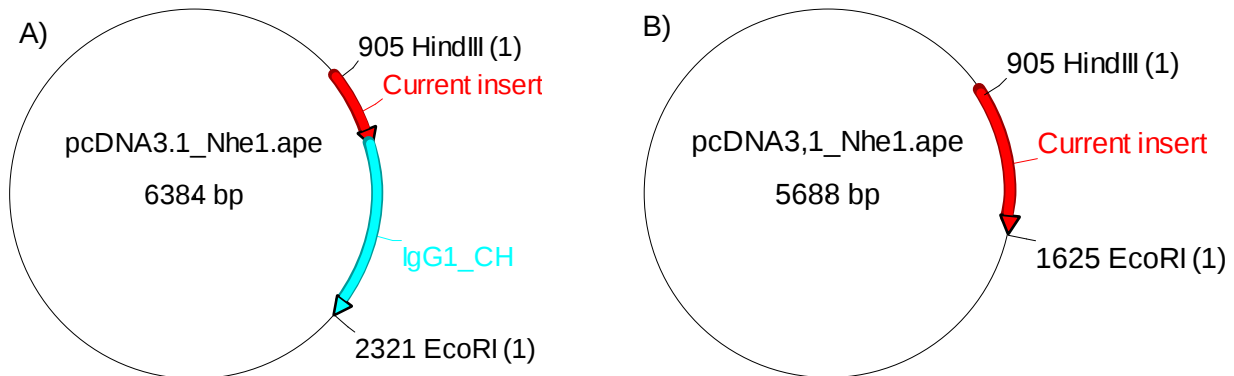


Fig. 19 A: Schematische voorstelling van digestie IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴ met restrictieenzymen HindIII en Nhe1. Het huidige insert is uit het IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴ plasmide gedigesteerd. De constante heavy chain (IgG1_CH) is nog in het plasmide aanwezig. **B:** Schematische voorstelling van digestie his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ met restrictieenzymen HindIII en EcoRI. Het huidige insert is uit het his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ plasmide gedigesteerd.

Beide plasmiden zijn in zowel de gedigesteerde als ongedigesteerde vorm geladen op een 1% agarosegel (fig. 20). Het IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴ plasmide geeft een bandje op ±6000kB (IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴, theoretisch: 5961kB) en een bandje op ±500kB (huidig insert). Het his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ geeft een bandje op ±5000kB (his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³, theoretisch 4968kB) en een bandje op ±1000kB (huidig insert). De bandjes komen dus overeen met de verwachte grootte. Beide ongedigesteerde plasmiden geven een bandje lager dan de gedigesteerde plasmiden. De gedigesteerde plasmiden zijn uit de agarosegel gesneden en met behulp van een gel extractie kit gezuiverd.

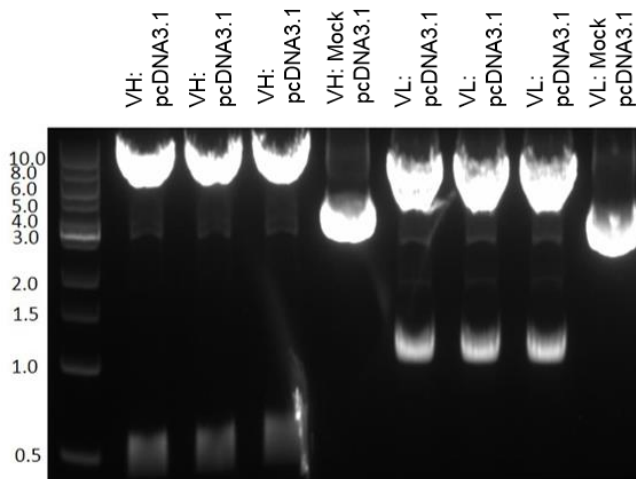


Fig. 20: Controle digestie van IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴ plasmide met restrictieenzymen HindIII en Nhe1 (3x) en his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ plasmide met restrictieenzymen HindIII en EcoRI (3x). Beide ongedigesteerde plasmiden geven een lager bandje dan de gedigesteerde plasmiden.

Na gel extractie van de gedigesteerde plasmiden uit de 1% agarosegel is de concentratie nucleïnezuur gemeten (tabel 1). De gemeten concentraties IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴ plasmide en his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ plasmide zijn respectievelijk 72.99 ng/μl en 84.56 ng/μl.

Tabel 1: Concentraties nucleïnezuur in plasmiden na gel extractie

Sample ID	ng/μl
IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-) ⁴	72.99
his-pcDNA3.1-Nhe1(-) ³	84.56

Na ligatie van het aFH07 VH¹ construct in IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴ en aFH07 VL-IgG1_CL² construct in his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ plasmiden zijn deze getransformeerd in One Shot TOP10F E.coli op LB selectieplaten (Carb.). Vervolgens zijn drie kolonies met VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ en drie kolonies VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ opgegroeid in 3ml LB medium. De plasmiden zijn vervolgens geïsoleerd met behulp van een MiniPrep Plasmid Isolation kit. De concentraties DNA (nucleïnezuur) van de geïsoleerde plasmiden zijn gemeten (tabel 2).

Tabel 2: Concentraties nucleïnezuur in plasmiden na MiniPrep plasmide isolatie

Plasmide	Concentratie (ng/μl)
<u>VH</u> -IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-) ⁶ MiniPrep bacteriesuspensie 1	195.6
<u>VH</u> -IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-) ⁶ MiniPrep bacteriesuspensie 2	218.5
<u>VH</u> -IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-) ⁶ MiniPrep bacteriesuspensie 3	203.1
<u>VL</u> -IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-) ⁵ MiniPrep bacteriesuspensie 1	239.0
<u>VL</u> -IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-) ⁵ MiniPrep bacteriesuspensie 2	230.5
<u>VL</u> -IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-) ⁵ MiniPrep bacteriesuspensie 3	223.5

Een controle digestie van VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ MiniPrep bacteriesuspensie 2 en VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ MiniPrep bacteriesuspensie 1 is uitgevoerd met restrictieenzym PST1. Beide plasmiden hebben twee PST1 restrictiesites in het VH-IgG1_CH⁷ - of VL-IgG1_CL²-insert en één restrictiesite na het insert (fig. 21).

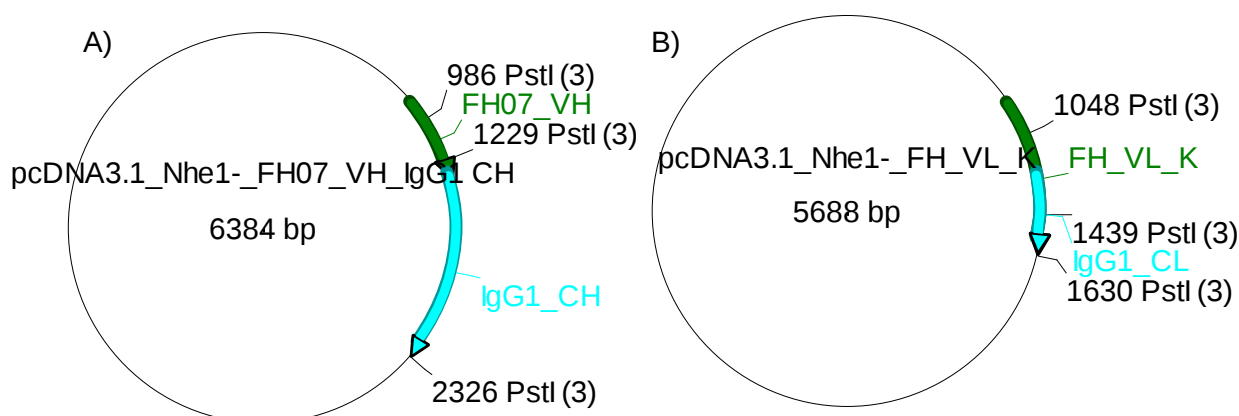


Fig. 21 A: Schematische voorstelling van controle digestie IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴ met restrictie enzym PstI. Na digestie ontstaan drie constructen. **B:** Schematische voorstelling van digestie his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ met restrictieenzymen PstI. Na digestie ontstaan drie constructen

De gezuiverde plasmiden uit de opgegroeide E.coli kolonies zijn in zowel de gedigesteerde als ongedigesteerde vorm geladen op een 1% agarosegel (fig. 22). Het door Pst1 gedigesteerde VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ plasmide uit kolonie 1 en 2 geven bandjes op ±5000kB, ±400kB en ±200kB (theoretisch: 5106kB, 391kB en 191kB). Alle andere kolonies met VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ plasmide geven niet het te verwachten bandenpatroon.

Het door Pst1 gedigesteerde VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ plasmide uit kolonie 2 en 3 geven bandjes op ±5000kB, ±1100kB en ±250kB (theoretisch: 5044kB, 1097kB en 243kB). Alle andere kolonies met VH-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ plasmide geven niet het te verwachten bandenpatroon.

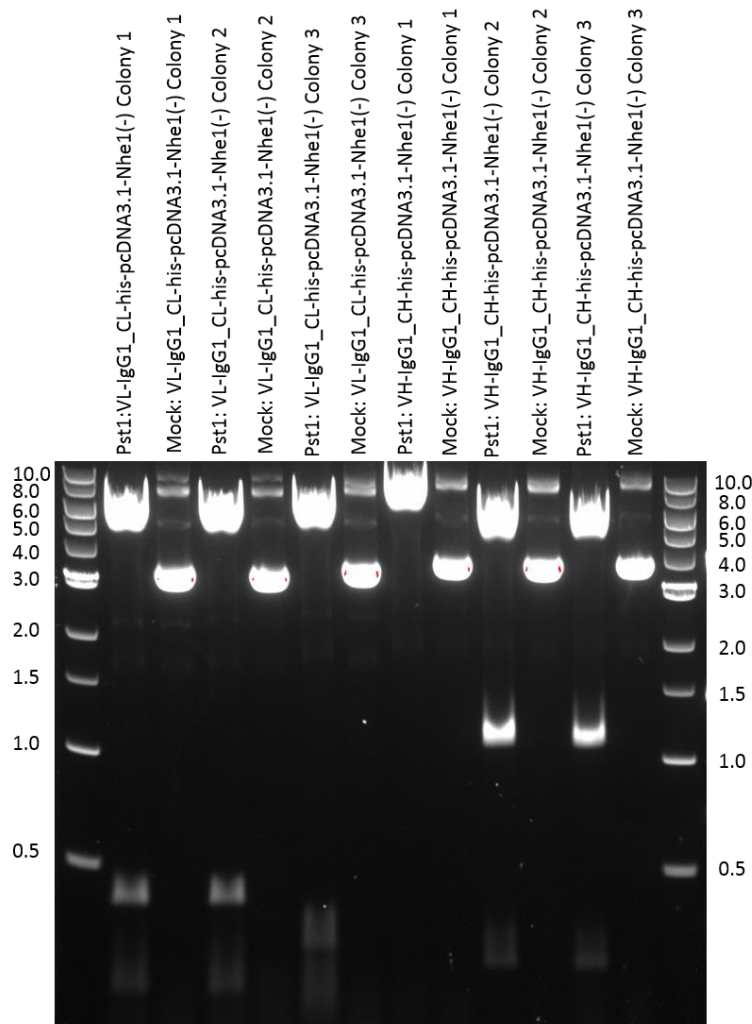


Fig. 22: Controle digestie van VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ plasmide en VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ plasmide met restrictieenzym Pst1 (3x) op een 1% agarosegel.

Er is gekozen om VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ kolonie 1 en VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ kolonie 2 groot op te kweken in 250ml LB-medium omdat deze bandjes geven op de verwachte grootte en de hoogste concentratie nucleïnezuur bevatten. Na overnacht incuberen op 37°C is een Maxiprep Plasmid Isolation uitgevoerd op beide bacterieculturen. Na isolatie is de concentratie nucleïnezuur bepaald (tabel 3). VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ is geïsoleerd met een eindconcentratie van 1860ng/μl en VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ met een eindconcentratie van 710 ngμl.

Tabel 3: Concentraties nucleïnezuur in plasmiden na MaxiPrep plasmide isolatie

Plasmide	Concentratie (ng/μl)
<u>VH</u> -IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-) ⁶ MaxiPrep	710
<u>VL</u> -IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-) ⁵ MaxiPrep	1860

Een transfectie is uitgevoerd met VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ en VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ in HeK293T cellen. Het geoogste supernatant is vervolgens gezuiverd met een Prot A kolom. Zes gezuiverde Prot A fracties, Prot A flowthrough, ongezuiverd supernatant na transfectie (HeK293T supernatant), Humira (Adalimumab, positieve controle) en een negatief supernatant (supernatant na transfectie zonder IgG) zijn geladen op een 4-12% polyacrylamide gel en overgebracht op een Westernblot. MH16-HRP (anti-FC) is gebruikt voor het aantonen van de IgG-Heavy Chains (fig. 23a). Ook is een tweede Westernblot uitgevoerd waar MH19-HRP (anti-Kappa) gebruikt is voor het aantonen van de IgG-Light Chains (fig. 23b). In figuur 23a is te zien dat het ongezuiverde supernatant (HeK293T supernatant) een bandje geeft op 100kD, wat mogelijk kan duiden op de aanwezigheid van 2 Heavy Chains. Ook is op 100kD een bandje waarneembaar in het negatieve supernatant en Prot A flowthrough. Humira (positieve controle) geeft meerdere bandjes tussen 50kD en 250kD. In alle Prot A gezuiverde fracties zijn geen bandjes waarneembaar. In figuur 23b zijn meerdere bandjes waarneembaar tussen 25kD en 250kD bij zowel het ongezuiverde supernatant als bij Prot A flowthrough. De brede bandjes op 25kD (wit gekleurd door signaal boven detectiegrens) kunnen duiden op de aanwezigheid van zeer veel IgG-Light Chains. De bandjes op 50kD kunnen duiden op het vormen van twee IgG-Light Chains. Ook zijn bandjes waarneembaar op 75kD, wat kan wijzen op het vormen van een half IgG antilichaam (1x IgG-Heavy Chain en 1x IgG-Light Chain). Ook het bandje op 100kD wijst hierop; aan het half IgG antilichaam zit mogelijk een extra IgG-Light Chain vast maar de tweede IgG-Heavy Chain ontbreekt. In het ongezuiverde supernatant is ook een (zwak) bandje zichtbaar op 150kD. Dit kan wijzen op het vormen van (zeer weinig) intacte IgG antilichamen. Dit bandje is niet zichtbaar in Prot A flowthrough of in de gezuiverde Prot A fracties. Het negatieve supernatant (negatieve controle) geeft geen bandjes en Humira (positieve controle) geeft meerdere bandjes tussen 25kD en 250 kD. De afwezigheid van intensieve bandjes op 150kD (intact IgG antilichaam) in het HeK293T supernatant op beide Westernblots wijzen op een niet succesvolle transfectie.

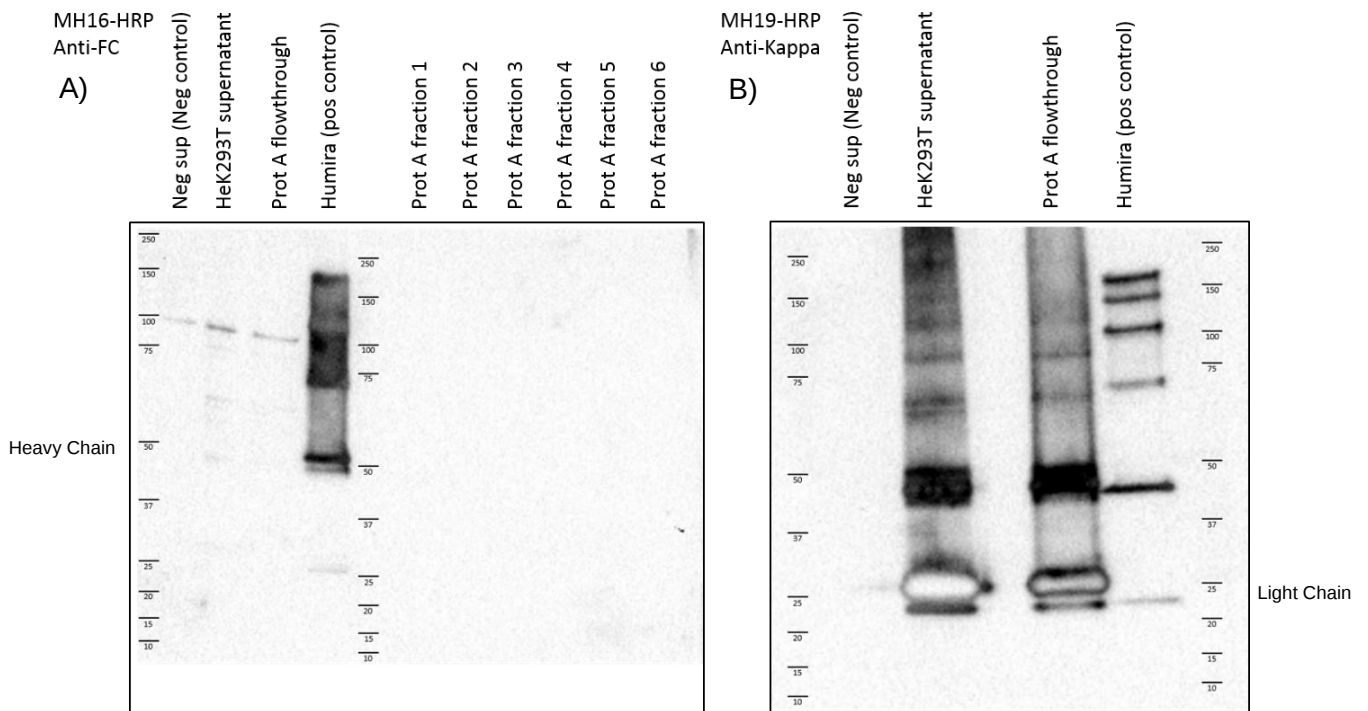


Fig. 23 A: Westernblot met ongezuiverd supernatant na transfectie (HeK293T supernatant), gezuiverde Prot A fracties, Prot A flowthrough, negatieve controle (neg sup) en Humira (positieve controle). MH16-HRP (anti-FC) is gebruikt als conjugaat. **B:** Westernblot uitgevoerd met ongezuiverd supernatant na transfectie (HeK293T supernatant), Prot A flowthrough, negatieve controle (neg sup) en Humira (positieve controle). MH19-HRP (anti-Kappa) is gebruikt als conjugaat.

Een tweede transfectie is uitgevoerd met een 10x overmaat VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ ten opzichte van VL-IgG1_CL-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁵ om zo de productie van de IgG-Heavy Chain te stimuleren. Het supernatant van deze transfectie (HeK293T supernatant#2), supernatant van de eerste transfectie (HeK293T supernatant#1), Humira (positieve controle) en een negatief supernatant (negatieve controle) zijn geladen op een 4-12% polyacrylamide gel en overgebracht op een Westernblot. Wederom zijn MH16-HRP (fig. 24a) en MH19-HRP (fig. 24b) gebruikt als conjugaat. Er zijn geen bandjes waarneembaar op beide Westernblots bij het supernatant van de tweede transfectie (HeK293T supernatant#2). Dit geeft aan dat er geen IgG-Heavy Chains en geen IgG-Light Chains geproduceerd zijn. In figuur 24a is te zien dat positieve controle Humira meerdere bandjes tussen 50kD en 250kD geeft. Een bandje op 100kD is zichtbaar bij het supernatant van de eerste transfectie (HeK293T supernatant#1). Ook is op dezelfde hoogte een bandje waarneembaar bij het negatieve supernatant. In figuur 24b is te zien dat er, in tegenstelling tot het supernatant van de eerste transfectie (Chi07#1), geen bandjes waarneembaar zijn bij het supernatant van de tweede transfectie (Chi07#2). Dit wijst er op dat tijdens de tweede transfectie geen IgG-Light Chains geproduceerd zijn, terwijl deze wel geproduceerd zijn tijdens de eerste transfectie. Positieve controle Humira geeft een aantal bandjes tussen 47kD en 150kD. De negatieve controle laat geen bandjes zien. Wederom zijn geen intensieve bandjes waargenomen op 150kD in het HeK293T supernatant en geeft aan dat ook deze transfectie niet succesvol is.

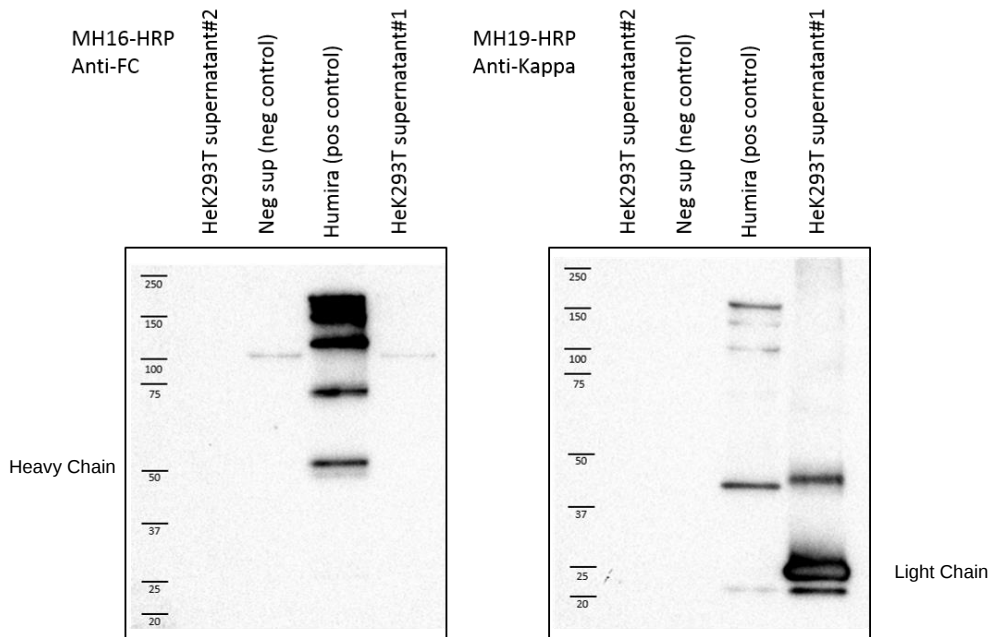


Fig 24 A: Westernblot uitgevoerd met ongezuiverd supernatant na eerste transfectie (HeK293T supernatant#1) en tweede transfectie (HeK293T supernatant#2), negatieve controle (neg sup) en positieve controle (Humira). MH16-HRP (anti-FC) is gebruikt als conjugaat. **B:** Westernblot uitgevoerd met ongezuiverd supernatant na eerste transfectie (HeK293T supernatant#1) en tweede transfectie (HeK293T supernatant#2), negatieve controle (neg sup) en positieve controle (Humira). MH19-HRP (anti-Kappa) is gebruikt als conjugaat.

Aangezien de IgG-Heavy Chains niet tot expressie komen in beide transfecties, werd besloten om het VH-IgG1_CH⁷ construct te ligeren in een his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ plasmide, welke ook gebruikt is voor het ligeren van het VL-IgG1_CL². Het VH-IgG1_CH⁷ insert is met restrictieenzymen HindIII en EcoRI uit het his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴ plasmide gedigesteerd (fig. 25).

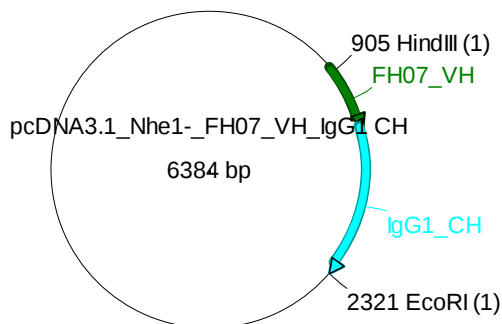


Fig. 25: Schematische voorstelling van digestie VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ met restrictieenzymen HindIII en EcoRI. Het VH-IgG1_CH⁷ insert is uit het his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ plasmide gedigesteerd.

Om het VH-IgG1_CH⁷ insert te verkrijgen is het VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ plasmide in zowel de gedigesteerde als ongedigesteerde vorm geladen op een 1% agarosegel (fig. 26). Het VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ plasmide geeft bandjes op ± 3000 kb en ± 1300 kb (theoretisch: 4968kb en 1416kb). De 1406kb bandjes (VH-IgG1_CH⁷) zijn onder een UV-lamp uit de agarosegel gesneden en met behulp van een gel extractie kit gezuiverd.

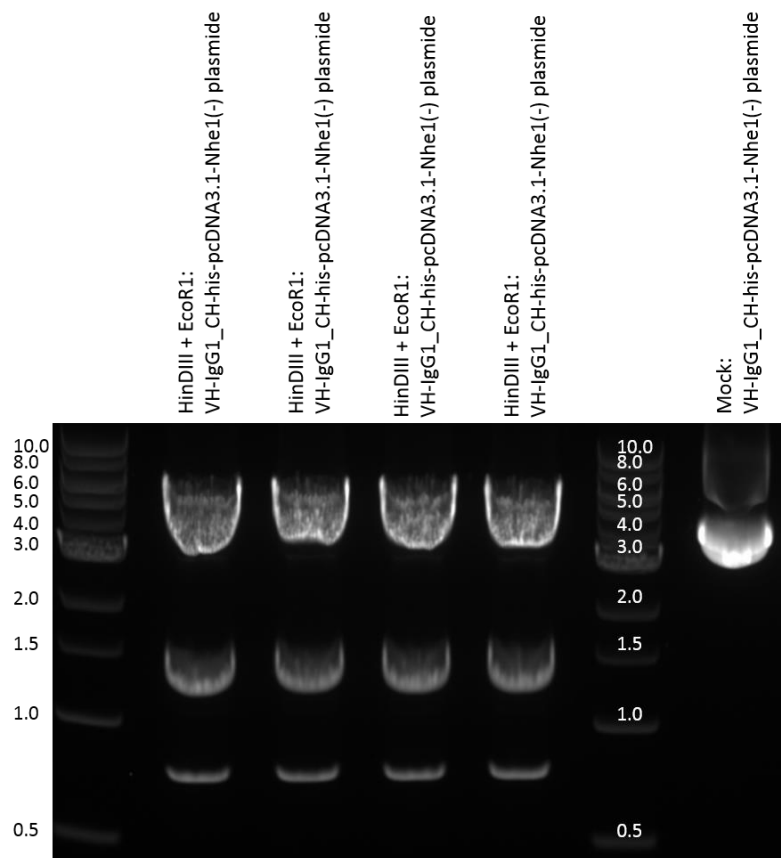


Fig. 26: Controle digestie van VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁶ plasmide met restrictieenzymen *HinDIII* en *EcoR1* (4x) op een 1% agarosegel).

Na gel extractie van het VH-IgG1_CH⁷ insert uit het his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁴ plasmide is een ligatie uitgevoerd waarbij het VH-IgG1_CH⁷ insert is geligeerd in het his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ plasmide. De concentratie nucleïnezuur is gemeten in het geligeerde VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁸ plasmide en is weergegeven in tabel 4.

Tabel 4: Concentratie nucleïnezuur in plasmiden na ligatie VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁸

Plasmide	Concentratie (ng/μl)
<u>VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)</u> ⁸	39.8

Na ligatie van het VH-IgG1_CH⁷ insert in de his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ plasmide, zijn deze getransformeerd in One Shot TOP10F E.coli op LB selectieplaten (Carb.). Vervolgens zijn 5 kolonies opgegroeid in 3ml LB medium. De plasmiden zijn geïsoleerd met behulp van een MiniPrep Plasmid Isolation kit. Op de geïsoleerde VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)⁸ plasmiden uit de 5 bacterieculturen zijn twee controle digesties uitgevoerd met restrictieenzym *Pst1* en restrictieenzym *Xmn1* om te controleren of het VH-IgG1_CH⁷ insert is opgenomen in de his-pcDNA3.1-Nhe1(-)³ plasmide. *Pst1* heeft twee restrictiesites in het VH-IgG1_CH⁷ insert en 1 restrictiesite na het insert (fig. 27a). Theoretisch gezien resulteert dit in drie constructen (5044kB, 1097kB en 243kB). *Xmn1* heeft 1 restrictiesite in het VH-IgG1_CH⁷ insert en 2 restrictiesite buiten het insert (fig. 27b). Theoretisch gezien resulteert dit in eveneens drie constructen (2965kB, 2411kB en 1008kB).

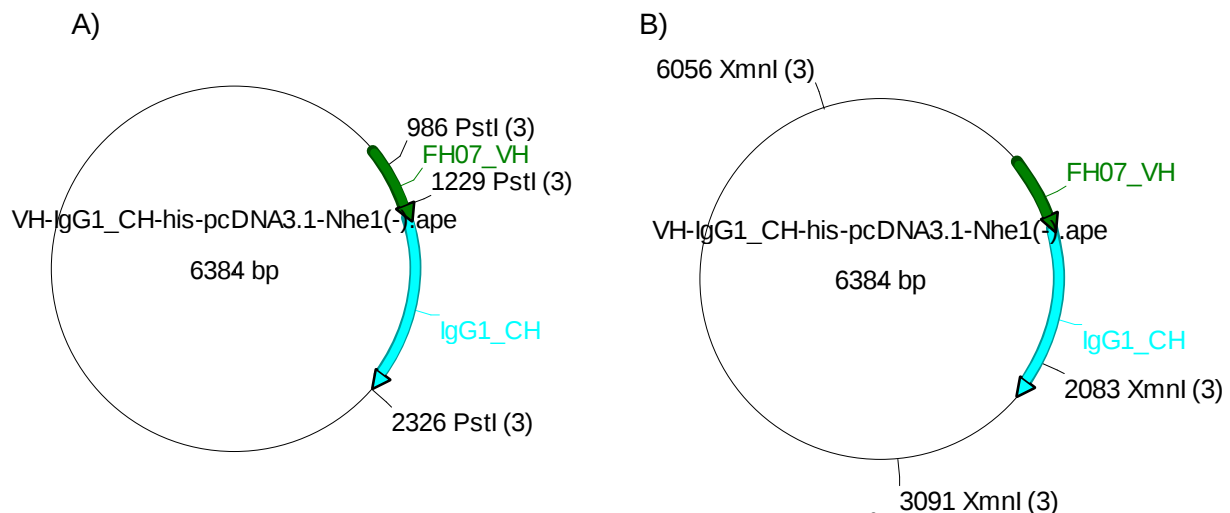


Fig. 27 A: Schematische voorstelling van digestie $\underline{VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)^8}$ restrictie-enzym *PstI*. Na digestie ontstaan drie constructen. **B:** Schematische voorstelling van digestie $\underline{VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)^8}$ restrictie-enzym *XmnI*. Na digestie ontstaan drie constructen.

Zowel de met *PstI*/*XmnI* gedigesteerde plasmiden als de ongedigesteerde plasmiden uit alle 5 bacterieculturen zijn geladen op een 1% agarosegel. In figuur 28 is te zien dat de uit bacterieculture 1,2 en 3 geïsoleerde plasmiden maximaal twee bandjes geven. Alleen de plasmiden afkomstig uit bacteriecultuur 4 en 5, welke gedigesteerd zijn met *PstI*, geven drie bandjes, maar deze komen niet overeen met de theoretisch verwachte hoogte van de bandjes (5044kB, 1097kB en 243kB).

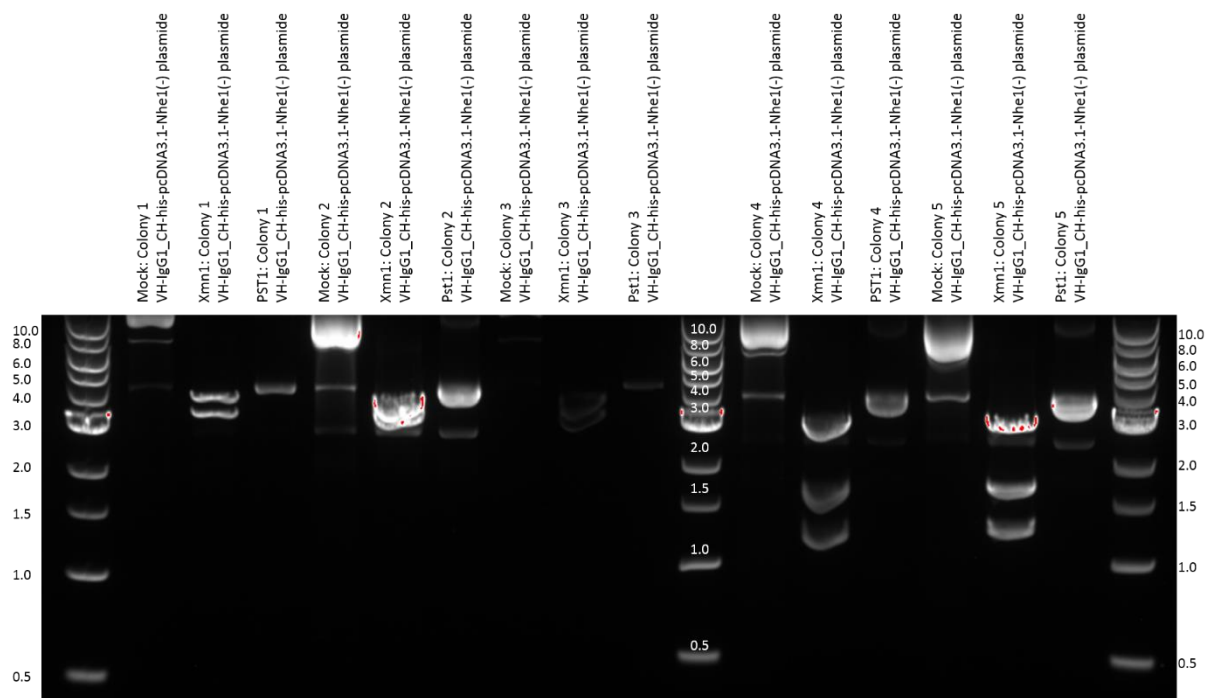


Fig. 28: Controle digestie van $\underline{VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-Nhe1(-)^8}$ plasmide met restrictieenzym *PstI* (5x) en *XmnI* (5x) op een 1% agarosegel

Discussie

Ondanks de “zeldzaamheid” van auto-antistoffen tegen Factor H in patiëntens serum, kan het bepalen van de aan- of afwezigheid een waardevolle bijdrage leveren in het stellen van diagnoses of uitsluiten van, voornamelijk, complement-gemedieerde ziekten. Zowel een Factor H deficiëntie, alsmede de aanwezigheid van auto-antistoffen tegen Factor H, kan een soortgelijk ziektebeeld geven, voornamelijk gekenmerkt door nierschade. Desondanks, is de wijze van behandeling verschillend. Wanneer auto-antistoffen tegen Factor H aanwezig zijn in patiëntens serum kan bijvoorbeeld de biological Eculizumab (anti-C5) toegediend worden. Dit voorkomt het vormen van MAC op lichaamseigen cellen en beschermt de cel voor lysis door complementactivatie. Als er sprake is van een Factor H deficiëntie, zal het tekort aan Factor H aangevuld kunnen worden door het uitvoeren van een plasmaferese.

Het is bekend dat anti-Factor H monoklonale antistoffen lysis kunnen induceren in een hemolytische assay. Dit is getest in een hemolytische assay waarbij een achttal anti-Factor H monoklonale antistoffen zijn uitgetitreerd op schapenerythrocyten (s. fig. 1, bijlage 1). In theorie kunnen (auto)antistoffen tegen Factor H dus ook lysis induceren in de eerste incubatiestap van de C3NeF hemolytische assay.

Om enerzijds antistoffen tegen Factor H te kunnen meten in patiënten met klinische verdenking op complement-gemedieerde ziekten, zoals aHUS, en anderzijds om een vals-negatieve C3NeF hemolytische activiteit uitslag te ondervangen, is een anti-Factor H ELISA ontwikkeld.

In eerste instantie leek het direct coaten van Factor H op een ELISA plaat goed te werken. Maar na een Factor H batchwisseling werd veel aspecifiek signaal waargenomen in sera van gezonde donoren. Ook de ratio's tussen de signalen van het aFH pos serum en sera van normale donoren werd aanzienlijk kleiner na het gebruiken van een nieuwe batch Factor H. Dit zou te maken kunnen hebben met de (on)zuiverheid van het Factor H preparaat of door aanwezige aggregaten in het oude Factor H preparaat (betere herkenning van epitopen door aFH antistoffen). Door middel van een Factor H coat titratie en het uitvoeren van een aFH Westernblot is bevestigd dat het signaal van deze gezonde donoren aspecifiek is. Tegelijkertijd is de aanwezigheid van aFH antistoffen in het aFH pos serum bevestigd. Wanneer Factor H indirect gecoat wordt door middel van een aFH monoklonaal antistof, wat vermoedelijk een gunstig effect heeft op de vouwing van Factor H, wordt het aspecifieke signaal van gezonde donoren gereduceerd. Ook werd de ratio tussen het aFH pos serum en de normalen donoren groter. Sommige patiëntensera bleven echter een aspecifiek signaal geven. Dit zijn waarschijnlijk anti-muis antistoffen in het patiëntens serum of normale donoren, welke ook gedetecteerd kunnen worden door het MH16-HRP conjugaat. Om dit te ondervangen zijn de patiëntensera naast de aFH16 coat ook gemeten op een irrelevante anti-Granzym A mAb coat (GA29). Granzym A komt voor in NK- en cytotoxische T-cellen en is niet, of in zeer lage concentratie aanwezig in serum. Wanneer signaal gemeten wordt op een aFH16 coat en geen signaal gemeten wordt op een GA29 coat, is er sprake van aFH antistoffen in het patiëntens serum.

In de anti-Factor H ELISA zijn sera van zesentwintig patiënten gemeten welke een verhoogde C3NeF uitslag hebben. Twee patiëntensera geven een aanzienlijk hoger signaal op de aFH16 coat ten opzichte van de GA29 coat. Deze patiënten zouden mogelijk, naast C3NeF, ook antistoffen kunnen hebben tegen Factor H. Om daadwerkelijk aan te tonen dat deze patiënten anti-Factor H antistoffen hebben, is het noodzakelijk om deze te meten tegenover een stabiele standaard en een cut-off vast gesteld te hebben door het meten van normale donoren. Ook

kan een Westernblot uitgevoerd worden met het serum van deze patiënten om anti-Factor H positiviteit vast te stellen.

Aangezien de hoeveelheid aFH pos serum niet oneindig was, is geprobeerd een muis anti-Factor H monoklonaal antistof (aFH07) te chimeriseren. Een recombinant monoklonale antistof als standaard heeft meerdere voordelen ten opzichte van een standaard gemaakt uit patiëntens serum; de chimeer antistof heeft een oneindige bron, zal altijd hetzelfde signaal geven en zorgt voor een betere standaardisatie zowel in het laboratorium, als tussen verschillende laboratoria.

De digesties met HindIII en NheI op de IgG1_CH-his-pcDNA3.1-NheI(-)⁴ plasmide gaven bandjes op ±6000kB (theoretisch 5961 kB). Het met HindIII en EcoRI gedigesteerde his-pcDNA3.1-NheI(-)³ plasmide gaf bandjes op ±5000kB (theoretisch: 4968kB). De huidige inserts zijn dus met succes gedigesteerd uit beide plasmiden. De controle digesties met PST1 die zijn uitgevoerd na ligatie van het VH¹ construct in IgG1_CH-his-pcDNA3.1-NheI(-)⁴ en aFH07 VL-IgG1_CL² construct in his-pcDNA3.1-NheI(-)³ geven aan dat de plasmiden (met inserts) succesvol zijn geligeerd en getransformeerd in Top10F E.coli. Op de Westernblots die uitgevoerd zijn na transfectie van de plasmiden in HeK293T cellen (LC:HC ratio= 1:0.8) bleek dat er nauwelijks aFH07 heavy chains geproduceerd zijn. Dit in tegenstelling tot de productie van aFH07 light chains. De positieve controle (Humira) laat duidelijk zien dat deze zowel heavy- als light –chains bevat. Ook laat het bandje op 150kD zien dat er volledige chimeer IgG antistoffen aanwezig zijn. De negatieve controle (supernatant van transfectie zonder IgG productie) laat zien dat er zeer weinig heavy chains en geen light chains aanwezig zijn. Een tweede transfectie is uitgevoerd waar een 10x overmaat VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-NheI(-)⁶ ten opzichte van de vorige transfectie is toegevoegd (LC:HC ratio= 1:8). In het HeK293T supernatant konden geen aFH07 heavy- en light –chains gedetecteerd worden. Al meer dan 30 jaar is een discussie gaande waarbij uitgegaan wordt dat de productie van IgG heavy chains toxisch zijn voor cellen (Wabl & Steinberg 1982; Köhler 1984; Li 2006). Aangezien nu een 10x overmaat aan VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-NheI(-)⁶ plasmide is toegevoegd, zou deze heavy chain toxiciteit een mogelijke verklaring kunnen zijn het ontbreken van zowel IgG heavy- als light –chains. Om dit te bevestigen zouden heavy chains aangetoond kunnen worden in het cellysaat van de HeK293T cellen. Aangezien de aFH07 light chains wel werden geproduceerd door de HeK293T cellen tijdens de eerste transfectie werd het vermoeden gewekt dat het probleem zich bevindt in het VH¹ insert en/of het IgG1_CH-his-pcDNA3.1-NheI(-)⁴ plasmide. Om deze reden is zowel het variabele- als constante –heavy chain insert uit het VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-NheI(-)⁶ gedigesteerd. Deze digestie laat bandjes zien op ±3000kB en ±1300kB (theoretisch: 4968kB en 1400kB). Het his-pcDNA3.1-NheI(-)⁴ plasmide geeft dus een lager bandje dan verwacht. Aangezien het VH-IgG1_CH⁷ wel een bandje gaf op de juiste hoogte is deze geligeerd in dezelfde his-pcDNA3.1-NheI(-)³ plasmide als gebruikt is voor het ligeren van het VL-IgG1_CL² insert. In deze ligatie is het gehele VH-IgG1_CH⁷ insert in het plasmide geligeerd terwijl tijdens de eerste uitgevoerde ligatie alleen het VH¹ insert is geligeerd. De twee controle digesties met XmnI en PST1 na transformatie van VH-IgG1_CH-his-pcDNA3.1-NheI(-)⁸ in Top10F E.coli gaven bandjes welke niet overeenkomen met de theoretische verwachtingen. De digestie met XmnI resulteerde in veel verschillende digestiepatronen. Alleen de plasmiden geïsoleerd uit bacteriecultuur 4 en 5 gaven drie bandjes, welke zich bevinden op ±3000kB, ±1600kB en ±1200kB (theoretisch: 2965kB, 2411kB en 1008kB). Alle digesties met PstI resulteerden in minder dan 3 bandjes. Het niet overeenkomen van de controledigesties uitgevoerd met zowel XmnI als PstI met de theoretische verwachtingen doet vermoeden dat het VH-IgG1_CH⁷ insert niet goed geligeerd is in het his-pcDNA3.1-NheI(-)³ plasmide.

Tijdens het ontwerpen van de geschikte aFH07 variabele light- en heavy –chain sequenties, gaf de SignalP 4.1 tool een hogere verwachting op expressie aan de gesequencde heavy chain signaalpeptide ten opzichte van een geoptimaliseerde signaalpeptide. Aangezien niet bekend is waarom de uitgevoerde transfecties mislukt zijn, is besloten om de aFH07 heavy chain sequentie opnieuw te bestellen waar, net als de aFH07 light chain, gebruik gemaakt wordt van een geoptimaliseerde signaalpeptide.

Wanneer het nieuwe aFH07 variabele heavy chain construct met geoptimaliseerde signaalpeptide geleverd is, zal begonnen worden met het opnieuw chimeriseren van het aFH07 antistof. Indien de chimerisatie leidt tot een succesvolle expressie van het aFH07 chimeer antistof, zal deze gebruikt worden als standaard in de aFH ELISA. Ook wordt een aFH positief referentiemonster ontvangen van Dragon-Durey en Frémeaux-Bacchi (Institut des Cordeliers, Parijs, Frankrijk), waar de aFH07 chimeer standaard op geijkt kan worden. Zo kunnen aFH titers vergeleken worden tussen verschillende diagnostische laboratoria wereldwijd. Vervolgens moeten meer aFH positieve controles verkregen worden om de juiste verdunningsfactor te kunnen bepalen. Verder zal geprobeerd worden om in serum aanwezige anti-muis antistoffen te blokkeren door middel van het toevoegen van normaal muis serum aan de HPE buffer. Een validatieplan voor deze aFH assay zal geschreven en uitgevoerd worden zodat de aFH assay op routinebasis uitgevoerd kan worden op het Immunochemie Diagnostiek laboratorium op Sanquin. Verder kunnen patiëntensera waarbij een eventuele valse-positiviteit in de C3NeF hemolytische assay door auto-antistoffen tegen Factor H vermoed wordt, gemeten kunnen worden in de aFH ELISA. Dit geldt ook voor het meten van serum van patiënten met klinische verdenking op complement-gemedieerde ziekten. Tevens kan een eventuele associatie gemaakt worden in patiënten met auto-antistoffen tegen Factor H en C3NeF.

Conclusie

Het Immunopathologie Research laboratorium op Sanquin, Amsterdam beschikt nu over een ELISA om auto-antistoffen tegen Factor H te detecteren in serum. Meer anti-Factor H positieve patiëntensera moeten gemeten worden om de juiste serumverdunding te bepalen. Ook moeten meer sera van normale donoren gemeten worden om een cut-off te bepalen. Een poging om een muis anti-humaan Factor H te chimeriseren, en zo een aFH ELISA-standaard te creëren, is tot op heden niet gelukt. Een nieuwe chimerisatie zal uitgevoerd worden met geoptimaliseerde signaal peptides voorafgaande aan de aFH light- en heavy –chain sequenties.

Referenties

- Appel, G.B. et al., 2005. Membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease): an update. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16(5), pp.1392–403. Available at: <http://jasn.asnjournals.org/content/16/5/1392.full>.
- Blanc, C. et al., 2015. Anti-factor H autoantibodies in C3 glomerulopathies and in atypical hemolytic uremic syndrome: one target, two diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(11), pp.5129–38. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1402770> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25917093>.
- Chames, P. et al., 2009. Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*, 157(2), pp.220–233.
- Cruz Corchado, J. & JH Smith, R.J., 2007. Dense Deposit Disease/Membranoproliferative Glomerulonephritis Type II. *GeneReviews*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1425/> [Accessed July 20, 2016].
- Fearon, D.T. & Austen, K.F., 1975. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *The Journal of experimental medicine*, 142(4), pp.856–863.
- Fridkis-Hareli, M. et al., 2011. Design and development of TT30, a novel C3d-targeted C3/C5 convertase inhibitor for treatment of human complement alternative pathway-mediated diseases. *Blood*, 118(17), pp.4705–4713.
- Goodship, T.H.J. et al., 2012. Factor H autoantibodies in membranoproliferative glomerulonephritis. *Molecular Immunology*, 52(3-4), pp.200–206.
- Köhler, G., 1984. Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *Nobel Lecture*.
- Leavy, O., 2010. Therapeutic antibodies: past, present and future. *Nature Reviews Immunology*, 10(5), pp.297–297. Available at: <http://www.nature.com/nri/journal/v10/n5/abs/nri2763.html> <http://www.nature.com/nri/journal/v10/n5/pdf/nri2763.pdf>.
- Li, J., 2006. *Recombinant IgG expression in mammalian cells*,
- Moore, I. et al., 2010. Association of factor H autoantibodies with deletions of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 115(2), pp.379–387.
- Pouw, R.B. et al., 2015. Of mice and men: The factor H protein family and complement regulation. *Molecular immunology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25824240>.
- Ricklin, D. et al., 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*, 11(9), pp.785–797. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1923>.
- Wabl, M. & Steinberg, C., 1982. A theory of allelic and isotypic exclusion for immunoglobulin genes - (heavy chain binding protein / heavy chain toxicity / DNA rearrangement). *Immunology*, 79.
- Walport, M.J. et al., 1994. C3 nephritic factor and SLE: report of four cases and review of the literature. *QJM*, 87(10), pp.609–615. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7987656.

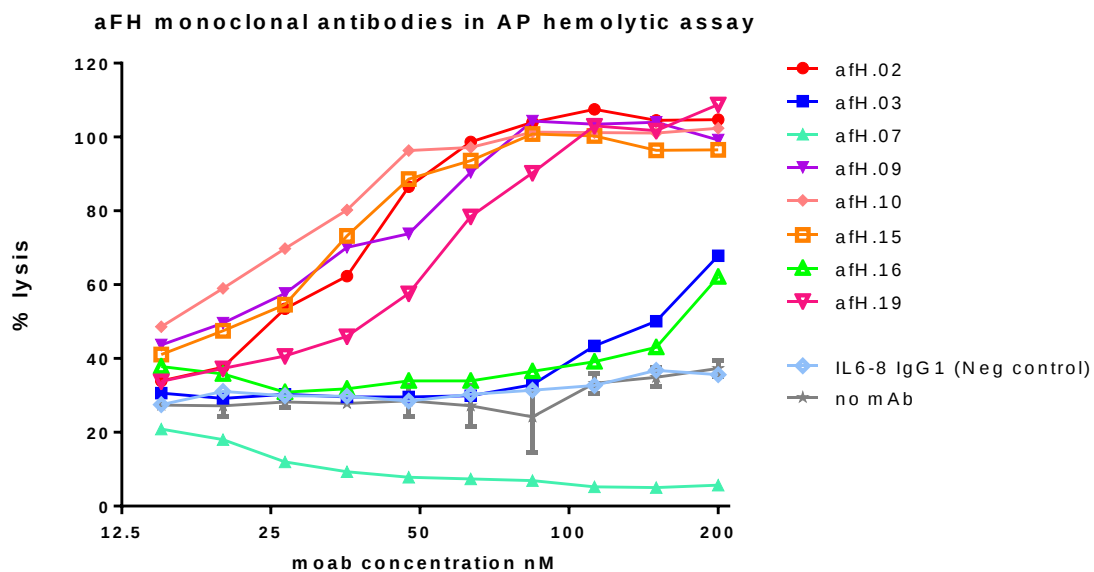
Dankwoord

Bij deze wil ik graag mijn directe stagebegeleider; Ing. Angela Kamp bedanken voor de dagelijkse begeleiding tijdens mijn stage, iets wat zij met hart en ziel gedaan heeft. Naast het hebben van zeer veel kennis en ervaring, beschikt zij over een oneindige hoeveelheid geduld, wat een zeer positief effect heeft gehad op het behalen van mijn gewenste resultaten. Verder wil ik Dr. Diana Wouters, Dr. Kyra Gelderman en MSc. Richard Pouw bedanken voor de supervisie, hulp en interessante discussies. Tevens wil ik MSc. Anna van Beek, Ing. Mieke Brouwer en Ing. Gerard van Mierlo bedanken voor alle hulp en begeleiding op het laboratorium. Ook wil ik mijn mentor; Dr. Tom Smeets bedanken voor de begeleiding tijdens het afstuderen vanuit Hogeschool Leiden. Tot slot wil ik mijn ouders; Ruud van Aalst en Jeannet van Aalst – de Koning bedanken voor alle steun, inspiratie en de momenten van ontspanning die zij mij gegeven hebben tijdens het afstuderen en het schrijven van dit verslag.

Bijlagen

Bijlage 1: aFH monoklonale antistoffen in hemolytische assay

In s. figuur 1 is te zien dat een aantal monoklonale antistoffen tegen Factor H zijn gemeten in een alternative pathway hemolytische assay. 5/7 mAb laten zien dat deze lysis induceren van de schapenerythrocyten in VB-MgEGTA. aFH03 en aFH16 induceren alleen lysis in de hoogste mAb concentraties (tot $\pm 60\%$). Irrelevante mAb IL6-8 (neg control) induceert $\pm 30\%$ lysis in alle concentraties mAb. Wanneer geen mAb wordt toegevoegd wordt hetzelfde patroon gezien als mAb IL6-8. aFH07, waarvan bekend is dat deze een potentierende werking heeft op Factor H, induceert geen lysis in alle gemeten verdunningen.



s.Fig. 1: Acht monoklonale antistoffen tegen Factor H gemeten in een alternative pathway hemolytische assay.

* Experiment uitgevoerd door Ing. Mieke Brouwer, Immunopathologie, Sanquin