Versuche zur antigenspezifischen Immunsuppression der Myasthenia gravis mit Immuntoxinen aus Gelonin und rekombinanten AChR-Fragmenten

Dem Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte

DISSERTATION
(D 386)

vorgelegt von

Dipl. Chem. Ulrike Kreilinger

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

Kaiserslautern 2001

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen September 1995 und Juni 2001 im Fachbereich Chemie, Abteilung Biochemie der Universität Kaiserslautern.

Herrn Prof. Dr. W. E. Trommer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und seine stets wohlwollende Unterstützung und Förderung während meiner Promotionszeit.
Mein Dank gilt auch dem gesamten Arbeitskreis Biochemie der Universität Kaiserslautern für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 6. September 2001

Promotionskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr.-Ing. S. Ernst
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. E. Trommer
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. P. D. Vogel

1. Einleitung 1

1.1. Das Immunsystem 1

1.1.1. Das unspezifische Immunsystem 1

1.1.2. Das spezifische Immunsystem 3

1.1.2.1. B-Lymphocyten 4

1.1.2.2. Immunglobuline 5

1.1.2.3. T-Lymphocyten 6

1.1.3. Immunologische Toleranz 9

1.2. Autoimmunerkrankungen 10

1.2.1. *Myasthenia gravis* 12

1.3. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor 16

1.4. Antigenspezifische Immunsuppression 19

1.4.1. Immuntoxine 19

1.4.2. Antikörper- bzw. Antigenkomponente 20

1.4.3. Toxinkomponente 21

1.4.4. Kopplungsreagenzien 22

1.5. Gentechnische Isolierung von Proteinen 24

1.5.1. AChR-Plasmide 24

1.6. Chaperone 27

1.6.1. Das Chaperonin GroEL und sein Co-Chaperonin GroES 28

1.6.2. Das Chaperonin-Plasmid pGroESL 30

2. Problemstellung 31

3. Experimentelle Autoimmune Myasthenia Gravis 33

3.1. Aufgabenstellung 33

3.2. Ergebnisse 34

3.2.1. Der Acetylcholinrezeptor des *Torpedo californica* 34

3.2.1.1. Isolierung des T-AChR 34

3.2.1.2. Charakterisierung des T-AChR 35

3.2.1.3. Diskussion 36

3.2.2. Tierversuche 37

3.2.2.1. Induzierung der EAMG in Lewis-Ratten 38

3.2.2.2. Krankheitsverlauf und Linderung der Symptome 39

3.2.2.3. Elektrophysiologische Messungen 40

3.2.2.4. Diskussion 42

3.3. Zusammenfassung 44

4. Expression rekombinanter AChR-Fragmente 47

4.1. Aufgabenstellung 47

4.2. Ergebnisse 49

4.2.1. Versuche mit dem Plasmid pαR506 49

4.2.1.1. Charakterisierung der Plasmide pαR506 und pGroESL 49

4.2.1.2. Koexpression der Plasmide pαR506 und pGroESL 50

4.2.1.3. Aufarbeitung und Charakterisierung des Expressionsproduktes 51

4.2.1.4. Diskussion 53

4.2.2. Versuche mit den Plasmiden pαE506 und pαE701 55

4.2.2.1. Charakterisierung der Plasmide pαE506 und pαE701 55

4.2.2.2. Koexpression von pαE506 bzw. pαE701 mit pGroESL 57

4.2.2.3. Aufarbeitung und Charakterisierung der Expressionsprodukte 57

4.2.2.4. Diskussion 60

4.2.3. Versuche mit den Plasmiden pαHE706 und pαHE701 62

4.2.3.1. Charakterisierung der Plasmide pαHE706 und pαHE701 62

4.2.3.2. Expression von pαHE506 mit und ohne pGroESL 64

4.2.3.3. Charakterisierung der Expressionsprodukte 65

4.2.3.4. Aufarbeitung des Pellets der Expression von BL21(DE3)/pGroESL/pαHE706 66

4.2.3.5. Diskussion 71

4.3. Zusammenfassung 77

5. T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugate 81

5.1. Aufgabenstellung 81

5.2. Ergebnisse 82

5.2.1. BMME gekoppelte T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugate 82

5.2.1.1. Einbau von Thiolgruppen in Gelonin 83

5.2.1.2. Einbau von Maleimidgruppen in modifiziertes Gelonin 83

5.2.1.3. Einbau von Thiolgruppen in T-AChR$_{1-209}$ 83

5.2.1.4. Diskussion 86

5.2.2. SMCC gekoppelte T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugate 87

5.2.2.1. Einbau von Thiolgruppen in Gelonin 88

5.2.2.2. Einbau von Maleimidgruppen in T-AChR$_{1-209}$ 88

5.2.2.3. Kopplung von thiolmodifiziertem Gelonin mit maleimidmodifiziertem T-AChR$_{1-209}$ 89
5.2.2.4. Reinigung und Charakterisierung des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates 90
5.2.2.5. Diskussion 91
5.3. Zusammenfassung 95

6. Gesamtzusammenfassung 97

7. Experimenteller Teil 99
7.1. Material 99
7.1.1. Geräte 99
7.1.2. Chemikalien 100
7.1.3. *E. coli*-Stämme 102
7.1.4. Enzyme 102
7.1.5. Monoklonale Antikörper 102
7.2. Proteinchemische Methoden 103
7.2.1. Konzentrationsbestimmungen 103
7.2.1.1. UV-Bestimmung 103
7.2.1.2. Lowry-Methode 104
7.2.1.3. BCA-Methode 104
7.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 105
7.2.2.1. Elektrophorese 105
7.2.2.2. Coomassie-Färbung 105
7.2.2.3. Silberfärbung 106
7.2.2.4. Geltrocknung 106
7.2.3. Isolierung von mAb 35 106
7.2.4. Isolierung des T-AChR 107
7.2.5. Isolierung von Gelonin 109
7.2.6. Proteinmodifizierung und Kopplung 109
7.2.6.1. Einführung von Thiolgruppen 109
7.2.6.2. Einführung von Maleimidgruppen 111
7.2.6.3. Kopplung der modifizierten Proteine 113
7.2.6.4. Bestimmung von Thiolgruppen in Proteinen 113
7.2.6.5. Bestimmung von Maleimidgruppen in Proteinen 113

7.3. Immunologische Methoden 114
7.3.1. Induzierung der EAMG in Lewis-Ratten 114
7.3.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay 115
7.3.3. Western Blot 115
7.4. Molekularbiologische Methoden 116
7.4.1. Kulturmedien 116
7.4.2. Allgemeine Arbeitsmethoden 117
7.4.2.1. Sterilisieren 117
7.4.2.2. Kulturbedingungen 117
7.4.2.3. Konservierung und Lagerung von Bakterienkulturen 117
7.4.2.4. Wachstumsmessungen 118
7.4.2.5. Herstellung kompetenter Zellen 118
7.4.2.6. Transformation chemisch kompetenter Zellen 119
7.4.2.7. Plasmid-Minipräparation: Alkalische-Lyse-Methode 120
7.4.2.8. Plasmid-Isolierung mit Wizard™ Plus Minipreps 120
7.4.2.9. Restriktionsverdau 120
7.4.2.10. Agarosegel-Elektrophorese 121
7.5. Expression und Aufarbeitung rekombinanter AChR-Fragmente 121
7.5.1. Proteinexpression 121
7.5.2. Lyse der Bakterienzellen mittels Ultraschall 122
7.5.3. Lyse der Bakterienzellen mittels French Pressure Cell 123
7.5.4. Aufreinigung der AChR-Fragmente nach Barkas 124
7.5.5. Ni-Affinitätschromatographie 125

8. Abkürzungen 127

9. Literaturverzeichnis 131

10. Anhang 145

Die α-Untereinheit des humanen nicotinischen AChR 145
Die AS-Sequenz der α-Untereinheit 146
Der Expressionsvektor pKK 233-2 147
Der Expressionsvektor pET 19b 148
Das Chaperonin-Plasmid pGroESL 149

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Unsere Umgebung enthält eine große Anzahl von infektiösen Organismen, wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten, die Krankheiten auslösen können und deshalb als pathogen bezeichnet werden. Als Infektion wird das Eindringen von pathogenen Mikroorganismen in den Körper und ihre Vermehrung in verschiedenen Geweben bezeichnet. Der Wirtsorganismus reagiert auf das Eindringen der Krankheitserreger mit unspezifischen und spezifischen Abwehrmechanismen, die das Ziel haben, fremde Pathogene zu erkennen und zu zerstören. Bei jedem dieser Mechanismen sind humorale Faktoren (*humor* lat.: Flüssigkeit) und Abwehrzellen beteiligt. Die Gesamtheit dieser ineinandergreifenden Partialfunktionen hat zur Folge, daß die überwiegende Mehrheit aller Infektionen nur kurzzeitig andauert und keinen dauerhaften Schaden hinterläßt.
Das unspezifische Immunsystem stellt die schnelle Eingreiftruppe dar, die körperfremde Organismen abtötet und phagocytiert, ohne daß auf den Zielzellen spezifische Erkennungsstrukturen vorhanden sein müssen. Die Besonderheiten des spezifischen Systems liegt in der Fähigkeit, auf körperfremde Strukturen mit einer spezifisch angepaßten Immunantwort zu reagieren und die einmal gewonnene Information über die Struktur des Pathogens in einer Art immunologischem Langzeitgedächtnis abzulegen (Adaptives Immunsystem).

1.1.1. Das unspezifische Immunsystem

Unspezifische Abwehrmechanismen sind bereits bei der Geburt voll ausgebildet. Zu den humoralen Faktoren der unspezifischen Abwehr gehören Lysozym, C-reaktives Protein, Interferone (IFN) und das Komplementsystem. Bestandteile der zellulären unspezifischen Abwehr sind Granulocyten, phagocytierende Makrophagen und natürliche Killerzellen. Einige dieser Systeme wie Komplementsystem, Interferone und Makrophagen haben eine Vermittlerrolle zwischen spezifischem und unspezifischem Abwehrsystem.
Lysozym spaltet die Muraminsäure der Bakterienwand und führt allein zur Bakteriolyse einiger grampositiver Kokken. Bei der Bakteriolyse gramnegativer Bakterien wirken Lysozym und Komplement zusammen [Meyer-Rienecker, 1992].
C-reaktives Protein bindet an Oberflächenstrukturen, die sich auf vielen Bakterien und Pilzen befinden und kennzeichnet diese für den Angriff des Komplementsystems und der Phagocyten.

Interferone sind speziesspezifische Glykoproteine, die von virusinfizierten Zellen gebildet werden und mit der Virusvermehrung im Wirtsorganismus interferieren. IFNγ wird unter anderem von aktivierten T-Zellen gebildet und ist ein wesentlicher humoraler Faktor bei der Vermittlung der Immunantwort. Streng genommen gehört IFNγ nicht zu den unspezifischen humoralen Abwehrstoffen, sondern ist ein Signalmolekül bei spezifischen Immunreaktionen.
Als Komplementsystem wird eine Familie von ca. 20 Proteinasen bezeichnet die komplementär zu spezifischen Antikörpern wirken und mit diesen zusammen Fremdzellen durch Lyse abtöten können. Die Proteinasen können örtlich durch mononukleäre Phagocyten freigesetzt werden, kommen aber auch im Plasma und in anderen Körperflüssigkeiten vor. Das Komplementsystem kann durch Bindung eines Faktors an Immunglobuline (IgG, IgM) in Gang gesetzt werden; in diesem Fall spricht man vom klassischen Aktivierungsweg. Beim alternativen Aktivierungsweg erfolgt das Startsignal durch Membranpolysaccharide, die für bestimmte pathogene Mikroorganismen charakteristisch sind, aber auch durch C-reaktives Protein, das an die Oberfläche von Pilzen und Bakterien bindet (siehe Abbildung 1-1).

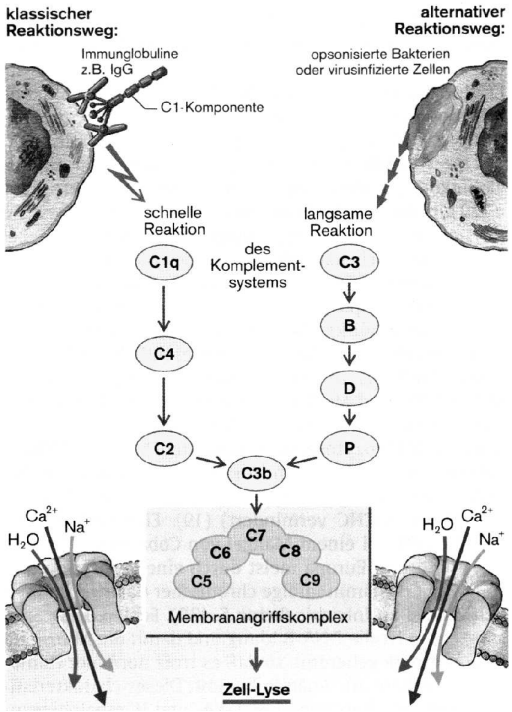


Abbildung 1-1: Die Aktivierung des Komplementsystems führt zur Auflösung von Fremdzellen und virusinfizierten Körperzellen. Die beiden Reaktionswege gehen am Reaktionsprodukt C3b ineinander über. Die Komponenten C5-9 polymerisieren und bilden einen röhrenförmigen Membranangriffskomplex, der durch die Membran der Zielzelle hindurchgeht. Nach der Bildung des Hohlzylinders erfolgt ein Einstrom von Ca^{2+}-Ionen, der bei hohen Konzentrationen cytotoxisch ist, sowie ein Einstrom von Na^{+}-Ionen und Wasser. Dieser Einstrom ist aber wahrscheinlich nicht der einzige Mechanismus, der die Lyse der Zelle herbeiführt. [Klinke *et al.*, 1996]

In den Körper eingedrungene Mikroorganismen werden in den Körperflüssigkeiten rasch in phagocytierenden Zellsystemen aufgenommen. Zu ihnen gehören die neutrophilen, polymorphkernigen Leukocyten des Blutes und die in Blut und Geweben vorkommenden mononukleären Phagocyten wie Monocyten und Makrophagen.
Durch Chemotaxis werden die Zellen des unspezifischen Immunsystems an den Ort der Entzündung gelockt. Prostagladine, Leukotrien B_4, C3, C5 und viele andere gehören zu den chemischen Substanzen, die durch Konzentrationsgradienten die Wanderung der Zellen induzieren.
Die Phagocytose beginnt mit der Anlagerung der Phagocyten an Mikroorganismen, geschädigte Zellen oder große Antigen-Antikörper-Aggregate. Nach der Anlagerung bilden die Phagocyten Pseudopodien, die den Fremdkörper umschließen. Es bilden sich die Phagosome. Der eigentliche Abbau des Fremdkörpers findet durch Verschmelzung der Phagosome mit den Lysosomen statt.

1.1.2. Das spezifische Immunsystem

Das spezifische Abwehrsystem des Körpers ist in der Lage, fremde Molekülstrukturen mit hoher Präzision zu erkennen und zu eliminieren. Diese Immunität ist erworben und läßt sich durch folgende Eigenschaften charakterisieren: Spezifität der Erkennung, Vielfalt von möglichen Immunantworten, ein immunologisches Gedächtnis und das Unterscheidungsvermögen zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen (Immunologische Toleranz). Werden körpereigene Strukturen als etwas Fremdes erkannt, kann dies zu Autoimmunkrankheiten führen. Gegen ein Antigen hochspezifisch zu reagieren, stellt für das Immunsystem eine genauso schwierige Aufgabe dar, wie gegen körpereigene Strukturen nicht zu reagieren.
Die immunologisch relevanten Gewebe und Organe sind dezentral über den gesamten Organismus verteilt und werden in zwei Gruppen eingeteilt. Zu den primären lymphatischen Organen gehören Knochenmark und Thymus, während die Milz, die Lymphknoten sowie das bronchus- und das darmassoziierte Lymphgewebe zu den sekundären Organen gehören. Der weitaus größte Teil der in den Körper eingedrungenen Fremdsubstanzen wird in den sekundären lymphatischen Organen abgefangen und den immunkompetenten Lymphocyten durch antigenpräsentierende Zellen dargereicht. So werden im Blut zirkulierende Fremdkörper hauptsächlich in der Milz abgefangen. Die Milz hat neben diesen immunologischen Aufgaben noch die Funktion einer „technischen Überwachungsanstalt“. Hier werden gealterte oder geschädigte Zellen aufgegriffen und phagocytiert [Clark, 1988].

Diese maßgeschneiderte Immunreaktion ist eine Leistung der Lymphocyten, an der sowohl humorale als auch zelluläre Reaktionen beteiligt sind. Die Lymphocyten entwickeln sich aus lymphatischen Stammzellen im Knochenmark, die zu Lymphocytenvorläuferzellen differenzieren und dann in den primären lymphatischen Organen, Thymus und lymphatische Anteile des Knochenmarks, weiterreifen. Durch den Einfluß lokaler Faktoren werden im Thymus T-Zellen geprägt, während im Knochenmark (*bone marrow*) B-Zellen entstehen. Von den primären lymphatischen Organen wandern die geprägten Lymphocyten mit dem Blutstrom in die sekundären lymphatischen Organe ein. Beim ersten Kontakt mit einem Antigen proliferieren sie und differenzieren zu den endgültigen Effektorzellen. So werden B-Zellen zu Plasmazellen und B-Gedächtniszellen (siehe Kapitel 1.1.2.1.), T-Zellen zu verschiedenen T-Effektorzellen, die sich nach ihrer Funktion in cytotoxische T-Zellen (T-Killerzellen, T_C), T-Helferzellen (T_H), T-Suppressorzellen (T_S) und T-Gedächtniszellen unterteilen lassen (siehe Kapitel 1.1.2.3.).

1.1.2.1. B-Lymphocyten

B-Zellen besitzen membranständige Immunglobuline (IgM, IgD) als Rezeptormoleküle auf der Oberfläche. Ein Antigen (Epitop) wird in aller Regel nur von denjenigen B-Zellen erkannt, die über einen passenden Immunglobulinrezeptor (Paratop) verfügen. Das Antigen selektioniert somit eine Sorte von Zellen, die sich nach dieser Aktivierung vermehren und eine große Anzahl identischer Tochterzellen, einen Zellklon, bilden. Dieser Vorgang der klonalen Selektion von antikörperproduzierenden Zellen führt über ein Zwischenstadium, den B-Lymphoblasten, zur Bildung von Plasmazellen.
Diese unterscheiden sich von den ruhenden B-Zellen dadurch, daß sie die gebildeten Immunglobuline in die Umgebung sezernieren, aber keine membranständige Immunglobuline auf der Oberfläche tragen. Die genetische Entscheidung, welche Antikörper gebildet werden, ist schon getroffen, bevor die Zelle je mit einem Antigen in Berührung kommt. Der Antigenkontakt bewirkt jedoch die massenhafte Vermehrung desjenigen Zelltyps, der diesen Antikörper sezerniert. Für die Erkennung des Antigens und die nachfolgende Umwandlung der B-Zellen in antikörpersezernierende Plasmazellen sind in den allermeisten Fällen noch antigenpräsentierende Zellen und T_H-Zellen erforderlich. Nur sehr große Antigene mit vielen repetitiven Strukturen sind offenbar in der Lage, die B-Zellen direkt zu stimulieren. Aufgrund der großen Vielfalt möglicher Antigene muß man annehmen, daß es mehrere Milliarden verschiedener B-Zellklone gibt.
Neben den Plasmazellen entstehen beim Antigenkontakt auch B-Gedächtniszellen, die keine Immunglobuline sezernieren, sondern die Information über die Struktur des Antigens

speichern. Nach einem zweiten Antigenkontakt können dann, in Zusammenarbeit mit T-Zellen, unverzüglich große Mengen von Antikörpern produziert werden.

1.1.2.2. Immunglobuline

Die Immunglobuline werden in fünf Klassen eingeteilt: IgG, IgM, IgA, IgE und IgD. In der einfachsten Form (IgG) besteht die Struktureinheit eines Antikörpers aus je zwei schweren (*heavy*) H-Ketten und zwei leichten (*light*) L-Ketten (siehe Abbildung 1-2).
Der F_{ab}-Anteil ist die antigenbindende Region des Moleküls. Die Anteile der H- und L-Ketten, die den distalen Teil des F_{ab}-Abschnittes (V-Region) bilden, sind variabel in ihrer Aminosäuresequenz, während der Rest innerhalb der einzelnen Ig-Klassen konstant ist (C-Region).
Der sogenannte F_c-Anteil des Moleküls führt zur Komplementfixierung (klassischer Aktivierungsweg) und zur Bindung an verschiedene Zelltypen des Abwehrsystems.

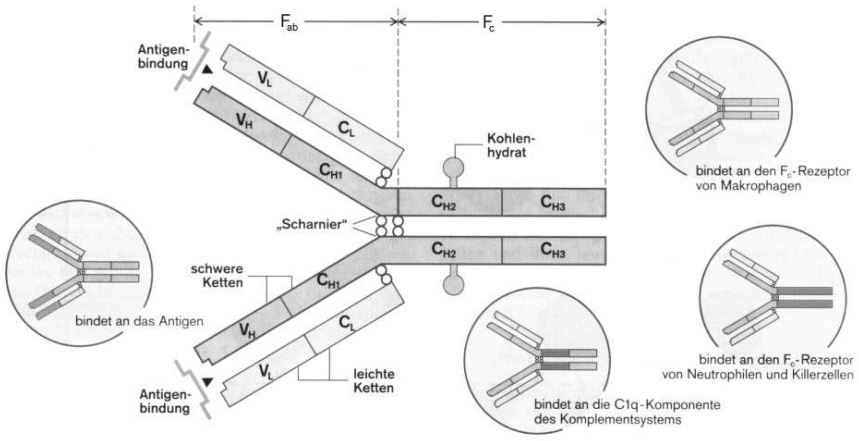


Abbildung 1-2: Grundstruktur des IgG und funktionelle Zuordnung der molekularen Abschnitte. Die leichten Ketten (V_L + C_L) und die schweren Ketten (V_H + $C_{H1,2,3}$) sind über nichtkovalente Bindungen sowie Disulfidbrücken miteinander verbunden. [Klinke *et al.*, 1996]

Nach einem ersten Antigenkontakt steigt die Antikörperreaktion (typischerweise IgM) mit einer Latenz von ungefähr einer Woche logarithmisch an, um danach schnell wieder abzufallen (Primärreaktion). Wenn nach einem Intervall von Wochen, Monaten oder manchmal sogar Jahren das Immunsystem erneut Kontakt zu demselben Antigen bekommt, ist die jetzt auftretende Sekundärreaktion von der Primärreaktion qualitativ und quantitativ unterschiedlich (Boost-Effekt). Die initiale Latenzphase ist kürzer; bereits nach wenigen Tagen beginnt die Antikörperkonzentration anzusteigen (fast ausschließlich IgG). Die Antikörperbildung ist wesentlich stärker und bleibt über längere Zeit bestehen. Die Antikörper erkennen die molekulare Struktur des Antigens mit größerer Präzision.

1.1.2.3. T-Lymphocyten

T-Zellen sind die Träger der spezifischen zellulären Immunreaktion. Sie befinden sich, wie die B-Zellen, zum Teil im Blut und zum Teil in den sekundären lymphatischen Organen. Nach antigener Stimulation proliferieren sie und differenzieren zu den T-Effektorzellen, die sich in cytotoxische T-Zellen (T_C), T-Helferzellen (T_H), T-Suppressorzellen (T_S) und langlebige T-Gedächtniszellen unterteilen [Kuby, 1997; Steinman, 1995].
Die Funktion der T_S-Zellen ist nicht eindeutig geklärt. Sie können durch freies, in Lösung befindliches Antigen aktiviert werden und unterdrücken die Immunantwort gegen das am T-Zell-Rezeptor (TCR) gebundene Antigen, indem sie z.B. entsprechende T_H-Zellen desaktivieren. Andererseits können sie die Effektorzellen auch ohne die Wechselwirkung mit Antigenen beeinflussen, daher wird ihre Rolle bei der immunologischen Toleranz diskutiert [Fabris *et al.*, 1983; Rajewski *et al.*, 1993].
Auf T_H-Zellen befinden sich CD4-Rezeptoren (CD: *cluster of differentiation*), während sich auf den T_C-Zellen CD8-Rezeptoren befinden [Bernard *et al.*, 1984; Knapp *et al.*, 1989]. Beide Rezeptoren verstärken die spezifische Wechselwirkung zwischen dem TCR und den jeweiligen Zielzellen, wobei CD8 als Korezeptor mit dem MHC-I-Komplex in Wechselwirkung tritt und CD4 dieselbe Funktion bei MHC-II erfüllt.
Die T_H-Zellen fördern die Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Bei der Zusammenarbeit zwischen T_H-Zellen und B-Zellen spielen hormonähnliche Signalstoffe, die Cytokine, eine wichtige Rolle. Die Cytokine werden von Lymphocyten und mononukleären Phagocyten produziert. Von den mehr als fünfzehn Cytokinen, die bisher isoliert wurden, ist z.B. das von T_H-Zellen gebildete Interleukin 2 (IL-2) wichtig für ihre eigene Aktivierung. IL-4 und IL-5 sind von großer Bedeutung für die Aktivierung von B-Zellen und ihre Differenzierung zu Plasmazellen. Die Entwicklung der T_H-Zellen (T_H0-Zellen) kann je nach dem in ihrer Umgebung vorherrschenden Cytokinmuster, zu den T_H1- oder den T_H2-Zellen verlaufen. Die T_H1-Zellen (auch inflammatorische Zellen genannt) sezernieren unter anderem IFNγ, das die Makrophagen aktiviert, so daß diese mit im Zellinneren überlebenden Erregern, z.B. Mykobakterien, besser fertig werden können. Mit der Makrophagenaktivierung startet die Reaktion auf den Erreger in Richtung Entzündung. Der zweite Zelltyp, die T_H2-Zellen, sezernieren hingegen IL-4 und IL-10. Ersteres ist ein Wachstumsfaktor für die T_H2-Zellen, die der B-Zell-Aktivierung und damit der Immunglobulinbildung dienen; das gleichzeitig ausgeschüttete IL-10 hemmt andererseits die Aktivierung von Makrophagen. Umgekehrt hemmt IFNγ die Vermehrung und Differenzierung der T_H2-Zellen.
Des weiteren sind für Immunreaktionen die Histokompatibilitätsantigene von zentraler Bedeutung. Diese Zelloberflächenmoleküle werden durch einen Genkomplex kodiert, der als Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) bezeichnet wird.

Die Zahl der im MHC lokalisierten Gene ist sehr groß und durch einen ausgesprochenen Polymorphismus gekennzeichnet. Beim Menschen wird diese Molekülgruppe auch HLA (*Human leucocyte antigen*) genannt. Die MHC-Moleküle werden in zwei Gruppen eingeteilt. MHC-I-Moleküle sind z.B. für die Organabstoßung nach einer Transplantation verantwortlich, sind aber auch bei der Ausschaltung von virustransformierten körpereigenen Zellen durch T_C-Zellen beteiligt. Die MHC-II-Moleküle spielen bei der engen Zusammenarbeit zwischen T_H-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen eine wichtige Rolle.

Antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APC), wie z.B. Makrophagen, tragen auf ihrer Oberfläche recht unspezifische, antigenbindende Strukturen. Nach der Phagocytose des nativen Antigens durch die APC werden Teile des Antigens (Epitope), eingebettet im MHC-II-Molekül, den T_H-Zellen dargereicht. Antigenepitope, die den T_C-Zellen präsentiert werden, sind in MHC-I-Moleküle eingebettet. Mobile APC halten im Blut oder Gewebe unbekanntes Material fest und führen es den T-Zellen in Lymphknoten und Milz zur Identifikation vor. Wenn diese immunkompetenten Zellen das präsentierte Antigen als fremd erkennen, werden die entsprechenden Abwehrmaßnahmen von aktivierten T_H-Zellen und T_C-Zellen in Gang gesetzt.

Auch B-Zellen können Antigene aufnehmen und Epitope auf der Zellmembran präsentieren, wobei es sich um Peptide handelt, die aus 8-10 Aminosäuren bestehen. Allerdings sind nur die B-Zellen in der Lage, die antigene Struktur spezifisch zu erkennen, während T-Zellen die Epitope nur nach vorheriger Aufbereitung durch APC zu erkennen vermögen.

T_C-Zellen töten körpereigene Zellen, an deren Oberfläche ein Fremdantigen auftritt direkt ab [Groscurth, 1989], etwa nach einer Virusinfektion der Zelle. Zusätzlich zu dem vom Virus stammenden Fremdantigen müssen noch MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche vorhanden sein. Nur wenn diese Kombination präsentiert wird, binden sich die T_C-Zellen mit ihrem TCR, ihrem CD8-Protein und anderen Liganden an die Zielzelle. Das führt zur lokalen Freisetzung von Perforinen und damit zur irreversiblen Schädigung der Zielzelle.

Abbildung 1-3 zeigt in einem vereinfachten Schema das Zusammenwirken von humoraler und zellulärer Immunantwort.

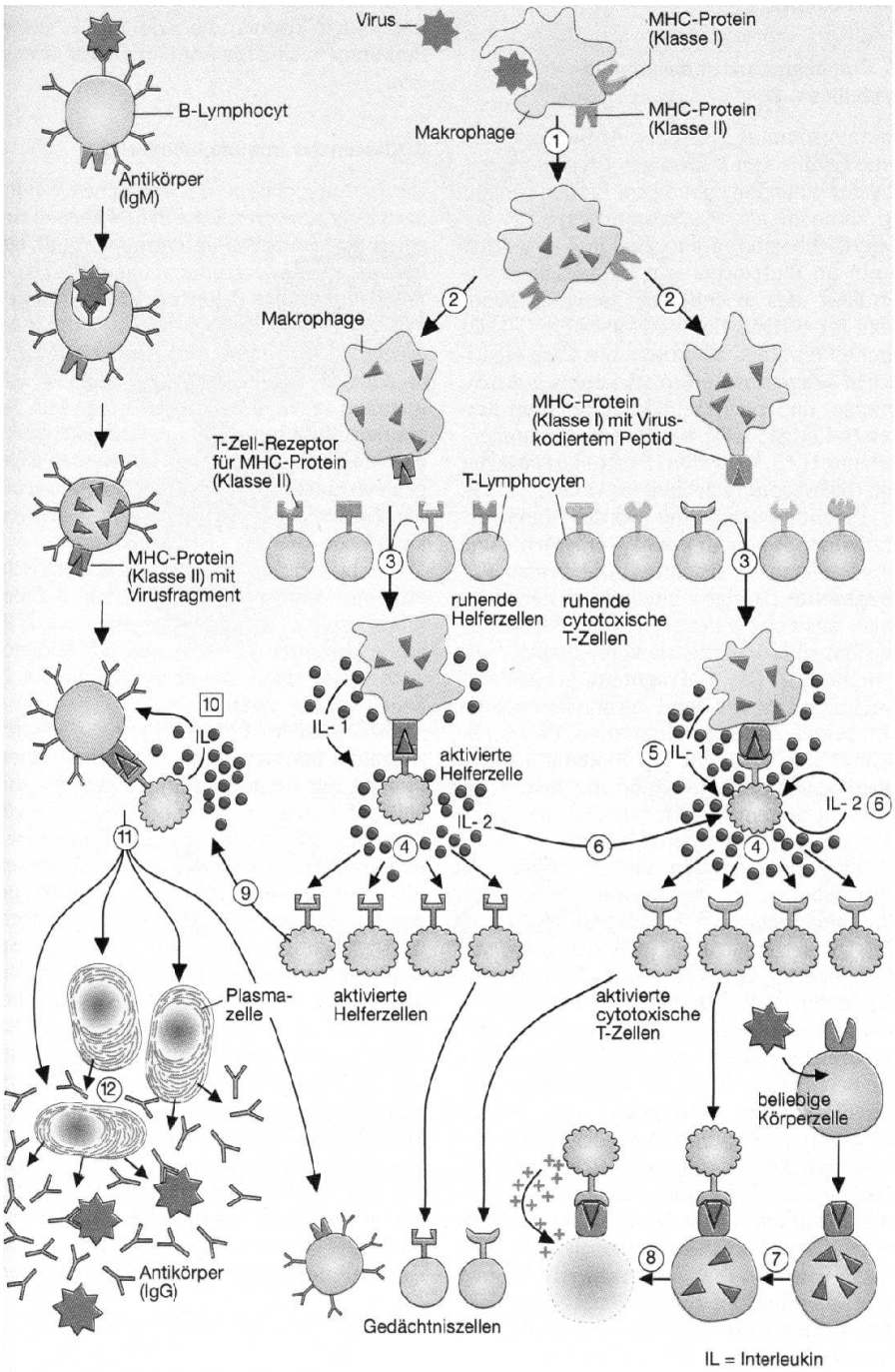


Abbildung 1-3: Ein Makrophage endocytiert einen Virus, baut ihn teilweise ab (1) und präsentiert Fragmente davon mit MHC-Molekülen auf seiner Oberfläche (2). Passende TCR binden an den Komplex (3), was zur Aktivierung und selektiven Vermehrung der entsprechenden T-Zellen führt (4). Die Ausschüttung von Interleukinen regt diese klonale Selektion an (5,6). Die aktivierten T_C-Zellen erkennen virusinfizierte Körperzellen, wenn diese Virusfragmente auf ihren MHC-I-Molekülen präsentieren (7) und töten diese befallenen Zellen ab (8). T_H-Zellen binden an diejenigen B-Zellen, die das Virusfragment auf ihrem MHC-II-Molekül präsentieren (9). Von Interleukinen stimuliert (10), differenzieren die B-Zellen durch klonale Selektion (11) zu Plasmazellen aus, die IgG sezernieren (12). [Koolman *et al.*, 1998]

1.1.3. Immunologische Toleranz

Um zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden zu können, werden T-Zellen im Thymus nach positiven und negativen Mechanismen aussortiert [Nossal, 1983].

Positive Selektion:
Vorläuferzellen der Prä-T-Lymphoblasten wandern aus dem Knochenmark in die Thymusrinde und beginnen die Gensegmente, die für den TCR kodieren, umzuordnen, um dann „ihren" TCR zu exprimieren. Anschließend prägen die nun zu Thymocyten gewordenen Zellen, innerhalb weniger Tage, sowohl CD8- als auch CD4-Moleküle aus. Findet der TCR keinen Liganden im Thymus, so erliegt der $CD4^+CD8^+$-Thymocyt nach nur wenigen Tagen der Apoptose. Wenn sich der TCR dagegen an MHC-Moleküle auf den Epithelzellen in der Thymusrinde bindet, entgeht der entsprechende Thymocyt der Apoptose. Auf den Epithelzellen des Thymus werden MHC-Moleküle der Klasse I und II zusammen mit Selbstantigenen bzw. deren Peptide exprimiert. Findet der Thymocyt ein MHC-I-Molekül, so entwickelt er die Kombination $CD4^-CD8^+$, reagiert er mit einem MHC-II-Molekül, entsteht eine $CD4^+CD8^-$-Zelle [Miller, 1961; Hengartner *et al.*, 1988].

Negative Selektion:
Hierbei werden autoreaktive T-Zellen vernichtet. Während die T-Zellen die Grenzschicht zwischen Rinde und Mark des Thymus passieren, werden ihnen von Makrophagen und dendritischen Zellen körpereigene Proteinfragmente präsentiert. Die Zellen, die hier eine Reaktivität zeigen, werden abgetötet [Marrak *et al.*, 1994].

Insgesamt verlassen nicht mehr als ein Prozent der im Thymus entstehenden Thymocyten dieses Organ auch als reife funktionsfähige Zellen. Es gibt auch Hinweise auf weitere Kontrollmechanismen zur Toleranzinduktion außerhalb des Thymus (klonale Anergie) [Schwartz, 1990].
Weitere Theorien für die Entstehung der Toleranz sind die Regulation autoreaktiver Zellen durch T_S-Zellen bzw. ein Netzwerk aus Idiotyp und Antiidiotyp [Abdou *et al.*, 1981; Bauman *et al.*, 1988]. Beide Theorien sind jedoch bis jetzt experimentell wenig gefestigt.
In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß selbst in gesunden Individuen Autoantikörper gegen praktisch jede getestete Selbst-Komponente vorkommen, jedoch in so geringer Konzentration, daß sie keinen Schaden verursachen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß B-Lymphocyten offensichtlich kein solches Kontrollsystem durchlaufen. Da

die B-Lymphocyten aber kein Aktivierungssignal von den T_H-Zellen erhalten, bleibt eine Autoimmunität normalerweise aus [Schoenfeld *et al.*, 1988].

1.2. Autoimmunerkrankungen

Eine geringe Autoimmunität gehört zur normalen Physiologie des Immunsystems und muß nicht zwangsläufig zu negativen Effekten für den Körper führen. Sie ist sogar von Nutzen, wenn es um die Beseitigung alternder oder toter Zellen geht. Ist die Autoimmunantwort jedoch gesteigert und induziert pathologische Veränderungen, spricht man von einer Autoimmunerkrankung.

Man unterscheidet zwischen organspezifischen und systemischen Autoimmunkrankheiten. Bei der ersten Kategorie handelt es sich um Immunreaktionen, die sich gegen ein bestimmtes Organ richten. Ein Beispiel hierfür ist die *Hashimoto Thyreoiditis*, bei der das Gewebe der Schilddrüse von Immunzellen angegriffen wird. Der *systemische Lupus erythematodes* (SLE) ist ein Beispiel für eine systemische Autoimmunerkrankung, bei der viele, vielleicht sogar alle Gewebearten des Körpers vom Immunsystem attackiert werden. Daneben existieren Zwischenstufen, bei denen sich die Immunreaktion nur gegen einige Organe richtet.

Bedingt durch die Vielzahl an Erscheinungsformen von Autoimmunerkrankungen liegt es auf der Hand, daß keine einzelne Theorie die Ursachen zu deren Entstehung vollständig erklären kann. Es müssen mehrere Faktoren beteiligt sein, wenn man die Diversität von Erkrankung zu Erkrankung und sogar von Patient zu Patient bei gleicher Erkrankung in Betracht zieht. Schoenfeld beschreibt dies als „Mosaik der Autoimmunität“ [Schoenfeld, 1989].

An erster Stelle der Faktoren muß die genetische Prädisposition genannt werden, für die es bei allen untersuchten Erkrankten Hinweise gibt. So sind bei vielen Familien mehrere Verwandte betroffen, oft auch mit verschiedenen Autoimmunkrankheiten gleichzeitig. Der HLA-Haplotyp der jeweiligen Person spielt eine Rolle bei der Ausbildung diverser Krankheiten [Yang *et al.*, 1998]. So besitzen z.B. Menschen mit dem Haplotyp HLA-DR2 ein viermal höheres Risiko, an multipler Sklerose zu erkranken als Individuen mit anderen HLA-Typen [Nepom *et al.*, 1991].

Auch hormonelle Faktoren scheinen die Ausbildung einer Autoimmunerkrankung zu beeinflussen. So treten Autoimmunerkrankungen bei weiblichen Individuen bis zu zehnmal häufiger auf, als bei männlichen Individuen, was durch die höhere Östrogenausschüttung erklärt werden kann [Talal *et al.*, 1987].

Als weiterer Mechanismus, der an der Entstehung einer Autoimmunerkrankung beteiligt ist, wird eine polyklonale B-Zell-Aktivierung postuliert, die zu einer Überreaktion von B-Lymphocyten und der Bildung von Autoantikörpern führt [Dziarski, 1988]. Die Hypothese geht davon aus, daß polyklonale Aktivatoren, wie z.B. das Epstein-Barr-Virus oder Liposaccharide aus Bakterien, alle B-Zellen und somit auch autoreaktive Klone unter Umgehung der Regulationsmechanismen durch T-Lymphocyten direkt aktivieren. Bei der Autoimmunkrankheit *Hashimoto Thyreoiditis* gibt es deutliche Hinweise auf eine solche polyklonale B-Zell-Aktivierung [Goodman *et al.*, 1981].

Eine weitere Ursache für die Pathogenese einer Autoimmunerkrankung könnte in dem bereits erwähnten Idiotyp-Antiidiotyp-Netzwerk liegen. Idiotypen sind individuelle Strukturregionen im variablen Bereich eines Antikörpers und können selbst wieder als Antigen für eine Immunreaktion dienen. Die gegen den Idiotyp gebildeten Antikörper, die sogenannten Antiidiotypen, sind dann in der Lage, an die variablen Regionen des Idiotyps zu binden und diesen so zu inaktivieren. Für bestimmte Autoimmunerkrankungen, wie den SLE, die rheumatische Arthritis, die Myasthenie und einige Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems, konnte die Beteiligung von Antiidiotypen-Antikörpern bereits gezeigt werden [Abdou *et al.*, 1981; Bauman *et al.*, 1988].

Bei Autoimmunkrankheiten werden gehäuft Thymusveränderungen (Thymome und Thymusdysplasien) gefunden. Bei der *Myasthenia gravis* ist dieses Zusammentreffen nahezu obligat. Fraglich ist, ob die Thymusveränderung Ursache oder Folge der Autoimmunkrankheit ist. Sicher erscheint dagegen, daß dabei die negative Selektion autoantigenreaktiver T-Zellklone gestört ist [Baehr von, 1992].

Ein anderes Modell beschreibt die Autoimmunität gegen Proteine, die normalerweise für Lymphocyten nicht zugänglich sind. Beispiele hierfür sind räumlich getrennte Bereiche (z.B. Augenlinsenproteine oder Spermazellen) oder Strukturen jenseits der Blut-Hirn-Schranke. Kommen derartige Proteine mit sensitiven T-Lymphocyten in Kontakt, z.B. nach einer Verletzung der schützenden Barriere, kann dies zu einer Autoimmunreaktion führen [Smith *et al.*, 1983].

Bei vielen Immundefekten, wie z.B. im Falle des erworbenen Immundefekt-Syndroms (*Acquired Immunodeficiency Syndrom*, AIDS), konnte gleichzeitig die Präsenz verschiedener Autoantikörper bzw. die Manifestierung einer Autoimmunerkrankung nachgewiesen werden [Calabrese, 1988]. Ebenso ist die Assoziation viraler Agentien mit Autoimmunerkrankungen bekannt [Weetman *et al.*, 1990]. Ob jedoch die durch eine Virusinfektion hervorgerufene Fehlregulation des Immunsystems für die Genese einer Autoimmunerkrankung eine Rolle spielt, oder ob autoreaktive Mechanismen Teil der Immunpathogenese von Viren sind, bleibt dahingestellt [Zinkernagel *et al.*, 1990; Zinkernagel *et al.*, 1991]. In engem Zusammenhang

mit diesen Beobachtungen steht eine der derzeit am besten belegten Hypothesen, wie die immunologische Toleranz durchbrochen werden kann.
Diese Theorie des molekularen *Mimikry* (engl. Nachahmung) könnte eine Erklärung für die Entstehung einer Autoimmunerkrankung sein [Oldstone, 1987; Baum *et al.*, 1993]. Mikroben versuchen der Erkennung des Immunsystems zu entgehen, indem sie „Selbst"-Strukturen des Wirts imitieren. Wenn diese Epitope nur ähnlich aber nicht identisch sind, kann es dennoch zu einer Immunreaktion kommen. Die Immunantwort zeigt dann eine Kreuzreaktion gegenüber den imitierten körpereigenen Molekülen. Dadurch wäre die immunologische Toleranz überwunden. Selbst wenn der mikrobielle Eindringling abgewehrt werden konnte, richtet sich das Immunsystem weiterhin gegen das imitierte Autoantigen, was zu einer Autoimmunerkrankung führt. Tatsächlich wurden viele Gemeinsamkeiten zwischen Epitopen von infektiösen Erregern und Wirtsproteinen gefunden [Oldstone, 1987, Zhao *et al.*, 1998]. Für die Hypothese des molekularen *Mimikry* spricht außerdem, daß in vielen Fällen einer manifestierten Autoimmunerkrankung die entsprechenden mikrobiellen Erreger tatsächlich nachweisbar sind oder vor Ausbruch der Krankheit eine Infektion mit den Erregern stattgefunden hat. Ein weiterer Hinweis ist, daß durch die Immunisierung von Versuchstieren mit strukturverwandten Stoffen einer anderen Tierart experimentelle Autoimmunkrankheiten induziert werden können [Rose *et al.*, 1993].

1.2.1. *Myasthenia gravis*

Die *Myasthenia gravis* ist eine der am besten untersuchten Autoimmunkrankheiten, Angriffsort und Mechanismus sind weitgehend bekannt.
Charakteristisch ist eine abnorme Ermüdbarkeit und bei Belastung rasch zunehmende Schwäche der Körpermuskulatur, die sich nach einer Erholungspause kurzzeitig bessert. Äußerlich erkennbar sind (zu etwa 90%) die Augenmuskeln und Lidhebermuskeln betroffen, ebenfalls häufig die Haltemuskeln des Nackens und Halses sowie die Schultergürtelmuskulatur und Flexoren des Hüftgelenks. Beeinträchtigt ist die mimische Muskulatur, die Kau-, Schluck- und Sprechmuskulatur. Die Störung an den Extremitäten betrifft die oberen stärker als die unteren und ist proximal ausgeprägter. Unbehandelt kann die Myasthenie durch Lähmung der Atemmuskulatur zum Tod führen [Meyer-Rienecker, 1992].
Das Krankheitsbild ähnelt den Vergiftungserscheinungen mit Curare. Eine Verbesserung der Symptome läßt sich durch Verabreichung von Pyridostigmin, einem Gegengift des Curare erreichen. So lag der Verdacht nahe, daß der Krankheit eine Störung der neuromuskulären Reizübertragung zugrunde liegt. Tatsächlich wurde eine verringerte Zahl funktionsfähiger nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (AChR) in den motorischen Endplatten gefunden.

Zur Pathogenese ergab sich eine Störung durch gegen die AChR gerichteten Autoantikörper, die bei etwa 90% der Patienten nachweisbar sind. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von motorischen Endplatten zeigten die Anwesenheit von Antikörpern und Proteinen des Komplementsystems [Engel *et al.*, 1979]. Die Kreuzvernetzung der Rezeptoren durch Antikörper führt zu einer erhöhten Endocytoserate von der Muskelmembran ins Zellinnere und damit zum Abbau der AChR. Außerdem wird durch Bindung von IgG die Komplementkaskade aktiviert und es kommt zur fokalen Lyse der postsynaptischen Membran. Ausgeprägte Langzeitendocytose und Komplement-bedingte Lyse führen zu geometrischen Veränderungen der postsynaptischen Membran, die sich in einer Abflachung der normalerweise gefalteten Struktur, sowie in einer Aufweitung des synaptischen Spaltes äußern. Eine direkte Blockierung durch die Antikörper scheint in diesem Zusammenhang von sekundärer Bedeutung zu sein [Drachman, 1983].

Die Antikörper sind nicht der primäre Auslöser für die Erkrankung, vielmehr scheint die Myasthenie T-Zell induziert zu sein, denn sie wird meist von strukturellen Abnormalitäten des Thymus begleitet [Meyer-Rienecker, 1992]. So leidet jeder zehnte Patient an einem, meist gutartigen, Tumor und bei 80% ist der Thymus vergrößert. Es konnte gezeigt werden, daß im Thymus Proteine vorkommen, die antigene Determinanten mit dem AChR teilen und als primäre Quelle zur Antigenpräsentation fungieren können [Marx *et al.*, 1989]. Bei der Entstehung der Krankheit werden Veränderungen sowohl dieser Antigenstruktur, als auch des muskulären AChR diskutiert, die zur Assoziation mit MHC-II-Proteinen und damit zur Auslösung von Autoimmunität führen können.

Auffallend ist weiter die bereits diskutierte hohe Frequenz bestimmter Histokompatibilitätsantigene (HLA-B8 und HLA-DR3) erkrankter Patienten, die eine Beteiligung in der Suszeptibilität für Myasthenie nahelegen [Fuchs *et al.*, 1986].

Zur Therapie der Patienten mit *Myasthenia gravis* gibt es unterschiedliche Ansätze.

Symptomatisch kann die gestörte neuromuskuläre Impulsübertragung durch eine erhöhte Acetylcholinkonzentration an den AChR beeinflußt werden. Dies ist durch Applikation von Cholinesterasehemmern (z.B. Pyridostigmin) möglich. Bei einer Überdosierung kann es zur cholinergen Krise kommen, die Atropin als Antidot erforderlich macht. Andererseits kann eine Unterdosierung zur myasthenen Krise führen, die die sofortige Verabreichung des rasch, aber kurz andauernd wirkenden Neostigmin indiziert.

Die ätiotrope Therapie ist auf die Autoimmunvorgänge gegen den AChR gerichtet. Dabei machen die komplexen und teilweise heterogenen Abläufe verständlich, daß verschiedene Behandlungsprinzipien angewandt werden, zumal eine die einzelnen pathogenetischen Faktoren berücksichtigende Therapie kaum möglich ist [Meyer-Rienecker, 1992].

1. *Thymektomie*: Eine annähernd absolute Indikation besteht beim Nachweis eines Thymoms, vor allem wegen der Möglichkeit einer malignen Entartung.
2. *Glucocorticosteroide*: Der Nachteil dieser Steroidhormone der Nebennierenrinde sind die starken Nebenwirkungen bei längerer Therapie.
3. *Immunsuppression*: Dabei erwiesen sich vor allem Azathioprin und Cyclosporin A als wirkungsvoll. Cyclosporin A reduziert selektiv die mRNA für die IL-2-Produktion. Nebenwirkungen bei diesem Verfahren sind die Anfälligkeit für Infektionserkrankungen und Spontantumore, weil nicht nur die autoimmunen Zellklone unterdrückt werden, sondern alle Immunzellen.
4. *Plasmapherese*: Der Plasmaaustausch soll zur Senkung zirkulierender Antikörper und anderer pathogenetisch relevanter Serumbestandteile beitragen. Das Verfahren bringt eine rasche und deutliche Besserung des Zustandes, der allerdings nur von kurzer Dauer ist.
5. *Kombinationstherapie*: Für eine Langzeittherapie mit anhaltendem Effekt eignet sich die Kombination von Glucocorticosteroiden mit Azathioprin. In schweren Krankheitsfällen ist zusätzlich die Plasmapherese und die Thymektomie angezeigt.

Neuere Strategien verfolgen das Ziel, nur die Komponenten des Immunsystems zu unterdrücken, die für die Krankheitssymptome verantwortlich sind. Die Desaktivierung oder gar Eliminierung der autoimmunen T-Zellen würde diese Bedingung erfüllen. Die autoreaktiven B-Zellen blieben zwar erhalten, könnten aber nicht mehr zur Proliferation stimuliert werden. Dabei zeigten sich Versuche zur Toleranzinduktion im Tierexperiment als erfolgreich [Karachunski *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000].

Der AChR kann aus elektrischen Organen, beispielsweise von Zitterrochen (*Torpedo californica*), in größeren Mengen isoliert werden. Die Rezeptoren von verschiedenen Spezies weisen eine hohe Sequenzhomologie auf [Hertling-Jaweed *et al.*, 1988]. Dies ist ein Grund dafür, daß sich die Symptome der Myasthenie im Tierversuch durch Immunisieren mit Torpedo-AChR (T-AChR) induzieren lassen. Im Verlauf dieser *experimentellen autoimmunen Myasthenia gravis* (EAMG) erfolgt zunächst eine Immunantwort gegen den fremden AChR; dadurch werden autoimmune Reaktionen gegen den körpereigenen Rezeptor initiiert, und die Tiere entwickeln der humanen Myasthenie vergleichbare Symptome.

Eine Vorstellung über den zeitlichen Verlauf der Erkrankung ist in Abbildung 1-4 dargestellt. (a) zeigt eine Synapse mit Acetylcholin (ACh) gefüllten Vesikeln in der präsynaptischen Membran der Nervenendigung, den synaptischen Spalt und die normal gefaltete Struktur der postsynaptischen Membran, auf deren „Faltenspitze“ sich die Rezeptoren konzentrieren. Durch Bindung von Antikörpern an AChR und Aktivierung von Komplement beginnt die Lyse

der Muskelmembran ca. 6 bis 7 Tage nach der Immunisierung (b). Die akute Phase wird durch phagocytische Invasion der Synapse nach ca. 8 bis 11 Tagen eingeleitet. Die Phagocyten binden über Antikörper (F_C)- und Komplement C3b-Rezeptoren an die postsynaptische Membran und zerstören weite Areale (c). Die neuromuskuläre Reizübertragung ist durch die Einlagerung der Phagocyten weitgehend blockiert. Nach ca. 30 Tagen tritt die chronische Phase der EAMG ein (d), die mit der *Myasthenia gravis* weitgehend vergleichbar ist. Die Phagocyten sind verschwunden und die verbleibenden Rezeptoren (bis zu 30% der normalen Anzahl) sind meist mit Antikörpern beladen und sitzen verstreut auf der nunmehr geglätteten postsynaptischen Membran. Der synaptische Spalt ist aufgeweitet und durch fortwährende komplement-vermittelte Lyse werden Muskelmembranfragmente zusammen mit AChR und Komplement in den synaptischen Spalt freigesetzt. Selbst eine verstärkt einsetzende AChR-Produktion kann den Abbau nicht ausgleichen, die Synapse ist weitgehend blockiert.

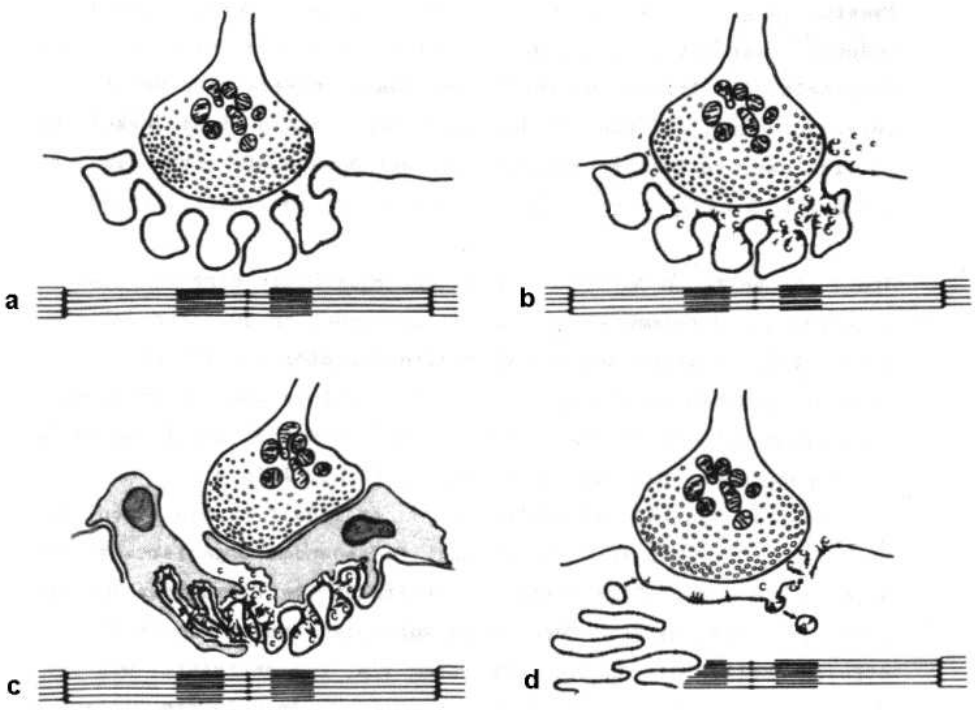


Abbildung 1-4: Verlauf der EAMG in Ratten.
a: Normale neuromuskuläre Synapse, b: frühe Phase der EAMG mit Antikörperbindung und Aktivierung von Komplement, c: akute Phase, charakterisiert durch phagocytische Invasion und d: chronische Phase mit geglätteter Struktur der motorischen Endplatte und weitgehend reduzierter Rezeptoranzahl. [Lindstrom, 1984]

1.3. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor (AChR)

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor hat seinen Namen von seinem Agonisten Nikotin, es existiert aber auch ein muskarinischer Acetylcholinrezeptor, der nach seinem Agonisten Muscarin (Gift des Fliegenpilzes) benannt ist. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur des muskarinischen Rezeptors im Vergleich zum nikotinischen, auf der sich auch eine unterschiedliche Funktion begründet, wird er bei der *Myasthenia gravis* nicht angegriffen und soll deshalb auch nicht weiter beschrieben werden.

Der nikotinische AChR ist ein Pentamer aus vier verschiedenen Untereinheiten, $\alpha_2\beta\gamma\delta$ bzw. $\alpha_2\beta\varepsilon\delta$, die stabförmig und senkrecht zur Membranebene angeordnet sind. Bei der fetalen Form ist die γ-Untereinheit durch eine homologe ε-Untereinheit ersetzt [Kaminski *et al.*, 1997]. Die Anordnung der Untereinheiten ist bisher nicht geklärt. Bei einigen Modellen wird die β-Untereinheit [Harcourt *et al.*, 1987; Unwin, 1995], bei anderen Modelle die γ-Untereinheit zwischen den beiden α-Untereinheiten postuliert [Changeux, 1994; Jacobson *et al.*, 1999; Lindstrom, 2000].

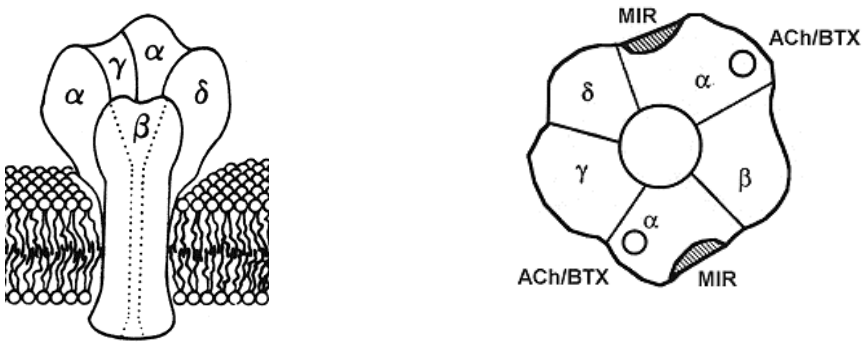


Abbildung 1-5: a: Seitenansicht des AChR mit seiner $\alpha_2\beta\gamma\delta$-Struktur. [Huganir *et al.*, 1989]
b: Ansicht des AChR von der synaptischen Seite mit MIR und ACh/BTX-Bindungsstellen. BTX: α-Bungarotoxin [Xu *et al.*, 1993]

Die beiden α-Untereinheiten besitzen an ihren synaptischen Enden die ACh-Bindungsstelle, eine Kooperation der Aminosäure 149 mit den Aminosäuren 190-198 [Dennis *et al.*, 1988], ebenso wie die sogenannte hauptimmunogene Region (*main immunogenic region*, MIR), an die mehr als die Hälfte aller autoreaktiven Antikörper, aus dem Blut myasthener Patienten, binden. Sie wurde bei den Aminosäuren 61-76 [Barkas *et al.*, 1988] bzw. 67-76 [Noda *et al.*, 1982; Tzartos *et al.*, 1988] lokalisiert. Als α-Bungarotoxin-Bindungsstelle wurden die Aminosäuren 189-195 der α-Untereinheit identifiziert [Tzartos *et al.*, 1990].

Die α-Untereinheit kann in zwei Isoformen vorkommen, die durch alternatives Spleißen des Introns zwischen dem P3- und P4-Exon entstehen. Die Isoform, bei der dieses P3A-Exon

exprimiert wird, ist um 25 Aminosäuren länger als die P3A$^-$-Form [MacLennan *et al.*, 1995]. Die physiologische Bedeutung der P3A$^+$-Isoform ist unbekannt. Da sie im Muskelgewebe kaum exprimiert wird, spielt sie bei der *Myasthenia gravis* eine untergeordnete Rolle.

Die Transmembrantopologie der Untereinheiten ist bis heute nicht genau geklärt, so wurden Vorschläge mit drei, vier, fünf oder sieben Transmembrandomänen gemacht. Der N-Terminus befindet sich bei allen Modellen mit ca. 200 meist hydrophilen Aminosäuren auf der extrazellulären Seite. In den unterschiedlichen Modellen folgt eine unterschiedliche Anzahl von Transmembrandomänen (M1-7, MA). Diese sind aus etwa 20 vorwiegend hydrophoben Aminosäuren, die jeweils eine α-Helix bilden, aufgebaut. Alle Modelle weisen zwischen den Transmembrandomänen M3 und M4 eine längere Sequenz auf der cytosolischen Seite der Membran auf. Der C-Terminus befindet sich nur bei Annahme von vier Transmembrandomänen auf der extrazellulären, sonst auf der cytosolischen Seite der Membran. Unwin konnte nachweisen, daß die Transmembrandomänen M2 der einzelnen Untereinheiten die Innenseite des Ionenkanals bilden [Unwin, 1995].

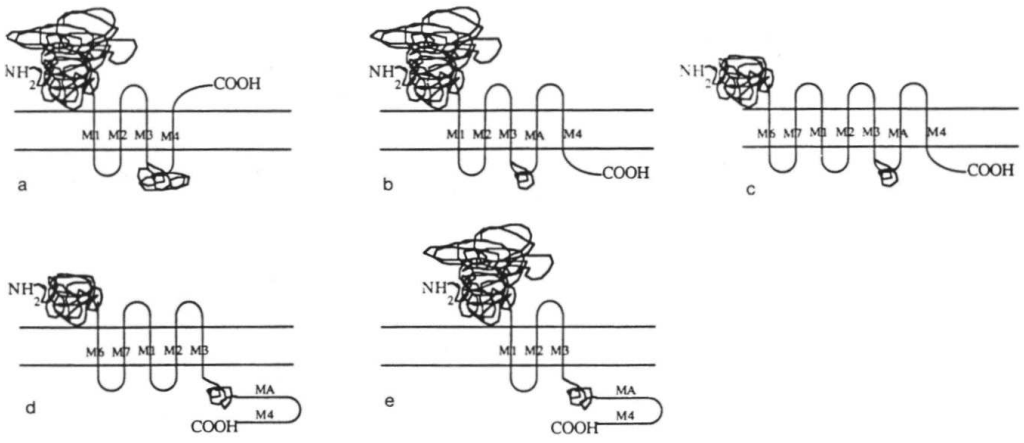


Abbildung 1-6: Vorschläge zur Transmembrantopologie der α-Untereinheit mit vier (a), fünf (b), sieben (c), fünf (d) und drei (e) Transmembrandomänen [Conti-Fine *et al.*, 1997].

Alle Untereinheiten des AChR weisen hohe Sequenzhomologien auf und besitzen eine gleiche Tertiärstruktur an den Untereinheit-Kontaktflächen, was auf eine gleiche Membrantopologie, wie auch auf ein gemeinsames Vorläufergen schließen lassen. Diese Homologien sind auch speziesübergreifend.

Die Übertragung eines Nervenimpulses zwischen Neuronen und Neuronen zu Effektororganen, wie z.B. Muskelzellen beginnt mit einer Serie von Aktionspotentialen entlang eines Axons, die zu einer Depolarisation des präsynaptischen Bereiches führen. Durch diese Depolarisation kommt es entlang des Axons zum Einstrom von Na^+-Ionen, während Ca^{2+}-Ionen in die synaptischen Endigungen einströmen. Das Ca^{2+} bindet an die bereits an der

präsynaptischen Membran liegenden „angedockten“ Vesikel, wobei eine Pore entsteht, durch die der Neurotransmitter ACh, in den synaptischen Spalt freigesetzt wird. Der erhöhte Ca^{2+}-Spiegel aktiviert ferner die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II. In der präsynaptischen Endigung phosphoryliert dieses Enzym das Synapsin, mit dem die Vesikel an die Actinfäden des Cytoskeletts fixiert sind. Daraufhin werden betroffene Vesikel freigesetzt und können zur späteren Verwendung an die präsynaptische Membran andocken. Nach Beendigung des präsynaptischen Aktionspotentials wird das Ca^{2+} über aktive Pumpen und im Austausch gegen Na^+ wieder aus der Präsynapse entfernt. Das freigesetzte ACh diffundiert durch den synaptischen Spalt an die gegenüberliegende postsynaptische Membran und dockt dort an die nikotinischen AChR. Durch Bindung von zwei ACh-Molekülen an dieses Protein kommt es zu Ladungsverschiebungen innerhalb des Makromoleküls und in deren Folge zu einer allosterischen Formveränderung. Der zentrale Kanal weitet sich auf einen Durchmesser von ca. 0,65 nm und wird somit durchgängig für Na^+- und K^+-Ionen. Aufgrund negativer Ladungen innerhalb der Pore können nur positiv geladene Ionen den Kanal durchdringen. Bedingt durch die elektrochemischen Gradienten kommt es zu einem starken Na^+-Einstrom und einem schwächeren K^+-Ausstrom an der postsynaptischen Membran und somit zu einer lokalen Depolarisation. Da das ACh im synaptischen Spalt rasch von der Acetylcholinesterase zu Acetat und Cholin hydrolysiert wird, bleibt der Kanal unter physiologischen Bedingungen nur etwa eine Millisekunde lang geöffnet. Bei gleichbleibend hohen ACh-Konzentrationen schließt der Kanal in weniger als einer Sekunde, ein als Desensibilisierung bezeichneter Vorgang [Stryer, 1996].

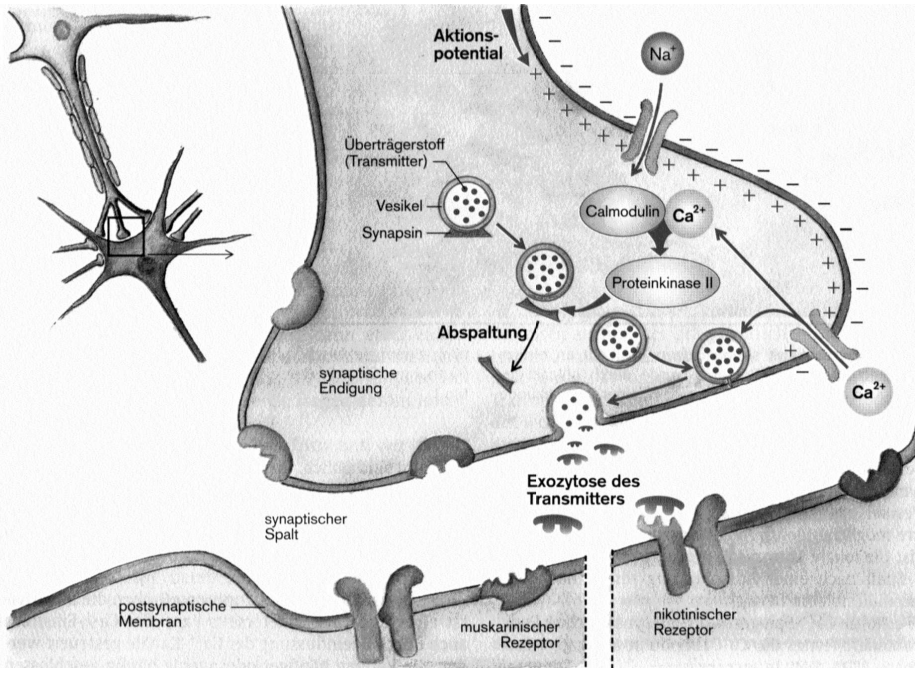


Abbildung 1-7: Mechanismus der Transmitterfreisetzung an einer präsynaptischen Endigung. [Klinke, 1996]

1.4. Antigenspezifische Immunsuppression

1.4.1. Immuntoxine

In Immuntoxinen sind eine Antikörper- oder eine Antigenkomponente chemisch mit einer Toxinkomponente verknüpft. Solche Immunkonjugate werden appliziert, um bestimmte Zellarten gezielt zu eliminieren. Dies ist vor allem in der Krebstherapie von Bedeutung, stellt aber auch zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Allergien eine interessante Alternative zur unspezifischen, immunsuppressiven Therapie dar.

Nach Applikation des Immuntoxins bindet die Antikörper- bzw. die Antigenkomponente, spezifisch an einen komplementären Rezeptor auf der Zellmembran der Zielzelle. Der Komplex aus Immuntoxin und Rezeptor wandert entlang der Membran, bis er eine clathrinreiche Region, ein sogenanntes *Coated Pit* erreicht [Sandvik *et al.*, 1989]. Das *Coated pit* senkt sich ein, bis sich ein Vesikel abschnürt, das als *Coated vesicle* bezeichnet wird. Es streift unter ATP-Verbrauch den Clathrin-Belag ab und das glatte Vesikel wird zum frühen Endosom. An dieser Stelle werden die Rezeptoren bzw. die Liganden in jeweils entgegengesetzte Bereiche abgedrängt, bevor sich das frühe Endosom in zwei Vesikel aufspaltet. Voraussetzung für diese Entkopplung ist ein leicht saures Milieu (pH 6,0) in den frühen Endosomen. Dazu erwirbt ihre Membran auf noch unbekanntem Weg eine Protonenpumpe (H^+-ATPase). Die Rezeptoren werden in Vesikeln wieder an die Zellmembran transportiert, in den verbleibenden Vesikeln dissoziert das Immuntoxin und das eigentliche Prozessieren durch Cystein- und Serinproteasen beginnt. Danach erfolgt der Transport zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Vom TGN wird angenommen, daß es für die weitere Sortierung verantwortlich ist [Van Deurs *et al.*, 1986; Van Deurs *et al.*, 1988]. Das Toxin gelangt ins Cytosol und letztendlich zu den Ribosomen, wo es seine Wirkung entfaltet.

Neuere Untersuchungen postulieren, daß die Pflanzentoxine Ricin und Abrin (beide Typ II-RIP, siehe Kapitel 1.4.3.) vom TGN über die Golgi-Zisternen zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert werden und dort durch Proteindisulfidisomerase (PDI) die Disulfidbrücke zwischen A- und B-Kette gespalten wird [Lord *et al.*, 1998]. Sollte diese Hypothese zutreffen, könnte auch die Spaltung der disulfidverbrückten Immuntoxine durch PDI im ER stattfinden (siehe Kapitel 1.4.4.). Lord gelang es nachzuweisen, daß die Golgi-Zisternen essentiell für die cytotoxische Wirkung der Toxine ist. Weiterhin wird spekuliert, daß die Translokation ins Cytosol im ER, durch dort vorhandene Proteinkanäle, erfolgt [Lord *et al.*, 1998]. Anschließend kann das Toxin ungehindert zu den Ribosomen gelangen. Die Proteinsynthese wird gehemmt und es kommt zum Zelltod.

Allerdings erreicht nur ein kleiner Anteil des endocytierten Toxins das TGN, der Hauptteil der in die Endosomen eingetretenen Toxine wird entweder zurück an die Zelloberfläche (Exocytose) oder in die Lysosomen transportiert, wo sie durch lysosomale Enzyme abgebaut werden.

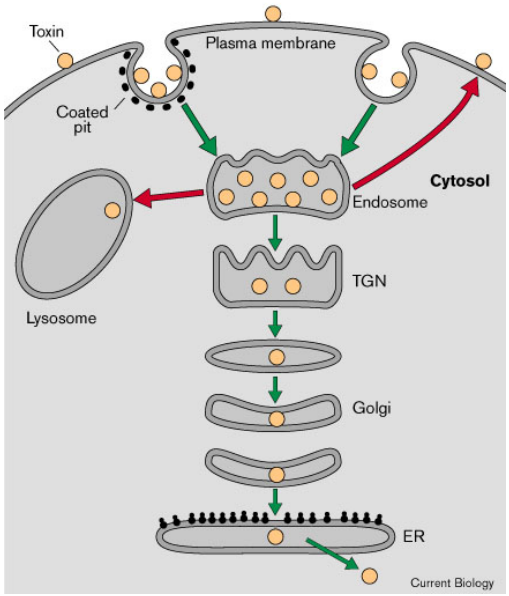


Abbildung 1-8: Möglicher Transportweg von endocytierten Toxinen, z.B. Ricin oder Abrin, in der Zelle. TGN: Trans-Golgi-Netzwerk Golgi: Golgi-Zisternen ER: Endoplasmatisches Retikulum [Lord *et al.*, 1998]

1.4.2. Antikörper- bzw. Antigenkomponente

Monoklonale Antikörper stellen die am meisten benutzte Ligandkomponente in Immuntoxinen dar [Vitetta *et al.*, 1991]. Monoklonale Antikörper gegen Antigene auf Tumorzellen ermöglichen es, maligne Zellen spezifisch anzugreifen. Ein Konzept, daß bereits von Paul Ehrlich als Hypothese der *magic bullets* postuliert wurde [Ehrlich, 1906].

Bei Autoimmunerkrankungen kommen dafür das Autoantigen oder Teile davon in Betracht, da sie mit den autoimmunen Zellen interagieren können. Zur Therapie der *Myasthenia gravis* wären der komplette AChR oder Untereinheiten bzw. Fragmente davon geeignet. Brust sowie Urbatsch konnten die Wirksamkeit solcher Konjugate durch *in vivo* Versuche an Ratten zeigen [Brust *et al.*, 1987; Urbatsch *et al.*, 1993]. Zur Synthese der Konjugate verwendeten sie kompletten AChR, den sie aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens, *Torpedo californica*, isolierten.

Im Fall von Antigen-Toxin-Konjugaten kommt der Reinheit des verwendeten Antigens bzw. des Konjugates besondere Bedeutung zu. Verunreinigungen mit Antigenen können stets zu neuerlicher Immunisierung führen.

1.4.3. Toxinkomponente

Als Toxinkomponenten für Immuntoxine kommen Proteine bakteriellen oder pflanzlichen Ursprungs zum Einsatz, welche die gemeinsame Eigenschaft besitzen, Ribosome und damit die zelluläre Eiweißbiosynthese zu inhibieren. Diese Toxine werden deshalb auch als ribosomen-inaktivierende Proteine (RIP) bezeichnet. Sie besitzen gegenüber Chemotherapeutika den Vorteil, nicht nur Zellen im Teilungsstadium, sondern auch ruhende Zellen abtöten zu können. Da es sich bei allen eingesetzten Toxinen um Enzyme handelt, die bei der eigentlichen Reaktion nicht verbraucht werden und somit mehrere Reaktionszyklen durchlaufen können, sind außerdem geringere Dosen für eine effektive Wirkung ausreichend.

Man unterscheidet zwischen Typ I und Typ II-RIP. Typ I-Proteine besitzen nur eine Untereinheit (A-Kette), Typ II-Proteine dagegen zwei (A- und B-Kette), die durch eine einzelne Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Bei der A-Kette handelt es sich um das eigentliche Toxin, die B-Kette ist für das Internalisieren des Toxins verantwortlich.

Die B-Kette ist ein Galaktose-sensitives Lektin, das in der Lage ist, an Galaktosereste in Glycolipiden oder -proteinen zu binden, die auf der Zelloberfläche fast aller eukaryontischer Zellen zu finden sind [Olsnes *et al.*, 1982]. Nach der Endocytose spielt die B-Kette auch eine entscheidende Rolle bei der Translokation des Toxins ins Cytosol [Lord *et al.*, 1991]. Ein deutlicher Hinweis für diese Theorie ist die Resistenz von *Saccharomyces cerevisiae* (Bierhefe) gegen Ricin. Das Fehlen von Galaktosyl-Transferasen verhindert den Einbau von Galaktose in die Zellmembran und dadurch auch das Anheften Galaktose-sensitiver Lektine [Bradley *et al.*, 1987].

Typ II-RIP sind hochwirksame Toxine, deren IC_{50}-Werte (halbmaximale Hemmkonzentration der Proteinbiosynthese *in vitro*) zwischen 10^{-9} und 10^{-11} M liegen [Lord *et al.*, 1991]. Im Gegensatz zu den Typ II-Toxinen besitzen Typ I-Toxine keine B-Kette und können nicht auf diesem Weg durch eine intakte Membran in die Zellen gelangen. Immuntoxine, die nur die Toxin A-Kette oder ein Typ I-RIP enthalten, haben sich in der Anwendung als weniger potent erwiesen. Dies ist auf die mangelnde Fähigkeit zur Translokation ins Cytosol zurückzuführen. Verwendet man zur Herstellung der Immuntoxine jedoch intaktes Typ II-Toxin, so führt dies zu einer hohen unselektiven Toxizität, da die unspezifische Bindungsfähigkeit der B-Kette mit der hohen spezifischen Rezeptorerkennung des *Carriers* konkurriert.

Es sind drei unterschiedliche Wirkmechanismen der Toxine bekannt [Fong *et al.*, 1991]. Pflanzentoxine, wie z.B. Gelonin (Typ I-RIP), Ricin und Abrin (beide Typ II-RIP), besitzen meistens N-Glycosidaseaktivität. Sie spalten spezifisch die N-glycosidische Bindung zwischen Adenin 4324 und Ribose der 28S rRNA in der 60S Untereinheit der Ribosomen [Endo *et al.*, 1987]. Dies führt zu einer Konformationsänderung der ribosomalen Proteine L 5

und L 14 [Paleologue *et al.*, 1986; Terao *et al.*, 1988], die in einer Region liegen, die wiederum mit der mRNA interagiert.

Viele Bakterientoxine, wie z.B. Pseudomonas Exotoxin oder Diphtherietoxin (beide Typ II-RIP), zeigen Ribosyl-Transferaseaktivität und katalysieren den Transfer der ADP-Ribose von NAD^+ zum Elongationsfaktor 2 (EF2) [Collier, 1988].

Mykotoxine, wie z.B. α-Sacrin (Typ I-RIP) inhibieren die Proteinbiosynthese durch Spaltung einer Phosphodiesterbindung in der 28S rRNA in der Nähe der EF2-Bindungsstelle (RNase-Aktivität) [Endo *et al.*, 1983].

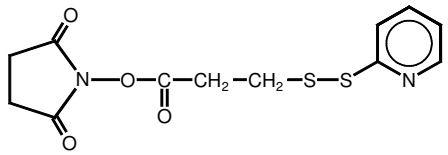
Nolan gelang 1993 die Synthese der cDNA aus isolierter mRNA und die anschließende Expression des Pflanzentoxins Gelonin in *E. coli.* (*Escherichia coli*) [Nolan *et al.*, 1993]. Rosenblum konnte zeigen, daß rekombinantes Gelonin im zellfreien Toxizitätstest eine vergleichbare N-Glycosidase-Aktivität aufweist wie natürliches Gelonin [Rosenblum *et al.*, 1995]. In hohen Konzentrationen wirkt Gelonin auch cytotoxisch auf intakte Zellen. Hierbei erweist sich jedoch das natürlich gewonnene Gelonin als vielfach toxischer (IC_{50} = 100 nM) im Vergleich zu rekombinantem Gelonin (nicht toxisch bis zu 1 µM) [Rosenblum *et al.*, 1999]. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Zelloberflächenkomponenten Carbohydratstellen erkennen und binden können. Da bei rekombinantem Gelonin im Gegensatz zu natürlichem Gelonin die Glycoproteine fehlen, kann es nicht über diese Zelloberflächenkomponenten in die Zelle gelangen.

1.4.4. Kopplungsreagenzien

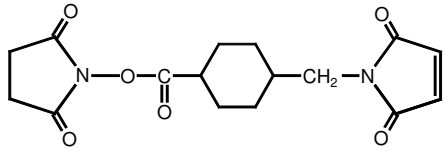
Die Antigen-Toxin-Konjugate müssen *in vivo* extrazellulär stabil sein, um die Abspaltung des Toxins zu verhindern. Gleichzeitig muß die Bindung aber so labil sein, daß sie der Toxinkomponente intrazellulär den Eintritt ins Cytosol erlaubt. Dies muß bei der Wahl des Kopplungsreagenzes berücksichtigt werden.

Es wird zwischen homo- und heterobifunktionellen Reagenzien, die zwei gleichartige oder aber zwei verschiedene funktionelle Gruppen besitzen, unterschieden. In der Praxis werden häufig N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP) [Carlsson *et al.*, 1978], Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) [Yoshitake *et al.*, 1979] oder auch Bis-(maleimido)-methylether (BMME) [Weston *et al.*, 1980] verwendet.

a



b



c

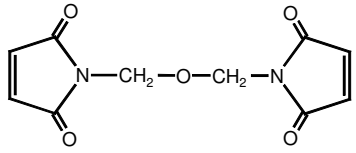


Abbildung 1-9: Häufig verwendete Kopplungsreagenzien.
a: N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP)
b: Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC)
c: Bis-(maleimido)-methylether (BMME)

Immuntoxine, die über eine Disulfidbrücke gekoppelt sind, erweisen sich *in vivo* als sehr instabil gegenüber der Reduktion durch Thiole im Blutkreislauf und in Geweben. Ihre Stabilität kann durch Schutz der Disulfidbrücke mit Hilfe sterisch aufwendiger Gruppen erhöht werden [Vitetta *et al.*, 1991; Ghetie *et al.*,1991].

Bei der Kopplung mit Reagenzien wie SMCC oder BMME werden Thioetherbrücken zwischen Proteinen gebildet, die nicht durch Reduktion gespalten werden können. Bei pH-Werten kleiner 6, wie sie in Endosomen vorherrschen, werden sie jedoch aufgrund der Ringspannung und Nachbargruppeneffekte leicht gespalten. Je nach gewünschter Stabilität im Zielorganismus werden die Immuntoxine mit Hilfe der passenden Kopplungsreagenzien synthetisiert.

Nicht alle Proteine besitzen die für die Reaktion mit Dithiopyridinen oder Maleimiden notwendigen freien Thiolgruppen; diese können aber durch Modifizierung mit 2-Iminothiolan vor der eigentlichen Kopplungsreaktion eingeführt werden [Jue *et al.*, 1978].

1.5. Gentechnische Isolierung von Proteinen

Die Gentechnik ermöglicht es, reine Proteine in hoher Ausbeute durch Überexpression in Bakterien oder eukaryontischen Zellen zu gewinnen. Die DNA-Segmente, welche die Erbinformation für das gewünschte Protein tragen, werden in Vektoren einkloniert. Als Klonierungsvektoren werden neben Bakteriophagen und Hefechromosomen hauptsächlich Plasmide eingesetzt. Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in Bakterienzellen ein eigenständiges Dasein führen. Sie enthalten einen eigenen Replikationsursprung, codierende Sequenzen und meist ein oder mehrere Gene für die Resistenz gegen Antibiotika.
Das DNA-Segment wird zunächst durch Restriktionsendonucleasen aus der Ursprungs-DNA herausgeschnitten und mit Plasmiden, die ihrerseits durch Restriktionsendonucleasen geöffnet wurden, gemischt. Das Fragment wird zwischen die entsprechenden Sequenzen der Transkriptionskontrolle der Vektor-DNA integriert und die Spaltstelle durch DNA-Ligase verschlossen. Durch Vorbehandlung einer großen Zahl von Wirtszellen kann erreicht werden, daß einige von ihnen das neukombinierte („rekombinante“) Plasmid aufnehmen (Transformation) und es bei ihrer eigenen Vermehrung zusammen mit ihrem eigenen Genom replizieren. Die Antibiotikaresistenzen ermöglichen die Selektion transformierter Klone aus der Mehrzahl der nicht veränderten Wirtsorganismen. Plasmide, die das Resistenzgen tragen, werden wesentlich öfters repliziert, was sich günstig auf die Expressionsrate auswirkt. Nach Transformation und Vermehrung der Wirtszellen wird durch Induktion gezielt eine effiziente Transkription des Gens ausgelöst. Durch Translation der gebildeten mRNA in der Wirtszelle kann dann das gewünschte Protein in großen Mengen entstehen.

1.5.1. AChR-Plasmide

Durch Expression in *E. coli* konnten AChR-Fragmente verschiedener Spezies isoliert werden [Noda *et al.*, 1983; Numa *et al.*, 1983], die zunächst zur Strukturaufklärung und zum *Screening* mit monoklonalen Antikörpern verwendet wurden [Tzartos *et al.*, 1982; Ohta *et al.*, 1990; Sano *et al.*, 1991]. Teilbereiche der Nukleotidsequenz, die die humane α-Untereinheit codiert, wurden bereits entweder chemisch synthetisiert [Talib *et al.*, 1991] oder die Restriktionsfragmente aus der entsprechenden cDNA ausgeschnitten [Beeson *et al.*, 1989].
Zum Einsatz in der antigenspezifischen Therapie der *Myasthenia gravis* erscheint es sinnvoll, den kompletten AChR (MW 250 kD) durch kleinere AChR-Fragmente zu ersetzen. Dadurch sind unerwünschte Immunreaktionen gegen pathologisch irrelevante Bereiche ausgeschlossen. Wichtig ist, daß die in den Konjugaten eingesetzten AChR-Fragmente den

Abschnitt der MIR enthalten, da sie dann vermutlich die Mehrheit der autoreaktiven Zellen binden und eliminieren können.

Da die exprimierten, äußerst hydrophoben AChR-Fragmente für die Bakterienzellen nicht von Bedeutung sind, werden sie in sogenannte *inclusion bodies* (Einschlußkörper) eingelagert, in denen die AChR-Fragmente in denaturierter und unlöslicher Form enthalten sind [Rousselle, 1996]. Durch denaturierende Reagenzien wie z.B. Harnstoff oder Guanidinium-Hydrochlorid können die Proteine in der denaturierten, biologisch unwirksamen Form isoliert werden. Da es sich aber bei der MIR um ein konformelles Epitop handelt, können manche Autoimmunantikörper nicht mit der denaturierten Konformation wechselwirken, eine Renaturierung ist erforderlich.

Die verwendeten Plasmide der α-Untereinheit des H-AChR wurden freundlicherweise von Herrn Dr. D. Beeson (Institute of Molecular Medicine, Oxford) zur Verfügung gestellt. Die Vektoren, in welche die Plasmide einkloniert wurden und die entsprechenden Promotoren sind in Tabelle 1-1 angegeben. Alle verwendeten AChR-Plasmide tragen ein Resistenzgen für Ampicillin, wodurch die Selektion der transformierten Klone ermöglicht wird.

Plasmid	Bereich [AS]	MW [kD]	Vektor	P3A-Exon	Promotor
pαR506	37-180	16,8	pKK 233-2	+	tac
pαE506	37-186	17,6	pKK 233-2*	-	tac
pαE701	1-437	49,9	pKK 233-2*	-	tac
pαHE706	1-186	24,5	pET 19b	-	T7/lac
pαHE701	1-437	52,7	pET 19b	-	T7/lac

Tabelle 1-1: Eigenschaften der verwendeten Plasmide der α-Untereinheit des H-AChR. Das Plasmid pαR506 wurde in den Vektor pKK 233-2 einkloniert, während für die Plasmide pαE506 und pαE701 der Vektor pKK 233-2 modifiziert wurde (siehe Kapitel 4.2.2.). Bei dem Expressionsvektor pKK 233-2 wird der tac-Promotor für die Transkriptionskontrolle verwendet. Die Plasmide pαHE706 und pαHE701 wurden in den Vektor pET 19b einkloniert, wobei die AChR-Gene unter der Transkriptionskontrolle der T7-Polymerase stehen. AS: Aminosäuren pKK 233-2*: modifizierter Vektor pKK 233-2

Die Gene für die extrazellulären α-Untereinheiten αR506 bzw. αE506 und die gesamte α-Untereinheit αE701 wurden in den käuflichen Expressionsvektor pKK 233-2 (Aufbau siehe Anhang, Fa. Pharmacia-Biotech) bzw. dessen modifizierte Form pKK 233-2* kloniert. Die Transkription der AChR-Gene steht in diesem Vektor unter Kontrolle eines tac-Promotors. Dabei handelt es sich um einen Hybridpromotor, der aus Teilen des lac-

und des trp-Promotors zusammengesetzt ist. Während sich der trp-Promotor durch eine hohe Expressionsrate auszeichnet, kann der lac-Promotor die Transkription kontrollieren.

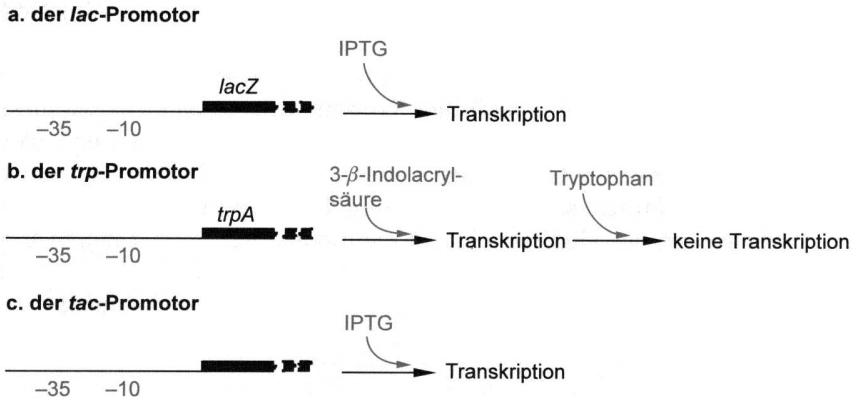


Abbildung 1-10: a: Der lac-Promotor reguliert die Transkription des lacZ-Gens, das die β-Galactosidase codiert und wird von IPTG (Isopropylthiogalactopyranosid) induziert. Somit wird die Expression jedes Gens angeschaltet, das sich in dem Expressionsvektor stromabwärts vom lac-Promotor befindet.

b: Der trp-Promotor liegt normalerweise stromaufwärts von der Gengruppe, die mehrere Enzyme für die Biosynthese der Aminosäure Tryptophan codiert und wird von Tryptophan reprimiert, läßt sich aber leichter mit 3-β-Indolacrylsäure induzieren.

c: Der tac-Promotor, ein Hybrid aus dem trp- und dem lac-Promotor, ist stärker als diese beiden Sequenzen, läßt sich aber ebenfalls durch IPTG induzieren.

[Brown, 1996]

Die Gene der extrazellulären α-Untereinheit αHE706 und die der gesamten α-Untereinheit αHE701 wurden in den Expressionsvektor pET 19b (Aufbau siehe Anhang, Fa. Novagen) einkloniert. Dieser Vektor enthält eine Sequenz für einen N-terminalen His-Tag, einen Peptidschweif, der aus zehn Histidinen aufgebaut ist. Das rekombinante Protein erhält somit die Fähigkeit, Schwermetallionen komplex zu binden und kann mittels Affinitäts-chromatographie an einer Ni-Säule aus dem *E. coli*-Aufschluß abgetrennt werden. Zusätzlich ist im Zielprotein noch eine Schnittstelle für Enterokinase enthalten, einer spezifisch wirkenden Peptidase, die den His-Tag wieder abspalten kann.

Die Transkription steht in diesem Vektor unter Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-Systems, das in *E. coli*-Stämmen, deren Chromosom die DE3-Mutation aufweist, durch IPTG-Zugabe induziert werden kann. Durch Zugabe des Induktors kann das DE3-Gen für die T7-RNA-Polymerase abgelesen werden. Diese virale Polymerase kann an den T7-Promotor auf dem pET-Vektor binden und das Target-Gen ablesen, das ebenfalls durch IPTG freigeschaltet wird. Bei Expressionsstämmen mit dem zusätzlichen Plasmid pLysE wir das T7-Lysozym codiert, welches die T7-RNA-Polymerase spezifisch inaktiviert.

Dadurch steht die Expression des Zielgens unter effektiver Kontrolle. Ein weiterer Vorteil dieses Systems liegt in der meist extrem hohen Expressionsrate.

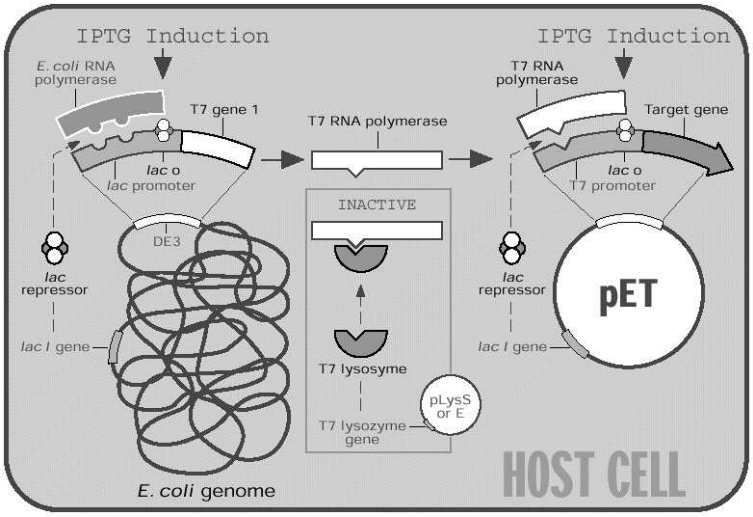


Abbildung 1-11: Das pET-Expressionssystem mit den Elementen der Transkriptionskontrolle.

1.6. Chaperone

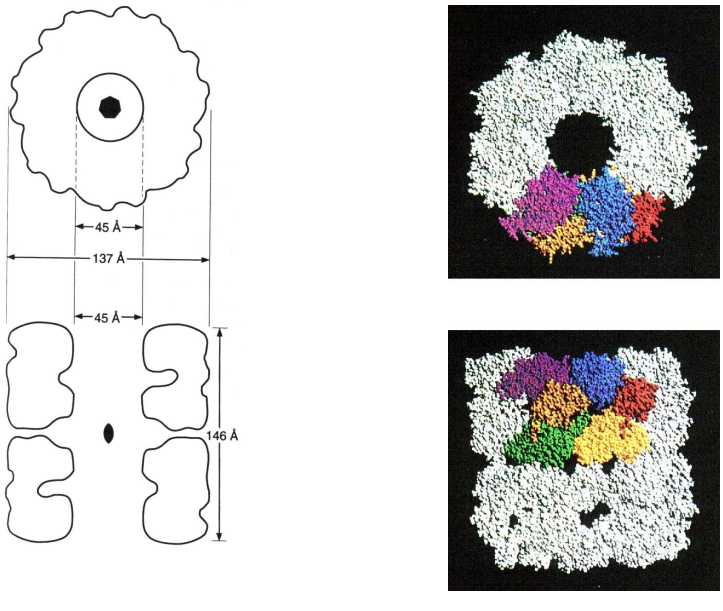
Die molekularen Chaperone wurden zum ersten Mal in den siebziger Jahren bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Bei erhöhten Temperaturen bildeten sich Verdickungen auf den Riesenchromosomen die bei normalen Wachstumstemperaturen nicht auftraten [Ritossa, 1962]. Weitere Untersuchungen zeigten, daß gleichzeitig mit dem Auftreten der Verdickung eine Gruppe von Proteinen in großer Menge gebildet wird, die als Hitzeschockproteine (Hsp) bezeichnet wurden [Tissières *et al.*, 1974]. Parsell zeigte 1993, daß auch andere Arten von Streß, wie die Einwirkung von Ethanol oder Schwermetallen, Virusinfektionen oder Krebs die vermehrte Produktion dieser speziellen Proteine auslösen können [Parsell *et al.*, 1993]. Die Hsp liegen in vielen Organismen von Bakterien bis hin zum Menschen in hochkonservierter Form vor und besitzen in allen Organismen ähnliche Funktionen [Hemmingsen *et al.*, 1988].

Die Funktion der Hsp beschränkt sich nicht nur auf Streßsituationen, sondern sie sind auch essentielle Zellbestandteile unter physiologischen Bedingungen [Lindquist *et al.*, 1988; Fayet *et al.*, 1989]. Die Hsp unterstützen die Faltung anderer Proteine und ihre Assemblierung zur korrekten dreidimensionalen Struktur, spielen aber auch beim Proteintransport eine wichtige Rolle [Ellis, 1996; Multhoff *et al.*, 1998]. Aufgrund ihrer vielfältigen Einbindung in zelluläre Prozesse prägte Ellis für die Hsp den Begriff „molekulare Chaperone“ (Anstandsdame) [Ellis, 1987]. Zur Klassifizierung werden die Abkürzungen Hsp oder Cpn verwendet, denen die

ungefähre Molekülmasse in kD nachgestellt wird [Buchner, 1996]. Die wichtigsten Chaperonsysteme in *E. coli* sind Hsp70 und Hsp60, dem auch das Chaperonin-System zugeordnet wird [Hemmingsen *et al.*, 1988].

1.6.1. Das Chaperonin GroEL und sein Co-Chaperonin GroES

Die Unterfamilie der Hsp60 wird auch als Chaperonine bezeichnet. Diese Bezeichnung für die sequenzhomologe Familie [Gething *et al.*, 1992; Hendrick *et al.*, 1993] wurde eingeführt, um Chaperone zu kennzeichnen, die in Plastiden, Mitochondrien und auch im Cytosol von Prokaryonten vorkommen [Ellis *et al.*, 1991]. Das Chaperonin GroEL hat zusammen mit seinem Co-Chaperonin GroES einen Anteil von 1,35% (GroEL) bzw. 0,24% (GroES) an der gesamten Proteinmenge einer Zelle [Zettlmeissl *et al.*, 1979], nach Hitzeeinwirkung steigt dieser Anteil auf 15% der Gesamtproteinmenge an [Parsell *et al.*, 1993]. Die Unterdrückung der GroEL-Synthese führt zur Aggregation vieler neu synthetisierter Proteine und schließlich zum Zelltod.
GroEL hat eine zylindrische Struktur, die einen zentralen Hohlraum umschließt. Der Zylinder setzt sich aus zwei Ringen zusammen, die jeweils aus sieben identischen Untereinheiten (MW 57 kD) aufgebaut sind [Braig *et al.*, 1994].



a b

Abbildung 1-12: Struktur des Chaperonins GroEL. [Braig *et al.*, 1994]
a: Schematische Darstellung des GroEL-Zylinders in der Aufsicht und im Querschnitt.
b: Van der Waals Modell des GroEL-Zylinders in der Aufsicht und im Querschnitt.

Das Co-Chaperonin GroES ist wesentlich kleiner als GroEL. Es bildet lediglich einen einzelnen Ring, der sich aus sieben identischen Untereinheiten (MW 10 kD) zusammensetzt. Mit seiner kuppelartigen Struktur verschließt er wie ein Deckel den Hohlraum des GroEL-Komplexes.

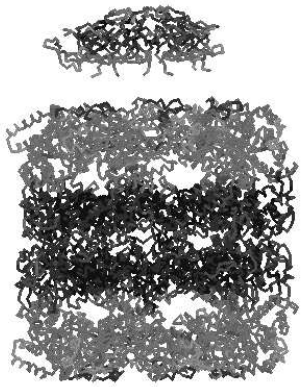


Abbildung 1-13: Struktur des asymmetrischen GroEL/ES-Komplexes [Brookhaven Datenbank der Pdb-Files]

Die Oberfläche des inneren Hohlraumes des GroEL-Zylinders besitzt hydrophobe Eigenschaften. Durch die Bindung des „GroES-Deckels“ sowie Bindung und Hydrolyse an Adeninnucleotiden kommt es zur konformellen Änderung innerhalb der *Cavity*, wobei die innere Oberfläche hydrophil wird [Roseman *et al.*, 1996].

GroEL schützt neu synthetisierte Polypeptide oder durch zellulären Streß denaturierte Proteine, indem es stabile Komplexe mit ihnen bildet. In diesem Komplex vermittelt es die Faltung bis zur nativen Form in einem ATP-abhängigen Prozeß, der mit der Bindung und Dissoziation des Cofaktors GroES gekoppelt ist [Hendrick *et al.*, 1993]. Genauere Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus zeigen, daß instabile Targetproteine in die Rückfaltungskammer des GroEL-Oligomeren eingelagert werden. Elektronenmikroskopisch wurde dabei sowohl einfache Beladung und Verschluß einer Rückfaltungskammer $(GroEL_7)_2(GroES_7)$ (siehe Abbildung 1-13) [Hartl, 1996] als auch die Bildung symmetrischer Komplexe $(GroEL_7)_2(GroES_7)_2$, die mit zwei Targetmolekülen besetzt sind [Sparrer *et al.*, 1997], beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden widersprüchliche Mechanismen der Rückfaltung vorgeschlagen, die aber hier nicht weiter diskutiert werden sollen. Allen Modellen liegt jedoch die Annahme zugrunde, daß durch Bindung von GroES und ATP-Hydrolyse die Umgebung der Targetproteine von hydrophob nach hydrophil verändert wird, die Konformation der Substratproteine der Änderung folgt und sie anschließend korrekt gefaltet wieder freigesetzt werden.

1.6.2. Das Chaperonin-Plasmid pGroESL

Das Chaperoninsystem ist auf dem *E. coli* Chromosom im GroE-Operon codiert und die Transkription wird durch den Hitzeschock-Promotor (Phs) reguliert (Aufbau siehe Anhang). Die Anwesenheit des Plasmids pGroESL in *E. coli* steigert den natürlichen GroEL-Anteil von 1,35% auf 10%. Zur Konstruktion des Plasmids wurde das GroE-Operon, ein 2,3 kb *Eco*RI-*Hin*dIII Fragment, in den Expressionsvektor pTG10 kloniert [Goloubinoff *et al.*, 1989]. Das GroE-Operon (Phs, GroES und GroEL) steht somit unter Kontrolle eines lac-Promotors (Plac), der mit IPTG induziert werden kann. Wie Neuhofen zeigte, steigt der Anteil an GroEL/GroES in den Zellen durch die einfache Anwesenheit des Plasmids auch ohne Induktion der Promotoren stark an [Neuhofen, 1997]. Zur Selektion transformierter Bakterien trägt das Plasmid ein Chloramphenicol-Resistenzgen (cm).

2. Problemstellung

Die Ausschaltung autoantigener Immunzellen ist das Prinzip der antigenspezifischen Immunsuppression, einer erfolgversprechenden Methode zur Therapie von Autoimmunerkrankungen. Im Fall der *Myasthenia gravis*, bei der die Autoimmunreaktion gegen den nikotinischen AChR gerichtet ist, wurden Konjugate aus dem kompletten T-AChR und dem ribosomen-inaktivierenden Toxin Gelonin in *in vivo* Versuchen eingesetzt [Urbatsch *et al.*, 1993; Brust *et al.*, 1987].

Urbatsch und Brust gelang die Therapie von Ratten, bei denen sie die EAMG ausgelöst hatten, durch Applikation dieser Konjugate. Zur Vermeidung unerwünschter Immunreaktionen gegen pathologisch irrelevante Teile des AChR, wurde die humane α-Untereinheit, sowie der extrazelluläre Teil, in dessen Bereich die hauptantigene Determinante liegt, in *E. coli* exprimiert [Rousselle, 1996]. Allerdings konnten diese Peptide nur in denaturierter, unlöslicher Konformation als *inclusion bodies* erhalten werden.

Ziel der vorliegende Arbeit war die Isolierung von AChR-Gelonin-Konjugaten aus nativen, korrekt gefalteten Rezeptor-Fragmenten und deren *in vivo* Einsatz zur Therapie der EAMG in Lewis-Ratten.

Durch die Koexpression von Rezeptorfragmenten und dem Chaperoninsystem GroEL/GroES sollte schon bei der Expression die korrekte Faltung der AChR-Fragmente erfolgen.

Zur Synthese der Antigen-Toxin-Konjugate sollten die isolierten nativ gefalteten Rezeptorfragmente mit verschiedenen spaltbaren Kopplungsreagenzien chemisch an Gelonin gekoppelt werden.

Die Induzierung der EAMG in Lewis-Ratten sollte mit T-AChR, isoliert aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens *Torpedo californica*, erfolgen.

Für die Immunisierung der Lewis-Ratten wurde das für Sprague-Dawley-Ratten entwickelte Immunisierungsschema von Urbatsch gewählt [Urbatsch *et al.*, 1993]. Dabei war die Übertragbarkeit des Applikationsschemas zwischen den verschiedenen Mausstämmen nachzuweisen.

Der Verlauf der EAMG, wie auch die spätere Therapie mit den Konjugaten, sollte elektrophysiologisch mit Hilfe der repetitiven Serienstimulation verfolgt werden.

3. Experimentelle Autoimmune Myasthenia Gravis

3.1. Aufgabenstellung

Die EAMG sollte in Lewis-Ratten induziert werden, um die Wirksamkeit von Gelonin-Konjugaten mit rekombinanten AChR-Fragmenten bei der antigenspezifischen Immunsuppression *in vivo* zu untersuchen. Da die Leitfähigkeit der motorischen Endplatten an Muskelfasern ein Maß für die Anzahl funktionsfähiger AChR ist [Seybold *et al.*, 1976; Hohlfeld *et al.*, 1983; Sterz *et al.*, 1986], kann mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen die Schwere der EAMG bei den Lewis-Ratten bestimmt werden.

Die Induzierung der EAMG in Lewis-Ratten mit 100 µg AChR aus *Electrophorus electricus* (Zitteraal) wurde von Lennon etabliert [Lennon *et al.*, 1975]. Verschiedene Arbeitsgruppen modifizierten diese Methode durch Einsatz von AChR aus *Torpedo californica* (T-AChR, aus Zitterrochen), Variierung der Antigenmenge bzw. des Gesamtvolumens pro Injektion und Anzahl der Injektionen. Hohlfeld setzte 1981 100 µg T-AChR emulgiert mit 100 µl CFA (komplettes Freund´s Adjuvans) in einem Gesamtvolumen von 200 µl ein [Hohlfeld *et al.*, 1981], variierte aber 1983 mit 50-100 µg die Menge des T-AChR [Hohlfeld *et al.*, 1983]. Lindstrom verwendete 30 µg T-AChR in CFA (50-200 µl Gesamtvolumen) und führte nach 2-3 Wochen nochmals mit den gleichen Mengen einen Boost in IFA (inkomplettes Freund´s Adjuvans) durch [Lindstrom, 1984]. Urbatsch induzierte die EAMG mit 50 µg T-AChR emulgiert mit 50 µl CFA (100 µl Gesamtvolumen) und einem analogen Boost mit IFA in Sprague-Dawley-Ratten, konnte aber eine Verstärkung der myasthenen Symptome durch Einsatz von 30 µg T-AChR emulgiert mit 200 µl CFA (250 µl Gesamtvolumen) bzw. IFA für den Boost erzielen [Urbatsch, 1990].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Immunisierung nach dem verbesserten Applikationsschema von Urbatsch an Lewis-Ratten durchgeführt werden. Der zur Immunisierung der Ratten notwendige T-AChR sollte aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens *Torpedo californica* isoliert werden.

Der Grad der Erkrankung sollte bei den Tieren durch Beobachtung beurteilt, zusätzlich aber durch die repetitive Serienstimulation elektrophysiologisch bestimmt werden. Diese elektrophysiologischen Untersuchungen wurden in der Neurologischen Universitätsklinik, Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K.V. Toyka unter Leitung von Dr. med. J. Zielasek durchgeführt. Im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Untersuchungen von Urbatsch, bei denen die Halsmuskel der Ratten freigelegt wurden [Urbatsch *et al.*, 1993], ist es bei diesen Untersuchungen nicht notwendig, die Versuchstiere zu töten. Mit der repetitiven Serienstimulation kann somit die Erkrankung, aber auch der Verlauf der Therapie mit AChR-Gelonin-Konjugaten dokumentiert werden.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Der Acetylcholinrezeptor des *Torpedo californica* (T-AChR)

Der T-AChR kann aus den elektrischen Organen von Fischen, wie dem Zitterrochen *Torpedo californica*, gewonnen werden. Dieses spannungserzeugende Organ ist aus sogenannten Elektroplaques aufgebaut, die sich im Laufe der Evolution aus Muskelzellen entwickelten und sehr reich an cholinergen postsynaptischen Membranen sind. Wie auch die Muskelzellen sind sie elektrisch erregbar, ihnen fehlt aber ein kontraktiler Apparat, was zum Aufbau eines elektrischen Potentials von 150 mV je Zelle führt. Durch „Reihenschaltung" vieler Zellen entstehen hohe Spannungen.

3.2.1.1. Isolierung des T-AChR

Die Isolierung des T-AChR wurde bereits 1990 in unserer Arbeitsgruppe von Urbatsch mittels Dichtegradientenzentrifugation, in Anlehnung an ein Verfahren von Hertling-Jaweed, durchgeführt [Urbatsch, 1990; Hertling-Jaweed *et al.*, 1988]. Das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation beruht auf dem unterschiedlichen Sedimentationsverhalten von Proteinen. Dadurch ist es möglich, schwere Membranstücke, die keinen T-AChR enthalten, und weitere Verunreinigungen abzutrennen. Trotz nachfolgenden Extraktionen mit Diiodosalicylat-Li-Salz (LiS) und Natriumcholat gelang es Urbatsch nicht, den T-AChR ohne eine größere Verunreinigung zu isolieren. In der SDS-PAGE trat eine starke Bande im Bereich von 80-90 kD auf, die einer ATPase zugeordnet wurde. Sehnert setzte 1994 zur weiteren Aufreinigung des T-AChR, zusätzlich zur Dichtegradientenzentrifugation, eine Affinitätschromatographie nach einem Verfahren von Mosckovitz ein [Sehnert, 1994; Mosckovitz *et al.*, 1988]. Dieses Reinigungsverfahren beruht auf der Bindung von Schlangengiften wie α-Bungaro- oder α-Cobratoxin an die α-Untereinheit des nikotinischen AChR. Sehnert benutzte eine Affinitätssäule aus α-Cobratoxin, einem 7 kD Protein, immobilisiert an BrCN-aktivierter Sepharose (Fa. Sigma). Der auf der Säule immobilisierte Rezeptor wurde durch Carbamoylcholin von der Säule eluiert. Durch diese zusätzliche Affinitätschromatographie gelang es, den T-AChR ohne Verunreinigung zu isolieren. Zur Vereinfachung des Verfahrens eliminierte Sehnert versuchsweise die Dichtegradientenzentrifugation und trug den in Natriumcholat-haltiger Lösung homogenisierten T-AChR direkt auf die α-Cobratoxin Säule auf. Sehnert konnte gereinigten T-AChR isolieren, blieb allerdings den Beweis schuldig, daß die durch zusätzliche Verunreinigungen stärker belastete Säule nach der Isolierung wieder

regenerierbar ist. Im nachfolgenden Versuch sollte T-AChR nach dem Verfahren von Sehnert isoliert, aber auch die Regenerierbarkeit der α-Cobratoxin Säule überprüft werden. 100 g des elektrischen Organs wurden in Puffer homogenisiert, filtriert und anschließend zentrifugiert. Mit dem Detergenz Natriumcholat wurden die rezeptorhaltigen Membranfragmente mittels Ultraschallbehandlung wieder in Lösung gebracht. Die nicht solvatisierten Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Die verbleibende Lösung wurde auf die α-Cobratoxin Säule aufgetragen, die Säule mit verschiedenen Puffersystemen gewaschen (siehe Kapitel 7.2.4.) und mit 1 M Carbamoylcholin eluiert. Eine zweite Fraktion wurde durch Inkubation der α-Cobratoxin Säule über Nacht mit Elutionspuffer erhalten. Der mit dem BCA-Test bestimmte Proteingehalt der ersten Fraktion betrug 2,8 mg, die zweite Fraktion enthielt 1,6 mg. Die Gesamtausbeute aus 100 g Gewebe betrug somit 4,4 mg. Nachdem die α-Cobratoxin Säule mit verdünnter Essigsäure und Tris-gepufferter NaCl-Lösung, nach dem Verfahren von Mosckovitz, regeneriert wurde [Mosckovitz *et al.*, 1988], konnten diese Werte bei weiteren Isolierungen reproduziert werden.

3.2.1.2. Charakterisierung des T-AChR

Zur Überprüfung des isolierten T-AChR wurden 25 µg der Proteinprobe in der SDS-PAGE eingesetzt. Durch die denaturierende Wirkung von SDS ist ein sich aus den vier verschiedenen Untereinheiten zusammensetzendes Bandenmuster zu erwarten.

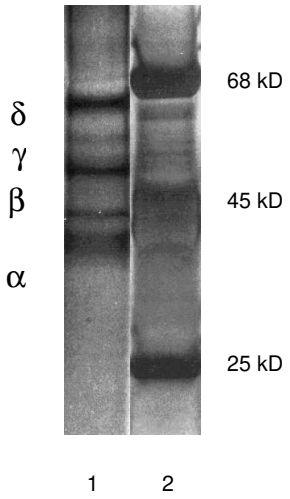


Abbildung 3-1: 10%ige SDS-PAGE mit Silber gefärbt.
Bahn 1: 25 µg Proteinprobe (T-AChR: α: 39 kD, β: 50 kD, γ: 57 kD, δ: 64 kD)
Bahn 2: Marker (68, 45 und 25 kD)

Das Ergebnis der SDS-PAGE stimmte mit den in der Literatur angegebenen Werten der Untereinheiten des T-AChR überein [Tzartos *et al.*, 1981]. Bei ca. 43 kD ist noch eine leichte Verunreinigung zu sehen, die aber in Anbetracht ihrer Stärke im Vergleich zu den Banden der einzelnen Untereinheiten vernachlässigt werden kann.
Zur weiteren Charakterisierung wurde die Proteinlösung im ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay) eingesetzt. Dazu wurde die Proteinlösung mit Coating Puffer auf eine Konzentration von 2 µg/ml eingestellt. Als Negativkontrolle diente Gelonin, eine Positivkontrolle war nicht vorhanden. mAb 35 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ; siehe Kapitel 7.1.5.) und mAb 198 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ, denaturiert) wurden als reaktive Antikörper eingesetzt.

	mAb 35 [A_{405}]	**Bew.**	**mAb 198 [A_{405}]**	**Bew.**
Proteinprobe (2 µg/ml)	0,8 ± 0,05	+	> 2	+
Gelonin (20 µg/ml)	0,02 ± 0,01	-	0,01 ± 0,03	-

Tabelle 3-1: ELISA nach 20 min Inkubationszeit.
Proteinprobe, Konzentration 2 µg/ml
Gelonin als Negativkontrolle, Konzentration 20 µg/ml
Sekundärantikörper: Anti-Ratten-IgG-AP-Konjugat
A_{405} : Absorption bei 405 nm
Bew: Bewertung +: positive Bewertung -: negative Bewertung

Die eingesetzten Antikörper mAb 35 und mAb 198 zeigten eine starke Reaktion mit der Proteinprobe und wie zu erwarten, keine Reaktion mit der Negativkontrolle Gelonin.
Durch die SDS-PAGE und den ELISA konnte die isolierte Proteinprobe eindeutig als T-AChR identifiziert werden.

3.2.1.3. Diskussion

Die Isolierung des T-AChR erfolgte über Affinitätschromatographie an α-Cobratoxin nach einem Verfahren von Sehnert [Sehnert, 1994]. Sehnert setzte vor der Affinitätschromatographie eine Dichtegradientenzentrifugation ein, eliminierte aber diesen Schritt zur Vorreinigung bei einem weiteren Versuch. Trotz Eliminierung des Reinigungsschrittes gelang es Sehnert, den T-AChR ohne Verunreinigungen zu isolieren, allerdings wurde nicht nachgewiesen, daß die durch Verunreinigungen stärker belastete α-Cobratoxin Säule nach dem Verfahren wieder regenerierbar ist.

Die Isolierung des T-AChR wurde nach dem Verfahren von Sehnert ohne Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, wobei auch der Nachweis der Regenerierbarkeit der α-Cobratoxin Säule erbracht werden sollte. Aus 100 g elektrischen Organ konnten 4,4 mg T-AChR isoliert werden. Der isolierte T-AChR zeigte in der SDS-PAGE eine schwache Verunreinigung mit einem etwa 43 kD großen Protein. Die von Sehnert zur Überprüfung der Reinheit des T-AChR durchgeführte SDS-PAGE [Sehnert, 1994] zeigte das erwartete Bandenmuster so schwach, daß es nicht möglich war eine Verunreinigung in dieser Stärke zu detektieren. Diese Verunreinigung trat auch bei der Isolierung des T-AChR von Urbatsch auf, bei der nur die Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt wurde [Urbatsch, 1990]. Urbatsch konnte diese Verunreinigung durch Extraktion mit Diiodosalicylat-Li-Salz (LiS) entfernen. Ohne Extraktion mit LiS ist die Stärke der Proteinbande des 43 kD-Proteins, in der SDS-PAGE, vergleichbar mit der Proteinbande der α-Untereinheit [Hertling-Jaweed *et al.*, 1988]. Da die Verunreinigung bei dieser Isolierung wesentlich geringer war (siehe Abbildung 3-1), wurde auf die Extraktion mit LiS und dem damit verbundenen Verlust an T-AChR verzichtet. Im ELISA reagierten die Antikörper mAb 35 und mAb 198 positiv.
Nach Regenerierung der α-Cobratoxin Säule mit verdünnter Essigsäure und Tris-gepufferter NaCl-Lösung konnte das Verfahren mehrfach mit gleichbleibenden Ausbeuten wiederholt werden. Damit wurde der Beweis erbracht, daß die α-Cobratoxin Säule auch ohne vorherige Dichtegradientenzentrifugation des Rohproduktes wieder regenerierbar ist.
Aufgrund der Ergebnisse der SDS-PAGE und des ELISA´s war es möglich, den isolierten T-AChR zur Induzierung der EAMG in Lewis-Ratten einzusetzen.

3.2.2. Tierversuche

In den Tierversuchen sollte untersucht werden, wie sich das Applikationsschema, daß von Urbatsch zur Induzierung der EAMG in Sprague-Dawley-Ratten verwendet wurde, auf Lewis-Ratten auswirkt. Die Intensität der Erkrankung sollte durch Beurteilung des Verhaltens wie auch über repetitive Serienstimulation elektrophysiologisch bestimmt werden.

3.2.2.1. Induzierung der EAMG in Lewis-Ratten

Vor der Induzierung der EAMG in fünf Lewis-Ratten (weiblich, 12 Wochen alt, Fa. Harlan Winkelmann, Paderborn-Borchen) wurde der T-AChR durch Dialyse gegen PBS, pH 7,2 umgepuffert und auf 1 mg/ml aufkonzentriert.
Der T-AChR-Lösung wurden Ovalbumin und Lochschnecken-Hämocyanin (KLH) zugesetzt. Die Menge der eingesetzten Proteine pro Ratte kann der Tabelle 3-2 entnommen werden. Diese zwei Antigene, die auch bei Urbatsch eingesetzt wurden, sollten als Vergleichsantigene während der Therapie mit Rezeptor-Gelonin-Konjugaten dienen [Urbatsch, 1990].
Zur Einführung autoimmuner Phänomene in Labortieren hat sich der Zusatz von Hitze-inaktivierten Tuberkulose Mikrobakterien in der Ölphase von Wasser-in-Mineralöl-Emulsionen (komplettes Freund´s Adjuvans, CFA) bewährt. Dadurch wird eine starke Immunglobulin-Produktion ausgelöst und die zellvermittelte Immunität wie auch mononukleäre Phagocyten (z.B. Makrophagen) werden verstärkt aktiviert. Ca. 2-3 Wochen nach der Erstimmunisierung empfiehlt sich eine Auffrischungs-Injektion (Boost), um die angelaufene Immunreaktion zu forcieren. Im Gegensatz zur Erstimmunisierung wird der Boost in inkomplettem Freund´s Adjuvans, IFA (Wasser-in-Mineralöl-Emulsion, ohne Hitze-inaktivierte Tuberkulose Mikrobakterien) durchgeführt. Durch die Ölphase entsteht bei den Immunisierungen eine Depotwirkung indem die in die wäßrige Phase dispergierten Antigene langsam in den Körper freigesetzt werden.
Bei der Erstimmunisierung wie auch bei der Auffrischung wurden die Proteinlösungen mit dem vierfachen Volumen an Freund´s Adjuvans versetzt. Die Immunisierung der Versuchstiere erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Injektion, wobei der Boost 25 Tage nach dem Priming durchgeführt wurde.

Injektion	T-AChR	Ovalb.	KLH	CFA	IFA	Ges.-Vol.
Priming	30 µg	20 µg	10 µg	200 µl	-	250 µl
Boost	30 µg	20 µg	10 µg	-	200 µl	250 µl

Tabelle 3-2: Applikationsschema für je eine Lewis-Ratte. Der Boost erfolgte 25 Tage nach dem Priming. Die Injektionen erfolgten intraperitoneal (i.p.).
Ovalb.: Ovalbumin in PBS, pH 7,2
KLH: Lochschnecken-Hämocyanin in PBS, pH 7,2
CFA: komplettes Freund´s Adjuvans
IFA: inkomplettes Freund´s Adjuvans
Ges.-Vol.: Gesamtvolumen der Injektion

3.2.2.2. Krankheitsverlauf und Linderung der Symptome

33 Tage nach dem Priming zeigten sich die ersten myasthenen Symptome bei den Lewis-Ratten. Zur Identifizierung der einzelnen Versuchstiere wurden ihnen Zahlen von 1-5 zugeordnet. Die Ratten 1 und 2 zeigten keine Symptome. Bei den Ratten 3, 4 und 5 trat starkes Zittern auf. Nach körperlicher Anstrengung legten sich diese Ratten mit ausgestrecktem Kopf flach auf den Boden und zeigten somit die für die EAMG typische Körperhaltung [Lennon *et al.*, 1975].

Nachdem die myasthenen Symptome bei den Ratten 3, 4 und 5 am 39. Tag nach dem Priming verstärkt auftraten, wurde diesen Ratten am 40. Tag Mestinon® über das Trinkwasser verabreicht. Der Wirkstoff Pyridostigminbromid in Mestinon® ist ein Acetylcholinesterasehemmer. Durch Erhöhung des Acetylcholinspiegels kommt es zur Abschwächung der myasthenen Symptome. Pyridostigminbromid lindert die Symptome der Krankheit, nimmt jedoch keinen Einfluß auf die pathogene Reduktion funktionstüchtiger AChR in den motorischen Endplatten. In der Diagnose dient es zum eindeutigen Nachweis der Myasthenie [Lennon *et al.*, 1975]. Nach einer oralen Verabreichung von 0,5 mg Pyridostigminbromid in Ratten werden innerhalb von 24 Stunden 42% der Dosis über die Niere und 38,4% über den Darm ausgeschieden [Husain *et al.*, 1968]. Aus diesem Grund ist es notwendig, myasthenen Ratten Mestinon® kontinuierlich über das Trinkwasser zu applizieren.

Ratte 3 verstarb am 41. Tag, nachdem sich die myasthenen Symptome noch weiter verstärkt hatten. Bei den Ratten 4 und 5 trat nach der Mestinongabe eine deutliche Verbesserung des Zustandes auf. Das Zittern stellte sich ein und körperliche Anstrengungen ermüdeten die Tier nicht so schnell wie vor der Mestinongabe. Diesen beiden Ratten wurde weiterhin Mestinon® über das Trinkwasser zugeführt. Am 45. Tag wurde das Medikament abgesetzt und die elektrophysiologischen Untersuchungen am folgenden Tag durchgeführt. Anschließend wurde den Ratten 4 und 5 erneut Mestinon® über das Trinkwasser verabreicht. Auch nach 16 Wochen traten bei probeweisem Absetzen des Medikaments wieder myasthene Symptome auf.

Die Ratten 1 und 2 zeigten vom Tag des Primings bis zur elektrophysiologischen Messung und darüber hinaus eine kontinuierliche Zunahme des Gewichts, während die Ratten 3, 4 und 5 nach dem Boost Gewicht verloren. Bei den Ratten 4 und 5 betrug die Gewichtsreduzierung ca. 10% und 30% bei Ratte 3. Nach der Applikation von Mestinon® stieg das Gewicht der Ratten 4 und 5 wieder kontinuierlich an.

3.2.2.3. Elektrophysiologische Messungen

Die elektrophysiologische Untersuchung der Tiere wurde von Dr. med. J. Zielasek in der Neurologischen Universitätsklinik, Würzburg (Prof. Dr. K.V. Toyka) vorgenommen. Deshalb sei das Prinzip der Messung hier nur kurz erläutert.
Wird mit einer Signalelektrode ein Nerv eines Versuchstieres gereizt, kann mit einer Ableitelektrode an nachfolgenden Muskeln, mit Hilfe eines Oszillographen, die Reizantwort aufgezeichnet werden (siehe a, Abbildung 3-2). Das Signal kann bezüglich Amplitudenhöhe bzw. Fläche unter dem Signal ausgewertet werden. Wird der Nerv eines gesunden Versuchstieres durch mehrere Reize in Folge stimuliert, empfängt die Ableitelektrode Signale mit analogen Zeitabständen und gleichbleibenden Amplitudenhöhen bzw. Flächen unter den Signalen (siehe b, Abbildung 3-2). Bei diesen repetitiven Serienstimulationen sind die Oszillogramme vereinfacht dargestellt. Die Signale sind als Striche abgebildet, wurden aber in Wirklichkeit weiterhin in Form des Einzelsignals (a) vom Oszillograph aufgenommen. Bei myasthenen Versuchstieren nimmt die Amplitudenhöhe und somit auch die Fläche unter den Signalen nach den ersten Stimulierungen ab (siehe c, Abbildung 3-2). Die Abnahme dieser Werte ist ein Maß für die Anzahl der vorhandenen funktionstüchtigen AChR und dient somit der Einschätzung der Störung der neuromuskulären Übertragung [Seybold *et al.*, 1976].

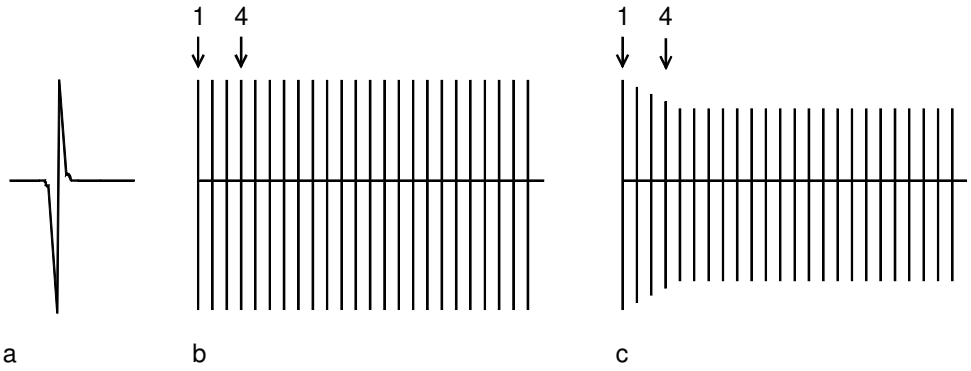


Abbildung 3-2: Oszillogramme von Nervenstimulationen.
a: einfache Stimulation
b: repetitive Serienstimulation bei einem gesunden Versuchstier
c: repetitive Serienstimulation bei einem myasthenen Versuchstier
1,4: Numerierung der Signale

Die Ratten 1, 2, 4 und 5 wurden der repetitiven Serienstimulation unterzogen. Als Kontrolle wurde eine unbehandelte Lewis-Ratte eingesetzt. Während der Untersuchung standen die Tiere unter Narkose mit Hypnorm® (i.p.-Injektion, Wirkstoffe: Fentanyl-Citrat und Fluanison). Mit der Signalelektrode wurde der Ischiasnerv (*Nervus Ischiadicus*) gereizt, die Ableit-

elektrode war in der Muskulatur des Unterschenkels plaziert. Die repetitive Serienstimulation wurde mit einer Frequenz von 10 Hz durchgeführt.
Zur Berechnung der Ergebnisse wurden die Signale der Reizantwort 1 und 4 herangezogen (siehe Abbildung 3-2). Die Fläche unter dem Signal 1 wurde als 100%-Wert festgelegt. Der Meßwert ist die Fläche unter dem Signal 4 und wird im Verhältnis prozentual zum Signal 1 angegeben. Als Dekrement wird die Differenz dieser beiden Prozentwerte bezeichnet. Die einzelnen Messungen wurden viermal wiederholt, in der Tabelle 3-3 sind die Mittelwerte mit Fehlertoleranzen angegeben.

Ratte	Symptome	Meßwert [%]	Dekrement [%]
1	nein	81 ± 1	19 ± 1
2	nein	57 ± 2	43 ± 2
4	ja	37 ± 4	63 ± 4
5	ja	55 ± 3	45 ± 3
Kontrolle	nein	91 ± 1	9 ± 1

Tabelle 3-3: Repetitive Serienstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz.
Signalelektrode: plaziert im Ischiasnerv (*Nervus Ischiadicus*)
Ableitelektrode: plaziert in der Muskulatur des Unterschenkels
Symptome: Auftreten von Zittern und der für myasthene Ratten typischen Körperhaltung nach Belastung.
Meßwert: Fläche unter dem Signal 4 im Verhältnis prozentual zum Signal 1
Dekrement: Differenz zwischen dem Signal 1 (100%) und dem Signal 4 in %

Ein Dekrement >10%, also ein Meßwert <90% gilt als pathologisch [Seybold *et al.*, 1976; Toyka, 1998]. Die Kontrollratte befindet sich somit im Normalbereich. Ratte 1, die weder zitterte noch die für myasthene Tiere typische Körperhaltung aufwies, zeigte auch einen relativ geringen Dekrementwert, während die Ratten 4 und 5, die durch Beobachtung als stark myasthen eingestuft wurden, auch entsprechend höhere Dekrementwerte aufwiesen. Überraschend ist, daß Ratte 2, bei der keine myasthenen Symptome zu beobachten waren, einen vergleichbar hohen Dekrementwert erzielte.

3.2.2.4. Diskussion

Fünf Lewis-Ratten wurden nach dem Schema von Urbatsch mit je 30 µg T-AChR pro Priming und Boost immunisiert [Urbatsch, 1990]. Zwischen Priming und Boost lag ein Abstand von 25 Tagen. 33 Tage nach dem Priming traten bei drei Ratten myasthene Krankheitssymptome auf. Nachdem sich der Gesundheitszustand der drei Ratten verschlechterte, wurde ab dem 40. Tag Mestinon® zugesetzt. Eine dieser drei Ratten verstarb am folgenden Tag. Die Zunahme der myasthenen Symptome vor dem Tod der Ratte wies auf eine verspätete und mengenmäßig nicht ausreichende Verabreichung von Mestinon® hin [Zielasek, 1998]. Der Zustand der beiden verbleibenden Ratten, die myasthene Symptome zeigten, verbesserte sich nach der Gabe von Mestinon® deutlich. Auch die Gewichtsreduzierungen konnten bestoppt werden und es kam zu einer kontinuierlichen Gewichtszunahme. Am 46. Tag wurden die elektrophysiologischen Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse der repetitiven Serienstimulation zeigten, daß bei den vier untersuchten Ratten Dekrementwerte im pathologischen Bereich auftraten, die auf eine Störung der neuromuskulären Übertragung zurückzuführen sind.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Induzierung der EAMG in allen fünf Lewis-Ratten, mit dem Applikationsschema nach Urbatsch, erfolgreich durchgeführt wurde. Da Urbatsch die EAMG in Sprague-Dawley-Ratten induzierte, war dieser Erfolg beim Wechsel zu Lewis-Ratten keine Selbstverständlichkeit. Schon 1980 zeigte Berman, daß ein Wechsel des Mausstammes über Erfolg oder Mißerfolg bei Induzierung der EAMG entscheiden kann [Berman *et al.*, 1980]. Unterschiede in der Auslösung und dem Verlauf der EAMG bei einzelnen Tierstämmen sind durch die unterschiedlichen MHC-Haplotypen bedingt [Berman *et al.*, 1980; Meyer-Rienecker, 1992].

Lennon berichtete, daß bei Lewis-Ratten eine akute Phase zwischen dem 7. und 12. Tag nach einer Immunisierung auftrat und zwischen dem 11. und 15. Tag wieder abklang. Zwischen dem 26. und 35. Tag kam es dann zum Ausbruch der chronischen Erkrankung [Lennon *et al.*, 1975]. Diese akute Phase wurde bei den fünf untersuchten Lewis-Ratten nicht beobachtet. Die bei Lennon aufgetretene akute Phase der EAMG stellte sich allerdings als Artefakt durch das zusätzlich injizierte Adjuvans *Bordetella pertussis* heraus [Lennon *et al.*, 1978]. 33 Tage nach dem Priming konnten bei drei der fünf untersuchten Ratten myasthene Symptome beobachtet werden, die aber irreversibel waren und somit der chronischen Phase zugeordnet wurden.

Bei der repetitiven Serienstimulation gelten Dekrementwerte >10% als pathologisch [Seybold *et al.*, 1976; Toyka, 1998]. Die Ratten mit Dekrementwerten von 45 und 63% zitterten, zeigten die für myasthene Tiere typische Körperhaltung und verloren ca. 10% ihres Gewichts, während die beiden Ratten, die keine dieser Symptome zeigten, Dekrementwerte von 19 und

43% erzielten. Warum eine Ratte mit einem Dekrementwert von 43% keine Krankheitssymptome zeigte, während bei einer anderen Ratte mit einem Dekrementwert von 45% starke Symptome auftraten, bleibt ungeklärt. Anscheinend spielen individuelle Unterschiede der Versuchstiere eine Rolle.

Dies zeigt, daß eine Aussage über den Krankheitszustand der Ratten durch Beurteilung des Verhaltens und Kontrolle des Gewichts nur bedingt möglich ist. Während die durch Beobachtung als myasthen eingestuften Ratten auch pathologische Dekrementwerte aufwiesen, traten bei zwei Ratten trotz pathologischer Dekrementwerte keine erkennbaren Krankheitssymptome auf. Die repetitive Serienstimulation erweist sich, gegenüber der Beurteilung nach Verhalten und Gewichtsänderung, als wesentlich sensitiver. Wie schon erwähnt, zeigen aber auch einige Ratten mit bis zu 60% Verlust der AChR keine klinischen Auffälligkeiten [Lindstrom *et al.*, 1978].

3.3. Zusammenfassung

Um die Wirksamkeit von Gelonin-Konjugaten mit rekombinanten AChR-Fragmenten *in vivo* untersuchen zu können, wurde die EAMG in Lewis-Ratten induziert. Der zur Induzierung der EAMG benötigte AChR wurde aus dem Zitterrochen *Torpedo californica* isoliert.

Die Isolierung des T-AChR erfolgte über Affinitätschromatographie an α-Cobratoxin nach einem Verfahren von Sehnert, basierend auf einem Verfahren von Mosckovitz [Sehnert, 1994; Mosckovitz *et al.*, 1988]. In ersten Versuchen setzte Sehnert vor der Affinitäts-chromatographie noch eine Dichtegradientenzentrifugation ein, um die α-Cobratoxin Säule mit weniger Verunreinigungen zu belasten. Nach einer versuchsweisen Eliminierung des Dichtegradientenzentrifugationsschrittes konnte Sehnert zwar T-AChR ohne größere Verunreinigungen isolieren, blieb allerdings den Beweis schuldig, daß die α-Cobratoxin Säule trotz der höheren Belastung an Verunreinigungen wieder regenerierbar ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der T-AChR isoliert, aber auch der Beweis erbracht, daß die α-Cobratoxin Säule auch ohne Dichtegradientenzentrifugation der Proteinlösung wieder regeneriert werden kann.

Aus 100 g elektrischen Organ konnten, mit Hilfe der α-Cobratoxin Säule ohne Einsatz der Dichtegradientenzentrifugation, 4,4 mg T-AChR isoliert werden. Die SDS-PAGE zeigte eine geringe Verunreinigung mit einem etwa 43 kD großen Protein. Im ELISA reagierten die Antikörper mAb 35 (H-AChR, T-AChR, nativ) und mAb 198 (H-AChR, T-AChR, nativ, denaturiert) stark positiv. Nach Regenerierung der α-Cobratoxin Säule mit verdünnter Essigsäure und Tris-gepufferter NaCl-Lösung, nach dem Verfahren von Mosckovitz [Mosckovitz *et al.*, 1988], konnte der T-AChR mit gleichbleibender Qualität und analogen Ausbeuten wiederholt isoliert werden. Damit wurde der Beweis erbracht, daß die α-Cobratoxin Säule auch ohne vorherige Dichtegradientenzentrifugation wieder regenerierbar ist.

Der isolierte T-AChR wurde zur Induzierung der EAMG in fünf Lewis-Ratten eingesetzt. Die Applikation erfolgte nach dem Schema von Urbatsch, das für die Induzierung der EAMG in Sprague-Dawley-Ratten entwickelt wurde [Urbatsch, 1990]. 30 µg T-AChR und zwei Vergleichsantigene (Ovalbumin und KLH) alle in PBS, pH 7,2, wurden mit dem vierfachen Volumen CFA (komplettes Freund´s Adjuvans) pro Ratte injiziert. Nach 25 Tagen erfolgte ein Boost bei dem CFA durch IFA (inkomplettes Freund´s Adjuvans) ersetzt wurde, alle anderen Komponenten wurden unverändert beibehalten.

33 Tage nach dem Priming konnten bei drei der fünf Lewis-Ratten myasthene Krankheitssymptome beobachtet werden. Die Ratten begannen zu zittern, zeigten die für myasthene Tiere typische Körperhaltung und verloren Gewicht. Da sich die Symptome verstärkten, wurde diesen drei Ratten ab dem 40. Tag der Acetylcholinesterasehemmer Mestinon® über das Trinkwasser zugesetzt. Eine dieser drei Lewis-Ratten verstarb am 41. Tag. Die Zu-

nahme der myasthenen Symptome bei dieser Ratte wiesen auf eine verspätete und nicht ausreichende Aufnahme von Mestinon® hin [Zielasek, 1998]. Die restlichen Ratten mit myasthenen Symptomen reagierte positiv auf die Gabe von Mestinon®. Das Zittern wurde nicht mehr beobachtet und auch nach Anstrengungen zeigte sich die typische Körperhaltung myasthener Tiere nicht mehr. Die aufgetretenen Gewichtsreduzierungen wurden wieder in kontinuierliche Gewichtszunahmen umgewandelt. Den beiden Ratten die weder zitterten, noch die typisch myasthene Köperhaltung zeigten und ihr Gewicht kontinuierlich erhöhten, wurde aufgrund der fehlenden Symptome kein Mestinon® appliziert.

Um eine Quantifizierung der Erkrankung zu ermöglichen, wurden die vier Lewis-Ratten mittels repetitiver Serienstimulation untersucht. Die bei der repetitiven Serienstimulation erhaltenen Dekrementwerte sind ein Maß für die Anzahl der vorhandenen funktionstüchtigen AChR und dienen somit der Einschätzung der Störung der neuromuskulären Übertragung [Seybold *et al.*, 1976]. Ein Dekrement >10% gilt als pathologisch [Seybold *et al.*, 1976; Toyka, 1998]. Eine, als Kontrolle eingesetzte, Lewis-Ratte zeigte in der repetitiven Serienstimulation ein Dekrement von 9% und lag somit noch im Normalbereich von gesunden Tieren. Die beiden Ratten die zitterten, die typischen myasthene Körperhaltung zeigten und Gewicht verloren wiesen Dekrementwerte von 45 und 63% auf, während bei den beiden Ratten ohne diese Symptome Dekrementwerte von 19 und 43% gemessen wurden. Die Messungen zeigen, daß die funktionsfähigen AChR in allen vier untersuchten Ratten reduziert waren. Da bei zwei dieser vier Ratten keine myasthenen Symptome beobachtet werden konnten zeigt sich, daß die repetitive Serienstimulation sensitiver ist als die Beurteilung der Ratten aufgrund des Verhaltens und der Kontrolle des Gewichts. Trotz vergleichbarer Dekrementwerte bestehen aber auch individuelle Unterschiede im Hinblick auf Verhalten und Gewichtsänderungen bei myasthenen Lewis-Ratten.

Da in allen fünf Lewis-Ratten die EAMG induziert werden konnte zeigte sich, daß das von Urbatsch zur Induzierung der EAMG in Sprague-Dawley-Ratten genutzte Applikationsschema auch auf Lewis-Ratten übertragbar ist.

Weiterhin zeigte sich, daß zur Überprüfung der Schwere der Erkrankung bei myasthenen Versuchstieren, wie auch deren antigenspezifische, immunsuppressive Therapie durch AChR-Gelonin-Konjugate die repetitive Serienstimulation benutzt werden sollte. Die Beurteilung aufgrund des Verhaltens und der Gewichtsänderung erwies sich als nicht ausreichend. Es wurde nachgewiesen, daß Tiere mit pathologisch reduzierter Anzahl funktionsfähiger AChR die myasthenen Symptome wie Zittern, die typische Körperhaltung nach Anstrengungen oder Gewichtsreduzierungen nicht zwangsläufig zeigten.

4. Expression rekombinanter AChR-Fragmente

4.1. Aufgabenstellung

Die antigenspezifische Immunsuppression mit Hilfe von AChR-Toxin-Konjugaten ist eine vielversprechende Methode zur Therapie der *Myasthenia gravis*, da gezielt nur die autoantigenen Immunzellen ausgeschaltet werden. Urbatsch setzte in *in vivo* Versuchen zur antigenspezifischen Immunsuppression den aus *Torpedo californica* isolierten AChR ein [Urbatsch, 1990]. Durch das hohe Molekulargewicht von 250 kD des T-AChR gelang es nicht, das T-AChR-Toxin-Konjugat vollständig von freiem T-AChR abzutrennen. Dazu kam ein mit der Therapie einhergehender Anstieg des Antikörpertiters gegen den AChR. Eine mögliche Ursache könnten unerwünschte Immunreaktionen gegen pathologisch nicht relevante Teile des in den Konjugaten verwendeten T-AChR, wie auch gegen den freien Rezeptor sein. Durch die Gefahr der Re-Immunisierung ist die Anwendung auf das Tiermodell beschränkt. Im Hinblick auf die humane Therapie scheinen kleinere Proteine oder gar Peptide, welche die MIR-Sequenz enthalten, geeigneter. Tzartos wies 1988 nach, daß über 60% der Anti-AChR-Antikörper von Patienten wie auch myasthenen Tieren, bei denen die EAMG mit nativem AChR induziert wurde, gegen die MIR gerichtet sind [Tzartos *et al.*, 1988]. Die Verwendung kleinerer Proteine bzw. Peptide erleichtert die Abtrennung von freiem Rezeptor bei der AChR-Toxin-Konjugat-Synthese und verhindert somit die durch freien Rezeptor induzierte Re-Immunisierung. Des weiteren sinkt auch die Gefahr der unerwünschten Immunreaktionen gegen pathologisch irrelevante Bereiche, je kleiner die verwendeten AChR-Komponenten in den AChR-Toxin-Konjugaten sind.

Seit einiger Zeit beschäftigen sich mehrere Arbeitsgruppen mit der Expression von AChR-Fragmenten in *E. coli* [Beeson *et al.*, 1989; Talib *et al.*, 1991]. Rousselle versuchte die α-Untereinheit (αE501) und den extrazellulären Teil der α-Untereinheit (αR506) des humanen nicotinischen AChR gentechnisch zu isolieren. Bei der Expression dieser AChR-Fragmente in *E. coli* wurden denaturierte, unlösliche *inclusion bodies* erhalten [Rousselle, 1996]. Dieses Phänomen liegt unter anderem in der hydrophoben Struktur der Proteine begründet und ist literaturbekannt [Voltz *et al.*, 1997; Barchan *et al.*, 1998; Diethelm-Okita *et al.*, 1998].

Die Ausbildung von *inclusion bodies* bei cytosolischer Expression rekombinanter Proteine in Mikroorganismen ist aber weniger mit den molekularen Charakteristika, wie Größe der Polypeptidkette, Untereinheitenstruktur oder der relativen Hydrophobizität des rekombinanten Proteins verbunden [Rudolph, 1995]. Bei entsprechend hoher Expression bilden sowohl heterologe als auch homologe Proteine aus der Wirtszelle unlösliche Aggregate. Es wird vermutet, daß aufgrund der kinetischen Konkurrenz zwischen Faltung und Aggregation eine

massive Überexpression die Ausbildung unlöslicher Aggregate begünstigt [Kiefhaber *et al.*, 1991]. Problematisch ist auch die intrazelluläre Produktion disulfidverbrückter Proteine, da im reduzierenden Cytosol die Oxidation zur Ausbildung der nativen Disulfidbrücken kaum möglich ist [Rudolph *et al.*, 1997].

Die Versuche von Rousselle, die aggregierten Peptide durch Verdünnung oder mit Hilfe von Detergenzien zu renaturieren, erzielten nur unbefriedigende Resultate. Mit einem Detergenssystem aus 40 mM n-Octyl-β-D-glucopyranosid (Octylglucosid), 10 mM 3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) konnte bei den AChR-Fragmenten eine Konzentration von maximal 800 µg/ml erzielt werden. Die relativ geringen Konzentrationen weisen auf eine nicht korrekte Faltung der AChR-Fragmente hin. Weitere Probleme zeigten sich in der Reproduzierbarkeit der Isolierung in Hinblick auf die Ausbeuten und den Reinheitsgrad [Rousselle, 1996].

In der vorliegenden Arbeit sollte durch Koexpression von Chaperonen der Anteil an nativen AChR-Fragmenten erhöht werden. Die Bedeutung der Chaperone bei der korrekten Faltung von Proteinen *in vivo* wurde in den letzten Jahren erkannt. Der natürliche Gehalt an Chaperonen in den Bakterienzellen reicht offensichtlich nicht aus, die AChR-Untereinheiten nativ zu falten. Durch die zusätzliche Anwesenheit des Plasmids pGroESL läßt sich der Anteil an Chaperoninen stark erhöhen und eventuell können nativ gefaltete, wasserlösliche AChR-Untereinheiten erhalten werden.

Zur angestrebten präparativen Konjugatsynthese werden Ausbeuten im mg-Bereich benötigt und das Protein muß in sehr reiner Form isoliert werden, da das Immunsystem auch auf geringe Verunreinigungen mit bakteriellen Proteinen stark anspricht [Diethelm-Okita *et al.*, 1998].

Alle in dieser Arbeit verwendeten AChR-Plasmide wurden freundlicherweise von Herrn Dr. D. Beeson (Institute of Molecular Medicine, Oxford) zur Verfügung gestellt und waren humanen Ursprungs.

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Versuche mit dem Plasmid pαR506

Da Chaperone die korrekte Faltung von Proteinen *in vivo* unterstützen, sollte durch Koexpression eines AChR-Fragmentes mit GroEL/GroES der natürliche Gehalt an Chaperonen in den Bakterienzellen und somit die Löslichkeit des Rezeptorproteins erhöht werden.
Als Rezeptorfragment wurde αR506 (ex-α-H-AChR, AS 37-180) gewählt. Das Fragment enthält nur den hydrophileren extrazellulären Teil der α-Untereinheit des Rezeptors und die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Faltung ist somit höher als bei der kompletten α-Untereinheit. Das AChR-Gen wurde von Beeson in den Vektor pKK 233-2 (Fa. Pharmacia-Biotech, siehe Anhang) einkloniert und das Plasmid Herrn Dr. H.-P. Rousselle (Fachbereich Chemie, Universität Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt.

4.2.1.1. Charakterisierung der Plasmide pαR506 und pGroESL

Die Charakterisierung des Plasmids pαR506 wurde 1998 von Frau Z.Y. Li (Fachbereich Chemie, Universität Kaiserslautern) durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid pαR506 durch eine Plasmid-Minipräparation (Alkalische-Lyse-Methode) aus dem *E. coli*-Stamm RB791 isoliert. Zur Charakterisierung erfolgte eine Agarosegel-Elektrophorese und eine Sequenzierung. Die Ergebnisse bestätigten das Vorliegen des korrekten Plasmids [Li, 1998].
Das von Frau Dr. P. Guhr (Fachbereich Chemie, Universität Kaiserslautern) freundlicherweise zur Verfügung gestellte Plasmid pGroESL wurde durch Restriktionsverdau mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese charakterisiert.
In der publizierten Nukleotidsequenz des Plasmids pGroESL ist eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sma*I bei der Base 3.907 vorhanden [Goloubinoff *et al.*, 1989]. Da in diesem Plasmid nur eine Schnittstelle für *Sma*I enthalten ist, wurde in der Agarosegel-Elektrophorese eine Bande mit einer Größe von 6.564 bp erwartet.
Wie in Abbildung 4-1 zu sehen ist, verdaut *Sma*I pGroESL und es erscheint eine Bande bei ca. 6.600 bp. Da das eingesetzte Plasmid eine *Sma*I-Schnittstelle besitzt und auch die erwartete Größe aufweist, ist das Vorliegen des korrekten Plasmids anzunehmen.

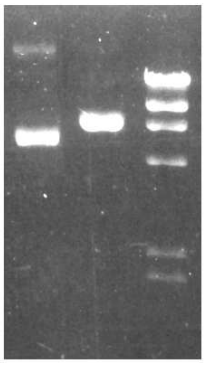


Abbildung 4-1: 0,9%iges Agarosegel zur Überprüfung des Plasmids pGroESL.
Bahn 1: pGroESL unverdaut
Bahn 2: pGroESL verdaut mit *Sma*I
Bahn 3: Marker λ-Phage mit *Hin*dIII (23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322 und 2.027 bp)

4.2.1.2. Koexpression der Plasmide pαR506 und pGroESL

Kompetente DH5α-Zellen wurden mit pGroESL transformiert, anschließend erneut kompetent gemacht und mit pαR506 transformiert. Da pGroESL ein Resistenzgen gegen Chloramphenicol trägt, wurde bei der ersten Transformation LBC-Medium (LB-Medium mit Chloramphenicol) verwendet, bei der nachfolgenden Transformation mit pαR506 (resistent gegen Ampicillin) wurde zu LBAC-Medium (LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol) gewechselt. Somit konnte sichergestellt werden, daß nur Klone selektiert wurden, die neben pGroESL auch pαR506 enthalten. Die Zellen wurden über Nacht in LBAC-Medium kultiviert. Mit 20 ml dieser Übernachtkultur wurden 500 ml LBAC-Medium angeimpft. Bei einer OD_{595} von etwa 0,5 bis 0,6 wurde die Proteinexpression mit 0,5 mmol/l IPTG induziert. Die Expression wurde bei einer OD_{595} von 1,0 abgebrochen.
Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in 50 ml 25 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 mg/ml Lysozym (Lysozymlösung) mit Ultraschall unter Eiskühlung lysiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt.
Insgesamt konnten im Überstand 116 mg Protein bestimmt werden. Diese Lösung wurde auf 5 ml aufkonzentriert und eine Proteinkonzentration von 12,5 mg/ml ermittelt.

4.2.1.3. Aufarbeitung und Charakterisierung des Expressionsproduktes

Das Proteinkonzentrat wurde in 100 µl Proben auf eine Gelfiltrationssäule (Superose 12, l = 30 cm, ∅ = 1,4 cm, FPLC-System) aufgetragen. Eluiert wurde mit PBS, pH 7,2 bei einer Flußrate von 0,4 ml/min.

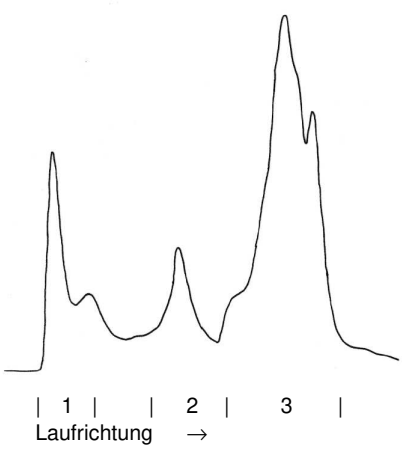


Abbildung 4-2: Elutionsdiagramm des Expressionsproduktes von DH5α/pGroESL/pαR506.
Die Zahlen 1-3 geben die Numerierungen der gesammelten Fraktionen an.
Säulenmaterial: Superose 12 (l = 30 cm, ∅ = 1,4 cm)
Elutionsmittel: PBS, pH 7,2 Flußrate: 0,4 ml/min
Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 277 nm.

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch einen BCA-Test bestimmt und lag zwischen 10 und 20 µg/ml. Für die nachfolgende SDS-PAGE wurden jeweils 10 µg Protein mit TCA gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und in der SDS-PAGE eingesetzt.

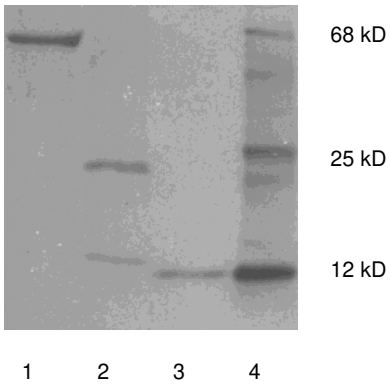


Abbildung 4-3: 7,5%ige SDS-PAGE mit Coomassie-Blau gefärbt.
Bahn 1: Fraktion 1, 10 µg Protein
Bahn 2: Fraktion 2, 10 µg Protein
Bahn 3: Fraktion 3, 10 µg Protein
Bahn 4: Marker (68, 25 und 12 kD)

Die SDS-PAGE zeigt in Fraktion 1 eine Proteinbande im Bereich der GroEL-Untereinheiten (57 kD). In der Fraktion 2 sind zwei Proteine zu erkennen. Beim Protein mit der Größe von ca. 22 kD könnte es sich um αR506 handeln. Das AChR-Fragment αR506 hat zwar eine Größe von 16,8 kD, erscheint aber durch Migrationseigenschaften in der SDS-PAGE bei 22 kD. Dieser Effekt ist bekannt; er wurde bereits 1981 von Sumikawa beschrieben und 1996 von Rousselle für das AChR-Fragment αR506 bestätigt [Sumikawa *et al.*, 1981; Rousselle, 1996]. Das zweite Protein hat ein Molekulargewicht von etwa 14 kD, hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Lysozym, welches zur Lyse der Zellen zugesetzt wurde. Die Proteinbande in Fraktion 3 wurde den GroES-Untereinheiten (10 kD) zugeordnet.

Zur Identifizierung der Proteinbande von 22 kD in Fraktion 2 wurde nach der SDS-PAGE ein Western Blot durchgeführt. Als Primärantikörper diente mAb 198 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ, denaturiert), der mit der denaturierten, wie auch der nativen Form der MIR des humanen AChR positiv reagiert. Die Affinität des mAb 198 zur denaturierten Form der MIR ist allerdings wesentlich schwächer als zur nativen Form [Loutrari *et al.*, 1997]. Durch die schwache Affinität zur denaturierten Form der MIR kann es so zu einer negativen Reaktion im Western Blot kommen, obwohl Fragmente des H-AChR mit der MIR vorliegen. Im durchgeführten Western Blot konnte keine positive Reaktion detektiert werden.

Im Western Blot liegen die Proteine in denaturierter und nicht in nativer Form vor. Da im ELISA die Proteine nicht denaturiert werden, können auch die Antikörper mAb 35 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ) und mAb 192 (Spezifität: H-AChR, nativ), beide MIR-Antikörper die nur mit nativ gefaltetem Protein reagieren, eingesetzt werden. Durch die höhere Affinität des mAb 198 zur nativen MIR steigt auch die Sensibilität im ELISA gegenüber dem Western Blot. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß einer positiven Reaktion nicht direkt die entsprechende Proteinbande in der SDS-PAGE zugeordnet werden kann.

Zum Einsatz im ELISA wurde die Fraktion 2, mit Coating Puffer auf eine Konzentration von 20 µg/ml eingestellt und auf die ELISA-Platte aufgetragen. Als Positivkontrolle diente isolierter T-AChR aus *Torpedo californica* (siehe Kapitel 3.2.1.1.), als Negativkontrolle Gelonin. Als Antikörper wurden mAb 35, mAb 192 und mAb 198 eingesetzt.

	mAb 35 [A_{405}]	**Bew.**	**mAb 192 [A_{405}]**	**Bew.**	**mAb 198 [A_{405}]**	**Bew.**
Fraktion 2 (20 µg/ml)	0,01 ± 0,01	-	0,01 ± 0,03	-	0,03 ± 0,02	-
T-AChR (5 µg/ml)	1,17 ± 0,04	+	0,01 ± 0,01	-	> 2	+
Gelonin (20 µg/ml)	0,01 ± 0,02	-	0,01 ± 0,03	-	0,01 ± 0,01	-

Tabelle 4-1: ELISA nach 20 min Inkubationszeit.
Fraktion 2 des Elutionsdiagramms (Abbildung 4-2), Konzentration 20 µg/ml
T-AChR als Positivkontrolle für die Antikörper mAb 35 und mAb 198, Konzentration 5 µg/ml
Gelonin als Negativkontrolle, Konzentration 20 µg/ml
Primärantikörper: mAb 35, mAb 192 und mAb 198
Sekundärantikörper: Anti-Ratten-IgG-AP-Konjugat
A_{405} : Absorption bei 405 nm
Bew.: Bewertung +: positive Bewertung -: negative Bewertung

Fraktion 2 reagierte mit keinem der drei eingesetzten Antikörper im ELISA. Durch den Einsatz von T-AChR als Positivkontrolle konnte nachgewiesen werden, daß die Antikörper mAb 35 und mAb 198 funktionsfähig waren. Der Antikörper mAb 192 blieb diesen Nachweis schuldig, da kein nativer humaner AChR, der als Positivkontrolle hätte fungieren können, vorhanden war. Die Negativkontrolle mit Gelonin ergab, wie zu erwarten, keine positive Reaktion. Somit konnte die Proteinbande in Fraktion 2 nicht als Protein αR506 identifiziert werden.

4.2.1.4. Diskussion

Die Sequenzierung wie auch die Restriktion und Agarosegel-Elektrophorese des Plasmids pαR506, durchgeführt von Frau Z.Y. Li (Fachbereich Chemie, Universität Kaiserslautern), bestätigten das Vorliegen des korrekten Plasmids [Li, 1998]. Die Restriktion und Agarosegel-Elektrophorese zeigten auch für das Plasmid pGroESL die, anhand der publizierten Nukleotidsequenz [Goloubinoff *et al.*, 1989], zu erwartenden Ergebnisse.
Da die verwendeten DH5α-Zellen nach der Transformation mit diesen beiden Plasmiden, sowohl gegen Ampicillin, wie auch Choramphenicol resistent waren, konnte gezeigt werden, daß die Kotransformation erfolgreich durchgeführt wurde.
Nach der Lyse der exprimierten Zellen und dem Abtrennen der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation wurde die verbleibende Lösung zur Aufreinigung der Proteine einer

Gelfiltration (Superose 12) unterworfen. Die nach der Auftrennung über Superose 12 durchgeführte SDS-PAGE zeigte eine Bande in Fraktion 2 mit einem Molekulargewicht, das dem des AChR-Fragment αR506 entspricht, wenn dessen Migrationseigenschaften berücksichtigt werden. Allerdings zeigten die Antikörper im Western Blot wie auch im ELISA keine positive Reaktion. Zur Erklärung dieser Ergebnisse gibt es mehrere Möglichkeiten.

a.) Keine AChR-Fragmente traten im Überstand auf, sondern lagen als *inclusion bodies* im Pellet vor. Das Pellet wurde nicht untersucht, da durch die Koexpression mit Chaperonen AChR-Proteine in nativer und somit löslicher Form erwartet wurden. Da Rousselle in früheren Versuchen die Pellets von pαR506 nur mit mäßigem Erfolg aufarbeitete, wurde in diesem Fall darauf verzichtet [Rousselle, 1996].
b.) Beeson entdeckte 1990, daß die α-Untereinheit des humanen nikotinischen AChR in zwei Isoformen existiert [Beeson *et al.*, 1990]. Zwischen dem Exon P3 und dem Exon P4 wurde eine zusätzliche 75 bp lange codierende Sequenz gefunden. Dieses Exon, das P3A genannt wurde, liegt auch im Plasmid pαR506 vor. Die dadurch auftretenden 25 Aminosäuren befinden sich zwischen den Aminosäuren 58 und 59 der ursprünglichen Sequenz. Wahrscheinlich haben diese zusätzlichen Aminosäuren einen Einfluß auf die native Faltung des rekombinanten AChR-Fragments.
c.) Die durch das P3A Exon zusätzlich auftretenden Aminosäuren sind in nächster Nähe zur MIR (AS 67 bis 76) plaziert. Eventuell wird dadurch die Antikörperbindung in der MIR-Region behindert. Somit ist ein eventuell aufgetretenes natives AChR-Fragment trotz der negativen Reaktion der Antikörper nicht ausgeschlossen.

Um die Expressionsprodukte der Koexpression von pGroESL und pαR506 genauer zu untersuchen, wären weitere Expressionen notwendig gewesen. Da aber der Einfluß des P3A Exons auf die native Faltung des AChR-Fragmentes bzw. die Antikörperbindung nicht näher bekannt war, wurde der Wechsel zu P3A-freien Plasmiden bevorzugt.

4.2.2. Versuche mit den Plasmiden pαE506 und pαE701

Die Plasmide pαE506 (ex-α-H-AChR, AS 37-186) und pαE701 (α-H-AChR, AS 1-437) wurden von Beeson in einen modifizierten pKK 233-2 Vektor (ursprünglicher Vektor: Fa. Pharmacia-Biotech) einkloniert. Um Verwechslungen zu vermeiden, wird der modifizierte Vektor pKK 233-2* genannt. Beeson machte keine Angaben über die Modifizierung des Vektors, sicher war aber, daß beide Plasmide kein P3A-Exon enthielten.

4.2.2.1. Charakterisierung der Plasmide pαE506 und pαE701

Zur Charakterisierung bzw. weiteren Plasmidgewinnung wurden die beiden Plasmide jeweils in den *E. coli*-Stamm DH5α transformiert und erneut durch eine Plasmid-Minipräparation isoliert. Durch einen Restriktionsverdau und anschließende Überprüfung in der Agarosegel-Elektrophorese wurden die Plasmide charakterisiert. Als Restriktionsenzyme wurden *Eco*52I, *Bgl*II und *Sma*I eingesetzt. Während die *Sma*I-Schnittstelle nur im Plasmid pαE701 enthalten ist, befindet sich die *Bgl*II-Schnittstelle in beiden Plasmiden.

Plasmid	*Eco*52I	*Bgl*II	*Sma*I
pαE506	pKK 233-2 (567)	AChR (359)	-
pαE701	pKK 233-2 (567)	AChR (359)	AChR (650)

Tabelle 4-2: Bestimmung der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme im jeweiligen Plasmid, anhand der publizierten Nukleotidsequenzen [Noda *et al.*, 1983; Fa. Pharmacia-Biotech, Produktbeschreibung]. Die Ziffern in den Klammern bezeichnen das Basenpaar, bei dem die Restriktionsstelle liegt. Die DNA-Sequenzen, auf die sich die Zahlen beziehen, sind im Anhang graphisch dargestellt.

Die Plasmide wurden mit den in Tabelle 4-2 angegebenen Enzymen verdaut und die Größe der entstandenen DNA-Stücke durch Vergleich mit einem Marker bekannter Fragmentgröße auf 0,9%igem Agarosegel bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-3 aufgeführt.

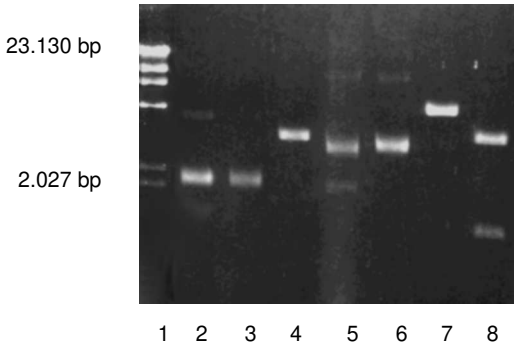


Abbildung 4-4: 0,9%iges Agarosegel zur Überprüfung der Plasmide pαE506 und pαE701.
Bahn 1: Marker λ-Phage mit *Hin*dIII (23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322 und 2.027 bp)
Bahn 2: pαE506 unverdaut
Bahn 3: pαE506 verdaut mit *Eco*52I
Bahn 4: pαE506 verdaut mit *Bgl*II
Bahn 5: pαE701 unverdaut
Bahn 6: pαE701 verdaut mit *Eco*52I
Bahn 7: pαE701 verdaut mit *Bgl*II
Bahn 8: pαE701 verdaut mit *Sma*I

Plasmid	***Eco*52I**	***Bgl*II**	***Sma*I**
pαE506	n.v.	3.200	-
pαE701	n.v.	4.100	3.000 / 1.100

Tabelle 4-3: Größe der im Agarosegel erkennbaren Plasmidfragmente, die durch den Restriktionsverdau entstanden sind.
Angaben in [bp]
n.v.: nicht verdaut
-: Versuch nicht durchgeführt

Die mit *Bgl*II verdauten Plasmide sind kleiner als der Ausgangsvektor pKK 233-2 mit 4.593 bp und beiden Plasmiden fehlt die erwartete *Eco*52I-Schnittstelle. Daraus läßt sich ableiten, daß Beeson den Vektor pKK 233-2 durch die Entfernung eines Sequenzbereiches modifizierte. Allerdings wurden beim Verdau mit *Sma*I zwei Bruchstücke von 3.000 bp und 1.100 bp gefunden. Dies läßt auf eine zusätzliche *Sma*I-Schnittstelle im Vektor schließen. Der Verdau von pαE506 mit *Sma*I wurde nicht durchgeführt, da im extrazellulären Teil des α-AChR wie auch im modifizierten Vektor pKK 233-2* keine passende Schnittstelle erwartet wurde. Der Größenunterschied zwischen pαE506 und pαE701 entspricht ungefähr der Differenz der unterschiedlichen AChR-Gene (250 AS = 750 bp) in den beiden Plasmiden.

4.2.2.2. Koexpression von pαE506 bzw. pαE701 mit pGroESL

Kompetente DH5α-Stammzellen wurden erst mit pGroESL und anschließend mit pαE506 bzw. pαE701 transformiert. Diese Zellen wurden über Nacht in LBAC-Medium kultiviert. Da die transformierten Stammzellen gegen Ampicillin wie auch gegen Chloramphenicol resistent waren, konnte gefolgert werden, daß die Transformationen mit pGroESL und dem entsprechenden Rezeptorplasmid erfolgreich durchgeführt worden waren.
Mit 20 ml dieser Übernachtkulturen von pGroESL/pαE506 bzw. pGroESL/pαE701 kotransformierten DH5α-Zellen wurden jeweils 500 ml LBAC-Medium beimpft. Bei einer OD_{595} von etwa 0,5 bis 0,6 wurde jeweils 0,5 mmol/l IPTG zugesetzt und das Wachstum vor Erreichen der stationären Phase bei einer OD_{595} von etwa 3 bis 4 abgebrochen. Nach Zentrifugation der Zellsuspensionen wurden die Zellpellets in 50 ml Lysozymlösung mit Ultraschall unter Eiskühlung lysiert und danach die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation entfernt. Die Lösungen wurden auf ca. 5 ml aufkonzentriert.

4.2.2.3. Aufarbeitung und Charakterisierung der Expressionsprodukte

Die aufkonzentrierten Lösungen wurden jeweils in 100 µl Aliquoten auf eine Gelfiltrationssäule (Superose 12, l = 30 cm, ∅ = 1,4 cm, FPLC-System) aufgetragen. Eluiert wurde mit PBS, pH 7,2 bei einer Flußrate von 0,4 ml/min.

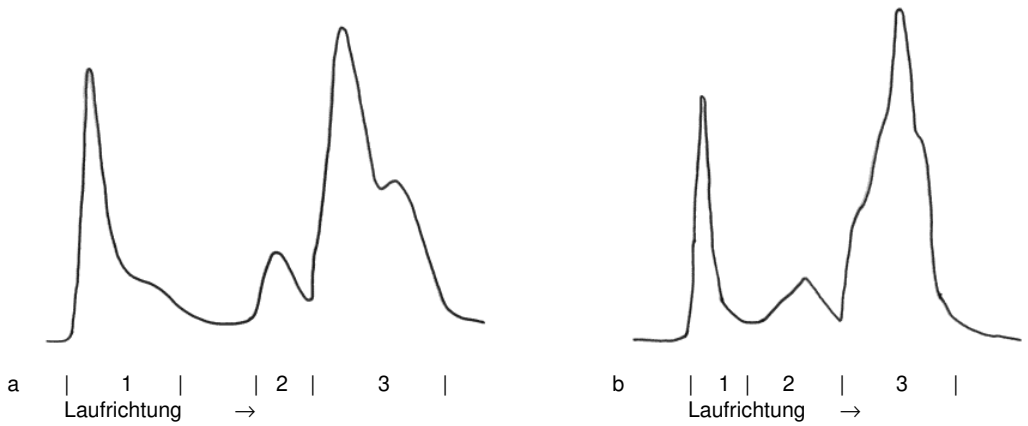


Abbildung 4-5: Elutionsdiagramme der Expressionsprodukte von
a: DH5α/pGroESL/pαE506
b: DH5α/pGroESL/pαE701
Die Zahlen 1–3 geben die Numerierungen der gesammelten Fraktionen an.
Säulenmaterial: Superose 12 (l = 30 cm, ∅ = 1,4 cm)
Elutionsmittel: PBS, pH 7,2 Flußrate: 0,4 ml/min
Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 277 nm.

Die Konzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden im BCA-Test bestimmt. Jeweils 50 µg Protein wurde mit TCA gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und in der SDS-PAGE eingesetzt. In Fraktion 2 konnte bei beiden Expressionsprodukten eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 22 kD detektiert werden. Da jedoch nur das Protein αE506 ein entsprechendes Molekulargewicht aufweist, die Bande aber in beiden Expressionsprodukten vorlag, ist anzunehmen, daß es sich bei diesem Protein nicht um ein Fragment des AChR handelt. Die Ergebnisse der SDS-PAGE sind hier nicht abgebildet, da sie vollständig mit der SDS-PAGE des Expressionsproduktes von DH5α/pGroESL/pαR506, nach der Gelfiltration, in Abbildung 4-2 übereinstimmen.

Da keine AChR-Fragmente gefunden wurden, bestand die Möglichkeit, daß sie exprimiert, aber während des weiteren Verlaufes der Expression wieder abgebaut wurden. Die Überprüfung dieser Möglichkeit sollte mit dem Plasmid pαE506 durchgeführt werden. DH5α-Zellen wurden erneut mit pGroESL/pαE506 in 500 ml LBAC-Medium herangezogen und bei einer OD_{595} von 0,5 mit 0,5 mmol/l IPTG induziert. Zur Kontrolle wurden die gleiche Zell-Plasmid-Kombination ohne Induzierung mit IPTG, wie auch DH5α-Zellen mit pαE506 induziert mit IPTG in LB-Medium, mit den jeweils entsprechenden Antibiotika-Kombinationen, herangezogen. Sobald die Kulturen den stationären Zustand erreichten, wurde das Wachstum abgebrochen.

Durch diese Vorgehensweise sollte zusätzlich herausgefunden werden, ob es Unterschiede in der Proteinproduktion zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen gibt und andererseits welche Unterschiede zwischen Chaperonin-angereicherten und „normalen“ Expressionsstämmen bestehen. Während der Inkubation wurden mehrmals 2 ml aus den jeweiligen Zellsuspensionen entnommen und direkt zentrifugiert.

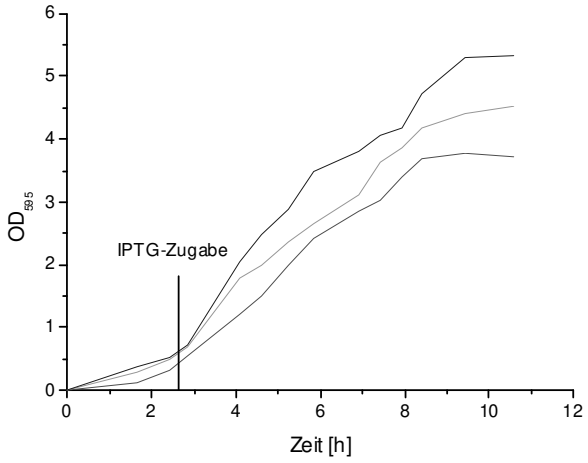


Abbildung 4-6: Wachstumskurven von
blau: DH5α/pGroESL/pαE506 ohne IPTG
grün: DH5α/pGroESL/pαE506 mit IPTG
rot: DH5α/pαE506 mit IPTG

Die nicht induzierte Kultur von DH5α/pGroESL/pαE506 (blau) wuchs stärker als die mit IPTG induzierte Kultur (grün). Das schwächste Wachstum zeigte die induzierte DH5α/pαE506-Kultur (rot). Die Verhältnisse der verschiedenen Wachstumskurven zueinander sind wenig aussagekräftig, zum einen zeigt der unstetige Kurvenverlauf, daß es zu Ungenauigkeiten bei der OD_{595}-Bestimmung kam, zum anderen wurde der Versuch nur einmal durchgeführt und somit ist eine Abschätzung des Fehlerbereiches nicht möglich.
Die nach der Zentrifugation vorliegenden Pellets wurden in 500 µl Lysozymlösung aufgenommen, mit Ultraschall behandelt, erneut zentrifugiert und Überstand und Pellet getrennt. Die Pellets wurden in 500 µl Lysozympuffer (ohne Lysozym) resuspendiert. Um vergleichbare Ergebnisse für lipidhaltige und membranfreie Proben zu erhalten, wurde der Proteingehalt nach der Lowry-Methode bestimmt. Jeweils 100 µg Protein wurden in der SDS-PAGE analysiert.

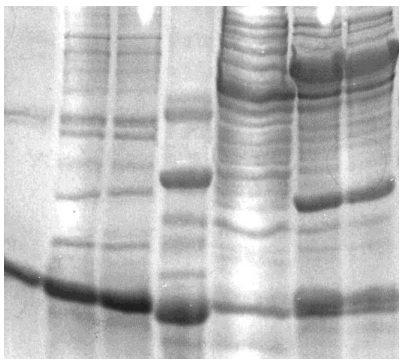


Abbildung 4-7: 15%ige SDS-PAGE mit Coomassie-Blau gefärbt
Bahn 1: Pellet DH5α/pαE506 mit IPTG, 100 µg Protein
Bahn 2: Pellet DH5α /pGroESL/pαE506 mit IPTG, 100 µg Protein
Bahn 3: Pellet DH5α/pGroESL/pαE506 ohne IPTG, 100 µg Protein
Bahn 4: Marker (45, 25 und 12 kD)
Bahn 5: Überstand DH5α/pαE506 mit IPTG, 100 µg Protein
Bahn 6: Überstand DH5α/pGroESL/pαE506 mit IPTG, 100 µg Protein
Bahn 7: Überstand DH5α/pGroESL/pαE506 ohne IPTG, 100 µg Protein

Die Expressionsprodukte von DH5α/pαE506 mit IPTG (Pellet: Bahn 1, Überstand: Bahn 5) unterscheiden sich von den Produkten der Kulturen DH5α/pGroESL/pαE506 mit IPTG (Pellet: Bahn 2, Überstand: Bahn 6) und DH5α/pGroESL/pαE506 ohne IPTG (Pellet: Bahn 3, Überstand: Bahn 7), die beiden letztgenannten Kulturen weisen keine erkennbaren Unterschiede in der Proteinzusammensetzung auf. In den Überständen von DH5α/pGroESL/pαE506 mit IPTG (Bahn 6) und DH5α/pGroESL/pαE506 ohne IPTG (Bahn 7) können die Banden von GroEL (57 kD) und GroES (10 kD) erkannt werden, zusätzlich

taucht bei ca. 22 kD eine Bande auf, die allerdings auch bei der Expression von DH5α/pGroESL/pαE701 aufgetreten war. Ein Auftreten dieser Bande auch ohne Induktion durch IPTG (Bahn 7) ist ein weiterer Hinweis, daß es sich hierbei nicht um ein AChR-Fragment handelt. Bei der Bande mit ca. 14 kD, die in allen Ansätzen im Pellet wie auch im Überstand vorkommt, handelt es sich vermutlich um das zur Lyse der Bakterienzellen eingesetzte Lysozym.
Die Pellets bzw. Überstände der zu unterschiedlichen Zeiten entnommenen Proben wiesen in der SDS-PAGE ein gleichbleibendes Bandenmuster auf (hier nicht gezeigt, da die jeweiligen Proben das analoge Bandenmuster wie in Abbildung 4-7 aufwiesen). Somit kann davon ausgegangen werden, daß das AChR-Fragment αE506 nicht temporär auftrat.
Um sicher zu gehen, daß sich bei den Expressionsprodukten von DH5α/pGroESL/pαE506 bzw. DH5α/pGroESL/pαE701 die AChR-Fragmente αE506 bzw. αE701 weder in den Pellets noch in den Überständen befanden, wurden Western Blots durchgeführt. Als Primärantikörper wurde mAb 198 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ, denaturiert) eingesetzt. Keine der Proben zeigte eine positive Reaktion. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, daß die AChR-Fragmente αE506 und αE701 nicht erfolgreich exprimiert werden konnten.

4.2.2.4. Diskussion

Durch Restriktionsverdau und Agarosegel-Elektrophorese konnte gezeigt werden, daß die Plasmide pαE506 und pαE701 die erwartete *Bgl*II-Schnittstelle besitzen. Auch die erwartete Größendifferenz zwischen den Plasmiden konnte mit diesem Verfahren bestätigt werden. Allerdings war die Größe beider Plasmide insgesamt zu gering, was sich durch die von Beeson durchgeführte Modifizierung des Vektors pKK 233-2 erklären läßt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß dem Vektor auch die *Eco*52I-Schnittstelle entfernt und eine zusätzliche *Sma*I-Schnittstelle eingefügt wurde.
Die mit pGroESL und pαE506 bzw. pαE701 kotransformierten DH5α-Zellen wiesen die Resistenzen gegen Chloramphenicol und Ampicillin auf. Daraus lies sich ableiten, daß die Kotransformationen von pGroESL und den Plasmiden der jeweiligen AChR-Fragmente erfolgreich durchgeführt wurden.
Nach der Lyse der exprimierten Zellen und dem Abtrennen der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation, wurden die verbleibenden Lösungen zur Aufreinigung der Proteine einer Gelfiltration (Superose 12) unterworfen. Die Gelfiltrationen der Expressionsprodukte von DH5α/pGroESL/pαE506 und DH5α/pGroESL/pαE701 über Superose 12 zeigten in beiden Fällen Elutionsdiagramme, welche mit dem Elutionsdiagramm des Expressionsproduktes von DH5α/pGroESL/pαR506 (siehe Abbildung 4-2) grob übereinstimmten. Diese

Übereinstimmung war auch bei den entsprechenden Fraktionen in der SDS-PAGE zu sehen. In Fraktion 2 konnte bei beiden Expressionsprodukten wiederum die Anreicherung eines Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 22 kD beobachtet werden. Da dieses Protein auch im Expressionsprodukt von DH5α/pGroESL/pαE701 detektiert werden konnte wird deutlich, daß es sich dabei nicht um das extrazelluläre AChR-Fragment handeln kann.

Um auszuschließen, daß ein AChR-Fragment exprimiert, aber während des weiteren Expressionsverlaufes wieder abgebaut worden war, wurde mit DH5α/pGroESL/pαE506 eine Wachtumskontrolle durchgeführt. Die kotransformierten DH5α-Zellen wurden exprimiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Nach der Lyse der Zellen und anschließender Zentrifugation wurden die Pellets und Überstände der Proben in der SDS-PAGE analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, daß das AChR-Fragment αE506 nicht temporär auftrat. Des weiteren wurden mit IPTG induzierte und nicht induzierte Expressionen von DH5α/pGroESL/pαE506-Kulturen verglichen. Das Auftreten einer Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 22 kD in den Überständen beider Expressionsprodukte ist ein weiterer Hinweis, daß es sich hierbei nicht um das AChR-Fragment αE506 handelt.

Die durchgeführten Western Blot-Analysen mit den Pellet- und Überstandproben der Expressionsprodukte von DH5α/pGroESL/pαE506 bzw. DH5α/pGroESL/pαE701 zeigten keine positive Reaktion.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß die AChR-Fragmente αE506 und αE701 nicht exprimiert wurden. Es ist anzunehmen, daß die Plasmide pαE506 und pαE701 einen Defekt aufwiesen, der die Expression der Rezeptorfragmente verhinderte. Beeson machte keine genauen Angaben zur Konstruktion der Plasmide. Möglicherweise hatte eine Punktmutation, Baseninsertion oder -deletion eine Verschiebung des Leserahmens verursacht. Das Ergebnis eines solchen „*Frameshifts*“ wäre eine Nonsense-Mutation des Genproduktes. Aufschluß darüber kann nur die Sequenzierung der Plasmide liefern.

Kurzfristig wurde die Arbeit darauf umgestellt, mit Hilfe der Plasmide pαHE706 und pαHE701 die AChR-Fragmente αHE706 und αHE701 zu exprimieren. Beeson erklärte, daß die Expression des Proteins αHE706 bereits erfolgreich gelungen sei. Zusätzlich bietet die His-Sequenz am N-terminalen Ende eine gute Möglichkeit, die exprimierten AChR-Proteine aufzureinigen.

4.2.3. Versuche mit den Plasmiden pαHE706 und pαHE701

Der Wechsel zu den Plasmiden pαHE706 (ex-α-H-AChR mit His-Tag, AS 1-186) und pαHE701 (α-AChR mit His-Tag, AS 1-437) versprach einige Vorteile bei der Expression und Aufarbeitung der Expressionsprodukte gegenüber den bisher verwendeten Plasmiden. Bei beiden Plasmiden wurden die AChR-Gene in einen pET19b-Vektor (Fa. Novagen, siehe Anhang) einkloniert. Die Expression der Zielgene verläuft im allgemeinen unter effektiver Kontrolle und mit hohen Expressionsraten. Der pET19b-Vektor enthält die Sequenz für einen N-terminalen His-Tag, dadurch besteht die Möglichkeit die AChR-Fragmente durch Ni-Affinitätschromatographie aufzureinigen.

4.2.3.1. Charakterisierung der Plasmide pαHE706 und pαHE701

Zur Charakterisierung und weiteren Plasmidgewinnung wurden jeweils DH5α-Zellen mit den Plasmiden pαHE706 bzw. pαHE701 transformiert. Die Plasmide wurden durch das DNA-Reinigungssystem Wizard™ (Fa. Promega) isoliert und in der Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt. Als Restriktionsenzyme wurden *Bgl*II, *Eco*52I und *Sma*I verwendet. Während die *Sma*I-Schnittstelle nur im Plasmid pαHE701 enthalten ist, befindet sich die *Bgl*II-Schnittstelle in beiden Plasmiden, wie auch im Vektor pET19b, der auch eine *Eco52*I-Schnittstelle enthält. In der Tabelle 4-4 sind die Schnittstellen der jeweiligen Restriktionsenzyme aufgeführt.

Plasmid	*Bgl*II	*Eco*52I	*Sma*I
pαHE706	AChR (359)	-	-
	pET19b (503)	pET19b (2.293)	-
pαHE701	AChR (359)	-	AChR (650)
	pET19b (503)	pET19b (2.293)	-

Tabelle 4-4: Bestimmung der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme im jeweiligen Plasmid, anhand der publizierten Nukleotidsequenzen [Noda *et al.*, 1983; Fa. Novagen, Produktbeschreibung]. Die Ziffern in den Klammern bezeichnen das Basenpaar, bei dem die Restriktionsstelle liegt. Die DNA-Sequenzen, auf die sich die Zahlen beziehen, sind im Anhang graphisch dargestellt.

Die Plasmide wurden mit den in Tabelle 4-4 angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und die Größe der entstandenen DNA-Bruchstücke durch Vergleich mit einem Marker mit bekannter Fragmentgröße auf 0,9%igem Agarosegel bestimmt.

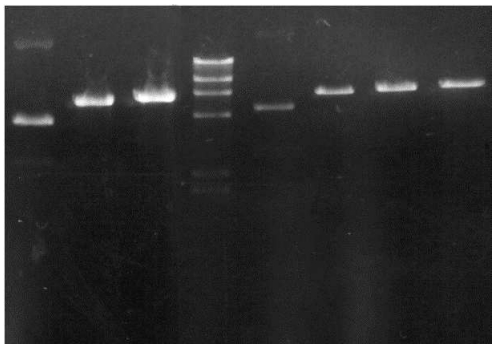


Abbildung 4-8: 0,9%iges Agarosegel zur Überprüfung der Plasmide pαHE706 und pαHE701
Bahn 1: pαHE706 unverdaut
Bahn 2: pαHE706 verdaut mit *Bgl*II
Bahn 3: pαHE706 verdaut mit *Eco*52I
Bahn 4: Marker λ-Phage mit *Hin*dIII (23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322 und 2.027 bp)
Bahn 5: pαHE701 unverdaut
Bahn 6: pαHE701 verdaut mit *Bgl*II
Bahn 7: pαHE701 verdaut mit *Eco*52I
Bahn 8: pαHE701 verdaut mit *Sma*I

Das Plasmid pαHE706 wurde mit *Bgl*II zu einem etwa 600 bp kleineren Fragment verdaut als mit *Eco*52I. Die zweite Bande des *Bgl*II-Verdaus mit einer Größe von 600 bp war auf dem Agarosegel nur schwach sichtbar. Dieses Ergebnis stimmt mit den, aus den Nukleotidsequenzen [Noda *et al.*, 1983; Fa. Novagen, Produktbeschreibung], berechneten Größen überein. Beim Verdau von pαHE701 mit *Bgl*II konnte kein kleineres Fragment auf dem Agarosegel entdeckt werden. Auch der Größenunterschied zwischen dem *Eco*52I- und dem *Sma*I-Verdau, für die laut Nukleotidsequenz jeweils nur eine Schnittstelle vorliegt, konnte nicht erklärt werden. Der Größenunterschied zwischen pαHE706 und pαHE701 entspricht ungefähr der Differenz der unterschiedlichen AChR-Gene in den beiden Plasmiden.
Beide Plasmide wurden zusätzlich von der Fa. Davis Sequenzing, California sequenziert. Die Sequenzierung von pαHE706 brachte das erwartete Ergebnis (siehe Anhang), während pαHE701 nach Angabe der Firma nicht sequenziert werden konnte.
Da die Ergebnisse des Restriktionsverdaus und der Sequenzierung von pαHE701 nicht den Erwartungen entsprachen, wurden die folgenden Expressionsversuche nur mit pαHE706 durchgeführt.

4.2.3.2. Expression von pαHE706 mit und ohne pGroESL

Die von Beeson zur Verfügung gestellten Plasmide pαHE706 und pαHE701 befanden sich im Vektor pET19b, dessen Aufbau im Anhang graphisch dargestellt ist. Der Vektor pET19b besitzt einen T7-Promotor. Zur Transkription der unter der Kontrolle des T7-Promotors klonierten Gene werden T7-RNA-Polymerasen benötigt, die nur in bestimmten *E. coli*-Stämmen vorkommen. Ein solcher Stamm ist BL21(DE3) (Fa. Novagen), der auch in Kombination mit dem Plasmid pLysE kommerziell erhältlich ist. Dieses Plasmid erlaubt eine noch stringentere Transkriptionskontrolle als das bei BL21(DE3) der Fall ist. pLysE codiert das T7-Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase. Da pLysE den gleichen Replikationsursprung wie pGroESL besitzt, können sich beide Plasmide nicht gleichzeitig in einer Zelle aufhalten. Die Folge ist, daß sich das BL21(DE3)/pLysE-Expressionssystem nicht für die Koexpression von Rezeptor und GroEL/GroES eignet. Aus diesem Grund wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3), ohne das Plasmid pLysE, zur Koexpression des AChR-Fragmentes αHE706 und des Chaperonin-Komplexes GroEL/GroES genutzt. Im Gegensatz dazu ist die Expression des Rezeptors im Expressionssystem BL21(DE3)/pLysE möglich.

BL21(DE3)/pLysE bzw. BL21(DE3)/pGroESL wurden kompetent gemacht und anschließend mit pαHE706 transformiert. Da sich sowohl im Lysozym-Plasmid pLysE als auch im GroESL-Plasmid ein Chloramphenicolresistenzgen befindet, wurden die transformierten Zellen in 2xYT-AC (2xYT-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol) über Nacht kultiviert. 2xYT-Medium ist nährstoffreicher als LB-Medium und soll ein schnelleres Wachstum der Zellen und eine höhere Expressionsrate ermöglichen. Mit jeweils 20 ml der Übernachtkultur wurden 500 ml 2xYT-AC-Medium angeimpft. Bei einer OD_{595} von 0,5 bis 0,6 wurden beide Kulturen mit 0,5 mmol/l IPTG induziert und das Wachstum kurz vor Erreichen der stationären Phase bei einer OD_{595} von ca. 4 abgebrochen. Obwohl das nährstoffreichere 2xYT-Medium verwendet wurde, lag das Wachstum vor Erreichen des stationären Zustandes nicht höher als bei den Expressionen in LB-Medium.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in 50 ml Lysozymlösung mit Ultraschall unter Eiskühlung lysiert. Überstand und Pellet wurden durch erneute Zentrifugation voneinander getrennt. Das Pellet wurde in 50 ml Lysozympuffer (ohne Lysozym) aufgenommen.

4.2.3.3. Charakterisierung der Expressionsprodukte

Die Proteinkonzentrationen der Proben wurde nach der Lowry-Methode bestimmt, bevor äquivalente Mengen (400 µg/ml) im ELISA getestet wurden. Als Positivkontrolle diente aus *Torpedo californica* isolierter T-AChR, als Negativkontrolle wurde Ovalbumin verwendet. Als Primärantikörper wurden mAb 192 (Spezifität: H-AChR, nativ) und mAb 198 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ, denaturiert) eingesetzt.

		mAb 192	Bew.	mAb 198	Bew.
BL21(DE3)/pLysE/pαHE706	**Überstand**	0,01 ± 0,01	-	0,01 ± 0,02	-
(jeweils 400 µg/ml)	**Pellet**	0,01 ± 0,03	-	0,01 ± 0,02	-
BL21(DE3)/pGroESL/pαHE706	**Überstand**	0,02 ± 0,02	-	0,02 ± 0,03	-
(jeweils 400 µg/ml)	**Pellet**	0,01 ± 0,01	-	0,13 ± 0,03	+
T-AChR (1 µg/ml)		0,02 ± 0,01	-	1,45 ± 0,07	+
Ovalbumin (100 µg/ml)		0,01 ± 0,01	-	0,02 ± 0,01	-

Tabelle 4-5: ELISA nach 60 min Inkubationszeit.
Überstand und Pellet von BL21(DE3)/pLysE/pαHE706, Konzentration 400 µg/ml
Überstand und Pellet von BL21(DE3)/pGroESL/pαHE706, Konzentration 400 µg/ml
T-AChR als Positivkontrolle für den Antikörper mAb 198, Konzentration 1 µg/ml
Ovalbumin als Negativkontrolle, Konzentration 100 µg/ml
Primärantikörper: mAb 192 und mAb 198
Sekundärantikörper: Anti-Ratten-IgG-AP-Konjugat
A_{405} : Absorption bei 405 nm
Bew.: Bewertung +: positive Bewertung -: negative Bewertung

Bei der Expression von BL21(DE3)/pLysE/pαHE706 konnte weder im Überstand noch im Pellet eine positive Reaktion der Antikörper detektiert werden.

Dagegen zeigte das Pellet der Expression von BL21(DE3)/pGroESL/pαHE706 mit mAb 198 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ, denaturiert) eine positive Reaktion. Da der Überstand mit keinem der beiden Antikörper reagierte, kann daraus gefolgert werden, daß die Koexpression des AChR-Fragmentes αHE706 mit dem Chaperonin-Komplex GroEL/GroES nur denaturiertes Rezeptorprotein in Form von *inclusion bodies* geliefert hat.

4.2.3.4. Aufarbeitung des Pellets der Expression von BL21(DE3)/pGroESL/pαHE706

Zur weiteren Untersuchung der Pellets wurden erneut Expressionen durchgeführt. Die Bakterienzellen wurden anfangs mittels Ultraschall und später mit der French Pressure Cell lysiert. Bei der French Pressure Cell-Methode wurde mittels ELISA der, wiederum im Pellet vorliegende, AChR in vergleichbaren Mengen detektiert. Somit konnte durch den Methodenwechsel keine Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden.

Die nach der Lyse zentrifugierten Pellets wurden nach der Methode von Barkas aufgearbeitet [Barkas *et al.*, 1987]. Bei der Barkas-Methode, zur Isolierung und Reinigung von AChR-Fragmenten, werden die Pellets mit mehreren Puffern gewaschen und die AChR-Fragmente liegen am Ende denaturiert in einer 8 M Harnstoff-Phosphatlösung vor. Rousselle konnte mit dieser Methode die komplette α-Untereinheit αE501 aufreinigen, die extrazelluläre α-Untereinheit αR506 des AChR wies aber noch weitere Verunreinigungen auf [Rousselle, 1996].

Zur Entfernung des Harnstoffs und Renaturierung der Proteine führte Rousselle nachfolgend Dialysen gegen verschiedene Detergens-haltige Puffersysteme durch [Rousselle, 1996]. Obwohl immer noch ein großer Teil der Proteine aggregierte, konnte Rousselle das beste Ergebnis mit einem Detergenssystem aus 40 mM Octylglucosid, 10 mM CHAPS in PBS, pH 7,2 erzielen.

Zur Verbesserung dieses Systems wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Versuche mit verschiedenen Verdünnungspuffern durchgeführt (siehe Tabelle 4-6). Jeweils 1 ml der proteinhaltigen 8 M Harnstoff-Phosphatlösung wurde direkt 1:10 mit dem jeweiligen Verdünnungspuffer verdünnt. Nach ca. 12 h Inkubation bei RT konnte bei einigen Proben ein Niederschlag festgestellt werden, während andere Proben nach der Inkubationszeit keinen Niederschlag aufwiesen.

Verdünnungspuffer	**Niederschlag**
PBS, pH 7,2	ja
40 mM Octylglucosid, 10 mM CHAPS in PBS, pH 7,2	ja
40 mM Octylglucosid, 10 mM CHAPS, 0,5 M Arginin in PBS, pH 7,2	nein
40 mM Octylglucosid, 10 mM CHAPS, 0,1 M Arginin in PBS, pH 7,2	ja
0,5 M Arginin in PBS, pH 7,2	nein
0,1 M Arginin in PBS, pH 7,2	ja

Tabelle 4-6: 1:10 Verdünnungen der nach Barkas in 8 M Harnstoff-Phosphatlösung vorliegenden Proteine mit jeweiligen Verdünnungspuffern.
CHAPS: 3-[N-(3-Cholanamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Octylglucosid: n-Octyl-β-D-glucopyranosid

Wie in Tabelle 4-6 zu sehen ist wurde 0,5 M Arginin benötigt um die Proteine bei einer direkten 1:10 Verdünnung in Lösung zu halten. Die Zugabe der Detergenzien CHAPS und Octylglucosid konnte die Löslichkeit der Proteine nicht erhöhen.

Dieser 0,5 M Arginin-PBS-Puffer erscheint geeignet, die Proteine nach Expression und Aufreinigung nach Barkas vom Denaturierungsmittel Harnstoff zu befreien. Anschließend sollte die weitere Aufreinigung des rekombinanten Proteins αHE706 mittels Ni-Affinitätschromatographie erfolgen. Dazu werden Ni^{2+}-Ionen auf einer Hi-Trap-Säule (Fa. Pharmacia-Biotech) immobilisiert, die entstehende Säule wird His-Trap-Säule genannt. Diese Säulen binden, mit einem Iminodiessigsäurederivat, die Metallionen komplex, indem drei der sechs Koordinationsstellen des Metalls besetzt werden. Die verbleibenden Bindungsstellen können mit zwei Histidin-Resten des am N-terminalen Proteinende befindlichen His-Tag in Wechselwirkung treten. Mit 0,2 M Imidazol können die Proteine wieder von der His-Trap-Säule eluiert werden.

Nach erneuter Expression von BL21(DE3)/pGroESL/pαHE706, Lyse mittels French Pressure Cell und Aufarbeitung nach Barkas, wurde die in der letzten Stufe vorliegende Harnstofflösung dreimal 3 Stunden gegen 2 l einer 0,5 M Arginin-PBS-Lösung dialysiert. Auch bei der Dialyse trat kein Niederschlag auf. Der Wechsel vom schnellen 1:10 Verdünnungsschritt zur langsamen Dialyse zeigte keine negativen Auswirkungen auf das Aggregationsverhalten der Proteine.

Auf einer 1 ml His-Trap-Säule wurden 20 mg Gesamtprotein des Dialysats in 0,5 M Arginin-PBS-Puffer aufgetragen. Davon passierten 8,5 mg die Säule ohne an die Ni^{2+}-Ionen zu

binden (Durchlauf). Vor dem Eluieren der Proteine wurde die Säule nochmals mit 6 ml 0,5 M Arginin-PBS-Puffer gewaschen (Waschfraktion), dabei wurden 1,2 mg Protein von der Säule gewaschen. 3,3 mg Protein konnten mit 0,2 M Imidazol in 0,5 M Arginin-PBS-Puffer eluiert werden (Eluat). Damit ergibt sich ein Verlust von 7 mg Protein (35%). Der Versuch wurde mit einer Gesamtproteinmenge von 3 mg wiederholt, dabei wurden im Durchlauf 1,1 mg und in der Waschfraktion 0,1 mg Protein gefunden. Im Eluat konnten 0,3 mg Protein detektiert werden. Somit ergab sich bei der reduzierten Menge an aufgetragenem Protein ein Verlust von 50%. Der Proteingehalt der Lösungen wurde in diesem und den nachfolgenden Versuchen mit Hilfe des BCA-Tests bestimmt.
Jeweils 50 µg des auf die His-Trap-Säule aufgetragenen Proteins, des Durchlaufes, der Waschfraktion und des Eluats wurden nach TCA-Fällung in der SDS-PAGE überprüft.

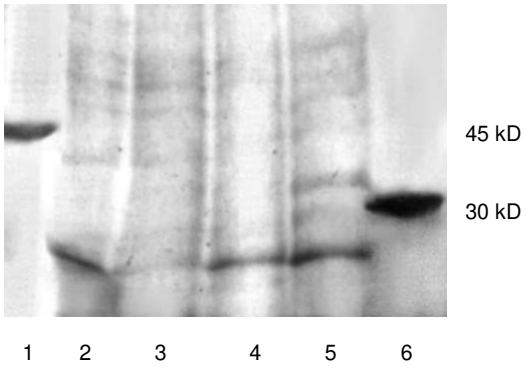


Abbildung 4-9: 10%ige SDS-PAGE mit Coomassie-Blau gefärbt.
Bahn 1: Ovalbumin, 30 µg Protein (45 kD)
Bahn 2: Proteinlösung vor der His-Trap-Säule, 50 µg Protein
Bahn 3: Durchlauf, 50 µg Protein
Bahn 4: Waschfraktion, 50 µg Protein
Bahn 5: Eluat, 50 µg Protein
Bahn 6: Gelonin, 30 µg Protein (30 kD)

Eine Bande bei ca. 25 kD, die im Proteingemisch vor dem Auftragen auf die His-Trap-Säule (Bahn 2) noch vorlag, tritt im Durchlauf (Bahn 3) nicht auf, ist aber im Eluat (Bahn 5) zu sehen. Dabei könnte es sich um spezifisch an die His-Trap-Säule gebundenes AChR-Fragment αHE706 handeln. Durch den angehängten N-terminalen His-Tag wurde das Protein um ca. 3 kD gegenüber dem vergleichbaren Protein ohne His-Tag vergrößert und kommt somit auf ein Molekulargewicht von ca. 25 kD. Da diese Proteinbande auch in der Waschfraktion (Bahn 4) auftritt, kann es sich allerdings auch um ein unspezifisch an die Säule gebundenes Protein handeln. Bei den einzelnen Ni-Affinitätschromatographie-Versuchen wurden zwischen 35 und 50% der Gesamtproteinmenge verloren,

wahrscheinlich aggregierten die Proteine auf der His-Trap-Säule. Eine Aufreinigung konnte nicht erzielt werden.

Eventuell ist es von Vorteil, die Proteine in Harnstoff, unter denaturierenden Bedingungen, über die His-Trap-Säule aufzureinigen und anschließend zu renaturieren. Durch den Zusatz von 8 M Harnstoff sind die Proteine gegenüber Aggregation unempfindlicher. Durch die Eliminierung des Dialyseschrittes gegen Arginin-PBS-Lösung und direktem Einsatz des Proteingemisches in der 8 M Harnstoff-Phosphatlösung auf der Säule, könnte der Proteinverlust eingedämmt werden.

Aus diesem Grund diente 8 M Harnstoff-Phosphatlösung als Startpuffer, Wasch- und Elutionspuffer wurden vorerst nicht verändert. Da die nachfolgenden Ni-Affinitätschromatographie-Versuche keine Verbesserungen der Ergebnisse zeigten, wurden auch Wasch- und Elutionspuffer durch 8 M Harnstoff-Phosphatlösung ersetzt. Dem Elutionspuffer wurde Imidazol in aufsteigender Konzentration zugesetzt, um eventuell noch auf der His-Trap-Säule gebundenes His-Tag-Protein zu eluieren. Die jeweiligen Pufferzusammensetzungen der hier erläuterten Versuche sind in Tabelle 4-7 aufgeführt.

Startpuffer	**Waschpuffer**	**Elutionspuffer**
8 M Harnstoff	0,5 M Arginin	0,5 M Arginin + 0,2 M Imidazol
8 M Harnstoff	8 M Harnstoff	8 M Harnstoff + 0,2 M Imidazol
8 M Harnstoff	8 M Harnstoff	8 M Harnstoff + 1 M Imidazol
8 M Harnstoff	8 M Harnstoff	8 M Harnstoff + 3 M Imidazol

Tabelle 4-7: Zusammensetzung der Puffer der Ni-Affinitätschromatographie-Versuche zur Verbesserung der Aufreinigung und Ausbeute der His-Tag-Proteine.
Die Basis der verwendeten Puffer ist PBS, pH 7,2.

Leider konnte keines der getesteten Puffersysteme die Proteinverluste während der Ni-Affinitätschromatographie verringern, noch das Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kD, bei dem es sich eventuell um das AChR-Fragment αHE706 handelt, ohne Verunreinigungen von der Säule eluieren.

Im Verfahren von Barkas wird das Pellet mit verschiedenen Puffern gewaschen, die Detergenzien enthalten. Bei diesen Waschschritten werden weniger hydrophobe Proteine abgetrennt. Am Ende werden die verbleibenden Proteine mit 8 M Harnstoff-Phosphatlösung aus den unlöslichen Membran-Trümmern extrahiert. Beim Entfernen des Harnstoffs durch Dialyse fällt wieder Protein in Form von *inclusion bodies* aus [Rousselle, 1996]. Da hauptsächlich überexprimierte Proteine präzipitieren, während andere Proteine

in Lösung bleiben, findet eine weitere Aufreinigung statt. Auch Schrattenholz nutzte die Aufreinigung über *inclusion bodies* bei der Isolierung des T-AChR$_{1-209}$-Fragmentes (ex-α-T-AChR, AS 1-209) [Schrattenholz *et al.*, 1998].

Als abschließende Untersuchung sollte diese Methode genutzt werden, um nachzuweisen ob das AChR-Fragment αHE706 exprimiert wurde. Zur Isolierung der *inclusion bodies* wurde die nach der Barkas-Methode erhaltene Proteinlösung mit 8 M Harnstoff dreimal 3 Stunden gegen 2 l PBS, pH 7,2 dialysiert. Durch Entfernung des Harnstoffs fiel Protein aus. Dieses Präzipitat ließ sich durch 1% SDS-PBS, pH 7,2 wieder in Lösung bringen. Der Nachteil dieses anionischen Detergenses ist, daß es durch Dialyse nicht entfernt werden kann. Da diese Untersuchung aber nur der Identifikation des Rezeptorproteins dienen sollte, war die Renaturierung des Proteins nicht zwingend notwendig. Durch die Vorreinigung über *inclusion bodies* läßt ich ein Großteil der Fremdproteine entfernen, aber auch bei Schrattenholz weist die SDS-PAGE der *inclusion bodies* noch Verunreinigungen auf. Aus diesem Grund wurde die Proteinlösung einer Ni-Affinitätschromatographie unterzogen. Als Start- und Waschpuffer wurde 1% SDS-PBS pH 7,2 eingesetzt. Mit 0,2 M Imidazol in 1% SDS-PBS, pH 7,2 wurde eluiert. Ausgehend von 400 ml Flüssigkultur wurden nach der Ni-Affinitätschromatographie 25 mg Protein erhalten.

Durch den N-terminalen His-Tag besteht die Möglichkeit das AChR-Fragment αHE706 eindeutig zu identifizieren. Mit dem His-Tag wurde neben der $(His)_{10}$-Sequenz auch eine $(Asp)_4$-Lys-Sequenz am N-terminalen Proteinende eingebaut. Diese $(Asp)_4$-Lys-Sequenz wird von Enterokinase (Fa. Novagen), einer Exopeptidase, erkannt und der His-Tag nach dem Lysin abgeschnitten, dabei wird das Protein um ca. 3 kD verkleinert. Zum Verdau wurden 50 µg der Eluates der Ni-Affinitätschromatographie mit einer Einheit Enterokinase versetzt und für 16 Stunden bei RT im Cleavage-Puffer inkubiert. Parallel dazu wurden die gleichen Lösungen zusammenpipettiert, wobei die Enterokinase durch das entsprechende Volumen Wasser ersetzt wurde. Nach der Inkubation wurden die Ansätze denaturiert und in einer SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse eingesetzt. Als Primärantikörper wurde mAb 198 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ, denaturiert) verwendet.

Abbildung 4-10: 15%ige SDS-PAGE mit Coomassie-Blau gefärbt (links) und Western Blot (rechts).
Bahn 1: Eluat der Ni-Affinitätschromatographie, 25 µg Protein
Bahn 2: Eluat der Ni-Affinitätschromatographie + Enterokinase, 25 µg Protein
Primärantikörper: mAb198
Sekundärantikörper: Anti-Ratten-IgG-AP-Konjugat

Im Eluat der Ni-Affinitätschromatographie konnte ein ca. 25 kD großes Protein, mit nur geringen Verunreinigungen, detektiert werden. Durch die Abspaltung eines ca. 3 kD kleineren Proteins mit Enterokinase und die positive Antikörperreaktion im Western Blot mit beiden Proteinbanden konnte bewiesen werden, daß es sich dabei um das AChR-Fragment αHE706 handelt. Durch die Kombination der Aufreinigungsmethoden über *inclusion bodies* und Ni-Affinitätschromatographie konnte das Rezeptorfragment weitgehend von Fremdproteinen befreit werden.
Allerdings wurde der größte Teil des Proteins durch die Enterokinase nicht verdaut. Möglicherweise überlagert ein anderes Protein, das die gleiche Größe und auch Affinität zu Ni^{2+}-Ionen besitzt, das Rezeptorfragment. Dagegen spricht aber, daß sich der unverdaute Proteinanteil im Western Blot eindeutig positiv verhält. Wäre ein Großteil dieser Proteinbande ein Fremdprotein, käme es nicht zu dieser eindeutigen Reaktion. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die Exopeptidase durch das im Ansatz vorhandene SDS gehemmt wurde. Dies könnte den vollständigen Verdau des Proteins αHE706 durch die Enterokinase verhindern. Eine Bestätigung dieser Annahme liefert die Produktbeschreibung (Fa. Novagen), worin angegeben wird, daß ab 0,25% SDS die Aktivität der Enterokinase sinkt.

4.2.3.5. Diskussion

Die Sequenzierung des Plasmids pαHE706, wie auch Restriktion und Agarosegel-Elektrophorese zeigten die für dieses Plasmid zu erwartenden Ergebnisse. Dagegen konnte das Plasmid pαHE701 nicht sequenziert werden (Angabe der Fa. Davis Sequenzing, California) und die Restriktion mit nachfolgender Agarosegel-Elektrophorese zeigte Ergebnisse, die nicht mit der publizierten Nukleotidsequenz des Plasmids übereinstimmten [Noda

et al., 1983; Fa. Novagen, Produktbeschreibung]. Aus diesem Grund wurden die weiteren Versuche nur mit dem Plasmid pαHE706 fortgesetzt.

Das Plasmid pαHE706 wurde zum einen in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/pLysE transformiert, aber auch mit pGroESL im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) kotransformiert. Da in den bisher durchgeführten Expressionsversuchen von αR506, αE506 und αE701, jeweils mit GroEL/GroES, keine AChR-Fragmente exprimiert werden konnten, sollte das Vorliegen von αHE706 direkt nach der Expression, vor der weiteren Aufarbeitung, überprüft werden. Als Untersuchungsmethode wurde der ELISA gewählt. Nach der Lyse der Zellen wurden die Pellets und Überstände durch Zentrifugation getrennt und im ELISA eingesetzt. Durch diese Trennung konnte zusätzlich festgestellt werden, ob das eventuell exprimierte AChR-Fragment αHE706 in löslicher Form im Überstand oder aggregiert im Pellet vorliegt. Während die Expression von BL21(DE3)/pLysE/pαHE706 weder im Pellet noch im Überstand das AChR-Fragment αHE706 aufwies, konnte es im Pellet der Expression von BL21(DE3)/pGroESL/pαHE706 nachgewiesen werden.

Zwei unterschiedliche Gründe können für die nicht stattgefundene Expression des AChR-Fragmentes αHE706 in BL21(DE3)/pLysE verantwortlich sein. Zum einen kann die induzierte Zellkultur das Plasmid wieder verloren haben. Das ist aber bei frisch transformierten Stämmen unwahrscheinlich. Der zweite Grund kann eine zu stringente Expressionskontrolle durch das Plasmid pLysE sein. Möglicherweise hätte mit mehr IPTG induziert werden müssen, um soviel T7-RNA-Polymerase zu erzeugen, daß sie sich gegen das T7-Lysozym durchsetzen kann. Bei einer erneuten Expression von pαHE706 sollte aus diesem Grund zu dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) gewechselt werden, der einer nicht so stringenten Expressionskontrolle unterliegt.

Im Pellet des Expressionsproduktes von BL21(DE3)/pGroESL/pαHE706 konnte das AChR-Fragment pαHE706 nachgewiesen werden. Dadurch wird ersichtlich, daß die Expression von αHE706 zwar erfolgreich verlief, aber die Koexpression mit dem Chaperonin-Komplex GroEL/GroES kein lösliches AChR-Fragment in nachweisbaren Mengen lieferte.

Das Pellet wurde nach der Methode von Barkas aufgearbeitet, danach lagen die Proteine denaturiert in 8 M Harnstoff-Phosphatlösung vor. Zur Verringerung des Harnstoffgehaltes wurden mehrere Proben dieser Lösung 1:10 mit verschiedenen Puffersystemen verdünnt. Dabei wurde festgestellt, daß 0,5 M Arginin benötigt wird, um das Aggregieren der Proteine zu vermeiden. Auch bei der langsamer verlaufenden Dialyse konnte der Zusatz von 0,5 M Arginin die Bildung von *inclusion bodies* verhindern.

Zur Aufreinigung des AChR-Fragmentes αHE706 wurde die nach der Dialyse gegen 0,5 M Arginin-PBS-Puffer vorliegende Proteinlösung einer Ni-Affinitätschromatographie unterzogen. Die Proteine wurden auf eine His-Trap-Säule aufgetragen und mit 0,2 M

Imidazol in 0,5 M Arginin-PBS-Puffer eluiert. In der nachfolgenden SDS-PAGE konnte ein Protein mit einer Größe von ca. 25 kD im Eluat, aber auch im Waschpuffer detektiert werden. Dieses Protein könnte das gesuchte AChR-Fragment αHE706 sein. Da es aber auch im Waschpuffer auftrat, könnte es sich jedoch auch um ein unspezifisch an die His-Trap-Säule gebundenes Protein handeln. Eine Aufreinigung dieses Proteins konnte nicht erzielt werden, zusätzlich kam es zu Proteinverlusten von bis zu 50% bei der Ni-Affinitätschromatographie. Anscheinend präzipitierten die Proteine auf der Säule. Auch das Auftragen der Proteine direkt in 8 M Harnstoff-Phosphatlösung, ohne Dialyse gegen 0,5 M Arginin-PBS-Puffer, die Zugabe von 8 M Harnstoff zum Wasch- und Elutionspuffer, wie auch die Erhöhung der Imidazolkonzentration (bis 3 M Imidazol) erzielten keine Verbesserungen in Bezug auf den hohen Proteinverlust und die Qualität der Ni-Affinitäts-chromatographie.

Eine abschließende Untersuchung sollte Aufschluß über zwei bisher ungeklärte Fragen geben. Zum einen, kann über die Isolierung der *inclusion bodies* bei der Expression von BL21(DE3)/pGroESL/pαHE706 eine Aufreinigung des Expressionsproduktes αHE706 erzielt werden, zum anderen, ob es sich bei dem in der SDS-PAGE detektierten Protein, mit einer Größe von ca. 25 kD, um das AChR-Fragment αHE706 handelt.

Durch Isolierung der *inclusion bodies*, Aufnahme in 1% SDS-PBS und anschließender Ni-Affinitätschromatographie mit 1% SDS-PBS, eluiert mit 0,2 M Imidazol in 1% SDS-PBS, konnte das beschriebene Protein weitgehend von Verunreinigungen befreit werden. Ein Teil des aufgereinigten Proteins wurde zur Identifizierung mit Enterokinase inkubiert, in der SDS-PAGE eingesetzt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die Enterokinase verdaute nur einen Teil des vorliegenden Proteins. Da aber die Enzymaktivität der Enterokinase durch einen SDS-Gehalt von über 0,25% eingeschränkt wird (siehe Produktbeschreibung Fa. Novagen), ist davon auszugehen, daß die komplette Bande bei ca. 25 kD dem AChR-Fragment αHE706 zuzuordnen ist. Dafür spricht auch die starke Reaktion des Antikörpers mit dem nicht verdauten Anteil des 25 kD-Proteins im Western Blot.

Da Prof. Dr. A. Maelicke (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Mainz) uns rekombinanten T-AChR$_{1-209}$ zur Verfügung stellte, wurden keine weiteren Versuche zur Renaturierung des AChR-Fragmentes αHE706 unternommen.

Durch die Koexpression des AChR-Fragmentes αHE706 mit dem Chaperonin-Komplex GroEL/GroES gelang es nicht, das Protein αHE706 in nativer löslicher Form zu isolieren. Die Erhöhung des Chaperoningehaltes erscheint nicht ausreichend, um die Aggregation des rekombinanten Proteins als *inclusion bodies* in *E. coli* entscheidend zu verringern.

Rudolph wie auch die nachfolgend aufgeführten Arbeitsgruppen, die sich mit der Isolierung von AChR-Fragmenten beschäftigen, isolieren zuerst die *inclusion bodies* und beginnen

danach die Renaturierung der AChR-Fragmente. Durch Isolierung der *inclusion bodies* wird eine Aufreinigung des überexprimierten Proteins erzielt.

Nach Rudolph werden die *inclusion bodies* durch Inkubation mit starken Denaturierungsmitteln wie 6 M Guanidinium-Hydrochlorid oder 6 bis 8 M Harnstoff solubilisiert [Rudolph *et al.*, 1997]. Dabei weist die Solubilisierung mit Guanidinium-Hydrochlorid einige Vorteile auf. Zum einen ist Guanidinium-Hydrochlorid im Vergleich zu Harnstoff ein sehr starkes Chaotrop, das auch extrem stabile *inclusion bodies* aufzulösen vermag, außerdem enthalten Harnstofflösungen meist Isocyanate, was zu einer chemischen Modifizierung der Aminogruppen von Lysinseitenketten führen kann.

Da entfaltete Polypeptidketten unter physiologischen Pufferbedingungen *in vitro* spontan ihre native dreidimensionale Struktur einnehmen sollten, müßte zur Renaturierung der solubilisierten *inclusion bodies* die Entfernung des Denaturierungsmittels durch Verdünnung oder Dialyse genügen.

Da sich in der α-Untereinheit des AChR drei Disulfidbrücken und eine freie SH-Gruppe befinden (Cys^{128} mit Cys^{142}, Cys^{192} mit Cys^{193}, Cys^{412} mit Cys^{418}, Cys^{222} ist nicht verbrückt [Mosckovitz *et al.*, 1988]), tritt bei der *in vitro*-Faltung zusätzlich das Problem auf, daß neben der korrekten dreidimensionalen Struktur auch die natürliche Disulfidverbrückung ausgebildet werden muß. Zwar besitzt das AChR-Fragment αHE706 nur eine Disulfidbrücke (Cys^{128} mit Cys^{142}), aber das von Schrattenholz verwendete Fragment T-$AChR_{1-209}$, das zur Konjugatsynthese (siehe Kapitel 5.) eingesetzt wurde, wie auch die im folgenden diskutierten Fragmente von Alexeev und Tsouloufis besitzen jeweils zwei Disulfidbrücken (Cys^{128} mit Cys^{142} und Cys^{192} mit Cys^{193}) [Alexeev *et al.*, 1999; Tsouloufis *et al.*, 2000]. Zum Verständnis der von diesen Arbeitsgruppen eingesetzten Reagenzien, soll deren Einfluß auf die Ausbildung von Disulfidbrücken näher erläutert werden. Durch Zusatz niedermolekularer Thiolreagenzien, wie Cystein, Cysteamin oder Mercaptoethanol, in reduzierter und oxidierter Form kann durch Katalyse der Thiol-Disulfidaustauschreaktion die Bildung des nativen Disulfidmusters extrem gesteigert werden [Ahmed *et al.*, 1975]. Allerdings erreicht man in einigen Fällen auch unter optimalen Redoxbedingungen nur sehr niedrige Renaturierungsausbeuten. Dies ist unter anderem auf die geringe Löslichkeit der reduzierten denaturierten Polypeptidkette zurückzuführen. In diesen Fällen kann die Löslichkeit des entfalteten Proteins durch reversible chemische Modifizierung der Cysteinreste, beispielsweise durch Ausbildung von gemischten Disulfiden mit Glutathion, drastisch erhöht werden. Bei diesem Verfahren wird in einem ersten Schritt das denaturierte, reduzierte Polypeptid durch einen hohen Überschuß an oxidiertem Glutathion in das gemischte Disulfid überführt. Nach Abtrennung von überschüssigem oxidiertem Glutathion erfolgt in einem weiteren Prozeßschritt die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken durch Zusatz katalytischer Mengen an reduziertem Glutathion

unter Nativbedingungen. Als optimale Konzentrationen erwiesen sich jeweils 1 mM für die oxidierte und reduzierte Form des Glutathions [Buchner *et al.*, 1992].

Zusätzlich zeigte sich auch der Einsatz von L-Arginin bei der *in vitro*-Faltung als sehr nützlich. Obgleich Arginin eine Guanidiniumgruppe enthält, wirkt es nicht so stark strukturdestabilisierend wie Guanidinium-Hydrochlorid. Dementsprechend erhöht Arginin vermutlich die Löslichkeit von entfalteten Polypeptidketten oder von Faltungsintermediaten, ohne daß es die native Proteinstruktur signifikant destabilisiert. Als optimale Konzentration erwies sich 0,5 M Arginin [Buchner *et al.*, 1992].

Die *in vitro*-Faltung von *inclusion bodies* kann durch genetische Kombination des gewünschten Zielproteins mit einem hydrophilen Partner verbessert werden [Samuelsson *et al.*, 1991]. Auf dieser Basis werden zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe Versuche durchgeführt, das extrazelluläre α-AChR-Fragment als Fusionsprotein mit dem hydrophileren Toxin Gelonin zu exprimieren.

Trotz der Vielzahl der bisher empirisch ermittelten Additive zur Verbesserung der *in vitro*-Proteinfaltung, ist es bisher kaum möglich, den molekularen Wirkmechanismus dieser Substanzen zu beschreiben. Die Zusätze können sowohl die Löslichkeit als auch die Stabilität der entfalteten Proteine, der Faltungsintermediate oder aber der endgültigen nativen Struktur verändern. Darüber hinaus können diese Zusätze sowohl die Faltungsgeschwindigkeit als auch die Aggregationskinetik beeinflussen [Rudolph *et al.*, 1996].

Schrattenholz gelang es, eine Methode zur Renaturierung des extrazellulären Teils der α-Untereinheit des T-AChR (ex-α-T-AChR$_{1-209}$) zu entwickeln [Schrattenholz *et al.*, 1998]. Zur Expression wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/pLysS mit einem pET3a-Vektor gewählt. Die anfallenden *inclusion bodies* wurden unter Zusatz von Guanidinium-Hydrochlorid, Glutathion (oxidierte und reduzierte Form) und L-Arginin unter Dialyse aufgearbeitet. Die Konzentration des isolierten AChR-Fragmentes lag bei 2-10 mg/ml. Die hohe Bindungsaffinität mit verschiedenen Liganden, wie z.B. α-Bungarotoxin und Nikotin, läßt auf eine annähernd native Konformation schließen. Die Konformationen anderer Regionen des Polypeptids, die nicht in der näheren Umgebung dieser Liganden-Bindungsstellen liegen, wurden nicht untersucht [Tsouloufis *et al.*, 2000]. Das von Schrattenholz exprimierte AChR-Fragment wurde in dieser Arbeit zur Synthese von Rezeptor-Gelonin-Konjugaten verwendet (siehe Kapitel 5.). Allerdings erwies sich das zur Verfügung gestellte Protein als weniger stabil wie in der Literatur [Schrattenholz *et al.*, 1998] angegeben und aggregierte bei Konzentrationen über 0,4 mg/ml.

Alexeev isolierte den extrazellulären Teil der α-Untereinheit des T-AChR (ex-α-T-AChR$_{1-209}$, mit His-Tag) [Alexeev *et al.*, 1999]. Zur Expression wurden zwei *E. coli*-Vektor-Kombinationen eingesetzt, BL21(DE3) mit pET22b und AD494 mit pQE31. Das exprimierte AChR-Protein trug einen His-Tag, der die Aufreinigung über die Ni-Affinitätschromatographie

ermöglichte. Als Denaturierungsmittel wurden Harnstoff und Guanidinium-Hydrochlorid verwendet, diese wurden zur Renaturierung mittels stufenweiser Dialyse bzw. Gelchromatographie entfernt. Die erzielten Proteinkonzentrationen lagen in der Größenordnung von ca. 5 mg/ml. Das rekombinante Polypeptid bindet α-Bungarotoxin mit hoher Affinität und reagiert positiv mit verschiedenen Antikörpern, konformationsabhängigen wie auch konformationsunabhängigen.

Tsouloufis war der Erste, der ein humanes AChR-Fragment (ex-α-H-AChR$_{1-207}$) in teilweise nativer Konformation isolierte [Tsouloufis *et al.*, 2000]. Dabei wurde die Methode der „Künstlichen Chaperone" von Rozema genutzt [Rozema *et al.*, 1995]. Bei dieser Methode wird der Zweistufen-Mechanismus des natürlichen Chaperonin-Komplexes GroEL/GroES nachgeahmt. Im ersten Schritt wird das nicht native Protein durch ein Detergens unter Bedingungen, die normalerweise zu irreversiblen Aggregation führen würden, in Lösung gehalten. Das Protein ist nicht in der Lage, aus diesem Detergens-Komplex spontan in die native Konformation zu falten. Die Zugabe von Cyclodextrin löst die Entfernung des Detergens aus und verhilft somit dem Protein zur korrekten Faltung. Tsouloufis verwendete die *E. coli*-Zellen BL12(DE3)/pLysS und den Vektor pET15b mit His-Tag. Nach der Renaturierung lag das Protein in einer Konzentration von 40 µg/ml vor. Mit I^{125}-gelabeltem mAb 198 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ, denaturiert) konnte gezeigt werden, daß ca. 25% des AChR-Fragmentes in nativer Konformation vorlag. Unklar bleibt, ob sich die einzelnen Proteine einheitlich wenig falten oder nur eine kleinere Menge der Proteine größere Faltungsregionen aufweisen. Da für die Synthese von AChR-Toxin-Konjugaten eine AChR-Konzentration von ca. 1 mg/ml benötigt wird, ist die von Tsouloufis erzielte Konzentration von 40 µg/ml für die Konjugatsynthese zu gering. Die Methode von Tsouloufis zeigt aber, durch den Einsatz der „Künstlichen Chaperone", einen neuen Weg der AChR-Isolierung auf. Durch weitere Modifizierungen könnten eventuell auch höhere AChR-Konzentrationen erzielt werden.

Die Ergebnisse von Tsouloufis weisen aber auch darauf hin, daß die in dieser Arbeit durchgeführte Koexpression von GroEL/GroES durchaus zur Renaturierung der AChR-Fragmente führen könnte. Auffallend ist, daß Schrattenholz, Alexeev und Tsouloufis extrazelluläre AChR-Fragmente der α-Untereinheit mit einem Ende im Bereich der Aminosäuren 207-209 wählten. In dieser Arbeit wurde versucht, das AChR-Fragment αHE706 zu renaturieren, welches mit der Aminosäure 186 endet. Eventuell sind die fehlenden 21-23 Aminosäuren für den Erfolg der Faltung entscheidend. In diesem Bereich des Proteins ist eine Disulfidbrücke lokalisiert (Cys^{192} mit Cys^{193}) deren Fehlen unter Umständen einen negativen Einfluß auf die Ausbildung der nativen Faltung des AChR-Fragmentes haben könnte.

4.3. Zusammenfassung

Die antigenspezifische Immunsuppression mit Hilfe von AChR-Toxin-Konjugaten ist eine vielversprechende Methode zur Therapie der *Myasthenia gravis*, da gezielt nur die autoantigenen Immunzellen ausgeschaltet werden. Wie schon in der Aufgabenstellung beschrieben (siehe Kapitel 4.1.), gibt es mehrere Gründe, warum sich kleinere rekombinante Fragmente des AChR besser zur Synthese von Konjugaten, wie auch dem nachfolgenden Einsatz zur antigenspezifischen Immunsuppression eignen, als der komplette Rezeptor. Diese Fragmente müssen allerdings die hauptimmunogene Region (MIR) des AChR enthalten, die auf dem extrazellulären Teil der α-Untereinheiten lokalisiert ist.
Bei bisherigen Expressionen des extrazellulären Teils der α-Untereinheit, wie auch der kompletten α-Untereinheit, in *E. coli* wurden denaturierte, unlösliche *inclusion bodies* erhalten [Rousselle, 1996; Voltz *et al.*, 1997; Barchan *et al.*, 1998; Diethelm-Okita *et al.*, 1998]. Versuche, die aggregierten Proteine zu renaturieren, erzielten nur geringe Ausbeuten und für die Konjugatsynthese zu niedrige Proteinkonzentrationen [Rousselle, 1996].
Durch die Koexpression des Chaperonin-Komplexes GroEL/GroES sollten die rekombinanten AChR-Fragmente nativ gefaltet werden, dadurch die Bildung der *inclusion bodies* verhindert und die Löslichkeit der rekombinanten AChR-Fragmente erhöht werden.

Für die Koexpression mit GroEL/GroES wurde das Rezeptorfragment αR506 (ex-α-H-AChR, AS 37-180) gewählt. Das AChR-Gen war in den Vektor pKK 233-2 einkloniert. Die Charakterisierung des Plasmids pαR506 wurde von Frau Z.Y. Li (Fachbereich Chemie, Universität Kaiserslautern) durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung und Restriktion mit nachfolgender Agarosegel-Elektrophorese konnten das Vorliegen des Plasmids pαR506 bestätigen [Li, 1998]. Die Restriktion und Agarosegel-Elektrophorese zeigten auch für das Plasmid pGroESL die, anhand der publizierten Nukleotidsequenz [Goloubinoff *et al.*, 1989], zu erwartenden Ergebnisse.
Die Resistenzen der mit den Plasmiden pαR506 und pGroESL transformierten DH5α-Zellen gegen Ampicillin und Chloramphenicol zeigten, daß die Kotransformation erfolgreich durchgeführt wurde.
Die nach der Lyse der exprimierten Zellen und dem Abtrennen der unlöslichen Bestandteile verbleibende Lösung wurde auf eine Gelfiltrationssäule (Superose 12) aufgetragen. Zwar konnte in der nachfolgenden SDS-PAGE ein Protein mit dem für das AChR-Fragment pαR506 entsprechenden Molekulargewicht von ca. 22 kD detektiert werden, aber die Identifikation im Western Blot schlug fehl.

Durch die Koexpression von αR506 und GroEL/GroES in *E. coli*, konnte kein lösliches AChR-Fragment isoliert werden. Wahrscheinlich lag das AChR-Fragment unlöslich in Form von *inclusion bodies* im Pellet vor.
Eventuell hat das im Plasmid pαR506 vorhandene Exon P3A das Ergebnis beeinflußt. Zum einen könnten die zusätzlich exprimierten 25 Aminosäuren die native Faltung des rekombinanten Proteins verhindert haben, aber auch eine Störung der Antikörperbindung im Bereich der MIR wäre denkbar. So könnten eventuell nativ gefaltete AChR-Fragmente im Überstand vorgelegen haben, aber durch die negative Reaktion der Antikörper nicht erkannt worden sein. Da kein natives AChR-Fragment detektiert werden konnte, aber auch die Auswirkungen des Exons P3A nicht bekannt sind, wurden die weiteren Expressionsversuche mit P3A-freien AChR-Plasmiden durchgeführt.

Dabei handelte es sich um die Plasmide pαE506 (ex-α-H-AChR, AS 37-186) und pαE701 (α-H-AChR, AS 1-437). Diese Plasmide wurden von Beeson in einen modifizierten pKK 233-2 Vektor einkloniert. Durch Restriktion und anschließender Agarosegel-Elektrophorese konnte festgestellt werden, daß dem pKK 233-2 Vektor bei der Modifizierung eine *Eco*52I-Schnittstelle entfernt und eine zusätzliche *Sma*I-Schnittstelle eingefügt wurde.
Die verwendeten DH5α-Zellen wiesen nach der Transformation mit pGroESL und dem jeweiligen AChR-Fragment Resistenzen gegen Ampicillin und Chloramphenicol auf. Daraus läßt sich die erfolgreiche Kotransformation mit den Plasmiden ableiten.
Die nach der Lyse der exprimierten Zellen und dem Abtrennen der unlöslichen Bestandteile verbleibenden Lösungen wurden auf eine Gelfiltrationssäule (Superose 12) aufgetragen. Die Elutionsdiagramme der aufgetragenen Lösungen von DH5α/pGroESL/pαE506 und DH5α/pGroESL/pαE701 stimmten grob mit dem Expressionsprodukt von DH5α/pGroESL/pαR506 überein. In allen Elutionsdiagrammen konnte in der zweiten Fraktion ein Protein mit einer Größe von ca. 22 kD detektiert werden. Da es auch im Expressionsprodukt von DH5α/pGroESL/pαE701 vorlag, kann es sich dabei nicht um den extrazellulären Teil der α-Untereinheit handeln.
Um auszuschließen, daß ein AChR-Fragment exprimiert, aber während des weiteren Expressionsverlaufes wieder abgebaut worden war, wurde mit DH5α/pGroESL/pαE506 eine Wachtumskontrolle durchgeführt. Die kotransformierten DH5α-Zellen wurden exprimiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Nach der Lyse der Zellen und anschließender Zentrifugation wurden die Pellets und Überstände in der SDS-PAGE analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, daß das AChR-Fragment nicht temporär auftrat. Des weiteren wurden mit IPTG induzierte und nicht induzierte Expressionen von DH5α/pGroESL/pαE506-Kulturen verglichen. Da in beiden Fällen die Proteinbande mit

einem Molekulargewicht von ca. 22 kD auftrat, ist anzunehmen, daß es sich hierbei nicht um das AChR-Fragment αE506 handelt.
Die durchgeführten Western Blot-Analysen mit den Pellet- und Überstandproben der Expressionsprodukte von DH5α/pGroESL/pαE506 bzw. DH5α/pGroESL/pαE701 zeigten keine positive Reaktion.
Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß die AChR-Fragmente αE506 und αE701 nicht exprimiert wurden. Da Beeson keine genauen Angaben über die Konstruktion der Plasmide machen konnte, ist anzunehmen, daß die Plasmide pαE506 und pαE701 einen Defekt aufwiesen, der die Expression der Rezeptorfragmente verhinderte.

Kurzfristig wurde die Arbeit darauf umgestellt, zur Expression der AChR-Fragmente die Plasmide pαHE706 und pαHE701 einzusetzen. Beeson erklärte, daß die Expression des Proteins αHE706 bereits erfolgreich gelungen sei.
Die Ergebnisse der Sequenzierung und Restriktion mit nachfolgender Agarosegel-Elektrophorese des Plasmids pαHE706 stimmten mit den Erwartungen anhand der Nukleotidsequenz überein. Da dies bei dem Plasmid pαHE701 nicht der Fall war, wurden die folgenden Versuche nur mit dem Plasmid pαHE706 durchgeführt.
Das Plasmid pαHE706 wurde zum einen in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/pLysE transformiert, aber auch mit pGroESL im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) kotransformiert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Pellets und Überstände durch Zentrifugation getrennt und im ELISA eingesetzt. Während die Expression von BL21(DE3)/pLysE/pαHE706 weder im Pellet noch im Überstand das AChR-Fragment αHE706 aufwies, konnte dieses im Pellet der Expression von BL21(DE3)/pGroESL/pαHE706 nachgewiesen werden. Dadurch war zu erkennen, daß die Expression von αHE706 in BL21(DE3)/pGroESL zwar erfolgreich verlief, aber die Koexpression mit dem Chaperonin-Komplex GroEL/GroES kein lösliches AChR-Fragment in nachweisbaren Mengen lieferte.
Das Pellet wurde nach der Methode von Barkas aufgereinigt, danach lagen die Proteine denaturiert in 8 M Harnstoff-Phosphatlösung vor. Um die Proteine von dieser denaturierenden Umgebung zu befreien, wurden Verdünnungsversuche mit mehreren Puffersystemen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß bei der 1:10 Verdünnung, wie auch bei der langsamer verlaufenden Dialyse, 0,5 M Arginin benötigt wird, um das Aggregieren der Proteine zu verhindern.
Zur Aufreinigung des AChR-Fragmentes mit His-Tag wurde die nach der Dialyse gegen 0,5 M Arginin-PBS-Puffer vorliegende Proteinlösung einer Ni-Affinitätschromatographie unterzogen. In der nachfolgenden SDS-PAGE konnte ein Protein mit einer Größe von ca. 25 kD im Eluat, aber auch im Waschpuffer detektiert werden. Dieses Protein könnte das

gesuchte AChR-Fragment αHE706 sein. Da es aber auch im Waschpuffer auftrat, könnte es sich jedoch auch um ein unspezifisch an die His-Trap-Säule gebundenes Protein handeln. Eine Aufreinigung dieses Proteins konnte nicht erzielt werden, zusätzlich kam es zu Proteinverlusten von bis zu 50% bei der Ni-Affinitätschromatographie. Anscheinend präzipitierten die Proteine auf der Säule. Auch die Ni-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff-Phosphatpuffern und eine erhöhte Konzentration an Imidazol erzielten keine Verbesserungen in Bezug auf den hohen Proteinverlust und die Qualität der Aufreinigung.

Abschließend sollte geklärt werden, ob über die Isolierung der *inclusion bodies* bei der Expression von BL21(DE3)/pGroESL/pαHE706 eine Aufreinigung des Expressionsproduktes αHE706 erzielt werden kann und ob es sich bei dem in der SDS-PAGE detektierten Protein, mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kD, um das AChR-Fragment handelt. Durch Isolierung der *inclusion bodies* und anschließender Ni-Affinitätschromatographie in 1% SDS-PBS konnte ein Protein mit einer Größe von ca. 25 kD weitgehend von Verunreinigungen befreit werden. Durch Verdau mit Enterokinase und anschließender SDS-PAGE mit Western Blot-Analyse konnte dieses Protein eindeutig als das AChR-Fragment αHE706 identifiziert werden. Der nicht vollständige Verdau der Proteinbande bei ca. 25 kD, ist vermutlich auf die Hemmung der Enzymaktivität der Enterokinase durch SDS zurückzuführen.

5. T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugate

5.1. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, durch Einsatz von rekombinanten AChR-Fragmenten in Antigen-Gelonin-Konjugaten, die Versuche von Urbatsch, zur antigenspezifischen Immunsuppression am Modell der EAMG, zu optimieren [Urbatsch *et al.*, 1993]. Die Vorteile der AChR-Fragmente gegenüber dem kompletten AChR bei der Konjugatsynthese wurden in Kapitel 4.1. ausführlich dargestellt.

Da die Isolierung der nativ gefalteten AChR-Fragmente im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, stellte Prof. Dr. A. Maelicke (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Mainz) freundlicherweise das rekombinante T-AChR$_{1-209}$-Fragment (ex-α-T-AChR, AS 1-209) zur Verfügung. Das Rezeptorfragment lag in einer Konzentration von 0,28-0,40 mg/ml vor und konnte nicht weiter aufkonzentriert werden. Auch Versuche der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Maelicke das T-AChR$_{1-209}$-Fragment aufzukonzentrieren scheiterten in meiner Anwesenheit. Die hohe Aggregationsbereitschaft des Rezeptorfragments stellte ein Problem bei der Kopplung mit dem ribosomeninaktivierenden Toxin Gelonin dar.

Wie bereits in Kapitel 1.4.4. erwähnt, stehen für die Kopplung des T-AChR-Fragmentes an Gelonin eine Vielzahl verschiedener Kopplungsreagenzien zur Verfügung, bei denen zwei Verbrückungsmethoden zum Einsatz kommen können: die Thioether- und die Disulfidverbrückung.

Die Thioetherbrücke zeichnet sich durch ihre Resistenz gegen Reduktion aus und ist deshalb zur Synthese stabiler Konjugate geeignet. Für *in vivo* Versuche ist sichergestellt, daß Immuntoxine, die eine Thioetherbrücke besitzen, zu ihren Zielzellen gelangen, bevor sie durch metabolische Prozesse abgebaut werden können. Andererseits besteht die Gefahr, daß die Immuntoxine, in der Zelle angelangt, nicht oder nur unvollständig gespalten werden und so ihre Funktion nicht erfüllen.

Für die Disulfidbrücke gilt das Gegenteil. Sie ist anfällig gegen Reduktion und kann daher, bevor das Konjugat seine Zielzelle erreicht hat, leicht metabolisiert werden. Ist das Konjugat jedoch phagocytiert, wird die Spaltung des Immuntoxins durch die Labilität der Disulfidbrücke begünstigt.

Für den *in vivo* Einsatz der T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugate erscheint die Verwendung von Kopplungsreagenzien die Thioetherbrücken ausbilden sinnvoller.

Nach Kopplung des T-AChR$_{1-209}$ an Gelonin müssen die entstandenen Konjugate von ihren Edukten abgetrennt werden, außerdem muß die Menge des isolierten Konjugates ausreichen, um eine aussagekräftige Anzahl von Lewis-Ratten mit EAMG therapieren zu können.

5.2. Ergebnisse

5.2.1. BMME gekoppelte T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugate

Bei der Kopplung des T-AChR$_{1-209}$-Fragmentes mit Gelonin sollte Bis-(maleimido)-methylether (BMME) als Kopplungsreagenz eingesetzt werden.
Gegenüber der Kopplung mit Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) bietet dieses Verfahren den Vorteil, daß beide Reaktionspartner zunächst mit 2-Iminothiolan modifiziert werden. Dadurch werden die Aminogruppen der Proteine in Amidine umgewandelt, welche unter physiologischen Bedingungen ebenfalls protoniert sind. Die Eigenschaften der Proteine, z.B. die Toxizität von Gelonin, werden so durch die Beibehaltung der Nettoladungen kaum beeinflußt [Hunter *et al.*, 1972]. Die Reaktion mit SMCC dagegen ist mit einer Ladungsänderung verbunden, denn es entsteht ein Säureamid, das sich unter physiologischen Bedingungen nicht mehr protonieren läßt. Die Modifizierung von Gelonin mit SMCC hat einen hohen Toxizitätsverlust zur Folge [Brust *et al.*, 1987] und manche Proteine aggregieren bei dieser Reaktion [Burk, 1990].
Die Kopplung sollte nach dem in Abbildung 5-1 gezeigten Schema erfolgen.

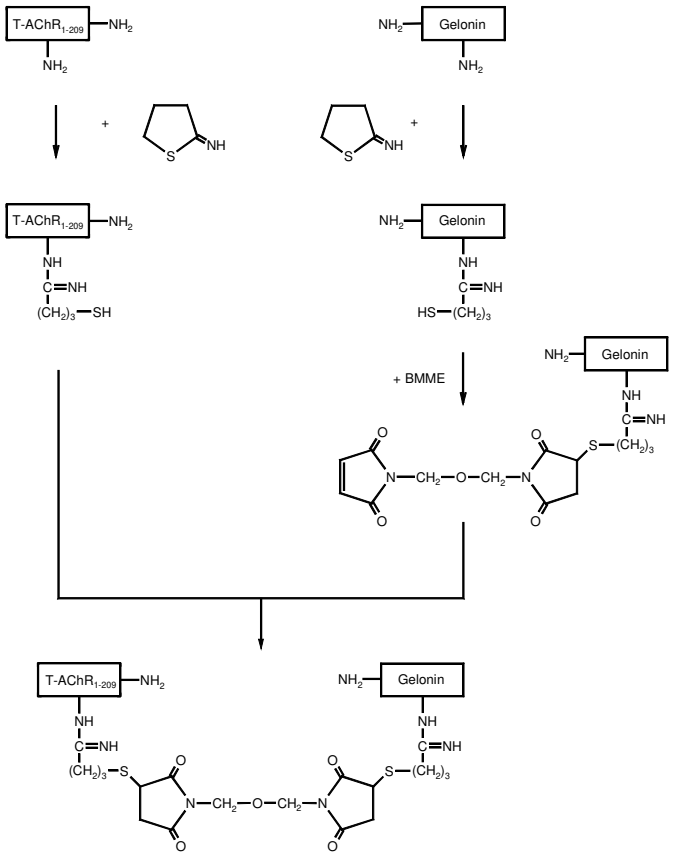


Abbildung 5-1: Kopplungsschema für die Darstellung des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates mit Bis-(maleimido)-methylether (BMME).

5.2.1.1. Einbau von Thiolgruppen in Gelonin

Da Gelonin keine frei zugänglichen Thiolgruppen besitzt, mußten diese durch Modifizierung mit 2-Iminothiolan eingeführt werden. Brust konnte zeigen, daß die biologische Aktivität bei der Einführung von bis zu zwei Mol 2-Iminothiolan pro Mol Gelonin weitgehend erhalten bleibt [Brust *et al.*, 1987].
Die Geloninlösung (5-10 mg/ml) wurde 90 min bei 4°C mit einem 25-fachen molaren Überschuß an 2-Iminothiolan inkubiert. Das nicht umgesetzte 2-Iminothiolan wurde durch Gelfiltration über eine Sephadex G 25 Säule abgetrennt. Anschließend wurde die Anzahl der eingebauten Thiolgruppen nach der Methode von Grassetti bestimmt [Grassetti *et al.*, 1967]. Dabei ergab sich bei einem 25-fachen molaren Reaktionsüberschuß an 2-Iminothiolan ein durchschnittlicher Einbau von 2 Mol Thiolgruppen pro Mol Gelonin. Die Ausbeuten an thiolmodifiziertem Gelonin lagen bei 60-70%.

5.2.1.2. Einbau von Maleimidgruppen in modifiziertes Gelonin

Zum Einbau von Maleimidgruppen wurde das thiolmodifizierte Gelonin mit einem 150-fachen molaren Überschuß an BMME für 20 min bei RT inkubiert und anschließend mit Centriprep 10 Konzentratoren (MWCO 10 kD) auf ca. 1 mg/ml aufkonzentriert. Die Konzentrierung führte zugleich zu einer teilweisen Entfernung von nicht umgesetztem BMME. Der restliche Teil des Modifizierungsreagenzes wurde durch Gelfiltration an Sephadex G 25 abgetrennt. Nach der Methode von Ishikawa wurde die Zahl der eingebauten Maleimidgruppen bestimmt [Ishikawa *et al.*, 1983]. Bei einem 150-fachen molaren BMME-Überschuß ergab sich ein Einbau von 1,4 Mol Maleimidgruppen pro Mol Gelonin. Die Ausbeute an maleimidmodifiziertem Gelonin bezogen auf thiolmodifiziertes Gelonin betrug 72%. Bezogen auf nicht modifiziertes Gelonin wurde eine Ausbeute von ca. 45% erzielt.

5.2.1.3. Einbau von Thiolgruppen in T-AChR$_{1-209}$

Da der T-AChR$_{1-209}$ keine frei zugänglichen Thiolgruppen besitzt, mußten diese durch Modifizierung mit 2-Iminothiolan eingeführt werden. Die zwei Disulfidbrücken (Cys^{128} mit Cys^{142}, Cys^{192} mit Cys^{193}) des T-AChR$_{1-209}$ könnten zwar mit DTT (Dithiothreitol-(4,5-Dihydroxy-1,2-dithian)) in die freien Thiole überführt [Cleland, 1964] und so zur Reaktion mit dem Kopplungsreagenz verwendet werden, jedoch birgt eine solche Methode die Gefahr der Destabilisierung der dreidimensionalen Proteinstruktur.

1 ml der T-AChR$_{1-209}$-Fragment-Lösung (0,4 mg/ml) wurde 90 min bei 4°C mit einem 50-fachen molaren Überschuß an 2-Iminothiolan modifiziert. Durch Einsatz des 50-fachen Überschusses sollten einerseits genügend Aminogruppen des T-AChR$_{1-209}$ modifiziert, andererseits die Bildung höherer Konjugate durch eine zu große Zahl von Thiolgruppen minimiert werden. Nach der Entfernung von nicht umgesetztem 2-Iminothiolan durch Gelfiltration an Sephadex G 25 wurde eine Einbaurate von 1,7 Mol Thiolgruppen pro Mol T-AChR$_{1-209}$ nach Grassetti bestimmt. Allerdings trat als Folge der Gelchromatographie ein hoher Proteinverlust auf, die Ausbeute an thiolmodifiziertem AChR$_{1-209}$ lag bei nur 20%. Anscheinend präzipitierten die Proteine auf der Säule.

Aus diesem Grunde mußte eine Alternative zur Abtrennung des überschüssigen Modifizierungsreagenzes gefunden werden. Da das T-AChR$_{1-209}$-Fragment nicht in ausreichenden Mengen vorhanden war, wurde es zur Optimierung der Reaktionsbedingungen durch Peroxidase (POD) ersetzt. POD wurde mit Gelonin schon früher zur Synthese von Konjugaten verwendet und hatte sich in Modellversuchen zur antigenspezifischen Immunsuppression bewährt [Brust, 1986; Hofmann, 1988; Schäfer, 1995; Kreilinger, 1995]. Die vom molaren Überschuß an 2-Iminothiolan abhängigen Einbauraten sind bei POD und dem T-AChR$_{1-209}$-Fragment allerdings nicht vergleichbar. Durch frühere Untersuchungen war bekannt, daß POD für eine Einbaurate von ca. 2 Mol Thiolgruppen pro Mol POD einen ca. 200-fachen molaren Überschuß an 2-Iminothiolan benötigt [Schäfer, 1995; Kreilinger, 1995].

Als Alternative zur Gelfiltration wurde die Dialyse in einer ProDiCon™-Membran (Fa. Spektrum) zur Abtrennung des Modifizierungsreagenzes gewählt.

5 ml der POD-Lösung (0,4 mg/ml) wurden 90 min bei 4°C mit einem 200-fachen molaren Überschuß an 2-Iminothiolan modifiziert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend gegen 5 mM EDTA-Phosphatpuffer mit Hilfe der ProDiCon™-Membran dialysiert. Nach der Dialyse konnte mit Hilfe der Methode von Grassetti eine Einbaurate von 3,5 Mol Thiolgruppen pro Mol POD bestimmt werden. Die Ausbeute an thiolmodifizierter POD betrug nur 20%. Um sicher zu gehen, daß die Dialyse nicht umgesetztes 2-Iminothiolan vollständig abgetrennt hatte, wurde das Dialysat auf eine Sephadex G 25 Säule aufgetragen. Sollte noch überschüssiges 2-Iminothiolan in detektierbaren Mengen im Dialysat vorliegen, erscheint nach dem Signal der modifizierten POD ein zweites Signal im Elutionsdiagramm.

1 | 2
Laufrichtung →

Abbildung 5-2: Elutionsdiagramm der Gelfiltration zur Überprüfung der vollständigen Abtrennung nicht umgesetzten 2-Iminothiolans von modifizierter POD. Eluiert wurde mit 5 mM EDTA-Phosphatpuffer.
1: modifizierte POD
2: nicht umgesetztes 2-Iminothiolan
Säulenmaterial: Sephadex G 25 (l = 12 cm, ∅ = 1,5 cm)
Flußrate: 1,5 ml/min
Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 277 nm.

Trotz der Dialyse in der ProDiCon™-Membran ist ein zweites Signal im Elutionsdiagramm zu erkennen. Eine erneute Bestimmung der Einbaurate nach Grassetti ergab 0,4 Mol Thiolgruppen pro Mol POD. Die Differenz zwischen 3,5 Mol Thiolgruppen pro Mol POD vor der Gelfiltration und 0,4 Mol Thiolgruppen pro Mol POD nach der Gelfiltration zeigte, daß noch überschüssiges 2-Iminothiolan nach der Dialyse vorhanden war und durch die Gelfiltration entfernt werden konnte. Das noch vorliegende 2-Iminothiolan hydrolysierte und erhöhte die nach der Methode von Grassetti bestimmten Werte.

Durch das Auftreten des zweiten Signals im Elutionsdiagramm und der Differenz der Einbauraten vor und nach der Gelfiltration konnte auf zwei unterschiedlichen Wegen bewiesen werden, daß das Modifizierungsreagenz nicht vollständig abgetrennt wurde. Eine Modifizierung der Dialyse mit der ProDiCon™-Membran wurde als nicht sinnvoll erachtet. Zum einen war die Einbaurate mit 0,4 Mol Thiolgruppen pro Mol POD zu niedrig, was eine Erhöhung des 2-Iminothiolan-Überschusses bzw. eine Verkürzung der Dialysezeiten erfordert hätte, zum anderen konnte das überschüssige 2-Iminothiolan nicht vollständig abgetrennt werden.

Da die ProDiCon™-Membran bei der Abtrennung des nicht umgesetzten Modifizierungsreagenzes versagt hatte, sollte eine Slide-A-Lyzer® Dialysekassette (Fa. Pierce) getestet werden. Die Konzentration der POD-Lösung, der Überschuß an 2-Iminothiolan und die weiteren Reaktionsbedingungen wurden nicht geändert. Das Reaktionsgemisch wurde gegen 5 mM EDTA-Phosphatpuffer mit Hilfe der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette dialysiert. Nach der Dialyse konnte mittels Grassetti eine Einbaurate von 0,9 Mol Thiolgruppen pro Mol

POD bestimmt werden. Die Ausbeute an thiolmodifizierter POD betrug 52%. Auch dieses Dialysat wurde auf eine Sephadex G 25 Säule aufgetragen. Im Elutionsdiagramm konnte 2-Iminothiolan detektiert werden. Eine der Gelfiltration folgende Einbauratenbestimmung nach Grassetti ergab 0,2 Mol Thiolgruppen pro Mol POD.
Das Auftreten des zweiten Signals im Elutionsdiagramm, wie die Differenz von 0,7 bei der Einbauratenbestimmung vor und nach der Gelfiltration zeigten, daß auch bei der Dialyse mit Hilfe der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette einerseits überschüssiges 2-Iminothiolan nicht vollständig abgetrennt werden konnte und andererseits auch nur eine Einbaurate von 0,2 Mol Thiolgruppen pro Mol POD erzielt werden konnte.

5.2.1.4. Diskussion

Die Synthese des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates sollte mit dem Kopplungsreagenz BMME nach dem in Abbildung 5-1 vorgestellten Schema durchgeführt werden.
Der Einbau von Thiolgruppen in Gelonin durch Modifizierung mit 2-Iminothiolan verlief erfolgreich. Durch einen 25-fachen molaren Überschuß an Modifizierungsreagenz konnte ein durchschnittlicher Einbau von 2 Mol Thiolgruppen pro Mol Gelonin erzielt werden. Dies waren optimale Voraussetzungen, um durch die Umsetzung mit einem 150-fachen molaren Überschuß an BMME Maleimidgruppen in Gelonin einzuführen. Der erhaltene Einbau von 1,4 Mol Maleimidgruppen pro Mol Gelonin ist ein geeigneter Wert für die Kopplung mit thiolmodifiziertem T-AChR$_{1-209}$.
Die Modifizierung von T-AChR$_{1-209}$ mit 2-Iminothiolan verlief allerdings nicht problemlos. Bei der Gelfiltration, nach der Umsetzung von T-AChR$_{1-209}$ mit einem 50-fachen molaren Überschuß an 2-Iminothiolan, trat ein Verlust von 80% an T-AChR$_{1-209}$ auf. Dieser hohe Verlust durch Präzipitation des Proteins bei der Gelchromatographie machte den Einsatz anderer Methoden zur Abtrennung von nicht umgesetzten Modifizierungsreagenz notwendig. Aus diesem Grund wurden Dialysemethoden mit einer ProDiCon™-Membran bzw. einer Slide-A-Lyzer® Dialysekassette getestet.
Zuerst mußte in Vorversuchen überprüft werden, ob diese Dialysemethoden zur vollständigen Abtrennung von nicht umgesetztem 2-Iminothiolan ausreichen. Da der T-AChR$_{1-209}$ nur in sehr geringen Mengen vorhanden war, wurde er in diesen Vorversuchen durch POD ersetzt. Der Wechsel zu POD hat auf die Abtrennung des nicht umgesetzten Modifizierungsreagenzes durch die jeweilige Dialysemethode keinen Einfluß. Nachteile dieser Substitution sind aber, daß die Aggregationsbereitschaft von T-AChR$_{1-209}$ bei den verschiedenen Dialysemethoden nicht überprüft werden konnte und die geeigneten Überschüsse an 2-Iminothiolan nicht von POD auf T-AChR$_{1-209}$ übertragbar sind. Nach erfolg-

reicher Abtrennung müßten weitere Versuche mit T-AChR$_{1-209}$ zur Abklärung dieser Punkte durchgeführt werden. Der jeweiligen Dialysemethode folgte eine Gelchromatographie. Anhand des Auftretens eines 2-Iminothiolan-Signals im Elutionsdiagramm und der Thiolgruppenbestimmungen vor bzw. nach der Gelchromatographie sollte überprüft werden, ob das nicht umgesetzte Modifizierungsreagenz durch die Dialyse vollständig entfernt werden konnte.

Keine der beiden, nach der Umsetzung von POD mit 2-Iminothiolan, durchgeführten Dialysemethoden konnte das überschüssige Modifizierungsreagenz vollständig abtrennen. In beiden Fällen konnte im Elutionsdiagramm der nachfolgenden Gelchromatographie ein 2-Iminothiolan-Signal detektiert werden. Die Differenz von 3,5 zu 0,4 Mol Thiolgruppen pro Mol POD vor und nach der Gelchromatographie bestätigte, daß nach der Dialyse mit der ProDiCon™-Membran noch überschüssiges, zwischenzeitlich hydrolysiertes, 2-Iminothiolan vorlag. Die Differenz von 0,9 zu 0,2 Mol Thiolgruppen pro Mol POD vor und nach der Gelchromatographie bei Verwendung der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette zeigte ein vergleichbares Ergebnis.

Es bleibt ungeklärt, warum 2-Iminothiolan mit seinem geringen Molekulargewicht von 137,6 g/mol nicht durch Membrane der ProDiCon™ bzw. Slide-A-Lyzer® Dialysekassette mit einem MWCO von 10 kD dialysiert werden konnte.

Da das T-AChR$_{1-209}$-Fragment bzw. POD mit 2-Iminothiolan zwar modifiziert werden konnte, aber bei der Abtrennung des überschüssigen Modifizierungsreagenz Probleme auftraten, wurde die Absicht, das T-AChR$_{1-209}$-Fragment über BMME mit Gelonin zu koppeln, verworfen.

5.2.2. SMCC gekoppelte T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugate

Eine weitere Möglichkeit, die beiden Proteine über eine Thioetherbrücke zu koppeln, eröffnet sich durch den Einsatz von Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC). Da bei der Reaktion von Gelonin mit SMCC durch die Änderung der Nettoladung die Toxizität des ribosomen-inaktivierenden Proteins gesenkt wird [Brust *et al.*, 1987], sollte das T-AChR$_{1-209}$-Fragment mit SMCC umgesetzt und in Gelonin durch 2-Iminothiolan, unter Beibehaltung der Nettoladung, Thiolgruppen eingeführt werden. Bei der Reaktion von T-AChR$_{1-209}$ mit SMCC besteht allerdings die Gefahr, daß durch Änderung der Nettoladung die Aggregationsbereitschaft des T-AChR$_{1-209}$ ansteigen könnte. Unklar ist auch, ob die Entfernung von überschüssigem SMCC nach der Umsetzung mit T-AChR$_{1-209}$ genauso problematisch verläuft, wie die Entfernung von überschüssigem 2-Iminothiolan (siehe Kapitel 5.2.1.3.). Die Kopplung sollte nach dem in Abbildung 5-3 gezeigten Schema erfolgen.

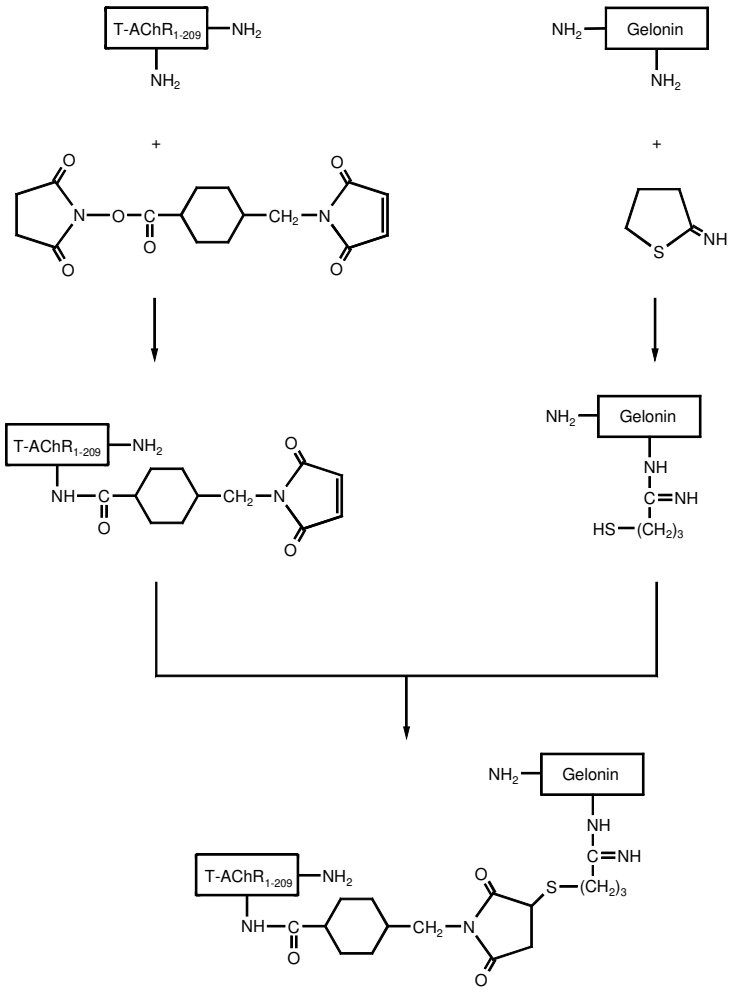


Abbildung 5-3: Kopplungsschema für die Darstellung des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates mit Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC).

5.2.2.1. Einbau von Thiolgruppen in Gelonin

siehe Kapitel 5.2.1.1.

5.2.2.2. Einbau von Maleimidgruppen in T-AChR$_{1-209}$

Zur Entfernung von überschüssigem 2-Iminothiolan nach der Modifizierung des T-AChR$_{1-209}$ wurden mehrere Methoden getestet (siehe Kapitel 5.2.1.3.). Bei der Gelchromatographie über Sephadex G 25 aggregierte das Rezeptorfragment, während bei den Dialysen mit der ProDiCon™-Membran bzw. der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette das überschüssige Modifizierungsreagenz nicht vollständig aus der Reaktionslösung entfernt werden konnte. Da der

Proteinverlust bei Einsatz der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette am niedrigsten war, sollte diese Dialysemethode zur Abtrennung von überschüssigem SMCC nach der Reaktion mit T-AChR$_{1-209}$ getestet werden. Auch zu diesem Vorversuch wurde POD anstelle des T-AChR$_{1-209}$-Fragmentes eingesetzt.

5 ml einer POD-Lösung (0,4 mg/ml) wurden 60 min bei RT mit einem 30-fachen molaren Überschuß an SMCC umgesetzt. Das während der Inkubation ausgefallene SMCC konnte durch Zentrifugation entfernt werden. Der Überstand wurde gegen 5 mM EDTA-Phosphatpuffer mit Hilfe der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette dialysiert. Nach der Dialyse konnte eine Einbaurate von 1,8 Mol Maleimidgruppen pro Mol POD nach Ishikawa bestimmt werden. Die Ausbeute an maleimidmodifizierter POD lag bei 55%.

Um nachzuweisen, daß die Dialyse den Überschuß an SMCC vollständig abgetrennt hatte, wurde das Dialysat auf eine Sephadex G 25 Säule aufgetragen. Noch vorhandenes SMCC würde, analog zu 2-Iminothiolan, mit einem zweiten Signal nach dem Proteinsignal eluieren. Im Elutionsdiagramm konnte kein SMCC-Signal detektiert werden. Die nach der Gelfiltration erneut durchgeführte Bestimmung der Einbauraten ergab 1,7 Mol Maleimidgruppen pro Mol POD. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß SMCC vollständig mit Hilfe der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette aus der Lösung entfernt wurde. Die Differenz bei der Bestimmung der Einbauraten von 0,1 ist auf Ungenauigkeiten der Messungen zurückzuführen.

Aufgrund der erfolgreichen Abtrennung des überschüssigen Modifizierungsreagenzes in den Vorversuchen wurde die Modifizierung des T-AChR$_{1-209}$-Fragmentes mit SMCC und anschließend die Kopplung mit Gelonin durchgeführt.

3 ml der T-AChR$_{1-209}$-Lösung (0,28 mg/ml) wurden 90 min bei RT mit einem 200-fachen molaren Überschuß an SMCC inkubiert. Durch Zentrifugation wurde das während der Inkubation ausgefallene SMCC entfernt. Der Überstand wurde gegen 5 mM EDTA-Phosphatpuffer mit Hilfe der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette dialysiert. Nach der Dialyse konnte eine Einbaurate von 4,8 Mol Maleimidgruppen pro Mol T-AChR$_{1-209}$ nach Ishikawa bestimmt werden. Die Ausbeute an maleimidmodifiziertem T-AChR$_{1-209}$ lag bei 67%.

5.2.2.3. Kopplung von thiolmodifiziertem Gelonin mit maleimidmodifiziertem T-AChR$_{1-209}$

Zur Kopplung wurden 0,56 mg maleimidmodifiziertes T-AChR$_{1-209}$-Fragment (siehe Kapitel 5.2.2.2.) mit einem vierfachen molaren Überschuß an thiolmodifiziertem Gelonin (siehe Kapitel 5.2.1.1.) versetzt. Die Proteinlösung wurde anschließend mit Centriprep 10 Konzentratoren (MWCO 10 kD) auf ein Volumen von ca. 2 ml aufkonzentriert und bei 4°C inkubiert.

5.2.2.4. Reinigung und Charakterisierung des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates

Zur Reinigung des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates, von den nicht umgesetzten Edukten, wurde eine Gelchromatographie durchgeführt. Ein Teil der Proteinlösung inkubierte vor der Gelchromatographie sechzehn Stunden bei 4°C, der restliche Teil zwei Wochen.
Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden 250 µl der Proteinlösung (1,6 mg/ml Gesamtprotein) auf die Gelfiltrationssäule (Superose 12, l = 30 cm, ∅ = 1,4 cm, HPLC-System) aufgetragen. Eluiert wurde mit PBS, pH 7,2 bei einer Flußrate von 0,75 ml/min. In Abbildung 5-4 sind die beiden Elutionsdiagramme dargestellt.

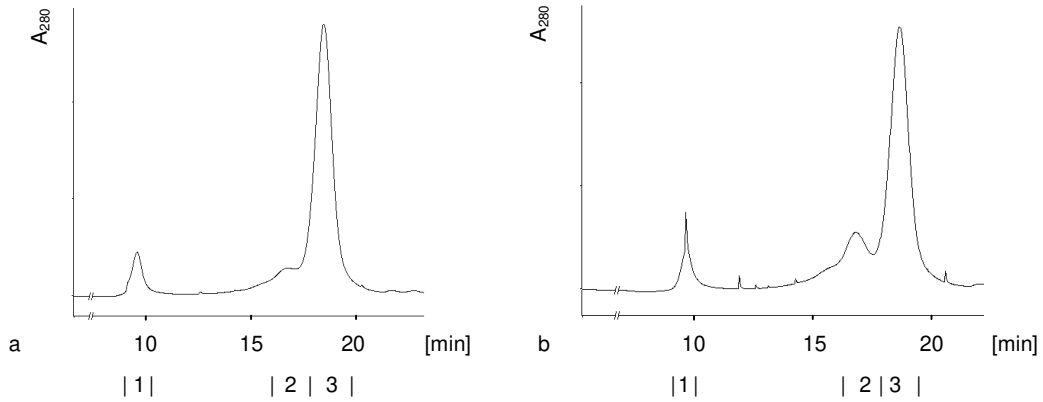


Abbildung 5-4: Elutionsdiagramme zur Aufreinigung des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates. Eluiert wurde mit PBS, pH 7,2. Die Zahlen 1-3 geben die Numerierungen der gesammelten Fraktionen an.
a: nach Inkubation von 16 Stunden bei 4°C
b: nach Inkubation von 2 Wochen bei 4°C
Säulenmaterial: Superose 12 (l = 30 cm, ∅ = 1,4 cm)
Flußrate: 0,75 ml/min
Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Durch den Vergleich mit den einzeln auf die Säule aufgetragenen Edukten (hier nicht gezeigt), konnten die im Elutionsdiagramm sichtbaren Signale zugeordnet werden. T-AChR$_{1-209}$ wurde nach 9,5 min (Fraktion 1) eluiert, während Gelonin nach 18,5 min (Fraktion 3) von der Säule kam. Somit handelt es sich bei der Schulter, an der linken Seite des Gelonin-Signals bei 16,5 min (Fraktion 2), wahrscheinlich um das Signal des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates. Nach Verlängerung der Inkubationszeit von sechzehn Stunden auf zwei Wochen ist ein Anwachsen dieser Schulter zu beobachten. Jeweils 2 ml der Fraktion 2 wurden mit TCA gefällt und in der SDS-PAGE analysiert.

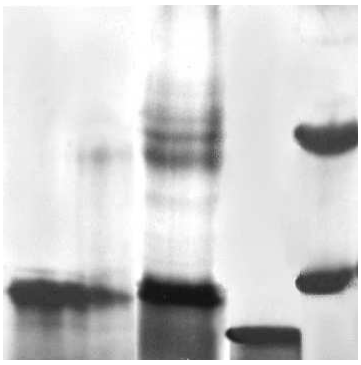


Abbildung 5-5: 10%ige SDS-PAGE mit Silber gefärbt.
Bahn 1: Gelonin, 20 µg
Bahn 2: Fraktion 2 nach Inkubation von 16 h bei 4°C
Bahn 3: Fraktion 2 nach Inkubation von 2 Wochen bei 4°C
Bahn 4: T-AChR$_{1-209,}$ 14 µg
Bahn 5: Marker (68 und 36 kD)

Unabhängig von der Inkubationszeit vor der Gelchromatographie, ist in der jeweiligen Fraktion 2, ein Protein zu erkennen, daß ein dem T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugat entsprechendes Molekulargewicht (ca. 57 kD, mit Berücksichtigung der Modifizierungen) aufweist. Wie schon in den Elutionsdiagrammen (siehe Abbildung 5-4) sichtbar ist, konnte dieses Protein nicht vollständig von Gelonin abgetrennt werden.
Da es in Vorversuchen nicht gelang den T-AChR$_{1-209}$ mit mAb 35 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ) im ELISA zu detektieren [Hossann, 2001] und zu diesem Zeitpunkt kein mAb 198 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ, denaturiert) vorhanden war, konnte keine weitere Charakterisierung vorgenommen werden.
Weitere Synthesen des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates bzw. eine Optimierung der Aufreinigung konnten nicht durchgeführt werden, da zu diesem Zeitpunkt kein T-AChR$_{1-209}$ mehr zur Verfügung stand.

5.2.2.5. Diskussion

Die Synthese des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates sollte mit dem Kopplungsreagenz SMCC nach dem in Abbildung 5-3 vorgestellten Schema durchgeführt werden.
Da bei der Reaktion von Gelonin mit SMCC durch die Änderung der Nettoladung die Toxizität des ribosomen-inaktivierenden Proteins gesenkt wird [Brust *et al.*, 1987], sollte das T-AChR$_{1-209}$-Fragment mit SMCC umgesetzt und in Gelonin durch 2-Iminothiolan, unter Beibehaltung der Nettoladung, Thiolgruppen eingeführt werden. Allerdings könnte durch die Reak-

tion von T-AChR$_{1-209}$ mit SMCC und der damit verbundenen Änderung der Nettoladung die Aggregationsbereitschaft des T-AChR$_{1-209}$ erhöht werden.

Bei der Konjugatsynthese nach diesem Schema war es notwendig überschüssiges SMCC nach der Umsetzung mit T-AChR$_{1-209}$ aus der Reaktionslösung zu entfernen. Die Untersuchungen zur Entfernung von 2-Iminothiolan (siehe Kapitel 5.2.1.3.) zeigten, daß der Proteinverlust beim Einsatz von Slide-A-Lyzer® Dialysekassetten im Vergleich zur ProDiCon™-Membran geringer war, während bei der Gelchromatographie ein Großteil des T-AChR$_{1-209}$ aggregierte. Aus diesem Grund sollte die Entfernung von nicht umgesetztem SMCC mit der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette durchgeführt werden. In einem Modellversuch, zur Überprüfung der Vollständigkeit der Abtrennung von SMCC, wurde der T-AChR$_{1-209}$ durch POD ersetzt. Die Vor- und Nachteile dieser Substitution wurden in Kapitel 5.2.1.4. ausführlich diskutiert. Nach der Umsetzung von POD mit einem 30-fachen molaren Überschuß an SMCC wurde mit der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette dialysiert. Die nachfolgende Bestimmung der Einbaurate ergab 1,8 Mol Maleimidgruppen pro Mol POD. Die Proteinausbeute nach der Dialyse betrug 55%. Um die vollständige Abtrennung von überschüssigem SMCC nachzuweisen, wurde das Dialysat einer Gelchromatographie unterzogen. Noch im Dialysat vorhandenes SMCC würde im Elutionsdiagramm, analog 2-Iminothiolan (siehe Kapitel 5.2.1.3.), mit einem Signal nach dem Proteinsignal eluieren. Da im Elutionsdiagramm kein SMCC-Signal detektiert werden konnte war anzunehmen, daß SMCC vollständig mit Hilfe der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette aus der Reaktionslösung entfernt worden war. Die nach der Gelfiltration bestimmte Einbaurate von 1,7 Mol Maleimidgruppen pro Mol POD bestätigte dieses Ergebnis. Die Differenz der Einbauraten von 0,1 vor und nach der Gelchromatographie ist auf Ungenauigkeiten der Messungen zurückzuführen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das T-AChR$_{1-209}$-Fragment mit SMCC modifiziert und das überschüssige Modifizierungsreagenz mit Hilfe der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette abgetrennt. SMCC wurde mit einem 200-fachen molaren Überschuß eingesetzt. Durch die begrenzte Menge an T-AChR$_{1-209}$ konnten vor der Umsetzung keine Einbauversuche mit mehreren unterschiedlichen Überschüssen an SMCC durchgeführt werden. Der hohe molare Überschuß an SMCC wurde in Anlehnung an die Ergebnisse von Rousselle unter Berücksichtigung der geringen T-AChR$_{1-209}$-Konzentration (0,28 mg/ml) gewählt. Nach der Dialyse konnte eine Einbaurate von 4,8 Mol Maleimidgruppen pro Mol T-AChR$_{1-209}$ bestimmt werden. Durch die hohe Einbaurate bestand zwar die Gefahr der Bildung von Polykonjugaten, aber eine zu niedrige Einbaurate hätte die Synthese des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates erschwert. Die Proteinausbeute von 67% nach der Dialyse zeigte, daß durch die Modifizierung mit SMCC und der damit verbundenen Änderung der Nettoladung, die Aggregationsbereitschaft des T-AChR$_{1-209}$ nicht wesentlich erhöht wurde.

Zur Konjugatsynthese wurde das maleimidmodifizierte T-AChR$_{1-209}$-Fragment mit einem vierfachen molaren Überschuß an thiolmodifiziertem Gelonin umgesetzt. Durch den hohen Überschuß an Gelonin sollte das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Produktes verschoben werden. Gelonin war dazu geeigneter als der T-AChR$_{1-209}$, da es in nahezu unbegrenzten Mengen vorlag. Des weiteren könnte nicht umgesetzter T-AChR$_{1-209}$, welcher eventuell nicht vollständig abgetrennt als Verunreinigung mit dem T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugat *in vivo* eingesetzt würde, zu einer unerwünschten Stimulierung der Autoimmunreaktion führen.

Die Elutionsdiagramme der Gelchromatographien (Superose 12), zur Abtrennung des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates von den nicht umgesetzten Edukten, nach Inkubationszeiten von sechzehn Stunden bzw. zwei Wochen, zeigten einen unerwarteten Verlauf. Der Vergleich mit den einzeln auf die Säule aufgetragenen Edukte bestätigte, daß nicht gekoppelter T-AChR$_{1-209}$ in einem Bereich eluierte (9,5 min), in dem normalerweise Proteine mit höherem Molekulargewicht erwartet werden. Die frühe Elution läßt auf das Vorliegen von T-AChR$_{1-209}$-Oligomeren schließen, die durch die denaturierenden Bedingungen in der SDS-PAGE als Monomere auftraten.

In der SDS-PAGE konnte, anhand des Molekulargewichts, nachgewiesen werden, daß es sich bei der Schulter an der linken Seite des Gelonin-Signals um das Signal des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates handelt. Charakterisierungen des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates auf immunologischer Basis, wie z.B. ELISA oder Western Blot, konnten nicht durchgeführt werden, da der T-AChR$_{1-209}$ im ELISA nicht mit mAb 35 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ) reagierte [Hossann, 2001]. Dies läßt auf eine unvollständige Faltung des T-AChR$_{1-209}$ schließen, die wiederum die hohe Aggregationsbereitschaft des Proteins erklärt. Andere Antikörper die mit dem T-AChR$_{1-209}$ reagieren, standen zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung.

In den Elutionsdiagrammen wie auch in der SDS-PAGE ist zu erkennen, daß das T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugat vollständig vom nicht umgesetzten T-AChR$_{1-209}$ abgetrennt werden konnte, aber noch eine starke Verunreinigung durch Gelonin aufwies. Bei weiteren Versuchen könnte eine Affinitätschromatographie, z.B. durch Einsatz von Schlangengiften wie α-Bungaro- bzw. α-Cobratoxin oder auch ein Wechsel des Elutionsmittels bei der Gelchromatographie die Aufreinigung verbessern. Rousselle erzielte durch den Wechsel von PBS/Cholat zu Wasser bei der Aufreinigung des αR506-Gelonin-Konjugates mittels Gelchromatographie gute Erfolge [Rousselle, 1996].

Die Bildung von Polykonjugaten konnte nicht beobachtet werden.

Das Anwachsen der Schulter im Elutionsdiagramm nach einer Inkubationszeit von zwei Wochen zeigte, daß die Kopplungsreaktion nach sechzehn Stunden noch nicht vollständig abgeschlossen war. Allerdings sind wohl im Verlauf der zwei Wochen die reaktiven Gruppen

der Edukte hydrolysiert. Zur Optimierung der Synthese des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates wären zusätzliche Versuche mit unterschiedlichen Inkubationszeiten notwendig gewesen.
Weitere Versuche zur Kopplung bzw. Aufreinigung des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates konnten aber nicht durchgeführt werden, da kein T-AChR$_{1-209}$ mehr zur Verfügung stand und auch nicht in absehbarer Zeit zu erhalten war.
Die negative Reaktion von mAb 35 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ) mit dem T-AChR$_{1-209}$ im ELISA [Hossann, 2001], ist ein Hinweis auf die nicht vollständige Faltung des Rezeptorfragmentes. Die hohe Bindungsaktivität mit verschiedenen Liganden, wie z.B. α-Bungarotoxin und Nikotin, läßt zwar auf eine annähernd native Konformation des T-AChR$_{1-209}$ schließen [Schrattenholz *et al.*, 1998], die Konformationen anderer Regionen des Polypeptids, die nicht in der näheren Umgebung dieser Liganden-Bindungsstellen liegen, wurden allerdings nicht untersucht [Tsouloufis *et al.*, 2000]. Die aufgrund der nicht vollständigen Faltung resultierende hohe Aggregationsbereitschaft und die Schwierigkeit den Rezeptor auf über 0,4 mg/ml aufzukonzentrieren, die auch in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Maelicke auftrat, erwiesen sich als problematisch für den Einsatz zur Synthese des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates.
Bevor weitere Versuche zur Synthese von Rezeptorfragment-Gelonin-Konjugaten durchgeführt werden, sollte erst eine Methode zur vollständigen Renaturierung der Rezeptorfragmente etabliert werden. Wie in Kapitel 4.2.3.5. diskutiert, sind dazu extrazelluläre AChR-Fragmente der α-Untereinheit mit einem Ende im Bereich der Aminosäuren 207-209 am besten geeignet. Zur Kopplung mit Gelonin könnten dann, die hier erarbeiteten Verbesserungen der Proteinmodifizierung eingesetzt werden. Mit größeren Proteinmengen sollte auch die Abtrennung der Edukte der Konjugatsynthese durch Modifizierung der Gelchromatographie oder Einsatz einer Affinitätschromatographie kein Problem sein.

5.3. Zusammenfassung

Durch den Einsatz von rekombinanten AChR-Fragmenten in Antigen-Gelonin-Konjugate sollten die Versuche von Urbatsch zur antigenspezifischen Immunsuppression am Modell der EAMG optimiert werden [Urbatsch *et al.*, 1993].

Das rekombinante Rezeptorfragment T-AChR$_{1-209}$ wurde freundlicherweise von Prof. Dr. A. Maelicke (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Mainz) zur Verfügung gestellt. Die hohe Aggregationsbereitschaft, die negative Reaktion mit mAb 35 (Spezifität: H-AChR, T-AChR, nativ) und die Probleme bei der Aufkonzentrierung, wiesen auf die unvollständige Faltung des T-AChR$_{1-209}$ hin, diese Annahme wurde in der Literatur bestätigt [Tsouloufis *et al.*, 2000].

Die Synthese des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates sollte mit dem Kopplungsreagenz BMME unter Ausbildung einer Thioetherbrücke erfolgen. Durch den Einsatz von BMME war es notwendig in beide Proteine Thiolgruppen, durch Modifizierung mit 2-Iminothiolan, einzuführen.

Die Modifizierung von Gelonin mit einem 25-fachen molaren Überschuß an 2-Iminothiolan, ergab einen durchschnittlichen Einbau von 2 Mol Thiolgruppen pro Mol Gelonin. Durch die nachfolgende Umsetzung mit einem 150-fachen molaren Überschuß an BMME konnten 1,4 Mol Maleimidgruppen pro Mol Gelonin eingeführt werden.

Bei der Modifizierung des T-AChR$_{1-209}$ mit einem 50-fachen molaren Überschuß an 2-Iminothiolan traten Probleme auf. Die Entfernung des nicht umgesetzten Modifizierungsreagenzes sollte durch eine Gelchromatographie (Sephadex G25) erfolgen. Dabei kam es zu einem Proteinverlust von 80%, der nur durch die Präzipitation des T-AChR$_{1-209}$ auf der Säule zu erklären ist. Aus diesem Grund wurden Dialysemethoden mit einer ProDiCon™-Membran bzw. einer Slide-A-Lyzer® Dialysekassette zur Abtrennung des überschüssigen 2-Iminothiolans getestet. Zuerst mußte in Vorversuchen überprüft werden, ob diese Dialysemethoden zur vollständigen Abtrennung von nicht umgesetztem 2-Iminothiolan ausreichen. Da der T-AChR$_{1-209}$ nur in sehr geringen Mengen vorhanden war, wurde er in diesen Vorversuchen durch POD ersetzt. Beide Dialysemethoden waren nicht in der Lage das überschüssige 2-Iminothiolan abzutrennen.

Da das T-AChR$_{1-209}$-Fragment bzw. POD mit 2-Iminothiolan zwar modifiziert, aber bei der Abtrennung des überschüssigen Modifizierungsreagenzes Probleme auftraten, wurden die weiteren Versuche der Synthese des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates mit dem Kopplungsreagenz SMCC durchgeführt. Analog zu BMME bildet auch SMCC eine Thioetherbrücke, bei der Kopplung von T-AChR$_{1-209}$ mit Gelonin aus.

Auch bei der Modifizierung des T-AChR$_{1-209}$ mit SMCC war es notwendig, nach der Inkubation, nicht umgesetztes Modifizierungsreagenz aus der Proteinlösung zu entfernen. Dazu

wurde die Dialysemethode mit einer Slide-A-Lyzer® Dialysekassette gewählt, wobei die vollständige Entfernung von überschüssigem SMCC erst am Modell mit POD überprüft wurde. Die Modifizierung von POD mit einem 30-fachen molaren Überschuß an SMCC, ergab einen Einbau von 1,8 Mol Maleimidgruppen pro Mol POD. Durch eine Gelfiltration der Reaktionslösung und nachfolgender Einbaubestimmung konnte die vollständige Entfernung von nicht umgesetztem SMCC bewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der T-AChR$_{1-209}$ mit einem 200-fachen molaren Überschuß an SMCC modifiziert und das überschüssige Modifizierungsreagenz mit Hilfe der Slide-A-Lyzer® Dialysekassette abgetrennt. Nach der Dialyse wurde eine Einbaurate von 4,8 Mol Maleimidgruppen pro Mol T-AChR$_{1-209}$ bestimmt.

Zur Synthese des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates wurde das maleimidmodifizierte T-AChR$_{1-209}$-Fragment mit einem vierfachen molaren Überschuß an thiolmodifiziertem Gelonin umgesetzt. Nach Inkubationszeiten von sechzehn Stunden bzw. zwei Wochen wurde die Proteinlösung einer Gelchromatographie (Superose 12), zur Abtrennung der nicht umgesetzten Edukte, unterzogen. In der nachfolgenden SDS-PAGE konnte das T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugat unabhängig von den unterschiedlichen Inkubationszeiten detektiert werden. Die Zunahme des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugat-Signals im Elutionsdiagramm nach einer Inkubationszeit von zwei Wochen, im Vergleich zur Inkubationszeit von sechzehn Stunden, zeigte allerdings, daß die Umsetzung nach sechzehn Stunden noch nicht vollständig abgeschlossen war. Das Konjugat konnte durch die Gelchromatographie vollständig von nicht umgesetztem T-AChR$_{1-209}$ abgetrennt werden, wies aber noch eine starke Verunreinigung durch Gelonin auf.

Da das von Prof. Dr. A. Maelicke zur Verfügung gestellte T-AChR$_{1-209}$-Fragment aufgebraucht war, konnten die notwendigen Versuche zur Optimierung der Konjugatsynthese nicht durchgeführt werden. In absehbarer Zeit konnte auch kein weiterer T-AChR$_{1-209}$ erhalten werden.

6. Gesamtzusammenfassung

Der zur Induzierung der EAMG benötigte nikotinische AChR konnte aus dem elektrischen Organ des *Torpedo californica* mittels Affinitätschromatographie an α-Cobratoxin isoliert werden.

Der isolierte T-AChR wurde zur Induzierung der EAMG in fünf Lewis-Ratten eingesetzt. Es konnte nachgewiesen werden, daß das von Urbatsch zur Induzierung der EAMG in Sprague-Dawley-Ratten benutzte Applikationsschema auf Lewis-Ratten übertragbar ist.

Eine Ratte mit stark myasthenen Symptomen verstarb vor der elektrophysiologischen Untersuchung. Bei den restlichen Ratten konnte durch die repetitive Serienstimulation eine pathologische Reduzierung der funktionstüchtigen AChR nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß dieses Verfahren wesentlich sensitiver ist als die Beurteilung aufgrund des Verhaltens und der Gewichtsänderungen.

Zur Isolierung nativ gefalteter AChR-Fragmente wurde die Koexpression des Chaperoninsystems GroEL/GroES mit verschiedenen AChR-Fragmenten durchgeführt. Bei Verwendung der Plasmide pαR506, pαE506 und pαE701 konnten keine der entsprechenden AChR-Fragmente exprimiert werden. Das Plasmid pαHE701 zeigte widersprüchliche Ergebnisse bei der Sequenzierung und Restriktion gegenüber der publizierten Nukleotidsequenz [Noda *et al.*, 1983; Fa. Novagen, Produktbeschreibung]. Nur mit dem Plasmid pαHE706 konnte das AChR-Fragment exprimiert werden. Da das Fragment αHE706 aber ausschließlich in Form von *inclusion bodies* detektiert wurde, muß die Koexpression mit dem Chaperonin-Komplex GroEL/GroES zur nativen Faltung des Proteins, als gescheitert angesehen werden.

Da die Isolierung der nativ gefalteten AChR-Fragmente nicht durchgeführt werden konnte, stellte Prof. Dr. A. Maelicke (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Mainz) freundlicherweise das rekombinante T-AChR$_{1-209}$-Fragment zur Verfügung. Die hohe Aggregationsbereitschaft, die negative Reaktion mit konformellen Antikörpern und Schwierigkeiten das Protein aufzukonzentrieren, wiesen auf die unvollständige Faltung des T-AChR$_{1-209}$ hin.

Die Synthese des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates sollte mit dem Kopplungsreagenz BMME unter Ausbildung einer Thioetherbrücke erfolgen. Dabei ist es notwendig in beide Proteine, durch Modifizierung mit 2-Iminothiolan, Thiolgruppen einzuführen. Da die Modifizierung des T-AChR$_{1-209}$ scheiterte, sollte die Thioetherbrücke zwischen den zwei Proteinen mit dem Kopplungsreagenz SMCC eingeführt werden. Bei dieser Methode ist es nicht notwendig, den T-AChR$_{1-209}$ mit Thiolgruppen zu modifizieren. Nach der Synthese des T-AChR$_{1-209}$-Gelonin-Konjugates wurde eine Gelchromatographie zur Abtrennung der Edukte durchgeführt. Dabei konnte der freie T-AChR$_{1-209}$ vollständig abgetrennt werden, während das Konjugat mit nicht umgesetztem Gelonin verunreinigt war. Da kein T-AChR$_{1-209}$-Fragment mehr zur Verfügung stand, mußten Versuche zur Optimierung der Konjugatsynthese aufgegeben werden.

Die starke Verunreinigung des $AChR_{1-209}$-Gelonin-Konjugates durch Gelonin machten den *in vivo* Einsatz bei Lewis-Ratten mit induzierter EAMG unmöglich. Deshalb wurden die Versuche zur antigenspezifischen Immunsuppression an diesem Punkt abgeschlossen.

7. Experimenteller Teil

7.1. Material

7.1.1. Geräte

Autoklaven:	RTX 182	Ebro
	Dampfkochtopf	Sitram
Brutschrank:	Cytoperm	Heraeus
Dialyse:	ProDiCon™-Membran	Spektrum
	MWCO 10 kD, l = 10 cm	
	Slide-A-Lyzer® Dialysekassette	Pierce
	MWCO 10 kD, Volumen 3-15 ml	
	Dialyseschlauch Visking	Fischer
	Size 1-8/32´´	
Durchflußphotometer:	Typ 2238 Uvicord SII	LKB
EIA-Reader:	Typ 2550	Bio-Rad
Elektrophoresezubehör:	Elektrophoresekammern	Kunststoff-verarbeitende Werkstatt, Uni KL
	UV-Lichtbank	Rex
	Sofortbildkamera	Polaroid
FPLC:	Pumpe: LKB 2150	Pharmacia
	Detektor: LKB 2141	Pharmacia
	Fraktionssammler: Frac-100	Pharmacia
French Press:	French Pressure Cell	Aminco
Geltrockner:	2003 Slab Gel Dryer	LKB
Haushaltsmixer:	Waring Typ 8011	Blender
HPLC:	System Gold	Pharmacia
Inkubatoren:	Incubator shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific
	Wasserschüttler HT 112	Infors AG
Küvetten:	Quarz: Suprasil	Hellma
	Kunststoff: Plastibrand	Brand
Peristaltikpumpe:	Microplex	LKB
pH-Meter:	Typ 521	WTW
	Typ StB	Knick AG

Säulen:	Hi-Trap-Säule	Pharmacia
	Superose 12	Pharmacia
	Protein G Sepharose 4, Fast Flow, HR 10/2	Pharmacia
Schreiber:	Servogor 120	BBC
Spannungsgeräte:	Power Pac 300 und 3000	Bio-Rad
Spektrophotometer:	UV Spektrometer DU 640	Beckman
Ultraschallgeräte:	Ultraschallbad RK 106	Brandelin
	Microtip	Branson
Waagen:	Feinwaage 1601 MP 8-1	Sartorius
	Waage 1204 MP	Sartorius
Zentrifugen:	Zentrifuge J2-21 mit den Rotoren JA-10, JA-14, JA-20	Beckman
	Minifuge T	Heraeus
	Eppendorfzentrifuge 5415 C	Eppendorf

7.1.2. Chemikalien

Agar (Bacteriological grade)	ICN Biochemicals Inc.
Agarose (for DNA electrophoresis)	Serva
Ampicillin	Sigma
Anti-Ratten-IgG-AP-Konjugat	Sigma
L-Arginin	Serva
Bacto-Trypton	DIFCO Laboratories
BCA Reagenzien	Pierce
BCIP/NBT	Promega
BMME	Calbiochem
BSA	Boehringer Mannheim
Carbamoylcholinchlorid	Sigma
CFA	Sigma
CHAPS	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
α-Cobratoxin, immobilisiert an Agarose	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva
DNase I (aus Rinderpankreas)	Sigma

4,4´-Dithiodipyridin	Sigma
EDTA	Merck
EGTA	Merck
Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz	Merck
Glycin	Serva
Hefeextrakt	ICN Biochemicals Inc.
IFA	Sigma
Imidazol	Fluka
2-Iminothiolan, Hydrochlorid	Sigma
IPTG	Roth
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Boehringer Mannheim
2-Mercaptoethanol	Fluka
2-Mercaptoethylamin	Sigma
Mestinon	Roche
Na-Cholat	Serva
4-Nitrophenylphosphat	Boehringer Mannheim
Octylglucosid	Serva
PMSF	Sigma
POD	Sigma
Protein G, immobilisiert an Sepharose	Pharmacia
Enterokinase (rekombinant)	Novagen
RNase A (aus Rinderpankreas)	Boehringer Mannheim
Sephadex G 25	Pharmacia
SMCC	Sigma
TEA	Boehringer Mannheim
Tris	Serva
Triton X 100	Boehringer Mannheim

Die Samen des *Gelonium multiflorum* wurden von der Fa. F.G. Celo in Zweibrücken geliefert. Die elektrischen Organe des *Torpedo californica* wurden von Pacific Bio-Marine Laboratories Inc., Venice, California und die Lewis-Ratten von der Versuchstierfarm Harlan Winkelmann, Paderborn-Borchen bezogen.

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden im Reinheitsgrad p.a. verwendet. Die nicht aufgeführten Chemikalien waren entweder im Arbeitskreis vorhanden oder konnten in der Chemikalienausgabe der Universität Kaiserslautern in der geforderten Reinheit bestellt werden.

7.1.3. *E. coli*-Stämme

Stamm	**Genotyp** [Sambrook *et al.*, 1989]
RB791	W 3110 *lacI*^{q} L8
DH5α	F$^-$ (ϕ80dΔ(*lacZ*)M15) *recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17* (r_k^-, m_k^+) *supE44 relA1 deoR* Δ(*lacZYA-argF*)U169
BL21(DE3)	F$^-$ *ompT hsdS$_B$* (r_B^-, m_B^-) *gal dcm* (DE3)
BL21(DE3)/pLysE	F$^-$ *ompT hsdS$_B$* (r_B^-, m_B^-) *gal dcm* (DE3) pLysE (cam^R)

7.1.4. Enzyme

In Klammern sind die Prototypen der Restriktionsendonukleasen angegeben. Die Restriktionsreaktionen wurden mit Pufferlösungen des MBI Fermentas 5-Puffer-Systems durchgeführt.

*Bgl*I	10 U/µl	MBI Fermentas
*Eco*52I (*Xma*III)	10 U/µl	MBI Fermentas
*Sma*I	10 U/µl	MBI Fermentas

7.1.5. Monoklonale Antikörper

In dieser Arbeit wurden die monoklonalen Antikörper mAb 35, mAb 192 und mAb 198 verwendet. Der Antikörper mAb 35 wurde aus der entsprechenden vorhandenen Hybridomzellinie produziert (ATCC, HB-8857), während die Antikörper mAb 192 und mAb 198 freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. S.J. Tzartos (Hellenic Pasteur Institut, Athen) zur Verfügung gestellt wurden. Der Ursprung aller drei Antikörper ist die Ratte und sie sind gegen die MIR des AChR gerichtet. Die Eigenschaften der einzelnen Antikörper und ihre Spezifität sind in Tabelle 7-1 dargestellt. Die Antikörper mAb 192 und mAb 198 lagen in einer Konzentration von 1 mg/ml vor und wurden für den Einsatz im ELISA und Western-Blot 1:6.000 verdünnt. Der Antikörper mAb 35 lag in einer Konzentration von 3-4 mg/ml vor und wurde mit einer Verdünnung von 1:8.000 eingesetzt.

Antikörper	Klasse	H-AChR	T-AChR	Konformation
mAb 35	IgG1	+	+	nativ
mAb 192	IgG2b	+	-	nativ
mAb 198	IgG2a	+	+	nativ, denaturiert

Tabelle 7-1: Eigenschaften und Spezifität der verwendeten monoklonalen Anti-MIR-Antikörper.
+: positive Reaktion -: negative Reaktion
[Loutrari *et al*., 1997; Tzartos *et al*., 1983]

7.2. Proteinchemische Methoden

7.2.1. Konzentrationsbestimmungen

7.2.1.1. UV-Bestimmung

Proteine besitzen aufgrund aromatischer Gruppen in den Aminosäuren (Indol in Tryptophan, Phenylrest in Tyrosin und Phenylalanin) eine Absorptionsbande bei 280 nm. Durch Messung der Absorption kann, unter Einbeziehung des molaren Extinktionskoeffizienten, die Konzentration von Proteinen berechnet werden [Layne, 1957; Peterson, 1983]. Die Anwesenheit von Fremdproteinen ist dabei störend. Alle Messungen wurden mit einem Beckman-Photometer Modell DU 640 durchgeführt.

Proteine	molarer Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]	Extinktion bei einer Konzentration von 1 mg/ml
BSA	45.400	0,667
Gelonin	20.100	0,670
POD	53.600	1,340
T-AChR	477.500	1,910
$T\text{-}AChR_{1\text{-}209}$	61.000	2,460

Tabelle 7-2: Molarer Extinktionskoeffizient der Proteine, deren Konzentration über UV bestimmt wurde.

Diese Methode eignet sich auch zur Herstellung von Eichlösungen, die als Standard zur Proteinbestimmung eingesetzt wurden. Dazu wurde BSA eingewogen, vollständig gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die BSA-Lösung wurden danach genau auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt, mit festem Natriumazid versetzt (0,02%) und in Aliquoten eingefroren.

7.2.1.2. Lowry-Methode

Die Proteinbestimmung nach Lowry erfolgte nach der von Peterson modifizierten Methode [Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1977]. Proteine bilden mit Cu^{2+}-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion), dabei werden die Cu^{2+}-Ionen zu Cu^{+}-Ionen reduziert. Diese bilden mit dem Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz einen instabilen blauen Komplex, der durch photometrische Bestimmung bei 650 nm, als Maß für die Proteinkonzentration dient.
Die Bestimmung ist unempfindlich gegen Lipide, Thiole, Harnstoff und Guanidinium-Hydrochlorid. Als Standard wurde BSA verwendet (siehe Kapitel 7.2.1.1.).

7.2.1.3. BCA-Methode

Basierend auf der Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lowry bietet die Fa. Pierce ein Bestimmungssystem an, das aus zwei Komponenten besteht. Die reaktiven Bestandteile sind 4,4´-Dicarboxy-2,2´-bichinolinnatriumsalz (BCA, Reagenz A) und Kupfer(II)sulfat (Reagenz B). Die Cu^{2+}-Ionen werden durch oxidierbare Gruppen im Protein zu Cu^{+}-Ionen reduziert; diese werden von BCA komplexiert. Die blau-violette Färbung dient zur photometrischen Bestimmung bei 562 nm. [Smith *et al.*,1985]
Die Bestimmung wird durch Anwesenheit von reduzierenden Substanzen (Kohlehydrate, Thiolreagenzien, Lipide, usw.) gestört. Die Proteinbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standard wurde BSA verwendet (siehe Kapitel 7.2.1.1.).

7.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

7.2.2.1. Elektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli [Laemmli, 1970], mit folgenden Modifikationen durchgeführt. In Abwandlung der Literaturvorschrift wurde eine Elektrophoresekammer von 10 x 7,5 x 0,2 cm verwendet und die Elektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 14 mA durchgeführt. Es wurden 4,5%ige Sammel- und 7,5-, 10- bzw. 15%ige Trenngele verwendet.
Die Denaturierung der Proteinproben erfolgte durch 1:1-Verdünnung mit Probenpuffer, mit 20% 2-Mercaptoethanol und 5 min Inkubation im Wasserbad bei 100°C.
Proben mit geringer Proteinkonzentration wurden vor der Zugabe von Probenpuffer durch eine TCA-Fällung aufkonzentriert.

Lösungen:

DOC-Lösung:	0,15% (w/v)	Natriumdesoxycholat
		ad 100 ml H_2O_{dd}
TCA-Lösung:	72% (w/v)	TCA
		ad 100 ml H_2O_{dd}

Die Proteinlösung wurde mit Wasser auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Nach Hinzufügen von 100 µl DOC-Lösung wurde gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 µl TCA-Lösung zugegeben, gemischt und 20 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Reaktionsgefäß vorsichtig ausgeklopft. Durch Zugabe von 30 µl Probenpuffer und 5 min Inkubation im Wasserbad bei 100°C, wurde denaturiert und die Probe anschließend auf das Gel aufgetragen.

7.2.2.2. Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung erfolgte nach der Vorschrift von Groth [Groth de *et al.*, 1963].

Färbelösung:	0,25% Coomassie Brilliant Blue R 250 in Entfärbelösung
Entfärbelösung:	1 Vol. Essigsäure, 3 Vol. Ethanol, 6 Vol. Wasser

Die Gele wurden zwei Stunden in frisch filtrierter Färbelösung, unter gelegentlichem Umschwenken, eingefärbt und anschließend über mehrere Stunden entfärbt.

7.2.2.3. Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode von Heukeshoven [Heukeshoven *et al.*, 1983].

7.2.2.4. Geltrocknung

Die Geltrocknung wurde an einem Trocknungsgerät der Fa. LKB Modell 2003 durchgeführt.

7.2.3. Isolierung von mAb 35

G-Streptokokken besitzen auf ihrer Oberfläche Protein G, ein spezifisches Bindungsprotein für den F_c-Teil von IgG. An Sepharose immobilisiertes Protein G bietet eine gute Möglichkeit, mono- oder polyklonale Antikörper der Klasse G zu isolieren. [Akerstrom *et al.*, 1985]

Lösungen:

Antikörperlösung:	500 ml	Hybridomüberstand aus antikörperproduzierenden Zellinien
Glycin-Puffer:	0,1 M	Glycin pH 2,7 (HCl) ad 1 l H_2O_{dd}
Tris-Puffer:	0,1 M	Tris/HCl pH 8,6 (HCl) ad 1 l H_2O_{dd}
Phosphatpuffer:	10 mM 10 mM	NaH_2PO_4 Na_2HPO_4 pH 7,2 (NaOH) ad 5 l H_2O_{dd}

Durchführung:
500 ml Hybridomüberstand wurden 30 min bei 8.700 rpm zentrifugiert (10.000 g, 4°C, JA 14), steril filtriert (Celluloseacetatfilter, 0,45 µm, Membranfilterhalter mit 500 ml Trichteraufsatz, Fa. Nalgene) und mit Glycin-Puffer neutralisiert.
Die Affinitätssäule (Protein G Sepharose 4 Fast Flow HR 10/2, l = 5 cm, ∅ 1 cm, Fa. Pharmacia) wurde mit 20 ml Phosphatpuffer äquilibriert, bevor die Antikörperlösung mit einer Flußrate von 0,4-0,5 ml/min aufgetragen wurde. Anschließend wurde die Affinitätssäule mit Phosphatpuffer so lange gewaschen, bis der Durchfluß im UV bei 277 nm keine Proteinabsorption mehr zeigte (LKB, Typ 2238 Uvicord SII). Die gebundenen Antikörper wurden mit Glycin-Puffer eluiert, wobei die UV-Absorption des Eluats spektrometrisch verfolgt wurde. Die Immunglobulin enthaltende Fraktion wurde mit Tris-Puffer auf pH 7,2 eingestellt und über Nacht bei 4°C gegen 5 l Phosphatpuffer dialysiert. Auf diese Weise konnten bis zu 15 mg IgG isoliert werden, dessen Aktivität im ELISA überprüft wurde.

7.2.4. Isolierung des T-AChR

Die Isolierung von T-AChR erfolgte aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens, *Torpedo californica* (Pacific Bio-Marine Laboratories Inc., Venice, California), nach einer Vorschrift von Mosckovitz, die von Sehnert modifiziert wurde [Mosckovitz *et al.*, 1988; Sehnert, 1994].

Lösungen:

Puffer A:	10 mM	Tris/HCl
	1 mM	EGTA
	1 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
	0,1 mM	PMSF
		pH 7,4 (HCl) ad 1 l H_2O_{dd}
Puffer B:	1,0% (w/v)	Na-Cholat
		ad 200 ml Puffer A
Puffer C:	0,1% (w/v)	Na-Cholat
		ad 100 ml Puffer A

Puffer D:	1 M	Carbamoylcholinchlorid
		ad 50 ml Puffer C
Dialysepuffer:	10 mM	Tris/HCl
	1 mM	EGTA
	1 mM	EDTA
	0,1 mM	PMSF
	0,1% (w/v)	Na-Cholat
		pH 7,4 (HCl) ad 5 l H_2O_{dd}
Regenerierungspuffer:	0,2 M	Essigsäure
	1,0 M	NaCl
		ad 50 ml Puffer A

Vorbereitung der α-Cobratoxin Säule:
In einer 5 ml Einwegspritze, mit einem mit Watte abgedichteten Auslauf, wurde mit 5 ml α-Cobratoxin (immobilisiert an Sepharose, aktiviert mit Bromcyan, Fa. Sigma) eine Säule gegossen. Anschließend wurde die Säule mit 50 ml Puffer A äquilibriert. Detektiert wurde mit einem Durchflußphotometer bei 277 nm (LKB, Typ 2238 Uvicord SII).

Durchführung:
100 g des tiefgefrorenen elektrischen Organs wurden bei RT aufgetaut, kleingeschnitten und mit 200 ml Puffer A bei 4°C in einem Haushaltsmixer homogenisiert. Um eine Überhitzung zu vermeiden, wurde die Homogenisierung in kleinen Intervallen bei maximaler Leistung mit ausreichend großen Abständen durchgeführt. Das Homogenisat wurde anschließend über ein Mulltuch filtriert und 60 min bei 9.300 rpm (13.000 g, 4°C, JA 14) zentrifugiert. In 100 ml Puffer B wurde das Pellet resuspendiert und im Ultraschallbad auf der niedrigsten Stufe (in kurzen Intervallen, unter Eiskühlung) beschallt. Die Suspension wurde anschließend für 2 h unter leichtem Schütteln bei 4°C inkubiert und nachfolgend 30 min bei 9.300 rpm (13.000 g, 4°C, JA 14) zentrifugiert.
Der Überstand wurde mit einer Flußrate von 0,4 ml/min auf die α-Cobratoxin Säule (l = 3 cm, ∅ = 1,4 cm) aufgetragen. Danach wurde die Säule mit jeweils 50 ml Puffer A, B und C gewaschen. Mit 4 ml (80% des Säulenvolumens) Puffer D wurde die Säule 45 min inkubiert. Danach wurde der T-AChR mit 5 ml Puffer D von der Säule eluiert. Die eluierte Proteinlösung wurde dreimal 2 h gegen 2 l Dialysepuffer dialysiert (Dialyseschlauch Visking, Size 1-8/32``, Fa. Fischer).

Über Nacht wurde die Säule erneut mit 4 ml Puffer D inkubiert. Der mit 5 ml Puffer D eluierte T-AChR wurde unter den gleichen Bedingungen wie am Vortag dialysiert.
Zur Regenerierung der α-Cobratoxin Säule wurde mit 50 ml Regenerierungspuffer gewaschen.
Der Proteingehalt der Lösungen wurde mittels UV-Absorption bei 280 nm bzw. BCA-Test bestimmt und der T-AChR anhand seines spezifischen Bandenmusters (α: 39 kD, β: 50 kD, γ: 57 kD und δ: 64 kD) in der SDS-PAGE identifiziert. Die durchschnittliche Ausbeute betrug 4-5 mg Gesamtprotein pro 100 g elektrischem Organ. Der T-AChR wurde bei -20°C gelagert.

7.2.5. Isolierung von Gelonin

Die Isolierung des ribosomen-inaktivierenden Proteins Gelonin aus *Gelonium multiflorum* (Fa. F.G. Celo, Zweibrücken) erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Stirpe und Brust [Stirpe *et al.*, 1980; Brust *et al.*, 1987]. Die genaue Durchführung ist in meiner Diplomarbeit beschrieben [Kreilinger, 1995].

7.2.6. Proteinmodifizierung und Kopplung

7.2.6.1. Einführung von Thiolgruppen

Mit 2-Iminothiolan wurden Thiolgruppen in die Proteine Gelonin, T-AChR$_{1-209}$ und POD, nach der Methode von Jue, eingeführt [Jue *et al.*, 1978].

Lösungen:

PBS, pH 7,2:	130 mM	NaCl
	4,5 mM	Na_2HPO_4
	2,5 mM	NaH_2PO_4
		pH 7,2 (NaOH) ad 1 l H_2O_{dd}
EDTA, 100 mM:	100 mM	EDTA
		pH 7,0 (NaOH) ad 100 ml H_2O_{dd}

TEA, pH 8,0:	500 mM	TEA pH 8,0 (HCl) ad 10 ml H_2O_{dd}
TEA, pH 8,3:	1 M	TEA pH 8,3 (HCl) ad 10 ml H_2O_{dd}
2-Iminothiolan:	200 mM	2-Iminothiolan/HCl ad 1 ml TEA, pH 8,3
Phosphatpuffer:	100 mM 5 mM	NaH_2PO_4 EDTA pH 6,5 (NaOH) ad 1 l H_2O_{dd}

Die zu modifizierenden Proteine lagen in folgender Form vor:

Gelonin:	5-10 mg/ml Gelonin in 5 mM NaH_2PO_4, 5 mM EDTA, pH 6,5
T-AChR$_{1-209}$:	0,4 mg/ml T-AChR$_{1-209}$ in 100 M Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM Sucrose, pH 7,4
POD:	0,4 mg/ml POD in PBS, pH 7,2

Durchführung:

Die Proteine wurden mit 120 µl TEA (0,5 M, pH 8,0) und 30 µl EDTA (100 mM, pH 7,0) pro ml Proteinlösung versetzt, am Wasserstrahlvakuum entgast und mit Argon belüftet. Anschließend wurde, abhängig vom jeweiligen Protein, der entsprechende Überschuß an 2-Iminothiolan zugefügt. Die Überschüsse sind bei der jeweiligen Versuchsbeschreibung in den Kapiteln 5.2.1.1. und 5.2.1.3. aufgeführt. Nach erneutem Entgasen und Belüften mit Argon wurde 90 min auf Eis inkubiert. Zur Entfernung von nicht umgesetztem 2-Iminothiolan wurden unterschiedliche Methoden getestet (siehe Kapitel 5.2.1.1. und 5.2.1.3.).

Gelfiltration:

Die Proteinlösung wurde auf eine mit Phosphatpuffer äquilibrierte Sephadex G25 Säule (l = 12 cm, ∅ = 1,5 cm) aufgetragen. Als Elutionsmittel wurde Phosphatpuffer verwendet. Mit einem Durchflußphotometer (LKB, Typ 2238 Uvicord SII) konnte die Elution bei einer Wellenlänge von 277 nm detektiert werden. Das thiolmodifizierte Protein wurde unter Argon aufgefangen und sofort weiterverarbeitet.

Dialyse mit einer ProDiCon™-Membran:

Die Dialysekammer (Volumen 2,5 l, Kunststoff-verarbeitende Werkstatt, Universität Kaiserslautern) wurde mit Phosphatpuffer gefüllt und unter Argon gesetzt. Die Proteinlösung wurde in die ProDiCon™-Membran (MWCO 10 kD, l = 10 cm, Fa. Spektrum) gefüllt und die Membran in der Dialysekammer plaziert. Der Phosphatpuffer wurde viermal nach je 45 min unter Argon Gegenstrom gewechselt. Nach Abschluß der Dialyse wurde das thiolmodifizierte Protein aus der ProDiCon™-Membran entfernt und unter Argon weiterverarbeitet.

Dialyse mit einer Slide-A-Lyzer® Dialysekassette:

Die Proteinlösung wurde mit einer Einwegspritze (Kanüle 0,9 x 40 mm) in die Slide-A-Lyzer® Dialysekassette (MWCO 10 kD, Volumen 3-15 ml, Fa. Pierce) gefüllt und unter Argon viermal 45 min gegen 2,5 l Phosphatpuffer in der Dialysekammer dialysiert. Nach Abschluß der Dialyse wurde das thiolmodifizierte Protein aus der Dialysekassette entfernt und unter Argon weiterverarbeitet.

7.2.6.2. Einführung von Maleimidgruppen

mit BMME

Zur Einführung von Maleimidgruppen in thiolmodifiziertes Gelonin wurde BMME in einem 150-fachen molaren Überschuß eingesetzt. Die genaue Durchführung ist in meiner Diplomarbeit beschrieben [Kreilinger, 1995]. Der Einbau der Maleimidgruppen erfolgte unter Argon.

mit SMCC

Mit Maleimidgruppen wurden die Proteine T-AChR$_{1-209}$ und POD nach der Methode von Ishikawa modifiziert [Ishikawa *et al.*, 1983]. Der Einbau der Maleimidgruppen erfolgte unter Argon.

Lösungen:

SMCC:	60 mM	SMCC ad 1 ml DMF
Phosphatpuffer:		siehe Kapitel 7.2.6.1.

Die zu modifizierenden Proteine lagen in folgender Form vor:

T-AChR$_{1-209}$:	0,28 mg/ml T-AChR$_{1-209}$ in 100 M Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM Sucrose, pH 7,4
POD:	0,4 mg/ml POD in PBS, pH 7,2

Durchführung:

Die Proteine wurden mit SMCC versetzt und bei RT inkubiert (60 min bei POD bzw. 90 min bei T-AChR$_{1-209}$). Die jeweiligen Überschüsse sind bei der Beschreibung der Versuche in Kapitel 5.2.2.2. aufgeführt. Nach der Inkubation wurde das teilweise ausgefallene SMCC durch Zentrifugation abgetrennt (3.000 g, 5 min, RT, 15 ml PPN-Röhrchen, Fa. Greiner).

Lösliches, nicht umgesetztes SMCC wurde durch Dialyse mit einer Slide-A-Lyzer® Dialysekassette entfernt, dazu wurde die Proteinlösung mit einer Einwegspritze (Kanüle 0,9 x 40 mm) in die Dialysekassette (MWCO 10 kD, Volumen 3-15 ml, Fa. Pierce) gefüllt und unter Argon viermal 60 min gegen 2,5 l Phosphatpuffer in der Dialysekammer dialysiert. Nach Abschluß der Dialyse wurde das maleimidmodifizierte Protein aus der Dialysekassette entfernt und unter Argon weiterverarbeitet.

7.2.6.3. Kopplung der modifizierten Proteine

Zur Kopplung wurden 0,56 mg maleimidmodifiziertes T-AChR$_{1-209}$-Fragment (0,2 mg/ml) mit einem vierfachen molaren Überschuß an thiolmodifiziertem Gelonin (2,3 mg/ml) versetzt. Das Proteingemisch wurde anschließend mit Centriprep 10 Konzentratoren (MWCO 10 kD, Fa. Amicon) auf 2 ml aufkonzentriert und sechzehn Stunden bzw. zwei Wochen bei 4°C inkubiert (siehe Kapitel 5.2.2.3.). Die Arbeiten wurden unter Argon durchgeführt.

7.2.6.4. Bestimmung von Thiolgruppen in Proteinen

Der Einbau der Thiolgruppen wurde nach Grassetti bestimmt [Grassetti *et al.*, 1967]. Die Durchführung wurde ausführlich von Rousselle beschrieben [Rousselle, 1996].
Durch die Reaktion von 4,4´-Dithiodipyridin mit Thiolen wird 4-Thiopyridon gebildet. Das 4-Thiopyridon liegt fast ausschließlich in der tautomeren Thioform vor, bei der das Wasserstoffatom an den Stickstoff gebunden ist. Dies verursacht die Veränderung des UV-Spektrums zwischen 4-Thiopyridon und dem korrespondierenden Disulfid.

7.2.6.5. Bestimmung von Maleimidgruppen in Proteinen

Der Einbau der Maleimidgruppen wurde nach Ishikawa bestimmt [Ishikawa *et al.*, 1983]. Die Durchführung wurde ausführlich von Rousselle beschrieben [Rousselle, 1996].
Durch die Reaktion der Maleimidgruppen mit einem definierten Überschuß an 2-Mercaptoethylamin wird ein Teil des 2-Mercaptoethylamins umgesetzt. Durch die Bestimmung der restlichen Thiolgruppen kann die Anzahl der Maleimidgruppen berechnet werden.

7.3. Immunologische Methoden

7.3.1. Induzierung der EAMG in Lewis-Ratten

Die Induzierung der EAMG in Lewis-Ratten wurde nach dem Schema von Urbatsch durchgeführt [Urbatsch, 1990].

Lösungen:

PBS, pH 7,2:		siehe Kapitel 7.2.6.1.
T-AChR:	30 µg	T-AChR je Ratte, isoliert aus *Torpedo californica* (siehe Kapitel 7.2.4.)
Ovalbumin-Lösung:	2 mg	Ovalbumin ad 1 ml PBS, pH 7,2
KLH-Lösung:	1 mg	KLH (Lochschnecken-Hämocyanin) ad 1 ml PBS, pH 7,2

Durchführung:
Zur Induzierung der EAMG in den Lewis-Ratten wurde der aus *Torpedo californica* isolierte Acetylcholinrezeptor verwendet. Da der T-AChR nach der Isolierung in einem für die Immunisierung ungeeigneten Puffer vorlag, wurde er viermal 2 h gegen 2 l PBS, pH 7,2 dialysiert (Dialyseschlauch Visking, Size 1-8/32``, Fa. Fischer) und mit Centriprep 10 Konzentratoren (MWCO 10 kD, Fa. Amicon) auf 1 mg/ml aufkonzentriert.
Der Proteinlösung wurden pro 30 µg T-AChR 20 µg Ovalbumin und 10 µg KLH zugesetzt (siehe Tabelle 3-2), anschließend wurde die Lösung über einen Celluloseacetatfilter (0,45 µm) sterilfiltriert.
Für die Erstimmunisierung (Priming) wurde die Proteinlösung mit komplettem Freund´s Adjuvans (CFA) im Verhältnis 1:4 versetzt und unter Eiskühlung emulgiert. Für die Auffrischung (Boost) wurde, nach dem gleichen Verfahren, eine Emulsion mit inkompletten Freund´s Adjuvans (IFA) hergestellt.
Die Immunisierung der Lewis-Ratten (weiblich, 12 Wochen, Fa. Harlan Winkelmann, Paderborn-Borchen) erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Injektion.

7.3.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Antikörpern oder Antigenen [Harlow *et al.*, 1987]. Zur Überprüfung des isolierten T-AChR bzw. der rekombinanten H-AChR-Fragmente wurde die modifizierte ELISA-Technik nach Peters genutzt, wobei das Antigen direkt an die feste Phase (Polystyrol) durch Adhäsion gebunden wird [Peters *et al.*, 1990].
Als Primärantikörper wurden mAb 35, mAb 192 und mAb 198 verwendet. Die jeweiligen Verdünnungen sind in Kapitel 7.1.5. aufgeführt. Als Sekundärantikörper wurde Anti-Ratten-IgG-AP-Konjugat in einer Verdünnung von 1:1.000 eingesetzt und 4-Nitrophenylphosphat als Substrat verwendet. Die Extinktionswerte wurden nach einer geeigneten Entwicklungszeit mit Hilfe eines EIA-Readers (Typ 2550, Fa. Bio Rad) bei 405 nm vermessen.
Die Meßwerte des EIA-Readers wurden statistisch ausgewertet. Dazu wurden die Negativkontrollen gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Für jede Probe wurde ebenfalls der Mittelwert aus den Meßwerten gebildet. Eine Probe ist dann positiv, wenn der Mittelwert größer ist als die Summe aus dem Mittelwert der Negativkontrolle und der zweifachen Standardabweichung.

7.3.3. Western Blot

Bei dieser Methode wird ein Proteingemisch nach der elektrophoretischen Auftrennung über die SDS-PAGE (siehe Kapitel 7.2.2.1.) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Einzelkomponenten können durch spezifische Antikörper detektiert werden.
Der Western Blot wurde nach der Methode von Khysen-Anderson [Khysen-Anderson, 1984], mit Modifikationen nach Milosavljevic, durchgeführt [Milosavljevic, 1998].
Als Antikörper wurde der monoklonalen Antikörper mAb 198 verwendet. Der Antikörper lag in einer Konzentration von 1 mg/ml vor und wurde mit einer Verdünnung von 1:6.000 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde Anti-Ratten-IgG-AP-Konjugat in einer Verdünnung von 1:1.000 eingesetzt, als Substrat diente BCIP/NBT (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat/Nitroblau Tetrazolium).

7.4. Molekularbiologische Methoden

7.4.1. Kulturmedien

Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden nach Sambrook angesetzt [Sambrook *et al.*, 1989]. Autoklaviert wurde 3 h bei 180°C und 6 bar (Autoklav) oder 20 min bei 120°C und 1,5 bar (Dampfkochtopf).

LB-Medium:	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
		pH 7,0 (NaOH) ad 1 l H_2O_{dd}
		autoklaviert
2xYT-Medium:	16 g	Bacto-Trypton
	10 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
		pH 7,0 (NaOH) ad 1 l H_2O_{dd}
		autoklaviert
Ampicillin-Stammlösung:	150 mM	Ampicillin
		ad 10 ml H_2O_{dd}
		über 0,45 µm steril filtriert
		portioniert bei -20°C gelagert
Chloramphenicol-Stammlsg.:	100 mM	Chloramphenicol
		ad 10 ml 90%iges Ethanol
		über 0,45 µm steril filtriert
		portioniert bei -20°C gelagert
IPTG:	500 mM	IPTG
		ad 10 ml H_2O_{dd}
		über 0,45 µm steril filtriert
		portioniert bei -20°C gelagert

Agarplatten:
Dem Flüssigmedium wurden jeweils 1,5 Gewichtsprozent Agar zugesetzt und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlung unter 50°C wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben und die Lösung in Petrischalen gegossen. Bis zur vollständigen Abkühlung wurden die Petrischalen bei RT stehen gelassen, dann mit Parafilm® (Fa. American National Can™) versiegelt und bis zur Benutzung bei 4°C aufbewahrt.

7.4.2. Allgemeine Arbeitsmethoden

7.4.2.1. Sterilisieren

Glasgefäße, Pipetten und weitere Glasartikel für die Kultur von Bakterien wurden für 3 h bei 180°C und 6 bar (Autoklav) oder 20 min bei 120°C und 1,5 bar (Dampfkochtopf) autoklaviert. Bei Metallgeräten und Meßpipetten hat sich die „trockene“ Sterilisation, 3 h bei 180°C im Trockenschrank, als besser geeignet erwiesen. Nicht autoklavierbare Gegenstände wurden mit Alkohollösungen, 35%iges Isopropanol- oder 70%iges Ethanol-Wasser-Gemisch, desinfiziert. Lösungen thermolabiler Substanzen wurden über Spritzenfilter (0,45 µm) sterilfiltriert.

7.4.2.2. Kulturbedingungen

Aus einer Glycerin-Stammkultur (siehe Kapitel 7.4.2.3.) wurde ein Verdünnungsausstrich auf einer Agarplatte angelegt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurden 20 ml Medium angeimpft und unter Schütteln (Wasserbad- bzw. Luftschüttler, 280-300 rpm) inkubiert. Ausgehend von dieser Übernachtkultur konnte eine größere Kultur angeimpft werden. Als Gefäße für die Flüssigmedien dienten Erlenmeyerkolben, die bis zu maximal 20% befüllt wurden, um eine ausreichende Belüftung des Kulturmediums zu gewährleisten.

7.4.2.3. Konservierung und Lagerung von Bakterienkulturen

Kurzzeitige Konservierung:
Die Agarplatten mit *E. coli*-Kulturen und Flüssigkulturen konnten für kurze Zeit (Platten bis zu 2 Wochen, Flüssigkulturen bis zu 2 Tagen) bei 4°C gelagert werden.

Langzeitige Konservierung (Glycerinkulturen):
500 µl Glycerin (80%) wurden in einem verschraubbaren Eppendorf-Gefäß autoklaviert. Dazu wurden 500 µl Übernachtkultur (siehe Kapitel 7.4.2.2.) gegeben, gut gemischt und in flüssigem Stickstoff oder im Trockeneis/Ethanol-Bad schockgefroren. Die Röhrchen wurden bei -70°C gelagert (max. 1-2 Jahre).
Zur Kultivierung von Einzelkolonien wurde ein Verdünnungsausstrich angelegt, indem mit der Impföse ein kleiner Teil von der Oberfläche der tiefgefrorenen Glycerinkultur abgekratzt und dann ausgestrichen wurde. Dabei sollte ein Auftauen der Glycerinkultur vermieden werden, um eine möglichst lange Lebensdauer zu gewährleisten.

7.4.2.4. Wachstumsmessungen

Das Wachstum von Bakterien kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm verfolgt werden. Das Licht wird beim Durchtritt durch die Suspension teilweise gestreut, wobei die Streuung von der Zahl, der Form und der Größe der Bakterien abhängt [Süßmuth *et al.*, 1987]. Diese Lichtabschwächung kann durch Vergleich mit unbeimpftem Medium photometrisch bestimmt werden und wird als optische Dichte (OD) bezeichnet, wobei die Trübung einer Flüssigkultur nur bis ungefähr 0,3 OD_{595} linear proportional der Zellzahl ist.

7.4.2.5. Herstellung kompetenter Zellen

Um von außen zugesetzte DNA aufnehmen zu können, müssen Zellen vor der Transformation mit einem speziellen Titurationspuffer (Calciumchloridlösung 100 mM) kompetent gemacht werden. Die kompetenten Zellen wurden nach der Methode von Mandel hergestellt [Mandel *et al.*, 1970].

Lösungen:

Magnesiumchloridlösung:	100 mM	$MgCl_2$
		ad 1 l H_2O_{dd}
		autoklaviert

Calciumchloridlösung:	100 mM	$CaCl_2$
		ad 1 l H_2O_{dd}
		autoklaviert
Lagerlösung:	0,85 mM	$CaCl_2$
	15% (w/v)	Glycerin
		ad 100 ml H_2O_{dd}
		autoklaviert

Durchführung:
200 ml Flüssigmedium wurden mit 5 ml Übernachtkultur angeimpft. Diese Kultur inkubierte unter schütteln (300 rpm) bei 37°C. Das Wachstum wurde bei einer OD_{595} von 0,6 abgebrochen und der Kolben auf Eis gestellt.
Die Zellen befinden sich hierbei in der exponentiellen Wachstumsphase, so daß hohe Transformationsraten erreicht werden können. Ab diesem Zeitpunkt müssen alle Geräte und Lösungen, die mit den Zellen in Berührung kommen, eiskalt sein.
Nach 30 min auf Eis wurden die *E. coli*-Zellen 10 min bei 4.000 rpm zentrifugiert (2.500 g, 4°C, JA 14), der Überstand dekantiert und das Pellet in 10 ml Magnesiumchloridlösung vorsichtig resuspendiert. Danach wurde mit der gleichen Lösung auf 50 ml aufgefüllt und unter analogen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder dekantiert und das Pellet in 10 ml Calciumchloridlösung resuspendiert, auf 100 ml aufgefüllt und 90 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand erneut dekantiert und das Pellet in 2 ml Lagerlösung vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden weitere 7 ml Lagerlösung zugegeben, jeweils 300 µl Aliquote in Eppendorf-Gefäße überführt und schockgefroren. Die Aliquote können bei -70°C gelagert werden.

7.4.2.6. Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die Transformation wurde leicht modifiziert nach Sambrook durchgeführt [Sambrook *et al.*, 1989].
Ein 300 µl Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Diese Zellsuspension wurde mit 2 bis 4 µl Plasmid-DNA vermischt, die ein bestimmtes Antibiotikum-Resistenzgen besitzt. Nach 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen 3 min bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. In einem Reagenzglas wurde 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) vorgelegt, die Zellen hinzugefügt und 1 h bei 37°C geschüttelt (150 rpm). In Abhängigkeit der zu erwartenden Transformationseffizienz

wurden 50-200 µl dieser Kultur mit einem Trigalski-Spatel auf Agarplatten ausgestrichen, die das Antibiotikum enthielten dessen Resistenzgen auf dem eingesetzten Plasmid codiert war. Um alle Zellen aufzutragen, wurde die restliche Kultur 30 sec bei 8.000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auch auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte ausgestrichen.
Um die Kontamination mit unerwünschten Keimen ausschließen zu können, wurden 100 µl kompetente, nicht transformierte Zellen auf LB-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen. Zur Überprüfung der Lebensfähigkeit der Zellen wurden 100 µl kompetente Zellen auf LB-Platten ohne Antibiotikum ausgestrichen.
Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

7.4.2.7. Plasmid-Minipräparation: Alkalische-Lyse-Methode

Die Alkalische-Lyse-Methode zur Plasmid-Isolierung wurde nach der Methode von Sambrook durchgeführt [Sambrook *et al.*, 1989].

7.4.2.8. Plasmid-Isolierung mit Wizard™ Plus Minipreps

Die Plasmide wurden mit dem Wizard™ Plus Minipreps DNA Reinigungssystem (Fa. Promega) isoliert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

7.4.2.9. Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, spezifische Basensequenzen der DNA zu erkennen und dort eine chemische Bindung zu spalten. Dadurch entstehen aus Plasmiden offene, lineare DNA-Moleküle, deren Größe in der Agarosegel-Elektrophorese bestimmt werden kann.
Der Verdau mit Restriktionsenzymen wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, dabei wurden die mitgelieferten 10-fach konzentrierten Puffer und BSA-Lösungen benutzt.
Die Reaktionsbedingungen der verwendeten Restriktionsendonukleasen können dem Pipettierschema in Tabelle 7-3 entnommen werden. Nach Zusammenpipettieren wurden die Ansätze 1 h im Wasserbad bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

	***Bgl*II**	***Eco*52I**	***Sma*I**
Puffer	2 µl des zugehörigen 10-fach konzentrierten Puffers		
Enzym	jeweils 1 µl		
Probe	je nach Konzentration 1-5 µl		
BSA (2 mg/ml)	–	1 µl	
H_2O_{dd} (steril)	ad 20 µl		
Temperatur	37°C		30°C

Tabelle 7-3: Pipettierschema für den Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl*II, *Eco*52I und *Sma*I.

7.4.2.10. Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde nach Sambrook [Sambrook *et al.*, 1989] mit Modifizierungen von Milosavljevic durchgeführt [Milosavljevic, 1998].

7.5. Expression und Aufarbeitung rekombinanter AChR-Fragmente

7.5.1. Proteinexpression

Lösungen:

LB-Medium:
2xYT-Medium:
IPTG:
Antibiotika:

} siehe Kapitel 7.4.1.

Durchführung:
500 ml Medium (LB- oder 2xYT-Medium, mit dem entsprechenden Antibiotikum) wurden in einem Erlenmeyerkolben (2 l) mit 20 ml einer Übernachtkultur von *E. coli* angeimpft und unter Schütteln (300 rpm) bei 37°C inkubiert. In der frühen exponentiellen Wachstumsphase (OD_{595} von 0,5 bis 0,6) wurden die Bakterien durch Zugabe von 500 µl 0,5 M IPTG (Endkonzentration: 0,5 mM IPTG) induziert. Vor Eintritt der Wachstumskurve in die stationäre Phase wurde das Wachstum durch Abkühlen auf Eis gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation, 45 min bei 10.000 rpm (17.700 g, 4°C, JA 10), geerntet. Das Zellpellet wurde bei -70°C gelagert.

7.5.2. Lyse der Bakterienzellen mittels Ultraschall

Für kleine Volumina hat sich im allgemeinen das Ultraschallgerät zur Lyse von Bakterienzellen als nützlich erwiesen. Es erzeugt Hochdruckwellen, die die Zellwände durch Scherkräfte unter Bildung kleiner Löcher (Kavitation) durchlässig machen.

Lösungen:

Lysozympuffer:	10 mM	EDTA
	25 mM	Tris/HCl
		pH 8,0 (HCl) ad 20 ml H_2O_{dd}
Lysozymlösung:	1 mg/ml	Lysozym
		ad 10 ml Lysozympuffer
		erst kurz vor Gebrauch ansetzen
RNase A:	2 mg	RNase A
		ad 1 ml H_2O_{dd}
PMSF:	0,1 M	PMSF
		ad 500 µl i-Propanol

Durchführung:
Das nach der Expression eingefrorene Pellet (siehe Kapitel 7.5.1.) wurde in 10 ml Lysozymlösung resuspendiert und mehrmals für max. 10 sec mit Ultraschall behandelt (Microtip, 70% Leistung). Um eine Überhitzung zu vermeiden wurden Pausen von 30 sec

zwischen den Beschallungen eingehalten und die Zellsuspension während der Ultraschallbehandlung mit Eis gekühlt. Die Ultraschallbehandlung wurde abgebrochen nachdem sich die Zellsuspension leicht grau verfärbte. Nach Zugabe einer Spatelspitze DNase I und 5 µl RNase A, zum Abbau von Nukleinsäuren und 10 min Inkubation auf Eis, erfolgte die Zugabe von 100 µl des Protease-Inhibitors PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid). Die Suspension wurde 30 min bei 15.000 rpm zentrifugiert (27.200 g, 4°C, JA 20). Pellet und Überstand wurden getrennt auf das Vorhandensein des Zielproteins untersucht.

7.5.3. Lyse der Bakterienzellen mittels French Pressure Cell

Bei der Hochdruckhomogenisation in der French Pressure Cell werden Bakterienzellen unter hohen Druck gesetzt. Durch öffnen eines Ventils und somit raschem Druckabfall werden die Zellen lysiert.

Lösungen:

PBS, pH 7,2: siehe Kapitel 7.2.6.1.

RNAse A:
PMSF: } siehe Kapitel 7.5.2.

Durchführung:
Das nach der Expression eingefrorene Pellet (siehe Kapitel 7.5.1.) wurde in 10 ml PBS, pH 7,2 resuspendiert. In der French Pressure Cell (Fa. Aminco) wurden die Zellen zweimal einem Druck von 300 kp/cm^2 ausgesetzt und das Eluat in einem gekühlten Zentrifugenbecher (für JA-20-Rotor) gesammelt. Nach Zugabe einer Spatelspitze DNase I und 5 µl RNase A, zum Abbau von Nukleinsäuren und 10 min Inkubation auf Eis, erfolgte die Zugabe von 100 µl PMSF. Die Suspension wurde 30 min bei 15.000 rpm zentrifugiert (27.200 g, 4°C, JA 20). Pellet und Überstand wurden getrennt auf das Vorhandensein des Zielproteins untersucht.

7.5.4. Aufreinigung der AChR-Fragmente nach Barkas

Die Aufreinigung der nach der Ultraschall- bzw. French Pressure Cell Methode anfallenden Pellets erfolgte nach Barkas [Barkas *et al.*, 1987].

Lösungen:

Puffer A:	25 mM	Tris/HCl
	10 mM	EDTA
	1% (w/v)	Triton X 100
		pH 8,0 (HCl) ad 250 ml H_2O_{dd}
Puffer B:	5 mM	KH_2PO_4
	5 mM	Na_2HPO_4
	100 mM	NaCl
	3 M	KSCN
		pH 7,2 (NaOH) ad 250 ml H_2O_{dd}
Puffer C:	5 mM	KH_2PO_4
	5 mM	Na_2HPO_4
	10 mM	EDTA
	8 M	Harnstoff
		pH 6,0 (HCl) ad 50 ml H_2O_{dd}

Durchführung:
Das Zellpellet wurde in 250 ml Puffer A mit einem Homogenisator (30 ccm, Fa. Fortuna) resuspendiert. Die Suspension wurde 40 min bei 4°C inkubiert und anschließend 30 min bei 15.000 rpm zentrifugiert (27.200 g, 4°C, JA 20). Diese Schritte wurden analog mit 250 ml Puffer B wiederholt. Nach dem Homogenisieren in 50 ml Puffer C wurde 2 h bei RT inkubiert und anschließend 45 min bei 15.000 rpm zentrifugiert (27.200 g, RT, JA 20). Danach befand sich das Protein im Harnstoff-haltigen Überstand.

7.5.5. Ni-Affinitätschromatographie

Der N-terminale His-Tag (aufgebaut aus 10 Histidinen) im AChR-Fragment αHE706, ermöglicht die Aufreinigung des Proteins über die Ni-Affinitätschromatographie.

Lösungen:

PBS, pH 7,2:		siehe Kapitel 7.2.6.1.
$NiSO_4$-Lösung:	0,1 M	$NiSO_4$ ad 100 ml H_2O_{dd}
Startpuffer:		je nach Versuch, siehe Kapitel 4.2.3.4.
Elutionspuffer:	0,2 M	Imidazol pH 7,2 ad 50 ml des jeweiligen Startpuffers bzw. höhere Imidazolkonzentrationen je nach Versuch, siehe Kapitel 4.2.3.4.

Durchführung:
Die His-Trap-Säule (l = 2,5 cm, ∅ = 1 cm) wurde durch Beladen einer Hi-Trap-Säule (Fa. Pharmacia) mit Ni^{2+}-Ionen hergestellt. Alle Säulenschritte wurden durchgeführt, indem eine 10 ml-Einwegspritze auf die Säule geschraubt und die entsprechende Lösung durch die Säule gedrückt wurde. Dabei durfte eine Flußrate von 2 ml/min nicht überschritten werden.
Die Hi-Trap-Säule wurde zunächst mit 10 ml H_2O_{dd} gewaschen, mit 1 ml $NiSO_4$-Lösung behandelt und anschließend mit 10 ml H_2O_{dd} das überschüssige Ni-Salz wieder herausgewaschen.
Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 5 ml Startpuffer wurde die Proteinlösung aufgetragen. Zur Entfernung unspezifisch bindender Proteine wurde die Säule mit 6 ml Startpuffer gewaschen. Das Rezeptorfragment wurde mit 5 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Dabei wurde das Eluat in 0,5 ml Fraktionen aufgefangen. Zur Regeneration wurde die Säule mit 10 ml Startpuffer und anschließend mit 10 ml H_2O_{dd} gewaschen.
Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde nach Lowry bestimmt (siehe Kapitel 7.2.1.2.), da diese Methode weder durch SDS noch durch Imidazol gestört wird.

8. Abkürzungen

A_{280}	Absorption bei 280 nm
A_{405}	Absorption bei 405 nm
AChR	Acetylcholinrezeptor
ad 100 ml	auf 100 ml Gesamtvolumen auffüllen
ADP	Adenosin-5´-diphosphat
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrom
APC	Antigen Presenting Cell
AS	Aminosäure
Asp	Asparatat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
BCA	4,4´-Dicarboxy-2,2´-bicholin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
Bew.	Bewertung
BMME	Bis-(maleimido)-methylether
bp	Basenpaare
BrCN	Bromcyan
BSA	Rinderserumalbumin
BTX	α-Bungarotoxin
CD	Cluster of Differentiation
CFA	komplettes Freund´s Adjuvans
CHAPS	3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
cm	Chloramphenicol-Resistenzgen
C-Region	konstanter Bereich der Antikörper
Cys	Cystein
DMF	N,N´-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DOC	Natriumdesoxycholat
DTT	Dithiothreitol-(4,5-Dihydroxy-1,2-dithian)
E. coli	Escherichia coli
EAMG	Experimentelle Autoimmune Myasthenia Gravis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Titriplex® II
EF2	Elongationsfaktor 2

EGTA	Ethylen-bis(β-aminoethylether)-N,N,N´,N´-tetraessigsäure, Titriplex® VI
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
ex-α-...	extrazellulärer Teil der α-Untereinheit ...
Fa.	Firma
F_{ab}	antigenbindende Region der Antikörper
F_c	Antikörperregion die zur Komplementfixierung führt
FPLC	Fast-Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
H_2O_{dd}	bidestilliertes Wasser
H-AChR	humaner Acetylcholinrezeptor
His	Histidin
H-Kette	schwere Kette der Antikörper
HLA	Human Leucocyte Antigen
Hsp	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
I^{125}	Iodisotop 125
IC_{50}	halbmaximale Hemmkonzentration der Proteinsynthese in vitro
IFA	inkomplettes Freund´s Adjuvans
IFN	Interferon
IFNγ	Interferon Gamma
Ig	Immunglobulin
IgX	Immunglobulin der Klasse X (X = A, D, E, G und M)
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kbp	Kilo-Basenpaare
kD	Kilo-Dalton
KLH	Lochschnecken-Hämocyanin
KSCN	Kaliumthiocyanat
lat.	lateinisch
LB	Luria-Bertani-Medium
LBAC	Luria-Bertani-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol

LBC	Luria-Bertani-Medium mit Chloramphenicol
LiS	Diiodosalicylat-Li-Salz
L-Kette	leichte Kette der Antikörper
Lys	Lysin
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
MIR	Main Immungenic Region
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Molecular Weight
MWCO	Molecular Weight Cut Off
N	Normalität
n.v.	nicht verdaut
NAD^+	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
NBT	Nitroblau Tetrazolium
Ni	Nickel
Octylglucosid	n-Octyl-β-D-glucopyranosid
OD	optische Dichte
OD_{595}	optische Dichte bei 595 nm
p.a.	für Analyse (Reinheitsgrad)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
Phs	Hitzeschock-Promotor
Plac	lac-Promotor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RIP	ribosomen-inaktivierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde

SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SMCC	Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat
SPDP	N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat
T-AChR	Acetylcholinrezeptor des Zitterrochens *Torpedo californica*
T_C	cytotoxische T-Zelle
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEA	Triethanolamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
T_H	T-Helferzelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T_S	T-Suppressorzelle
U	Unit
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
V-Region	variabler Bereich der antigenbindenden Region
α-AChR	α-Untereinheit des Acetylcholinrezeptors
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
∅	Durchmesser

9. Literaturverzeichnis

Abdou, N.I.; Wall, H.; Lindsley, H.B.; Halsey, J.F. & Suzuki, T.
J. Clin. Invest. (1981), **67**, 1297-1304

Ahmed, A.K.; Schaffer, S.W. & Wetlaufer, D.B.
J. Biol. Chem. (1975), **250**, 8477-8482

Akerstrom, B.; Brodin, T.; Reis, K. & Björk, L.
J. Immunol. (1985), **135**, 2589-2592

Alexeev, T.; Krivoshein, A.; Shevalier, A.; Kudelina, I.; Telyakova, O.; Vincent, A.; Utkin, Y.; Hucho, F. & Tsetlin, V.
Eur. J. Biochem. (1999), **259**, 310-319

Baehr von, R.
in: Sönnichsen, N. & Apostoloff, E. (Hersg.)
Autoimmunkrankheiten, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart (1992), 2. Auflage

Barchan, D.; Asher, O.; Tzartos, S.J.; Fuchs, S. & Souroujon, M.C.
European Journal of Immunology (1998), **28**, 616-624

Barkas, T.; Gabriel, J.-M.; Mauron, A.; Hughes, G.J.; Roth, B.; Alliod, C.; Tzartos, S.J. & Ballivet, M.
J. Biol. Chem. (1988), **263**, 5916-5920

Barkas, T.; Mauron, A.; Roth, B.; Alloid, C.; Tzartos, S.J. & Ballivet, M.
Science (1987), **235**, 77-80

Baum, H.; Butler, P.; Davies, H.; Sternberg, M.J.E. & Burroughs, A.K.
Trends in Biochemical Sciences (1993), **18**, 140-144

Bauman, G.P. & Hurtubise, P.
Clinics in Laboratory Medicine (1988), **8**, 399-407

Beeson, D.; Brydson, M.; Wood, H.; Vincent, A. & Newsom-Davis, J.
Biochemical Society Transactions (1989), **17**, 219-220

Beeson, D.; Morris, A.; Vincent, A. & Newsom-Davis, J.
EMBO J. (1990), **9**, 2101-2106

Berman, P.W. & Patrick, J.
J. Exp. Med. (1980), **151**, 204-223

Bernard, A.; Boumsell, L.; Dausset, J.; Milstein, C. & Schlossman, S.F.
Leukocyte typing, Springer Verlag, New York (1984)

Bradley, J.L.; Silva, H.M. & McGuire, P.M.
Biochemical and Biophysical Research Communications (1987), **149**, 588-593

Braig, K.; Otwinowski, Z.; Hedge, R.; Boisvert, D.C.; Joachimiak, A.; Horwich, A.L. & Sigler, P.B.
Nature (1994), **371**, 578-586

Brown, T.A.
Gentechnologie für Einsteiger
Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg; Berlin; Oxford (1996), 2. Auflage

Brust, S.
Dissertation, Universität Kaiserslautern (1986)

Brust, S.; Filipp, G.; Hofmann, U.; Kalies, I.; Peper, K.; Rajki, K.; Sterz, R.K.M. & Trommer, W.E.
Biol. Chem. Hoppe Seyler (1987), **368**, 991-999

Buchner, J.
FASEB J. (1996), **10**, 10-19

Buchner, J.; Pastan, I. & Brinkmann, U.
Analytical Biochemistry (1992), **205**, 263-270

Burk, S.
Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern (1990)

Calabrese, L.H.
in: Deodhar, S. (Hersg.)
Autoimmune diseases, clinics in laboratory medicine,
W.B. Saunders, Philadelphia (1988), **8**, 269-279

Carlsson, J.; Drevin, H. & Axen, R.
Biochemical Journal (1978), **173**, 723-737

Changeux, J.-P.
Spektrum der Wissenschaft (1994), **1**, 84-91

Clark, M.R.
Physiol. Rev. (1988), **58**, 503-554

Cleland, W.W.
Biochemistry (1964), **3**, 480-482

Collier, R.J.
in: Frankel, A.E. (Hersg.)
Immunotoxins, Boston: Kluwer Academic Publisher (1988)

Conti-Fine, B.M.; Protti, M.P.; Bellone, M. & Howard Jr., J.F.
in: *Myasthenia gravis: The immunbiology of an autoimmune disease*
Springer Verlag, New York (1997)

Dennis, M.; Giraudat, J.; Kotsyba-Hilbert, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Chang, J.-Y.; Lazure, C.; Chretien, M. & Changeux, J.-P.
Biochemistry (1988), **27**, 2346-2357

Diethelm-Okita, B.; Wells, G.B.; Kuryatov, A.; Okita, D.; Howard, J.; Lindstrom, J.M. & Conti-Fine, B.M.
Journal of Autoimmunity (1998), **11**, 191-203

Drachman, D.B.
Trends in Neurosciences (1983) November, 146-151

Dziarski, R.
Immunology Today (1988), **9**, 340-342

Ehrlich, P.
in: Himmelweit, F.; Marquardt, M. & Dale, H. (Hersg.)
The collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Elmsford, N.Y. (1956), **1**, 596-618

Ellis, R.J.
Nature (1987), **328**, 378-379

Ellis, R.J.
The Chaperonins, Acad. Press (1996)

Ellis, R.J. & Vies van der, S.M.
Annu. Rev. Biochem. (1991), **60**, 321-347

Endo, Y. & Tsurugi, K.
J. Biol. Chem. (1987), **262**, 8128-8130

Endo, Y.; Huber, P. & Wool, I.
J. Biol. Chem. (1983), **258**, 2662-2667

Engel, A.G.; Sahashi, K.; Lambert, E.H. & Howard, F.M.
in: Aguayo, G. & Karpati, G. (Hersg.)
Eycerpta Medica, Amsterdam (1979)

Fabris, N.; Garaci, E.; Hadden, J. & Mitchison, A.
Immunoregulation, Plenum Press, New York, London (1983)

Fayet, O.; Ziegelhoffer, T. & Georgopoulos, C.P.
J. Bacteriol. (1989), **171**, 1379-1385

Fong, W.P.; Wong, R.N.S.; Go, T.T.M. & Yeung, H.W.
Life Sciences (1991), **49**, 1859-1869

Fuchs, S. & Souroujon, M.C.
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1986), **475**, 81-93

Gething, M.J. & Sambrook, J.
Nature (1992), **355**, 33-45

Ghetie, V.; Thorpe, P.; Ghetie, M.A.; Knowles, P.; Uhr, J.W. & Vitetta, E.S.
Journal of Immunological Methods (1991), **142**, 223-230

Goloubinoff, D.S.; Gatenby, A.A. & Lorimer, G.H.
Nature (1989), **337**, 44-47

Goodman, M.E. & Weigle, W.O.
Immunology Today (1981), **2**, 54-57

Grassetti, D.R. & Murray, J.F.
Archieves of Biochemistry and Biophysics (1967), **119**, 41-49

Groscurth, P.
Anat. Embryol. (1989), **180**, 109-119

Groth de, St.F.; Webster, R.G. & Datyner, A.
Biophys. Acta (1963), **71**, 377-391

Harcourt, G. & Jeremy, A.
Immunology Today (1987), **8**, 319-321

Harlow, E. & Lane, D.
Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Habor Laboratory (1987)

Hartl, F.U.
Nature (1996), **381**, 571-580

Hemmingsen, S.M.; Woolford, C.; van der Vies, S.M.; Tilly, K.; Dennis, D.T.; Georgopoulos, C.P.; Hendrix, R.W. & Ellis, R.J.
Nature (1988), **333**, 330-334

Hendrick, J.P. & Hartl, F.U.
Annu. Rev. Biochem. (1993), **62**, 349-384

Hengartner, H.; Odermatt, B.; Schneider, R.; Schreyer, M.; Wälle, G.; MacDonald, H.R. & Zinkernagel, R.M.
Nature (1988), **336**, 388-390

Hertling-Jaweed, S.; Bandini, G.; Müller-Fahrnow, A.; Domes, V. & Hucho, F.
FEBS Letters (1988), **241**, 29-32

Heukeshoven, J.M. & Demick, R.
Elektrophorese Forum, München (1983), 92-97

Hofmann, U.
Dissertation, Universität Kaiserslautern (1988)

Hohlfeld, R.; Sterz, R.K.M.; Kalies, I.; Peper, K. & Wekerle, H.
Pflügers Arch. (1981), **390**, 156-160

Hohlfeld, R.; Sterz, R.K.M.; Kalies, I.; Wekerle, H. & Peper, K.
Muscle & Nerve (1983), **6**, 160-163

Hossann, M.
Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern (2001)

Huganir, R.L. & Miles, K.
Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology (1989), **24**, 183-215

Hunter, M.J. & Ludwig, M.L.
Methods in Enzymology (1972), **25**, 585-596

Husain, M.A.; Roberts, J.B.; Thomas, B.H. & Wilson, A.
Br. J. Pharmac. (1968), **34**, 445-450

Ishikawa, E.; Imagawa, M.; Hashida, S.; Yoshitake, S.; Hamaguchi, Y. & Ueno, T.
Journal of Immunoassay (1983), **4**, 209-327

Jacobson, L.; Beeson D.; Tzartos, S.J. & Vincent, A.
Journal of Neuroimmunology (1999), **98**, 112-120

Jue, R.; Lambert, J.M.; Pierce, L.R. & Traut, R.R.
Biochemistry (1978), **17**, 5399-5406

Kaminski, H.J.; Suarez, J.I. & Ruff, R.L.
J. Clin. Invest. (1997), **48**, 8-17

Karachunski, P.I.; Ostlie, N.S.; Okita, D.K. & Conti-Fine, B.M.
Journal of Neuroimmunology (1999), **93**, 108-121

Khysen-Anderson, J.
J. Biochem. Biophys. Meth. (1984), **10**, 203-209

Kiefhaber, T.; Rudolph, R.; Kohler, H.-H. & Buchner, J.
Bio/Technology (1991), **9**, 825-829

Klinke, R. & Silbernagl, S.
Lehrbuch der Physiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1996), 2. Auflage

Knapp, W.; Dörken, B.; Rieber, P.; Schmidt, R.E.; Stein, H. & van dem Borne, A.E.G.
Immunology today (1989), **10**, 253-258

Koolman, J. & Röhm, K.H.
Taschenatlas der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1998), 2. Auflage

Kreilinger, U.

Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern (1995)

Kuby, J.

Immunology, Freeman, New York (1997), 3. Auflage

Laemmli, U.K.

Nature (1970), **227**, 680-685

Layne, E.

Methods in Enzymology (1957), **3**, 447-454

Lennon, V.A.; Lindstrom, J.M. & Seybold, M.E.

J. Exp. Med. (1975), **141**, 1365-1375

Lennon, V.A.; Seybold, M.E.; Lindstrom, J.M.; Cochrane, C. & Ulevitch, R.

J. Exp. Med. (1978), **147**, 973-983

Li, Z.Y.

Human muscle acetylcholine receptor: Expression and isolation in E. coli for the α-subunit. Zusammenfassung der durchgeführten Versuche,
Universität Kaiserslautern (1998)

Lindquist, S. & Craig, E.A.

Annu. Rev. Genet. (1988), **22**, 631-677

Lindstrom, J.M.

Muscle & Nerve (2000), **23**, 453-477

Lindstrom, J.M.

Monoclonal and Anti-Idiotyp Antibodies, Alan R. Liss. Inc., New York (1984), 21-57

Lindstrom, J.M. & Lambert, E.H.

Neurology (1978), **28**, 130-138

Lord, J.M. & Roberts, L.M.

Current Biology (1998), **8**, R56-R58

Lord, J.M.; Hartley, M.R. & Roberts, L.M.

Seminars in Cell Biology (1991), **2**, 15-22

Loutrari, H.; Kokla, A.; Trakas, N. & Tzartos, S.J.
Clin. Exp. Immunol. (1997), **109**, 538-546

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J.
J. Biol. Chem. (1951), **193**, 76-85

MacLennan, C.; Beeson, D.; Vincent, A. & Newsom-Davies, J.
Nucleic Acids Research (1995), **21**, 5463-5467

Mandel, M. & Higa, A.
J. Mol. Biol. (1970), **53**, 159-162

Marrak, P. & Kappler, J.W.
Das Immunsystem, Spektrum der Wissenschaft, Spezial 2 (1994), 36-44

Marx, A.; O´Connor, R.; Tzartos, S.J.; Kalies, I.; Kirchner, T. & Müller-Hermelinck, H.-K.
Thymus (1989), **14**, 171-178

Meyer-Rienecker, H.-J.
in: Sönnichsen, N. & Apostoloff, E. (Hersg.)
Autoimmunkrankheiten, Gustav Fischer Verlag; Jena; Stuttgart (1992), 2. Auflage

Miller, J.F.A.P.
Lancet (1961), **2**, 748-749

Milosavljevic, R.
Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern (1998)

Mosckovitz, R. & Gershoni, J.M.
J. Biol. Chem. (1988), **263**, 1017-1022

Multhoff, G.; Botzler, C. & Issels, R.
Biol. Chem. (1998), **389**, 295-300

Nepom, G.T. & Erlich, H.
Annual Review of Immunology (1991), **9**, 493-525

Neuhofen, S.
Dissertation, Universität Kaiserslautern (1997)

Noda, M.; Furutani, Y.; Takahashi, H.; Toyosato, M.; Tanabe, T.; Shimizu, S.; Kikyotani, S.; Kayano, T.; Hirose, T.; Inayama, S. & Numa, S.
Nature (1983), **305**, 818-823

Noda, M.; Takahashi, H.; Tanabe, T.; Toyosato, M.; Furutani, Y.; Hirose, T.; Asai, M.; Inayama, S.; Miayta, T. & Numa, S.
Nature (1982), **299**, 793-797

Nolan, P.A.; Garrison, D.A. & Better, M.
Gene (1993), **134**, 223-227

Nossal, G.V.J.
Annual Review of Immunology (1983), **1**, 33-62

Numa, S.; Noda, M.; Takahashi, H.; Tanabe, T.; Toyosato, M. & Furutani, Y.
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. (1983), **48**, 57-69

Ohta, M.; Ohta, K.; Itoh, N.; Nishitani, H.; Hara, H. & Hayashi, K.
Neurology (1990), **40**, 1776-1778

Oldstone, M.B.A.
Cell (1987), **50**, 819-820

Olsnes, S. & Phil, A.
in: Cohen, P. & van Heyringen, S. (Hersg.)
Molecular Action of Toxins and Viruses, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam (1982)

Paleologue, A.; Reboud, J.P. & Reboud, A.M.
FEBS Letters (1986), **208**, 373-378

Parsell, D.A. & Lindquist, S.
Annu. Rev. Genet. (1993), **27**, 437-496

Peters, J.H. & Baumgarten, H. (Hrsg.)
Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung
Springer, Berlin (1990), 2. Auflage

Peterson, G.L.
Anal. Biochem. (1977), **83**, 346-356

Peterson, G.L.
Methods in Enzymology (1983), **91**, 95-119

Rajewski, K. & Boehmer, H.
Current Opinion in Immunology (1993), **5**, 175-177

Ritossa, F.M.
Experientia (1962), **18**, 571-573

Rose, N.R. & Bona, C.
Immunology Today (1993), **14**, 426-430

Roseman, A.M.; Chen, S.; White, H.; Braig, K. & Saibil, H.R.
Cell (1996), **87**, 241-251

Rosenblum, M.G.; Kohr, W.A.; Beattie, L.; Beattie, W.G.; Marks, J.W.; Toman, P.D. & Cheung, L.H.
Journal of interferon and cytokine research (1995), **15**, 547-555

Rosenblum, M.G.; Marks, J.W. & Cheung, L.H.
Cancer Chemother. Pharmacol. (1999), **44**, 343-348

Rousselle, H.-P.
Dissertation, Universität Kaiserslautern (1996)

Rozema, D. & Gellman, S.H.
J. Am. Chem. Soc. (1995), **117**, 2373-2374

Rudolph, R.
Protein Engineering: Principles und Practices, Wiley, New York (1995), 283-298

Rudolph, R. & Lilie, H.
Nachr. Chem. Tech. Lab. (1997), **45**, 753-758

Rudolph, R. & Lilie, H.
FASEB J. (1996), **10**, 49-56

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T.
Molecular Cloning; A Laboratory Manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Edition (1989)

Samuelsson, E.; Wadensten, H.; Hartmanis, M.; Moks, T. & Uhlen, M.
Bio/Technology (1991), **9**, 363-366

Sandvik, K.; Olsnes, S.; Brown, J.E.; Petersen, O.W. & Van Deurs, B.
Journal of Cell Biology (1989), **108**, 1331-1343

Sano, M.; McCormick, D.J.; Talib, S.; Griesmann, G.E. & Lennon, V.A.
International Immunology (1991), **3**, 983-989

Schäfer, F.
Dissertation, Universität Kaiserslautern (1995)

Schoenfeld, Y. & Isenberg, D.A.
Immunology Today (1989), **10**, 123-126

Schoenfeld, Y. & Isenberg, D.A.
Immunology Today (1988), **9**, 178-182

Schrattenholz, A.; Pfeiffer, S.; Pejovic, V.; Rudolph, R.; Godovac-Zimmermann, J. & Maelicke, A.
J. Biol. Chem. (1998), **273**, 32393-32399

Schwartz, R.H.
Science (1990), **248**, 1349-1356

Sehnert, B.
Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern (1994)

Seybold, M.E.; Lambert, E.H.; Lennon, V.A. & Lindstrom, J.M.
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1976), **274**, 275-282

Smith, H.R. & Steinberg, A.D.
Annual Review of Immunology (1983), **1**, 175-210

Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K. & Gartner, F.H.
Analytical Biochemistry (1985), **150**, 76-85

Sparrer, H.; Rutkat, K. & Buchner, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. (1997), **94**, 1096-1100

Steinman, L.
Cell (1995), **80**, 7-10

Sterz, R.K.M.; Hohlfeld, R.; Rajki, K.; Kaul, M.; Heiniger, K.; Peper, K. & Toyka, K.V.
Muscle & Nerve (1986), **9**, 306-312

Stirpe, F.; Olsnes, S. & Phil, A.
J. Biol. Chem. (1980), **255**, 6947-6953

Sumikawa, K.; Houghton, M.; Emtage, J.S.; Richards, B.M. & Barnard, E.A.
Nature (1981), **292**, 862-864

Süßmuth, R.; Eberspächer, J.; Haag, R. & Springer, W.
Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1987)

Talal, N. & Ahmad, S.A.L.
Journal of Rheumatology (1987), **14**, 191-193

Talib, S.; Leiby, K.R. & Okarma, T.B.
Gene (1991), **98**, 289-293

Terao, K.; Uschiumi, T.; Endo, Y. & Ogata, K.
European Journal of Biochemistry (1988), **174**, 459-463

Tissières, A.; Mitchell, H.K. & Tracy, U.M.
J. Mol. Biol. (1974), **84**, 389-398

Toyka, K.V.
persönliche Mitteilung (1998)

Tsouloufis, T.; Mamalaki, A.; Remoundos, M. & Tzartos, S.J.
International Immunology (2000), **12**, 1255-1265

Tzartos, S.J. & Remoundos, M.S.
J. Biol. Chem. (1990), **265**, 21462-21467

Tzartos, S.J.; Kokla, A.; Walgrave, S.L. & Conti-Tronconi, B.M.
Proc. Natl. Acad. Sci. (1988), **85**, 2899-2903

Tzartos, S.J.; Langeberg, L.; Hochschwender, S. & Lindstrom, J.M.
FEBS Letters (1983), **158**, 116-118

Tzartos, S.J.; Rand, D.E.; Einarson, B.L. & Lindstrom, J.M.
J. Biol. Chem. (1981), **256**, 8635-8645

Tzartos, S.J.; Seybold, M.E. & Lindstrom, J.M.
Proc. Natl. Acad. Sci. (1982), **79**, 188-192

Unwin, N.
Nature (1995), **373**, 37-43

Urbatsch, I.L.
Dissertation, Universität Kaiserslautern (1990)

Urbatsch, I.L.; Sterz, R.K.M.; Peper, K. & Trommer, W.E.
European Journal of Immunology (1993), **23**, 776-779

Van Deurs, B.; Sandvik, K.; Petersen, O.W.; Olsnes, S.; Simons, K. & Griffiths, G.
Journal of Cell Biology (1988), **106**, 253-267

Van Deurs, B.; Tonnessen, T.I.; Petersen, O.W.; Sandvik, K. & Olsnes, S.
Journal of Cell Biology (1986), **102**, 37-47

Vitetta, E.S. & Thorpe, P.
in : De Vita, V.T.; Hellman, S. & Rosenberg, S.A. (Hersg.)
Biological therapy of cancer, J. P. Lippincott Company (1991)

Voltz, R.; Kamm, C.; Padberg, F.; Malotka, J.; Kerschensteiner, M.; Spuler, S.; Dornmair, K. & Tzartos, S.J.
Journal of Neuroimmunology (1997), **80**, 131-136

Weetman, A.P. & Borysiewicz, L.K.
Autoimmunity (1990), **5**, 277-292

Weston, P.D.; Drevies, J.A. & Wrigglesworth, R.
Biochemical and Biophysical Acta (1980), **612**, 40-49

Wu, J.M.; Wu, B.; Guarnieri, F.; August, J.T. & Drachman, D.B.
Journal of Neuroimmunology (2000), **106**, 145-153

Xu, Q.; Fairclough, R.H. & Richman, D.
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1993), **681**, 172-174

Yang, B.; McIntosh, K.R. & Drachman, D.B.
Clinical Immunology and Immunopathology (1998), **86**, 45-58

Yoshitake, S.; Yamada, Y.; Ishikawa, E. & Masseyeff, R.
Eur. J. Biochem. (1979), **101**, 395-399

Zettlmeissl, G.; Rudolph, R. & Jaenicke, R.
Eur. J. Biochem. (1979), **100**, 593-598

Zhao, Z.; Granucci, F.; Yeh, L.; Schaffer, P.A. & Cantor, H.
Science (1998), **279**, 1344-1347

Zielasek, J.
persönliche Mitteilung (1998)

Zinkernagel, R.M.; Cooper, S.; Chambers, J.; Laszarini, R.A.; Hengartner, H. & Arnheiter, H.
Nature (1990), **344**, 68-71

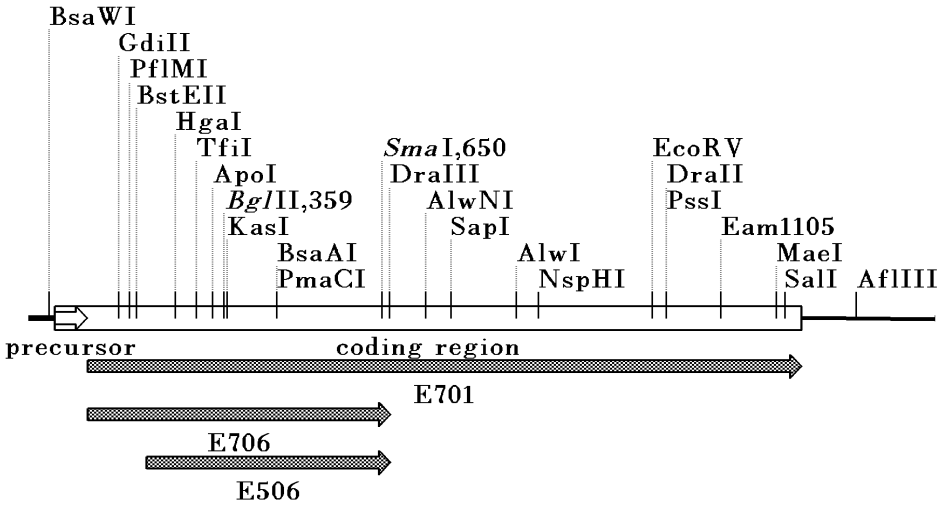
Zinkernagel, R.M.; Pircher, H.P.; Ohashi, P.S.; Oehen, S.; Odermatt, B.; Mak, T.W.; Arnheiter, H.; Bürki, K. & Hengartner, H.
Immunol. Rev. (1991), **122**, 133-171

10. Anhang

Auf den nachfolgenden Seiten finden sich Übersichtsdiagramme der DNA-Sequenzen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Die α-Untereinheit des humanen nicotinischen AChR

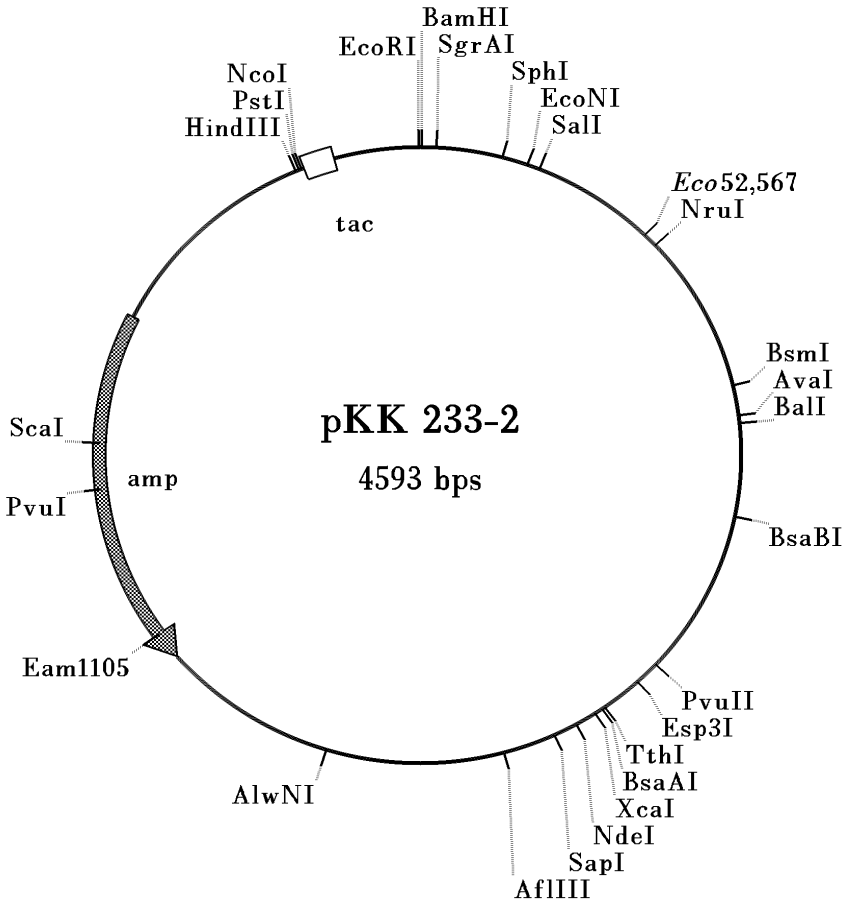
Das Bild zeigt die schematische Darstellung der Genabschnitte, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Es sind einige Restriktionsenzyme aufgeführt, die der Charakterisierung dienen können.



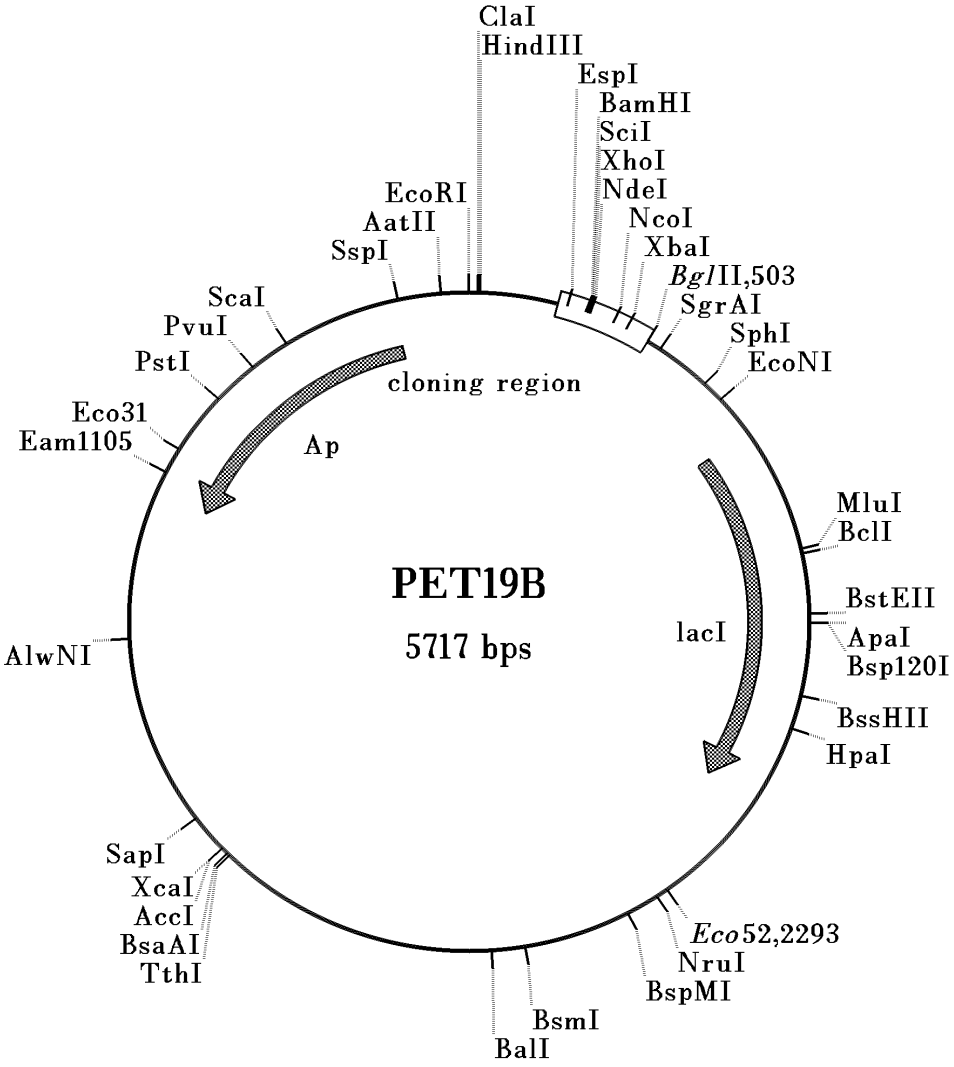
Die AS-Sequenz der α-Untereinheit des H-AChR

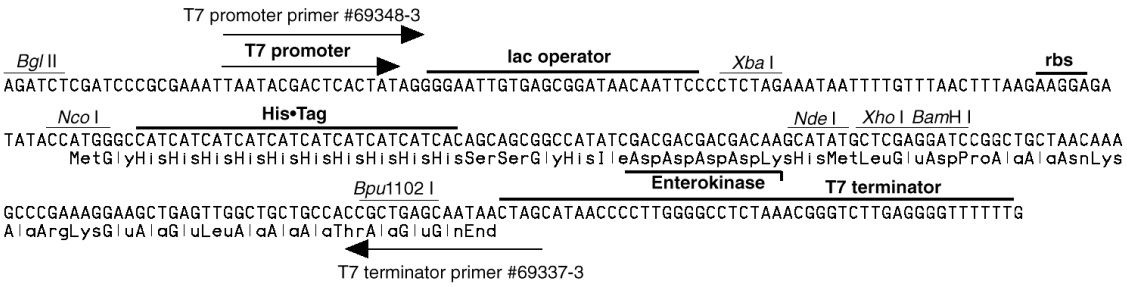
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1-20	Ser	Glu	His	Glu	Thr	Arg	Leu	Val	Ala	Lys	Leu	Phe	Lys	Asp	Tyr	Ser	Ser	Val	Val	Arg
21-40	Pro	Val	Glu	Asp	His	Arg	Gln	Val	Val	Glu	Val	Thr	Val	Gly	Leu	Gln	Leu	Ile	Gln	Leu
41-60	Ile	Asn	Val	Asp	Glu	Val	Asn	Gln	Ile	Val	Thr	Thr	Asn	Val	Arg	Leu	Lys	Gln	Gln	Trp
61-80	Val	Asp	Tyr	Asn	Leu	Lys	Trp	Asn	Pro	Asp	Asp	Tyr	Gly	Gly	Val	Lys	Lys	Ile	His	Ile
81-100	Pro	Ser	Glu	Lys	Ile	Trp	Arg	Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Tyr	Asn	Asn	Ala	Asp	Gly	Asp	Phe
101-120	Thr	Thr	Asn	Val	Arg	Leu	Lys	Gln	Gln	Trp	Val	Asp	Tyr	Asn	Leu	Lys	Trp	Asn	Pro	Asp
121-140	Asp	Tyr	Gly	Gly	Val	Lys	Lys	Cys	His	Ile	Pro	Ser	Glu	Lys	Ile	Trp	Arg	Pro	Asp	Leu
141-160	Val	Cys	Tyr	Asn	Asn	Ala	Asp	Gly	Asp	Phe	Tyr	Asp	Gly	Ser	Val	Val	Ala	Ile	Asn	Pro
161-180	Glu	Ser	Asp	Gln	Pro	Asp	Leu	Ser	Asn	Phe	Met	Glu	Ser	Gly	Glu	Trp	Val	Ile	Lys	Glu
181-200	Ser	Arg	Gly	Trp	Lys	His	Ser	Val	Thr	Tyr	Ser	Cys	Cys	Pro	Asp	Thr	Pro	Tyr	Leu	Asp
201-220	Ile	Thr	Tyr	His	Phe	Val	Met	Gln	Arg	Leu	Pro	Leu	Tyr	Phe	Ile	Val	Asn	Val	Ile	Ile
221-240	Pro	Cys	Leu	Leu	Phe	Ser	Phe	Leu	Thr	Gly	Leu	Val	Phe	Tyr	Leu	Pro	Thr	Asp	Ser	Gly
241-260	Glu	Lys	Met	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Val	Phe	Leu	Leu	Val	Ile
261-280	Val	Glu	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Ala	Val	Pro	Leu	Ile	Gly	Lys	Tyr	Met	Leu	Phe
281-300	Thr	Met	Val	Phe	Val	Ile	Ala	Ser	Ile	Ile	Ile	Thr	Val	Ile	Val	Ile	Asn	Thr	His	His
301-320	Arg	Ser	Pro	Ser	Thr	His	Val	Met	Pro	Asn	Trp	Val	Arg	Lys	Val	Phe	Ile	Asp	Thr	Ile
321-340	Pro	Asn	Ile	Met	Phe	Phe	Ser	Thr	Met	Lys	Arg	Pro	Ser	Arg	Glu	Lys	Gln	Asp	Lys	Lys
341-360	Ile	Phe	Thr	Glu	Asp	Ile	Asp	Ile	Ser	Asp	Ile	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	Met
361-380	Gly	Phe	His	Ser	Pro	Leu	Ile	Lys	His	Pro	Glu	Val	Lys	Ser	Ala	Ile	Glu	Gly	Ile	Lys
381-400	Tyr	Ile	Ala	Glu	Thr	Met	Lys	Ser	Asp	Gln	Glu	Ser	Asn	Asn	Ala	Ala	Ala	Glu	Trp	Lys
401-420	Tyr	Val	Ala	Met	Val	Met	Asp	His	Ile	Leu	Leu	Gly	Val	Phe	Met	Leu	Val	Cys	Ile	Ile
421-437	Gly	Thr	Leu	Ala	Val	Phe	Ala	Gly	Arg	Leu	Ile	Glu	Leu	Asn	Gln	Gln	Gly			

Der Expressionsvektor pKK 233-2



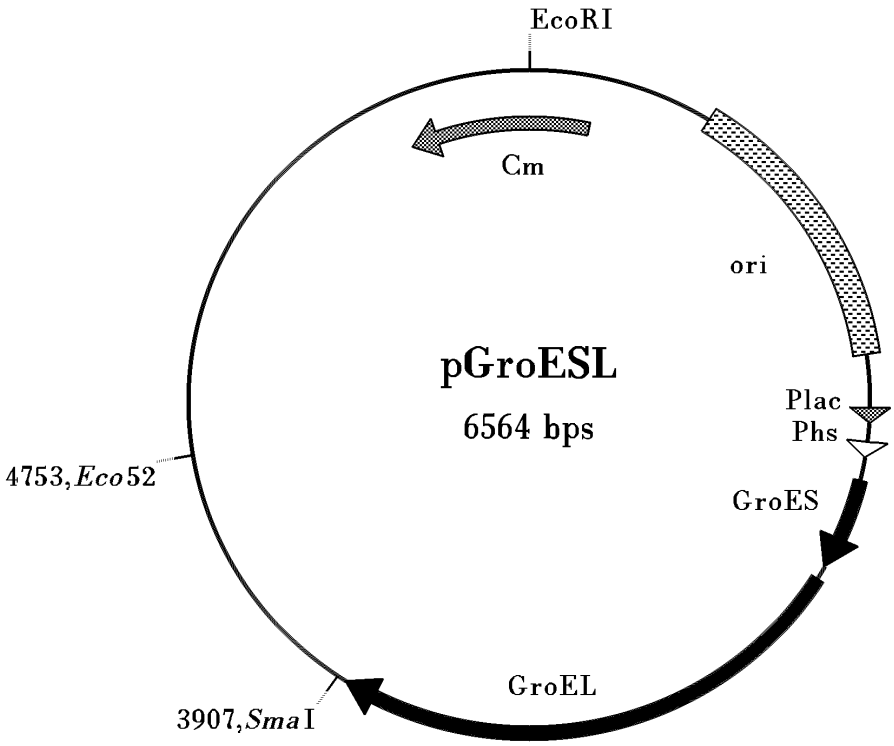
Der Expressionsvektor pET 19b





pET-19b cloning/expression region

Das Chaperonin-Plasmid pGroESL



Danke...

... an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. K.V. Toyka und Herrn Dr. med. J. Zielasek in Würzburg (Neurologische Universitätsklinik) danke ich für die Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen und die freundliche Aufnahme in Würzburg.

Herrn Dr. D. Beeson in Oxford (Institute of Molecular Medicine) danke ich für die freundliche Bereitstellung der humanen AChR-Plasmide.

Herrn Prof. Dr. S.J. Tzartos in Athen (Hellenic Pasteur Institut) danke ich für die freundliche Bereitstellung der Antikörper mAb 192 und mAb 198.

Herrn Prof. Dr. A. Maelicke und Herrn Dr. A. Schrattenholz in Mainz (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie) danke ich für die freundliche Bereitstellung des Rezeptorfragments T-AChR$_{1-209}$.

Herrn Dr. John G. Wise danke ich für seine Unterstützung bei den gentechnischen Arbeiten und ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Priv. Doz. Dr. Pia D. Vogel danke ich für viele hilfreiche Diskussionen.

Herrn Ralf Milosavljevic und Herrn Ronny Wolf danke ich für ihre engagierte Mitarbeit an dieser Arbeit im Rahmen ihrer Forschungspraktika.

Herrn Martin Hossann danke ich für seine unermüdliche Geduld.

Frau Dr. Katja Fromknecht, Frau Silvia Hahn, Frau Dr. Petra Guhr, Frau Dr. Annette Erbse, Herrn Michael Haller, Herrn Markus Klein und Herrn Ralf Milosavljevic gilt mein besonderer Dank für die moralische Unterstützung und die vielen interessanten Gespräche.

Dem gesamten Arbeitskreis ein herzliches Dankeschön für die gute Zusammenarbeit, freundliche Atmosphäre und Unterstützung während meiner Promotion.

„Last but not least“ danke ich meinen Eltern und meinen Freunden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	:	Kreilinger Ulrike
Wohnort	:	Ölmühle 67697 Otterberg
Geburtsdatum	:	20.06.1967
Geburtsort	:	Kaiserslautern

Schulausbildung

1973 - 1977	:	Stresemann Grundschule, Kaiserslautern
1977 - 1979	:	Bännjerrück Hauptschule, Kaiserslautern
1979 - 1986	:	Heinrich-Heine Gymnasium, Kaiserslautern Abschluß: Abitur

Studium

10/1986	:	Aufnahme des Studiengangs Chemie an der Universität Kaiserslautern
08/1990	:	Diplom-Vorprüfung
07/1994	:	Diplom-Hauptprüfung
08/1994 - 07/1995	:	Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. W. E. Trommer, Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Abteilung Biochemie
seit 09/1995	:	Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. W. E. Trommer
6. September 2001	:	Tag der wissenschaftlichen Aussprache