

Antigenspezifische Immunsuppression in einem Tiermodell der Myasthenia gravis

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern

zur Verleihung des akademischen Grades

“Doktor der Naturwissenschaften”

genehmigte

DISSERTATION

(D 386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Martin Hossann

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 04. Juni 2004

Für meine Eltern und Christine

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge sind, wie sie sind.

Aristoteles

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 04. Juni 2004

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. S. Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. E. Trommer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. med. D. Schrenk

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen März 2001 und Juni 2004 im Fachbereich Chemie / Abteilung Biochemie der Universität Kaiserslautern.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer für die Überlassung dieses höchst interessanten Themas, für die Unterstützung, für den Freiraum bei der Durchführung und für die stetige Diskussionsbereitschaft. Weiterhin danke ich für viele lehrreichen Einblicke, auch in andere Gebiete der Biochemie.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem der Wirbeltiere	1
1.1.1. Lymphozyten	1
1.1.2. Antigenpräsentierende Zellen (APC)	5
1.1.3. Toleranz	8
1.2. Myasthenia gravis	11
1.2.1. Pathogenese	11
1.2.2. Mechanismus	12
1.2.3. Entstehung - Der Bruch der Toleranz	13
1.2.4. Therapie	15
1.2.5. Experimentelle autoimmune Myasthenia gravis (EAMG)	18
1.3. Antigen-spezifische Immunsuppression	18
1.3.1. B-Zellen im Visier - Immuntoxine	19
1.3.2. T-Zellen im Visier	19
1.3.3. Verwendung von APC	20
1.3.4. Orale Toleranz	20
1.4. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor	21
1.4.1. Struktur	21
1.4.2. Der extrazelluläre Teil der α -Untereinheit	22
1.5. Ribosomen-inaktivierende Proteine	24
1.5.1. Einsatz in der Medizin	24
1.5.2. Wirkmechanismus	24
1.5.3. Gelonin	25
2. Problemstellung	27
3. Chemische Deglykosylierung von natürlichem Gelonin	29
3.1. Aufgabenstellung	29
3.2. Chemische Deglykosylierung mit TFMS	29
3.3. Berechnung des Massenunterschieds	30
3.4. Diskussion	30

4. Expression und Isolierung von rekombinantem Gelonin	35
4.1. Aufgabenstellung	35
4.2. Plasmidcharakterisierung	35
4.3. Expression	37
4.4. Lyse der Zellen	37
4.5. Isolierung mit Hilfe von Nickel-Ionen-Affinitätschromatographie	38
4.5.1. Elution mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen	38
4.5.2. Abspaltung des HisTag	40
4.5.3. Elution mit Thrombin	41
4.6. Charakterisierung	44
4.6.1. ESI-FT Massenspektrometrie	44
4.6.2. Western Blot	44
4.6.3. Toxizitätstest	45
4.7. Diskussion	47
5. Klonierung, Expression und Isolierung von H-α-AChR₄₋₂₀₈	53
5.1. Aufgabenstellung	53
5.2. Klonierungsstrategie von p α HE706ext	55
5.3. Charakterisierung der Ausgangsvektoren	56
5.3.1. p α HE706	56
5.3.2. Synthese von pUC α HE706	57
5.3.3. Synthese der 100 bp-Box	57
5.3.4. Synthese von pUC α HE706ext	60
5.3.5. Synthese von p α HE706ext	61
5.4. Expression und Lyse der Zellen	62
5.5. Aufarbeitung der <i>inclusion bodies</i>	63
5.6. Aufarbeitung des Zellüberstandes mit Nickel-Affinitätschromatographie	64
5.6.1. Versuche zur Elution mit Imidazol	64
5.6.2. Versuche zur Elution mit Enterokinase	65
5.6.3. Filtration mit Amicon Ultra-Konzentratoren (MWCO 30.000)	66
5.7. Diskussion	67
6. Isolierung von His₆^(T)-Gelonin₁₋₂₄₆-H-α-AChR₄₋₁₈₁	71
6.1. Aufgabenstellung	71
6.2. Untersuchung der Klonierungsstrategie von Li	71
6.3. Isolierung	73
6.3.1. Aufreinigung des vorgereinigten Fusionsproteins	73
6.3.2. Rückfaltung des Fusionsproteins	74
6.3.3. Isolierung aus <i>inclusion bodies</i>	77

6.4.	Versuche zur Abspaltung des HisTag	78
6.4.1.	Einfluss von Guanidin-hydrochlorid auf Thrombin	78
6.4.2.	Bestimmung der sterischen Zugänglichkeit des HisTag	79
6.5.	Charakterisierung	79
6.5.1.	Western Blot	79
6.5.2.	Toxizitätstest	80
6.6.	Diskussion	81
7.	Isolierung des AChR aus <i>Torpedo californica</i>	85
7.1.	Aufgabenstellung	85
7.2.	Aufarbeitung des elektrischen Organs	86
7.3.	Isolierung mit α -Cobratoxin-Affinitätschromatographie	86
7.3.1.	Durchführung der Isolierung im Durchflussverfahren	86
7.3.2.	Durchführung der Isolierung im Batch-Verfahren	87
7.4.	Diskussion	88
8.	Versuche zur antigenspezifischen Immunsuppression <i>in vivo</i>	89
8.1.	Aufgabenstellung	89
8.2.	Verlauf der Tierversuche	90
8.2.1.	Verwendete Ratten	90
8.2.2.	Haltungsbedingungen	90
8.2.3.	Bewertung der Erkrankung	91
8.3.	Immunisierung der Ratten	91
8.4.	Elektrophysiologische Untersuchungen - Repetitive Nervenstimulation	91
8.4.1.	Narkose	91
8.4.2.	Versuchsaufbau	92
8.4.3.	Versuchsparameter	93
8.4.4.	Auswertung	95
8.4.5.	Versuche zur Bestimmung der Latenzzeit	97
8.4.6.	Einfluss der RNS auf die Ratte	98
8.5.	Krankheitsverlauf	99
8.5.1.	Ratte I5	99
8.5.2.	Ratte I6	100
8.5.3.	Ratte I4, I7, I9, I11 und I12	101
8.5.4.	Ratte I1, I6 und I8	101
8.6.	Therapie	102
8.6.1.	Durchführung	102
8.6.2.	Therapiekontrolle durch optische Beobachtung	102
8.6.3.	Therapiekontrolle durch RNS	102

8.7. Diskussion	103
9. Zusammenfassung	111
9.1. Chemische Deglykosylierung von natürlichem Gelonin	111
9.2. Expression und Isolierung von rekombinantem Gelonin	111
9.3. Klonierung, Expression und Isolierung von H- α -AChR ₄₋₂₀₈	112
9.4. Isolierung von His ₆ ^(T) -Gelonin ₁₋₂₄₆ -H- α -AChR ₄₋₁₈₁	113
9.5. Isolierung des AChR aus <i>Torpedo californica</i>	114
9.6. Versuche zur antigenspezifischen Immunsuppression <i>in vivo</i>	114
10. Experimenteller Teil	117
10.1. Materialien	117
10.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	117
10.1.2. Chemikalien	118
10.1.3. DNA- und Proteinmarker	120
10.1.4. Säulenmaterial	121
10.1.5. <i>E.coli</i> -Stämme und Plasmide	121
10.1.6. Proteine und Enzyme	122
10.1.7. Antikörper	123
10.1.8. Oligonukleotide	123
10.2. Allgemeine Arbeitsmethoden	124
10.2.1. Konzentrationsbestimmungen	124
10.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	125
10.2.3. Dialyse	125
10.2.4. Proteinkonzentration	126
10.3. Gentechnische Methoden	127
10.3.1. Allgemeine Arbeitsmethoden	127
10.3.2. Plasmidisolierung	128
10.3.3. Herstellung kompetenter Zellen	129
10.3.4. Transformation und Kompetenztest	129
10.3.5. Restriktionsverdau	129
10.3.6. Phosphorylierung von Oligonukleotiden	129
10.3.7. Annealing von Oligonukleotiden	130
10.3.8. Agarose-Gelelektrophorese	130
10.3.9. DNA-Isolierung aus Agarosegelen	130
10.3.10. Expression	130
10.3.11. Zelllyse	131
10.4. Proteinisolierung	132
10.4.1. Isolierung von rekombinantem Gelonin (His ₆ ^T -Gelonin ₁₋₂₅₁)	132

10.4.2. Isolierung des His ₆ ^(T) -Gelonin ₁₋₂₄₆ -H- α -AChR ₄₋₁₈₁ -Fusionsproteins	135
10.4.3. Isolierung von His ₁₀ ^E -H- α -AChR ₄₋₂₀₈	137
10.5. Spezielle Arbeitsmethoden	138
10.5.1. Isolierung von Gelonin aus <i>Gelonium multiflorum</i>	138
10.5.2. Isolierung von T-AChR aus <i>Torpedo californica</i>	138
10.5.3. Chemische Deglykosylierung von Gelonin	140
10.5.4. <i>In vitro</i> Translationstest	140
10.6. Immunologische Methoden	142
10.6.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	142
10.6.2. Western Blot	143
10.7. Tierversuche	143
10.7.1. Halten und Spritzen der Ratte	143
10.7.2. Induzierung der EAMG in Lewis-Ratten	144
10.7.3. Repetitive Nervenstimulation	144
A. Anhang	147
A.1. Diskutierte Aminosäuresequenzen von natürlichem Gelonin	147
A.2. DNA- und Aminosäuresequenz der rekombinanten Proteine	148
A.2.1. His ₆ ^T -Gelonin ₁₋₂₅₁	148
A.2.2. His ₆ ^(T) -Gelonin ₁₋₂₄₆ -H- α -AChR ₄₋₁₈₁	149
A.2.3. His ₁₀ ^E -H- α -AChR ₄₋₂₀₈	151
A.3. Plasmidkarten	152
A.4. Mögliche Bestandteile der Glykosylierung von Gelonin	156
B. Danksagung	177
C. Lebenslauf	179

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Einleitung: Struktur eines Immunglobulins der Klasse G (IgG)	2
1.2.	Einleitung: Reifung von dendritischen Zellen	6
1.3.	Einleitung: Modell der Interaktion zwischen mDC und CD4 ⁺ T-Lymphozyten	7
1.4.	Einleitung: Zentrale Toleranz	9
1.5.	Einleitung: Modell der Gefahrensignale nach Matzinger	11
1.6.	Einleitung: Vergleich einer gesunden und myasthenen Synapse	12
1.7.	Einleitung: Therapieschema bei Myasthenia gravis	16
1.8.	Einleitung: Struktur eines AChBP-Monomers und Vergleich mit H- α -AChR ₄₋₂₀₈	23
1.9.	Einleitung: Struktur von rekombinantem Ricin	25
3.1.	Deglykosylierung: SDS-PAGE der Umsetzung mit TFMS	30
3.2.	Deglykosylierung: Mögliche Zuckerzusammensetzung der Spezies 1 und 4.	32
4.1.	Rekombinantes Gelonin: Charakterisierung von pET-gel	36
	(a). Plasmidkarte pET-gel	36
	(b). Agarosegel des Restriktionsverdaus	36
	(c). Verwendete Restriktionsenzyme und erwartete Fragmente	36
4.2.	Rekombinantes Gelonin: Primärstruktur (schematisch)	38
	(a). His ₆ ^T -Gelonin ₁₋₂₅₁	38
	(b). Gelonin ₁₋₂₅₁	38
4.3.	Rekombinantes Gelonin: SDS-PAGE der Säulenfraktionen (Elution mit Imidazol)	39
4.4.	Rekombinantes Gelonin: Isolationskontrolle und Charakterisierung mit ELISA	40
	(a). Vergleich der versch. Isolierungen mit Anti-Gelonin Antikörpern	40
	(b). Untersuchung der Säulenfraktionen mit Anti-Gelonin Antikörpern	40
4.5.	Rekombinantes Gelonin: Abspaltung des HisTag	41
4.6.	Rekombinantes Gelonin: Charakterisierung der Fraktionen (Elution mit Thrombin)	42
	(a). SDS-PAGE der Säulenfraktionen	42
	(b). ELISA der Säulenfraktionen	42
4.7.	Rekombinantes Gelonin: ESI-FT Massenspektrum	43
4.8.	Rekombinantes Gelonin: ESI-FT Massenspektrum (<i>mass-deconvoluted</i>)	43
4.9.	Rekombinantes Gelonin: ESI-MS Massenspektrum (<i>mass-deconvoluted</i>)	44
4.10.	Rekombinantes Gelonin: Immunologische Charakterisierung	45

(a).	Western Blot mit polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern	45
(b).	Western Blot mit Anti-HisTag Antikörpern	45
4.11.	Rekombinantes Gelonin: <i>In vitro</i> Translationstest	46
5.1.	H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Synthesestrategie für das Plasmid p α HE706ext (Teil 1)	54
5.2.	H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Synthesestrategie für das Plasmid p α HE706ext (Teil 2)	55
5.3.	H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Verdau der Ausgangsvektoren	57
5.4.	H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Charakterisierung von pUC α HE706	58
5.5.	H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Sequenz der synthetisierten 100 bp-Box	58
5.6.	H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Nachweis der synthetisierten 100 bp-Box	59
5.7.	H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Charakterisierung von pUC α HE706ext	60
5.8.	H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Charakterisierung von p α HE706ext	61
5.9.	H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Primärstruktur (schematisch)	63
(a).	His ₁₀ ^E -H- α -AChR ₄₋₁₈₁	63
(b).	His ₁₀ ^E -H- α -AChR ₄₋₂₀₈	63
(c).	H- α -AChR ₄₋₂₀₈	63
5.10.	H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Isolierungsversuch durch Elution mit Imidazol	65
5.11.	H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Isolierungsversuch durch Elution mit Enterokinase	66
6.1.	Fusionsprotein: Klonierung der DNA-Information in den pET28a-Vektor	72
6.2.	Fusionsprotein: Primärstruktur (schematisch)	72
6.3.	Fusionsprotein: Elutionsdiagramm	73
6.4.	Fusionsprotein: Isolierung aus den vorgereinigten <i>inclusion bodies</i>	74
(a).	SDS-PAGE der Säulenfraktionen	74
(b).	Zeitlicher Verlauf der Renaturierung	74
6.5.	Fusionsprotein: ELISA nach der Renaturierung in PBS-Puffer	76
6.6.	Fusionsprotein: Isolierung aus den <i>inclusion bodies</i>	77
(a).	SDS-PAGE der Säulenfraktionen	77
(b).	ELISA	77
6.7.	Fusionsprotein: Hemmung von Thrombin durch Guanidin-hydrochlorid	79
6.8.	Fusionsprotein: Charakterisierung	80
(a).	Western Blot	80
(b).	<i>In vitro</i> Translationstest	80
7.1.	T-AChR: Elektrisches Organ	86
7.2.	T-AChR: Isolierung aus <i>Torpedo californica</i>	87
(a).	SDS-PAGE	87
(b).	ELISA	87
8.1.	Tierversuche: Verlauf der <i>in vivo</i> Versuche	90

8.2. Tierversuche: Platzierung der Elektroden	92
8.3. Tierversuche: Schematische Darstellung von Puls und Antwort	93
8.4. Tierversuche: Einfluss der Masse-Elektrode bei der RNS	94
8.5. Tierversuche: Einfluss der Stimulationsfrequenz bei der RNS	96
8.6. Tierversuche: Das erste Signal	97
8.7. Tierversuche: Messbeispiele der RNS	98
8.8. Tierversuche: Versuche zur Bestimmung der Latenzzeit	99
8.9. Tierversuche: Einfluss der RNS auf die Ratte	99
8.10. Tierversuche: Gewichtskontrolle der Ratten.	100
8.11. Tierversuche: Ergebnisse der RNS (vor und nach der Therapie)	104
A.1. Anhang: Vergleich der bekannten Aminosäuresequenzen von Gelonin	147
A.2. Anhang: Plasmidkarte p α HE706	152
A.3. Anhang: Plasmidkarte p α HE706ext	152
A.4. Anhang: Plasmidkarte pBDH-VU1	153
A.5. Anhang: Plasmidkarte pET19b	153
A.6. Anhang: Plasmidkarte pET-gel	154
A.7. Anhang: Plasmidkarte pET-GA	154
A.8. Anhang: Plasmidkarte pUC α HE706	155
A.9. Anhang: Plasmidkarte pUC α HE706ext	155
A.10. Anhang: Mögliche Zuckerbestandteile der Glykosylierung von Gelonin	156

Tabellenverzeichnis

1.1. Einleitung: Aminosäuresequenz der MIR und des <i>cys-loop</i> bei versch. Spezies . . .	22
3.1. Deglykosylierung: Berechnung der exp. bestimmten mittleren Molekularmassen . . .	33
4.1. Rekombinantes Gelonin: Vergleich der Toxizitäten von rekomb. und nat. Gelonin . .	49
5.1. H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Aus den SDS-Gelen bestimmte Molekularmassen	68
5.2. H- α -AChR ₄₋₂₀₈ : Literaturvergleich von α -AChR _{ex} -Isolierungen	69
6.1. Fusionsprotein: Renaturierungsmethoden im Vergleich	75
6.2. Fusionsprotein: Vergleich der Toxizitätsverluste von RIP in Fusionsproteinen	84
7.1. T-AChR: Molekularmassen und Ausbeuten	88
8.1. Tierversuche: Optische Bewertung der myasthenen Symptome	91
8.2. Tierversuche: Einfluss der Nadelposition bei der RNS	95
8.3. Tierversuche: Einfluss der Frequenz auf den Dekrementwert	95
8.4. Tierversuche: Rattenübersicht	103
9.1. Zusammenfassung: Vergleich der Isolationsmethoden von rekombinantem Gelonin .	112
10.10Exp. Teil: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	143
A.1. Anhang: Mögliche Bestandteile der Glykosylierung von Gelonin	156

Verwendete Abkürzungen

A	Ampicillin
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChBP	Acetylcholin-bindendes Protein
AChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
α -AChR	α -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors
APC	antigenpräsentierende Zelle (<i>engl.</i> : antigen presenting cell)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
BCA	4,4-Dicarboxy-2,2-bichinolin-Natriumsalz
BDH	(R)-3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase
Bew.	Bewertung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
CD	Differenzierungsantigene
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>engl.</i> : cytotoxic T-lymphocyte)
Da	Dalton (g/mol)
DC	dendritische Zelle (<i>engl.</i> : dendritic cell)
DEA	Diethanolamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAMG	Experimentelle autoimmune Myasthenia gravis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-bis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMG	Elektromyogramm
engl.	englisch

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Electrospray-Ionisierung
Fa.	Firma
Fruc	D-Fructose
FT	Fourier-Transformation
GdmHCl	Guanidin-hydrochlorid
Gluc	D-Glucose
GlucNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
GPI	Glykophosphatidylinositol
H-AChR	humaner, nikotinischer Acetylcholinrezeptor
His ₁₀ ^E	10xHisTag mit Enterokinase-Schnittstelle
His ₆ ^T	6xHisTag mit Thrombin-Schnittstelle
His ₆ ^(T)	6xHisTag mit Thrombin-Schnittstelle, nicht abspaltbar
HisTag	Histidin-Tag
HLA	Gewebsantigene (<i>engl.</i> : human leukocyte antigen)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Ig	Immunglobulin
IgX	Immunglobulin (Klasse X, X = A, D, E, G, M)
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IVIg	intravenöses Immunglobulin
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
lat.	lateinisch
LC	Langerhans Zellen
LSM	große suppressive Makrophagen (<i>engl.</i> : large suppressive macrophages)
M	Molekulargewicht
Man	D-Mannose
MEA	Mercaptoethylamin
MG	Myasthenia gravis
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex (<i>engl.</i> : major histocompatibility complex)
MIR	hauptimmunogene Region (<i>engl.</i> : main immunogenic region)
MOPS	3-(N-morpholino)propan-sulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NeKo	Negativkontrolle
OD	optische Dichte
opt.	optisch

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNAG	Polynukleotid-Adenosin Glykosidase
PoKo	Positivkontrolle
RIP	Ribosomen-inaktivierende Proteine
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Repetitive Nervenstimulation
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMCC	Succinimidyl-4-(N-maleimido)-cyclohexan-1-carboxylat
sog.	sogenannte
T-AChR	Acetylcholinrezeptor aus <i>Torpedo californica</i>
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zell Rezeptor (<i>engl.</i> : T-cell antigen receptor)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFMS	Trifluormethansulfonsäure
TLR	Toll-like Rezeptor (<i>engl.</i> : toll-like receptor)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UE	Untereinheit
UV	ultraviolett
VIS	sichtbar
Xyl	D-Xylose

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem der Wirbeltiere

Der Organismus von Wirbeltieren ist ständig äußeren Einflüssen ausgesetzt. Viele davon sind für ihn pathogen. Dringen Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten in den Organismus ein, werden diese durch das Immunsystem spezifisch erkannt und zerstört (Klein, 1991; Bundschuh *et al.*, 1992; Gemsa *et al.*, 1997). Ein wichtiges Merkmal des Immunsystems ist dabei die Fähigkeit zwischen körpereigenen und körperfremden, bzw. für den Körper schädliche Strukturen zu unterscheiden.

Lebewesen sehr niedriger Organisationsstufe, wie z.B. Einzeller, können sich dagegen nur im beschränkten Umfang schädigender Einflüsse erwehren. So werden toxische Stoffe enzymatisch entgiftet, mikrobielle Krankheitserreger durch Phagozytose und Verdauung vernichtet. Das Vorliegen eines gewissen Unterscheidungsvermögens zeigt sich allerdings dadurch, dass sich solche Organismen nicht selbst phagozytieren. Entwicklungsgeschichtlich tritt ein Immunsystem erst bei den Vertebraten auf.

Nach dem Eindringen eines Fremdkörpers (Infektion) werden sowohl unspezifische (angeborene), als auch spezifische (erworbene) Abwehrmechanismen aktiviert. Während unspezifische Maßnahmen körperfremde Organismen, ohne spezifische Erkennungsmerkmale abtöten, ist das spezifische System in der Lage, Antigene aufgrund ihrer Struktur zu erkennen, zu beseitigen und die Information über deren Struktur zu speichern.

Eine weitere Einteilung der Abwehrmechanismen bezieht sich auf die Form der Immunantwort. So findet man humorale (*lat*: humor, Flüssigkeit) und zelluläre Faktoren, die allerdings miteinander wechselwirken. Aufgrund der Vielzahl an Partialfunktionen gelingt es dem Organismus, die überwiegende Mehrheit der Infektionen zu beseitigen, ohne dass ein dauerhafter Schaden entsteht.

1.1.1. Lymphozyten

Die Spezifität des Immunsystems gegen schädliche Strukturen wird von den sog. Lymphozyten gebildet. Lymphozyten entstehen aus Stammzellen des Knochenmarks, die keinerlei immunologische Kompetenz besitzen. Nach dem Ort ihrer Reifung werden B- und T-Lymphozyten unterschieden. An der Zelloberfläche gebundene Rezeptoren sind die Grundlage der Lymphozyten-Spezifität. Jeder Lymphozyt besitzt dabei Rezeptoren nur einer einzigen Spezifität, die auch an seine Abkömmlinge

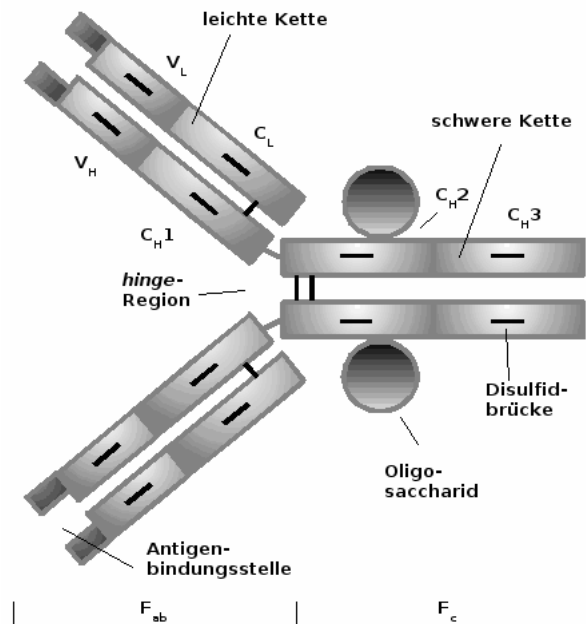


Abb. 1.1: Struktur eines Immunglobulins der Klasse G (IgG).

(Klone) weitergegeben werden. Eine Abschätzung der Zahl von Antigenen, gegen die ein Mensch immunologisch reagieren kann, liegt in der Größenordnung von 10^8 . T- und B-Lymphozyten sind im Ruhezustand morphologisch nicht unterscheidbar. Während der Reifung erwerben sie sich allerdings Differenzierungsantigene (CD, *engl.*: cluster of differentiation), Membranproteine die zu ihrer Unterscheidung benutzt werden können.

1.1.1.1. B-Lymphozyten und Antikörper

B-Lymphozyten sind Zellen der lymphatischen Reihe, die auf ihrer Oberfläche Antikörper (Immunglobuline, Ig) einer einzigen Spezifität als Rezeptoren tragen. Sie entstehen aus ihren Vorläuferzellen im Knochenmark (*engl.*: bone marrow) und werden dort nach ihrer Spezifität selektiert. Lymphozyten, die eine hohe Affinität für körpereigenes Gewebe besitzen werden eliminiert, während alle anderen das Knochenmark verlassen und in die sekundären Lymphorgane, Milz, Lymphknoten und dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe wandern. B-Lymphozyten zirkulieren sehr wenig, ihr Anteil an der Lymphozytenpopulation im Blut beträgt nur 10-15 %.

Unreife B-Lymphozyten, die an ihrer Oberfläche IgM- und IgD-Moleküle als Antigenrezeptoren tragen, reifen nach Antigenkontakt auf zwei verschiedenen Wegen. Neben der Differenzierung in eine IgM-sezernierende Plasmazelle, kann sich der aktivierte B-Lymphozyt auch in eine Gedächtniszelle differenzieren. Diese Gedächtniszellen sezernieren Antikörper der Immunglobulinklasse G (IgG) der gleichen Spezifität und sind relativ langlebig. Gedächtniszellen spielen bei einer Sekundärreaktion gegen das Antigen eine entscheidende Rolle. Die anschließende Wanderung der Plasmazellen in das Knochenmark bildet den Abschluss der Immunantwort (Craxton *et al.*, 1999).

Antikörper

Die von den Plasmazellen gebildeten Antikörper sind für die spezifische humorale Abwehr zuständig. Es handelt sich um Glykoproteine, von denen man fünf verschiedene Klassen unterscheidet (IgG, IgA, IgM, IgD und IgE). Die Immunglobuline besitzen die gleiche Grundstruktur, die sich in Größe, elektrischer Ladung, Zusammensetzung der Aminosäuren und Kohlenhydratanteil unterscheiden. In Abb. 1.1 ist die schematische Struktur eines IgG abgebildet, das im normalen menschlichen Serum mit 70-75 % den Hauptbestandteil ausmacht. Die Bindung von Antigenen erfolgt in den Regionen, die sich durch eine variable Aminosäuresequenz (V_L , V_H) auszeichnen. In der sog. Hinge-Region ist eine Winkeländerung und somit die Besetzung beider Antigenbindungsstellen unabhängig voneinander möglich.

Die Bindung eines Antigens an das zugehörige Immunglobulin erfolgt durch spezifische Wechselwirkung von einigen Aminosäuren im hypervariablen Bereich des Immunglobulins mit einem strukturellen Bereich (antigene Determinante, Epitop) des Antigens. Die restlichen Aminosäuren dienen der Aufrechterhaltung der Integrität der Bindungsstelle durch die Bildung der Tertiärstruktur. Die Bindungsenergie ergibt sich aus den beteiligten Bindungskräften (Wasserstoffbrücken, elektrostatische und Van-der-Waals-Kräfte, sowie hydrophobe Wechselwirkungen). Da die nichtkovalenten Wechselwirkungen stark vom Abstand der wechselwirkenden Gruppen abhängig sind, spielt die Form des Bindungsortes eine maßgebliche Rolle. Nur wenn die strukturelle Determinante und Oberfläche des Antikörpers optimal ineinander passen, erreicht die Bindungsenergie ihr Maximum.

Ein Immunglobulinmolekül hat zwei Aufgaben: Die Bindung von Antigenen und Markierung (Opsonierung) für den Angriff von Immunzellen, einige phagozytierende Zellen und eine Komponente des Komplementsystems. Die Bindung von Immunzellen, wie z.B. Lymphozyten erfolgt dabei an den konstanten Teil (C_H) der Immunglobuline.

Affinitätsreifung

Die Affinität der gebildeten Antikörper erhöht sich im Verlauf der Immunreaktion gegen ein bestimmtes Antigen. Dieser Vorgang wird als Affinitätsreifung bezeichnet. Ursache scheinen Punktmutationen zu sein, die bei der Expansion der durch das Antigen selektionierten B-Lymphozytenklone entstehen. Infolge der Mutationen entstehen Klone, die eine geänderte Affinität zum Antigen besitzen. Klone mit höherer Affinität werden bevorzugt weiter durch das Antigen stimuliert, während Klone mit niedriger Affinität aufgrund fehlender Stimulation nicht überleben.

1.1.1.2. T-Lymphozyten

Eine weitere Subpopulation von Lymphozyten bilden die T-Lymphozyten, die auf ihrer Zelloberfläche T-Zell Rezeptoren (TCR, *engl.*: T-cell antigen receptor) tragen. TCR besitzen wie Antikörper eine

sehr große Vielfalt. Sie sind in der Lage spezifisch an MHC-Rezeptoren von Zellen zu binden, die Antigenpeptide auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Der T-Zellen Antigen Rezeptor (TCR)

Der Oberflächenrezeptor, der für die Spezifität der T-Lymphozyten verantwortlich ist, besteht aus zwei Untereinheiten, die bei der Reifung des Lymphozyten gebildet werden. Dabei kommt es zum genetischen Rearrangieren der Gene für die α - und β -Kette, verbunden mit einer ungenauen Vernetzung der Gensegmente. Durch diesen Prozess entsteht eine riesige Anzahl von TCR, von denen allerdings nur ein geringer Prozentsatz den Pool der reifen peripheren T-Lymphozyten erreicht. Die TCR erkennen Fremdproteine nur in Form von kurzen Peptiden mit 8-10 Aminosäuren, die von antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden.

Reifung und Wanderung

Unreife T-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet und wandern in den Thymus. Ein Mensch produziert dabei 10^7 neuer T-Lymphozyten pro Minute. Im Thymus findet anschließend eine Selektion statt. Dies soll verhindern, dass autoreaktive Zellen den Thymus verlassen (Kapitel 1.1.3.1). Den Prozess der Selektion überleben nur 2-3 % aller Lymphozyten (Chen *et al.*, 1983). Die nicht benötigten Lymphozyten werden durch Apoptose eliminiert. Apoptotische Zellen werden effizient und ohne Hinweise auf inflammatorische Reaktionen entfernt (Surh und Sprent, 1994). Die reifen T-Lymphozyten verlassen den Thymus und wandern in die sekundären lymphatischen Organe. T-Lymphozyten rezirkulieren stark, d.h. sie wandern aus den lymphatischen Organen über das Lymphsystem und das Blut zurück in die lymphatischen Organe. Daher beträgt ihr Anteil an der Lymphozytenpopulation im Blut 60-80 %.

Aufgaben

Die Regulation von Immunantworten ist die zentrale Funktion der T-Lymphozyten. Dies geschieht durch die Ausschüttung von Mediatorsubstanzen, sowie durch direkten Zellkontakt mit antigenpräsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Diese Zellen werden T-Helferzellen (T_H) genannt und besitzen als Differenzierungsantigen den Marker CD4. Man unterscheidet zwei Subpopulationen von T-Helferzellen. T_{H1} -Lymphozyten fördern die Ausbildung der zellvermittelten Immunreaktion, während T_{H2} -Lymphozyten die Differenzierung von B-Lymphozyten bis zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle steuern.

Lange Zeit wurde die Existenz von sog. Suppressor-T-Lymphozyten diskutiert. Heute weiß man allerdings, dass diese Subpopulation nicht existiert. Suppression kann durch alle T-Lymphozyten vermittelt werden. So fördern z.B. T_{H1} -Lymphozyten ihre eigene Entwicklung, während sie die Entwicklung von T_{H2} -Lymphozyten hemmen.

T-Lymphozyten die den Marker CD8 tragen, sind unmittelbare Effektorzellen. Sie sind in der Lage

virusinfizierte körpereigene Zellen, die spezifisch mit Hilfe des TCR erkannt wurden, abzutöten (CTL, *engl.*: cytotoxic T-lymphocyte). Dies erfordert allerdings in der Regel die Interaktion der CTL-Vorläuferzelle mit einer T-Helferzelle.

1.1.2. Antigenpräsentierende Zellen (APC)

Gemeinsames Merkmal der antigenpräsentierenden Zellen (APC, *engl.*: antigen presenting cell) ist die Expression von Oberflächenproteinen, die im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, *engl.*: main histocompatibility complex) des Genoms kodiert sind. Diese Glykoproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Präsentation von Antigenpeptiden. Während MHC-Klasse I Proteine auf allen kernhaltigen Zellen vorkommen, findet man MHC-Klasse II Proteine nur auf B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen und Langerhans-Zellen. MHC-Klasse I Proteine präsentieren Antigenfragmente an CTL, während MHC-Klasse II Proteine mit T_H-Lymphozyten interagieren.

Die Präsentation von Antigenfragmenten erfolgt hauptsächlich über zwei Pfade. Ein exogener oder endosomaler, bei dem die prozessierten Antigenpeptide mit MHC-Klasse II Proteinen präsentiert werden (Morris *et al.*, 1994; Castellino und Germain, 1995; Shi *et al.*, 2000) und ein endogener und proteosomaler Weg, bei dem es zur Präsentation mit MHC-Klasse I Proteinen kommt (Pamer und Cresswell, 1998). Virale Proteine werden über den proteosomalen Weg abgebaut und somit CTL präsentiert, die so die virenbefallene Zelle abtöten können. Bakterielle und auch körpereigene Proteine werden über beide Wege prozessiert.

1.1.2.1. Makrophagen

Makrophagen gehören zu einer, von Monozyten abstammenden Klasse von Zellen, die in der Lage sind durch Phagozytose exogene Strukturen aufzunehmen und zu prozessieren. Sie wurden bereits 1884 von Metschnikow als Effektorzelle für die Infektabwehr identifiziert. Ihre wichtigsten Funktionen sind die Phagozytose, Zytotoxizität, Kooperation mit Lymphozyten und Sekretion verschiedenster biologisch aktiver Produkte.

Nach der Erkennung von körperfremdem Material, durch Mechanismen, die noch wenig bekannt sind, kommt es zur Aufnahme durch Phagozytose, Abtötung durch mikrobiozide Substanzen und Verdauung durch lysosomale Enzyme. Der Erkennungsprozess kann erheblich durch die Opsonierung des Pathogens durch Antikörper und der Komplementkomponente C3b beschleunigt werden. Somit erhalten Makrophagen mit Hilfe von antikörperproduzierenden B-Lymphozyten eine Spezifität für eingedrungene Pathogene. Die Fähigkeit zur Chemotaxis, d.h. der Wanderung gegen einen ansteigenden Gradienten chemotaktisch aktiver Substanzen, ermöglicht es den Makrophagen gezielt einen Entzündungsort im Körper zu erreichen.

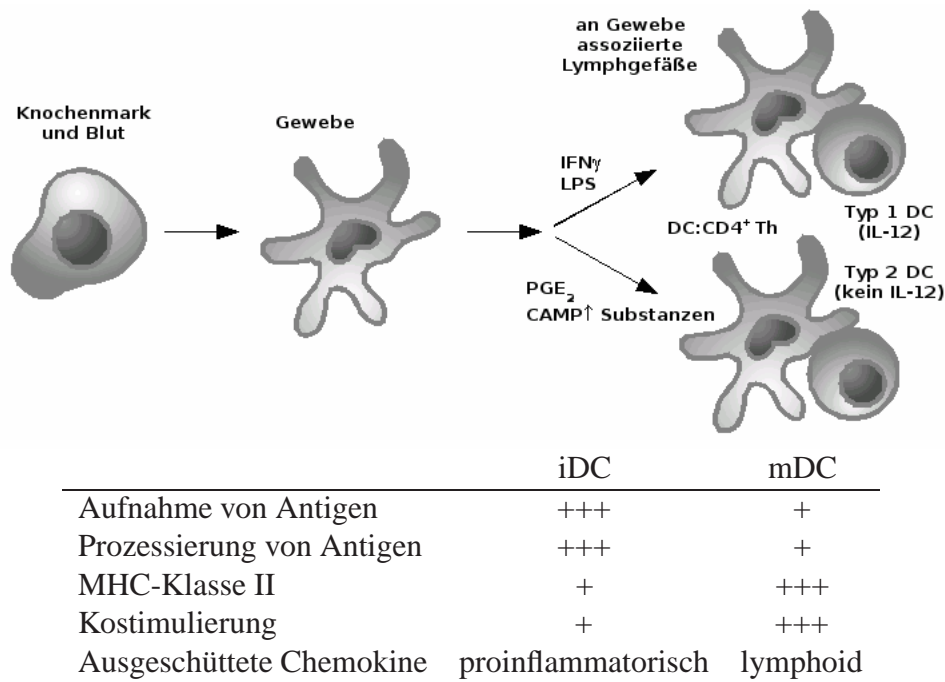


Abb. 1.2.: Reifung von dendritischen Zellen (nach: Lipscomb und Masten, 2002).

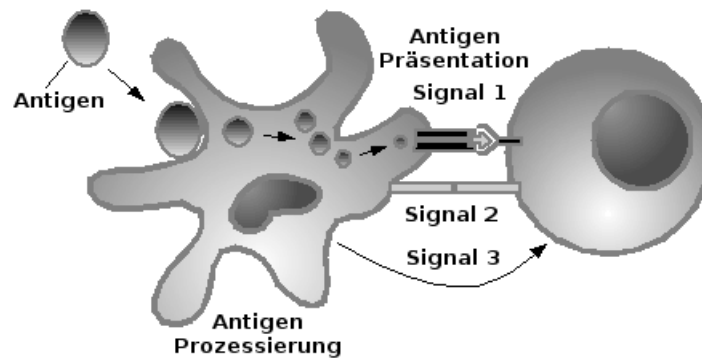
1.1.2.2. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) wurden erstmals 1973 von Ralph Steinman beschrieben, der eine neue Subpopulation von Zellen mit charakteristisch verästeltem (*engl.*: dendritic) Aussehen, isoliert aus der Milz, beschrieb (Steinman *et al.*, 1973). DC sind eine heterogene Gruppe von Zellen mit Unterschieden in der anatomischen Lokalisation und dem Phänotyp der Zelloberfläche. Sie besitzen gemeinsame Funktionen bei der Kontrolle und Regulation der Immunantwort (Banchereau und Steinman, 1998).

1.1.2.3. Typen und Vorkommen

Ausgehend von CD34 $^+$ Stammzellen des Knochenmarks, entwickeln sich Vorläufer DC (pDC, *engl.*: precursor DC). Über die Blutbahn gelangen diese ins Gewebe und entwickeln sich zu unreifen DC (iDC, *engl.*: immature DC), zu denen auch die Langerhans Zellen (LC) und interstitialen DC (auch dermale DC) gehören.

Die Funktion von unreifen DC im Gewebe liegt in der Überwachung der Umgebung. Dabei findet man z.B. LC und interstitiale DC in der Darmschleimhaut und der Haut. Nach ihrer Aktivierung durch Entzündungssignale wie z.B. proinflammatorische Chemokine in der Umgebung, nehmen sie Antigen auf, prozessieren es und präsentieren die Peptide auf ihren Oberflächen-MHC-Rezeptoren des Typs I und II. Werden sie noch zusätzlich durch Gefahrensignale (siehe Kap. 1.1.3.2) aktiviert, reifen sie zu mDC und es erfolgt eine Änderung der Oberflächenrezeptoren (Abb. 1.2). Die Rezeptoren für inflam-



	mDC	CD4 ⁺ T-Lymphozyt
Signal 1	MHC Klasse II-Peptid	TCR / CD4
Signal 2	CD11a	CD54
	CD40	CD40L
	CD54	CD11a
	CD80	CD28/CTLA4
	CD86	CD28/CTLA4
Signal 3	IL-12 Ausschüttung	Th1 Antwort
	keine IL-12 Ausschüttung	Th2 Antwort

Abb. 1.3.: Modell der Interaktion zwischen mDC und CD4⁺ T-Lymphozyten (nach: Lipscomb und Masten, 2002).

matorische Chemokine verschwinden und es werden Rezeptoren für lymphoide Chemokine exprimiert, die eine Wanderung (*engl.*: homing) der reifen DC in Organe des Lymphsystems ermöglichen. Dort interagieren die mDC mit antigenspezifischen CD4⁺ T_H-Lymphozyten und lösen eine Immunantwort aus (de Smet *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2000). Faktoren, die bei der Reifung in der Umgebung vorliegen, beeinflussen, ob diese mDC später eine T_H1 oder T_H2 Immunantwort auslösen (Vieira *et al.*, 2000).

1.1.2.4. Interaktion der Zellen des Immunsystems durch Antigenpräsentation

DC sind in der Lage sowohl einzelne Moleküle durch Phagozytose, als auch ganze Zellen, wie z.B. apoptotische oder nekrotische Zellen aufzunehmen. Auch die Aufnahme von Antigenen von lebenden Zellen zur Präsentation an CTL ist bekannt (Harshyne *et al.*, 2001).

Die Präsentation von Antigenpeptiden zu T-Lymphozyten ist in Abb. 1.3 schematisch für einen CD4⁺ T-Lymphozyten dargestellt und konnte erstmal direkt von Ingulli *et al.* *in vivo* detektiert werden (Ingulli *et al.*, 1997). Je nachdem wie viele der drei aufgeführten Signale den T-Lymphozyten erreichen, kommt es zu unterschiedlichen Reaktionen. Signal 1 alleine reicht nicht zur Aktivierung des T-Lymphozyten aus. Unterbleibt eine Kostimulation nach Signal 2, so hat das Anergy oder Apoptose zur Folge. Kommt es zur Kostimulation, wird der Lymphozyt aktiviert und es kann je nachdem

ob Signal 3 erfolgt, eine Differenzierung zu einem antigenspezifischen T_H1 - oder T_H2 -Lymphozyten erfolgen. Auch die Dauer der Wechselwirkung mit einer dendritischen Zelle ist für das Schicksal des T-Lymphozyten von entscheidender Bedeutung. Bei kurzer Wechselwirkung kommt es zu Anergy oder Apoptose, während bei längerer Wechselwirkung die Ausbildung von Gedächtnis- oder Effektor-T-Lymphozyten erfolgt (Banchereau und Steinman, 1998; Lanzavecchia *et al.*, 1999). Nach der Aktivierung der T-Lymphozyten verschwinden die antigenpräsentierenden mDC, was zum Beenden der Lymphozytenstimulation führt. Dies könnte ein Schutzmechanismus sein, um eine unkontrollierte Immunantwort mit aktivierten T-Lymphozyten zu verhindern (Ingulli *et al.*, 1997).

1.1.2.5. Rolle der DC bei der Verbindung angeborenes und erworbenes Immunsystem

DC gehören zum angeborenen, unspezifischen Immunsystem, spielen aber eine wichtige Rolle bei der Regulation des erworbenen Immunsystems. Als professionelle antigenpräsentierende Zellen, mit ihrer Eigenschaft über Rezeptoren Gefahrensignale aus dem umliegenden Gewebe zu verarbeiten, sind sie ein wichtiges Bindeglied zwischen dem unspezifischen Immunsystem und dessen Gedächtnis. Eine große Rolle spielen die dendritischen Zellen deshalb bei der Ausbildung der Toleranz des Immunsystems.

1.1.3. Toleranz

Eine wichtige Eigenschaft des Immunsystems ist die Aufrechterhaltung der Toleranz gegen körpereigenes Gewebe. Wird diese Toleranz durchbrochen, kommt es zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen (Kapitel 1.2).

Das ursprüngliche Modell von Burnet beschrieb die direkte Unterscheidung des Immunsystems von „Selbst“- und „Nichtselbst“. Danach sollten autoreaktive Lymphozyten im frühen Stadium des Lebens eliminiert werden (Burnet, 1959). Dieses Modell wurde seit seiner Einführung mehrmals modifiziert. 1975 entdeckten Lafferty und Cunningham, dass T_H -Lymphozyten sterben, wenn sie Antigen durch eine APC präsentiert bekommen und nicht durch Kostimulation gerettet werden. Eine weitere Modifikation erfuhr das Modell durch die Entdeckung, dass APC eine eigene Methode von „Selbst/Nichtselbst“-Erkennung besitzen müssen (Janeway, 1989). So werden diese durch die Bindung von Bakterien an Oberflächenrezeptoren aktiviert, kostimulierende Liganden und Rezeptoren exprimiert, die bakteriellen Antigene prozessiert und diese den T-Lymphozyten präsentiert.

Ein völlig neues Modell der Toleranzinduktion schlug Matzinger vor (Matzinger, 1994). Darin postulierte sie, dass Lymphozyten nicht die erste Stufe der Immunantwort durch Entdeckung von Antigenen sein müssen. Das Aussenden von Gefahrensignalen durch Zellen des Gewebes und deren Kommunikation mit Immunzellen aktivieren ebenfalls das Immunsystem.

1.1.3.1. Zentrale Toleranzinduktion

Im Thymus, dem Ort der Produktion von T-Lymphozyten, findet die erste Auswahl von unreifen T-Lymphozyten statt. Man spricht hier von zentraler Toleranzinduktion. Bei der Entwicklung von T-Lymphozytenklonen werden die Gene für die beiden Untereinheiten des TCR willkürlich rearrangiert, um eine möglichst große Anzahl von verschiedenen Rezeptoren auszubilden. Dabei kommt es auch zur Produktion von autoreaktiven Lymphozyten-Klonen.

Aufgrund der Affinität des TCR zu von Selbst-MHC präsentierten Selbst-Peptiden, erfolgt die zentrale Selektion der T-Lymphozyten (Abb. 1.4). Bindet der TCR nicht an das mit Selbst-MHC präsentierte Selbst-Peptid, so bleiben Differenzierungssignale aus und der T-Lymphozyt stirbt. Mit diesem Schritt wird erreicht, dass nur die T-Lymphozyten den Thymus verlassen, welche die eigenen MHC-Proteine erkennen. In einem Schritt der Negativselektion werden die T-Lymphozyten eliminiert, deren TCR eine hohe Bindungsaffinität an die Komplexe aus Selbst-MHC und Selbst-Peptid besitzen und somit autoreaktiv sind. Den Thymus verlassen nur die T-Lymphozyten, die eine niedrige Affinität besitzen. Damit wird erreicht, dass die Zellen den Thymus verlassen, die potentielle Fremdpeptide präsentiert durch Selbst-MHC erkennen. Dies wird als Positivselektion bezeichnet.

Die Selektion erfolgt mit $CD4^+/CD8^+$ T-Lymphozyten. Im Rahmen dieser Positivselektion werden die Zellen nach ihrer Affinität für die MHC-Proteine weiter differenziert. T-Lymphozyten, die eine Affinität zu MHC II-Proteinen besitzen, differenzieren sich in $CD4^+$ T-Lymphozyten (T_H -Lymphozyten). Während sich die T-Lymphozyten die eine Affinität zu MHC I-Proteinen besitzen, zu $CD8^+$ T-Lymphozyten (CTL) differenzieren.

Allerdings gelingt es im Thymus nicht alle autoreaktiven Lymphozyten zu eliminieren. Dies hat verschiedene Gründe. Zum einen können T- und B-Lymphozyten der Selektion entgehen (Bouneaud *et al.*, 2000), weiterhin haben viele Selbstantigene keinen Zugang zum Thymus (Lo *et al.*, 1989),

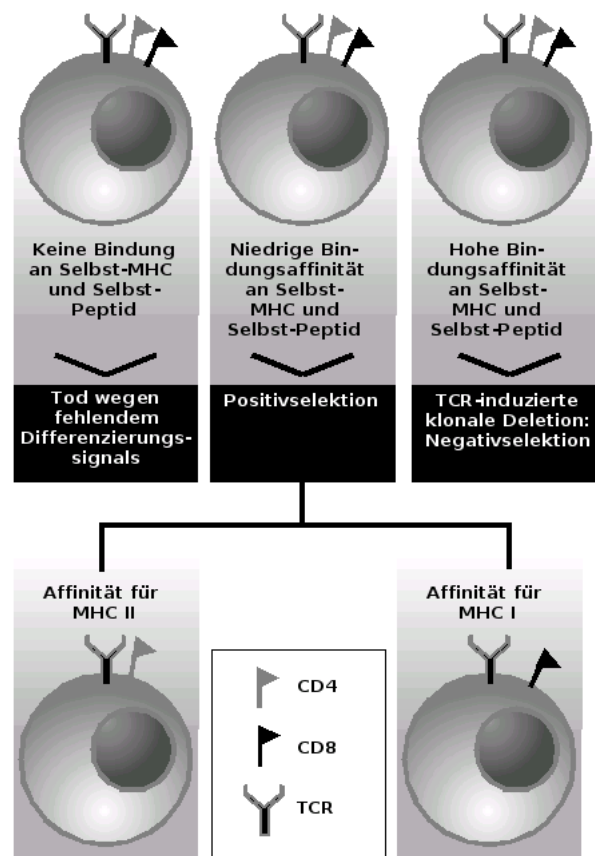


Abb. 1.4.: Vereinfachte Darstellung der im Thymus ablaufenden Selektionsschritte von $CD4^+/CD8^+$ T-Lymphozyten.

während andere erst später im Leben exprimiert werden, nachdem das Repertoire der Lymphozyten bereits ausgebildet wurde.

1.1.3.2. Periphere Toleranzinduktion

Ein großer Teil der Selbstantigene wird nicht im Thymus exprimiert. Um eine Reaktion des Immunsystems gegen diese Selbstantigene zu verhindern, muss außerhalb des Thymus ein Mechanismus existieren, der eine Induktion der Toleranz ermöglicht. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang Deletion, Anergy und Regulation. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass vor allem APC in der Peripherie für die Ausbildung der Toleranz verantwortlich sind. Lambolez *et al.* zeigten 2002 erstmals, dass dendritische Zellen *in vitro* Toleranz induzieren können (Lambolez *et al.*, 2002).

Ruhende DC sind nur dann in der Lage Lymphozyten zu stimulieren, wenn sie aktiviert werden und zu mDC differenzieren. Diese Aktivierung kann z.B. durch die Bindung von Bakterien an spezifische Rezeptoren (TLR, *engl.*: toll-like receptors) an der DC-Oberfläche erfolgen. TLR binden eine große Zahl verschiedenster biologischer Moleküle (Medzhitov und Janeway jr., 2002; Aderem und Ulevitch, 2000), wie z.B. Komponenten von Bakterien oder Pilzen. Bisher konnten in Säugetieren zehn TLR charakterisiert werden (Akira *et al.*, 2001).

Das Modell nach Matzinger

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Autoantikörper (Mouthon *et al.*, 1995; Coutinho *et al.*, 1995) und autoreaktive Lymphozyten (Huetz *et al.*, 1988; Melms *et al.*, 1992; Shanmugam *et al.*, 1994) auch im Blut von gesunden Menschen gefunden werden. Dies lässt sich durch das oben aufgeführte Toleranzmodell nicht oder nur unzureichend erklären. Weiterhin bedeutet „Nichtselbst“ nicht unbedingt pathogen. Viele exogene Substanzen schädigen den Körper nicht und machen somit eine Aktivierung des Immunsystems überflüssig.

Matzinger beschrieb in ihrem „Modell der Gefahrensignale“ 1994 die Kommunikation des umliegenden Gewebes mit den Zellen des Immunsystems. Werden Zellen von pathogenen Erregern angegriffen, so senden sie Gefahrensignale aus, die professionelle APC, wie z.B. dendritische Zellen, aktivieren und zur Reifung anregen. Diese präsentieren Antigenen den T-Lymphozyten und lösen eine Immunreaktion aus. Zu diesen Gefahrensignalen gehören z.B. endogene Signale wie Hitzeschockproteine (Breloer *et al.*, 2001), DNA (Ishii *et al.*, 2001), RNA, Interferon- α , Interleukin-1 β , CD40-L und Trümmer von lysierten Zellen (nekrotische Zellen), aber auch exogene Signale wie z.B. virale RNA (Alexopoulou *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2002), bakterielle DNA (Hemmi *et al.*, 2000; Häcker *et al.*, 2002) oder andere bakterielle Komponenten (Hayashi *et al.*, 2001). Bleibt eine Aktivierung durch lokale Gefahrensignale aus, so findet aufgrund der fehlenden Reifung der iDC keine Aktivierung des Immunsystems statt. Um eine Aktivierung des Immunsystems durch apoptotische Zellen zu verhindern, werden apoptotische Körper in Makrophagen aufgenommen, ohne dass Zellbestandteile austreten

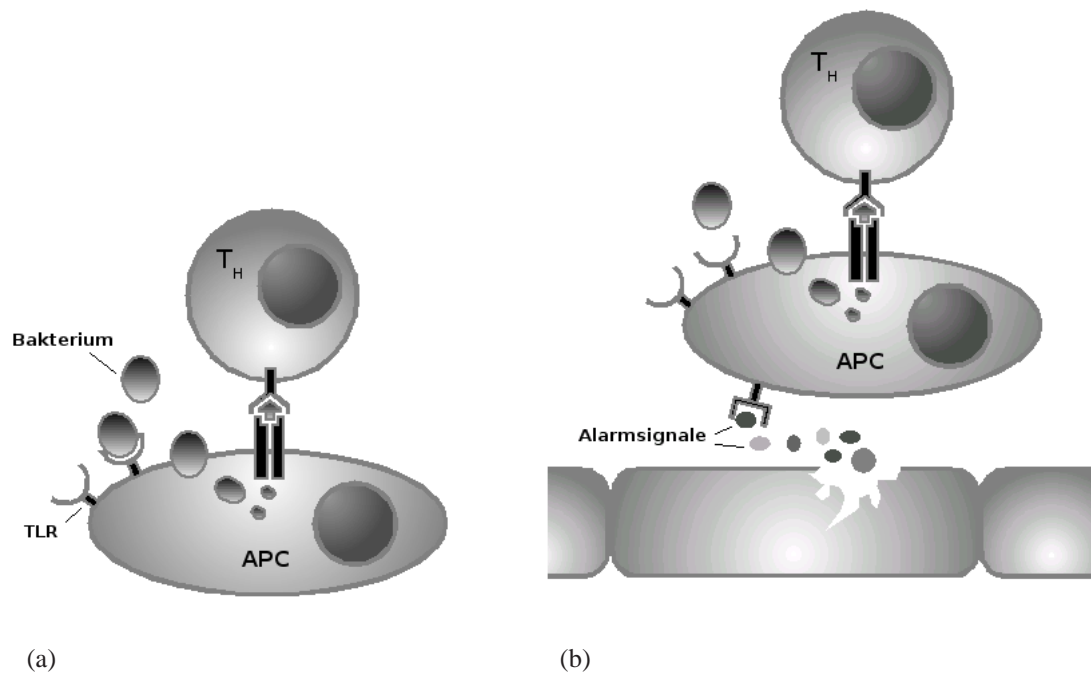


Abb. 1.5.: Aktivierung von T_H -Lymphozyten durch APC, die (a) durch Bindung von Bakterienstrukturen an ihre TLR, oder (b) durch Gefahrensignale aktiviert und zur Reifung angeregt werden.

können (Reddy *et al.*, 2002). Mit diesem Modell lässt sich auch die Notwendigkeit von Adjuvans bei der Immunisierung von Tieren mit Antigenen zur Ausbildung einer Immunantwort erklären. Das Adjuvans wirkt als Gefahrensignal und aktiviert die iDC. Nach ihrer Reifung werden dann prozessierte Antigene den Zellen des Immunsystems präsentiert und eine Immunantwort ausgelöst.

1.2. Myasthenia gravis

Da sowohl Angriffsort, als auch Mechanismus weitgehend bekannt sind, ist Myasthenia gravis eine der am besten untersuchten Autoimmunerkrankungen (Conti-Fine *et al.*, 1997). Das Wort Myasthenie leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet Muskelschwäche.

1.2.1. Pathogenese

Zum Krankheitsbild zählt eine abnorme Ermüdbarkeit und eine rasch zunehmende Schwäche der quergestreiften Körpermuskulatur bei Belastung. Überwiegend sind die Muskulatur des Auges, des Lids, sowie Nacken-, Hals- und Schultergürtelmuskulatur betroffen. Weiterhin kommt es zur Beeinträchtigung bei der mimischen Muskulatur, sowie bei Kau-, Schluck- und Sprechmuskulatur. Die Muskelschwäche variiert dabei episodisch. Die Symptome gipfeln in der myasthenen Krise (Atemin-

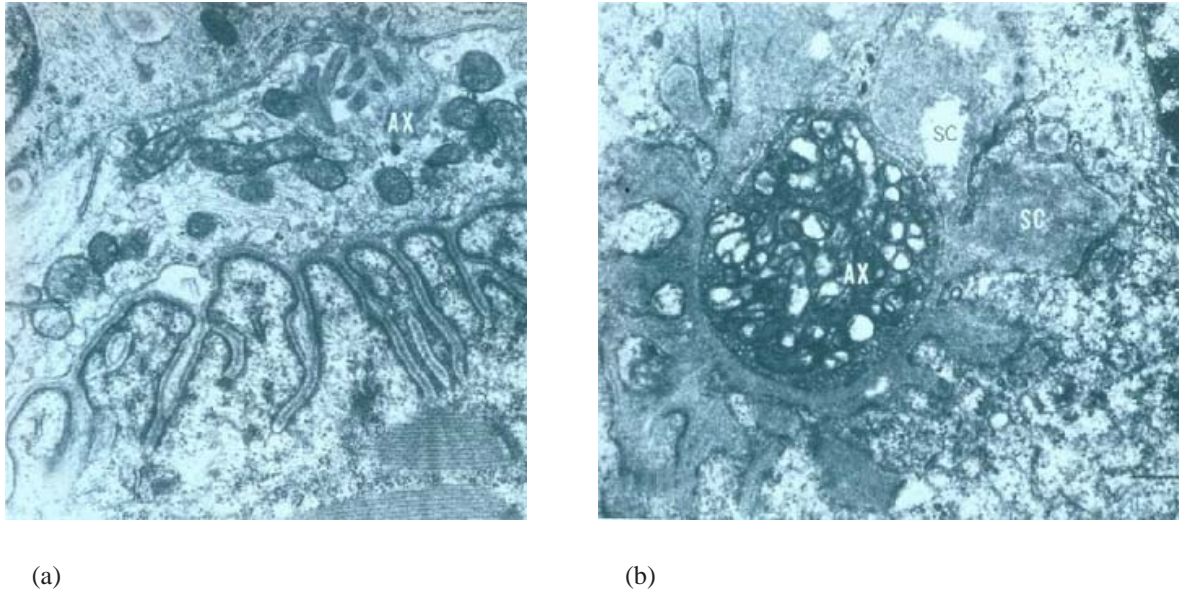


Abb. 1.6.: Vergleich einer gesunden und myasthenen Synapse - **(a)** Gesunde Synapse: Man erkennt den Axon-Fuß (AX) mit Mitochondrien und synaptischen Vesikeln, die ACh in den synaptischen Spalt (SC) ausschütten können. Der synaptische Spalt ist schmal und besitzt eine große Oberfläche. **(b)**: Myasthene Synapse: der synaptische Spalt ist stark geweitet und besitzt eine geringere Oberfläche als bei einer gesunden Synapse (Illingworth, 2004).

suffizienz) und schließlich im Tod des Patienten. Das Krankheitsbild ähnelt einer Vergiftung mit Curare. Die Verabreichung von Pyridostigmin, einem Gegengift des Curare, führt zu einer Verbesserung der Symptome. Es zeigte sich, dass eine Störung der neuromuskulären Reizübertragung zugrunde liegt, die eine Verringerung der Zahl funktionsfähiger nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (AChR) in den motorischen Endplatten zur Ursache hat.

1.2.2. Mechanismus

Myasthenia gravis hat seine Ursache in der Bildung von Autoantikörpern gegen den AChR durch autoreaktive B-Lymphozyten. Diese Autoantikörper sind zum großen Teil gegen die α -Untereinheit des AChR gerichtet. Andere Untereinheiten spielen bei der Pathogenese nur eine untergeordnete Rolle. Allerdings zeigen die Autoantikörper eine hohe Heterogenität (Vincent *et al.*, 1987). Die Bildung der Autoantikörper wird durch T_H -Lymphozyten reguliert (Zhang *et al.*, 1988), die allerdings andere Abschnitte auf dem AChR erkennen (Fujii und Lindstrom, 1988; Hohlfeld *et al.*, 1988). Bei gesunden Menschen findet man keine Autoantikörper gegen den AChR im Blut, allerdings konnte die Existenz von T_H -Lymphozyten, die spezifisch gegen den AChR reagieren nachgewiesen werden (Melms *et al.*, 1992). Es existieren unterschiedliche Mechanismen die Symptome auslösen können. Diese sind im folgenden einzeln aufgeführt.

Kreuzvernetzung und Internalisierung der AChR

Der Kreuzvernetzung der AChR durch Autoantikörper führt zur Internalisierung durch Endozytose und zum Abbau der Rezeptoren durch lysosomale Enzyme. Dies bezeichnet man als *antigenic modulation*. Dabei wird die Halbwertszeit des AChR an der Zelloberfläche von 7 auf 2 Tage reduziert. Zur Kompensation wird die AChR-Synthese, messbar durch die erhöhten mRNA-Levels für die α -UE, gesteigert (Asher *et al.*, 1993; Guyon *et al.*, 1994). Eine Blockade der Acetylcholin-Bindungsstelle durch Autoantikörper gilt als pathophysiologisch irrelevant (Pumplin und Drachman, 1983).

Fokale Lyse der postsynaptischen Membran

Die Autoantikörper gegen den AChR sorgen nicht nur für dessen Abbau, sondern können auch das Komplementsystem aktivieren. Durch Ausbildung des membranangreifenden Komplexes kann die postsynaptische Membran lokal lysiert werden. Allerdings kommt es nicht zur Lyse der kompletten Muskelfaser, da dieses sehr große Synzytium resistent gegen Abbauprozesse ist. Die Lyse führt stattdessen zur Veränderung der Oberflächenstruktur der Membran (Abb 1.6). Es kommt zu einer Reduzierung der Faltungen, was zu einer Verringerung der Oberfläche und einer geringeren AChR-Dichte im synaptischen Spalt führt. Die fokale Lyse ist essentiell für die Ausbildung von Myasthenia gravis und die *antigenic modulation*, da nur in Organismen die ein Komplementsystem besitzen, Experimentelle autoimmune Myasthenia gravis (EAMG) induziert werden kann. Möglicherweise werden bei der Lyse die Ankerpunkte des AChR im Zytoskelett in der Membran entfernt und somit die Endozytose des Rezeptors erleichtert (Lennon *et al.*, 1978; Lennon und Lambert, 1981), welches die *antigenic modulation* vereinfacht. Tsujihata *et al.* zeigten in einem Rattenmodell, dass das Komplementsystem eine entscheidende Rolle beim Abbau der AChR, über die fokale Lyse der postsynaptischen Membran, spielt (Tsujihata *et al.*, 2003). Außerdem konnten sie zeigen, dass Makrophageninvasion in die postsynaptische Membran nur bei schwerer Erkrankung beobachtet werden kann und anscheinend ein sekundäres Phänomen bei der Pathogenese der Myasthenia gravis darstellt.

Der Anti-AChR-Antikörpertiter und die Schwere der Erkrankung

Messungen des Titers der Anti-AChR-Antikörper im Blut myasthener Patienten, zeigen, dass dieser nicht mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Ein Maß für die Schwere der Erkrankung ist daher nur die Zahl der AChR in der motorischen Endplatte. Dies liegt daran, dass ein Teil der Antikörper pathologisch irrelevante Teile erkennen und so nicht die pathologisch relevanten Mechanismen auslösen können (Lindstrom und Lambert, 1978).

1.2.3. Entstehung - Der Bruch der Toleranz

Der eigentliche Auslöser von Autoimmunerkrankungen ist bis heute unbekannt und Gegenstand der Diskussion. Das Auftreten von Thymusveränderungen wird dabei sowohl als Ursache, als auch als

Folge angesehen (Sönnichsen und Apostoloff, 1992). Prinzipiell wäre die Ausbildung einer Autoimmunerkrankung dadurch möglich, dass die selbstprotektiven Kontrollmechanismen geschwächt sind, oder dass es zum Auftreten eines überwältigend starken positiven Stimulationssignal käme. Auch die Bildung von autoreaktiven Immunzellen bei der Affinitätsreifung könnte zur Ausbildung einer Autoimmunerkrankung führen. Untersucht man die im Körper von gesunden Menschen vorkommenden autoreaktiven T- und B-Lymphozyten, so fehlen Klone die gegen Autoantigene gerichtet sind, die in hoher Konzentration im Körper vorkommen (z.B. Serumalbumin). Im folgenden soll eine Zusammenfassung von möglichen Auslösern der Autoimmunerkrankung Myasthenia gravis gegeben werden.

Molekularer Mimikry

Mit der These der molekularen Mimikry beschäftigten sich Deitiker *et al.* (Deitiker *et al.*, 2000). Sie durchsuchten Datenbanken nach gemeinsamen strukturellen Bereichen zwischen mikrobiellen Proteinen und den hauptantigenen Determinanten auf der humanen α -UE des AChR. Sie fanden dabei hunderte Strukturen, die mögliche Kreuzreaktionen hervorrufen könnten. Die Synthese von einer Auswahl solcher Peptide und die Untersuchung der Reaktion mit Autoantikörpern myasthener Patienten brachte eine große Anzahl von Kreuzreaktionen. Das Blut von gesunden Probanden zeigte keine Kreuzreaktion mit diesen Peptiden. Eine Infektion könnte also durchaus eine Kreuzreaktion mit körpereigenem AChR hervorrufen und somit eine Autoimmunerkrankung auslösen.

Bei der Behandlung von Hepatitis C durch die Gabe von Interferon α 2b entwickelte sich bei einem 56-jährigen Mann Myasthenia gravis (Evoli *et al.*, 2002). Die Ausbildung von Autoimmunerkrankungen bei der Behandlung von Hepatitis C mit Interferonen ist seit längerem bekannt (Eibl *et al.*, 2001; Fukuyama *et al.*, 2000).

Genetische Faktoren

Der Einfluss von genetischen Faktoren auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wird ebenfalls diskutiert, und die Identifikation von Krankheitsgenen ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Morhahan und Morel, 2002). Bekannt ist, dass Menschen eines bestimmten HLA-Typs (*engl.*: human leukocyte antigen) häufiger an Myasthenia gravis erkranken (Compston *et al.*, 1980; Nepom und Erlich, 1991; Yang *et al.*, 1998). In Untersuchungen bei Mäusen wurde gezeigt, dass eine Mutation im MHC die Ausbildung von EAMG nach der Immunisierung mit AChR verhindert (Christadoss *et al.*, 1985; Bellone *et al.*, 1991).

Hormonelle Faktoren

An verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie z.B. Lupus erythematosus, Multiple Sklerose und *early onset* Myasthenia gravis erkranken signifikant häufiger Frauen als Männer. Dies ist ein Indiz für den Einfluss von Hormonen und/oder die potentielle Beteiligung des X-Chromosoms (Whitacre, 2001). Matthews *et al.* untersuchten Autoantikörper von Frauen, die nach der Geburt an Myasthenia

gravis erkrankten. Sie konnten zeigen, dass eine Autoimmunisation mit fetalem AChR ein möglicher Weg zur Ausbildung von Myasthenia gravis bei der Mutter ist (Matthews *et al.*, 2002).

Die Beeinflussung der Immunantwort durch Hormone könnte dabei über verschiedene Mechanismen geschehen. So wären eine Modulation der T-Lymphozyten, ein Einfluss auf die Expression von Oberflächenrezeptoren und/oder Transkription und Translation von Genen für Cytokine von Immunzellen denkbar (Talal und Ahmad, 1987; Whitacre *et al.*, 1999).

Fehlregulation der Apoptose

Eine der wichtigsten Eigenschaften des Immunsystems ist seine homeostatische Kontrolle. Nach der Aktivierung und Eliminierung des Antigens muss die Lymphozytenzahl wieder auf den Stand vor der Aktivierung heruntergeregelt werden (Berzins *et al.*, 1999). Dies wird durch ein Gleichgewicht zwischen Wachstum und Tod erreicht. Apoptose ist die Hauptursache für das Absterben von Immunzellen (Krammer, 2000). Eine Fehlregulation der Apoptose könnte so eine Autoimmunerkrankung auslösen.

Ein genetischer Defekt im CD95-CD95L System führte in einem Mausmodell zur Ausbildung einer Erkrankung, deren Symptome ähnlich zu denen beim systemischen Lupus erythematosus sind (Nagata, 1998). Bei Menschen führt eine Mutation in der Death-Domäne von CD95 zu ALPS (*engl.*: autoimmune lymphoproliferative syndrome). Charakteristisch für die Erkrankung ist eine stark ausgebildete Autoimmunität (Rieux-Laucat *et al.*, 1999).

Ein erhöhter Widerstand von autoreaktiven T-Lymphozyten gegenüber Apoptose führte im Tierversuch ebenfalls zur Autoimmunität (Zhou *et al.*, 1999). Die Gabe von Substanzen, welche die Empfindlichkeit von T-Lymphozyten gegenüber Apoptose steigern, führte zu einer Verbesserung der Symptome.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Fehlregulation der Apoptose bei zellulären Bestandteilen der Antigenpräsentation und Selbst-Toleranz (Krammer, 2000).

1.2.4. Therapie

Die Therapie von Myasthenia gravis richtet sich nach der Stärke der Erkrankung. Allerdings können bisher nur die Symptome behandelt werden. Eine spezifisch gegen die Ursache gerichtete Therapie ist zur Zeit nicht möglich (Pascuzzi, 2001). In Abbildung 1.7 ist ein Therapieschema gezeigt, wie Myasthenia gravis aktuell behandelt werden kann.

In einer 1937 veröffentlichten Studie von Kennedy und Moersch wurde der Krankheitsverlauf von 87 unbehandelten Patienten untersucht. Remission wurde in 31 % der Patienten beobachtet, wobei die Remission bis zu 15 Jahre anhielt (Mittel: 2,2 Jahre). Bei 46 Patienten wurde eine Verbesserung festgestellt, während 28 an Myasthenia gravis verstarben. Kennedy und Moersch schlossen daher, dass die Tendenz zur Besserung bei Myasthenia gravis die Bewertung einer Therapie erschwert. Es könne

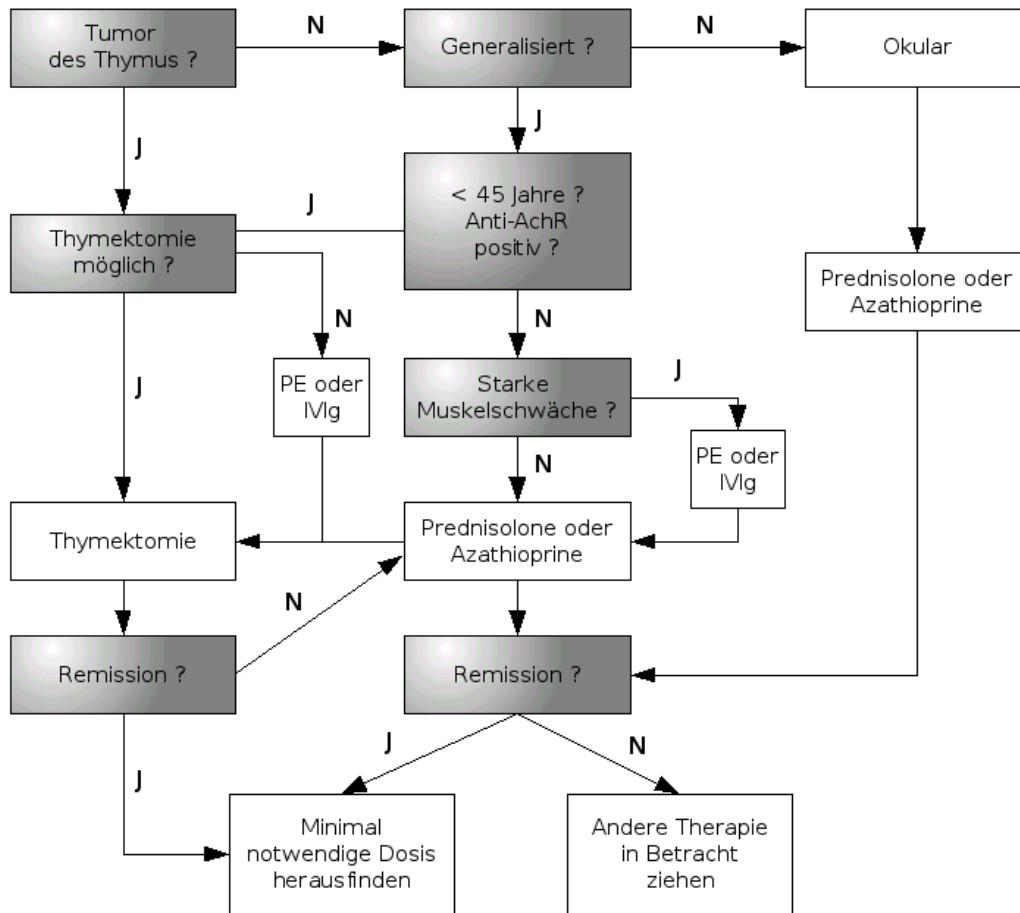


Abb. 1.7.: Therapieschema bei Myasthenia gravis, vorgestellt von Prof. Dr. Newsom-Davis auf dem ESI-Kongress in Paris 2001.

nie gesagt werden, ob die Besserung von der Therapie, oder der spontanen Remission verursacht wird (Kennedy und Moersch, 1937).

Thymektomie

Wird Myasthenia gravis bei Patienten diagnostiziert, so stellt man bei 80 % eine Vergrößerung des Thymus fest. Jeder zehnte Patient leidet an einem meist gutartigem Tumor des Thymus. Wird dieser entfernt, führt es bei einem großen Teil der Patienten zu einer Verbesserung der Symptome. Dies wurde von Perlo bei der Betrachtung von 267 Patienten, die einer Thymektomie unterzogen wurden belegt (Perlo *et al.*, 1971). Oftmals wird die Thymektomie auch bei, vor allem jüngeren, Patienten, ohne verändertes Thymusgewebe durchgeführt.

Acetylcholinesterasehemmer

Um die Lebensdauer des Neurotransmitters Acetylcholin im synaptischen Spalt zu erhöhen und so den Verlust an AChR im synaptischen Spalt zu kompensieren, werden Acetylcholinesterasehemmer

gegeben. Acetylcholinesterase ist ein Enzym, das im synaptischen Spalt den Abbau von Acetylcholin zu Acetat und Cholin katalysiert. Die Gabe von Acetylcholinesterasehemmern ermöglicht häufig bei schwacher bis moderater Myasthenie eine Behandlung ohne weitere Medikation. Patienten mit starken Symptomen benötigen eine Immuntherapie.

Allgemeine Immunsuppression

Aufgrund der autoreaktiven Eigenschaften des fehlregulierten Immunsystems ist die Gabe von unspezifischen Immunsuppressiva oftmals der einzige Weg, die Erkrankung zu kontrollieren. Anwendung finden hier Corticosteroide wie z.B. Prednison, aber auch nicht-steroidale Immunsuppressiva wie z.B. Azathioprine oder Cyclosporin A. Als Ersatz für das nierenschädigende Cyclosporin A sehen Evoli *et al.* Tacrolimus, ein Immunsuppressiva mit ähnlichem Wirkmechanismus, das allerdings um den Faktor 10-100 potenter ist (Evoli *et al.*, 2002). Häufig werden zusätzlich Acetylcholinesterasen gegeben, um die Dosen und Nebenwirkungen der Immunsuppressiva so gering wie möglich zu halten.

Plasmapherese und IVIg

Zur Behandlung einer myasthenen Krise oder zur Vorbereitung der Patienten auf die Thymektomie empfiehlt sich die Plasmapherese, bei der das Blutplasma der Patienten ausgetauscht oder gefiltert wird. Dabei werden die pathogenen Autoantikörper und andere humorale Bestandteile des Immunsystems entfernt. Da nur ca. 45% der Autoantikörper intravaskulär vorkommen, ist die Plasmapherese mehrmals durchzuführen. Da nicht nur die pathogenen Antikörper, sondern auch die Komponenten des Komplementsystems entfernt werden, stellt sich innerhalb kurzer Zeit eine deutliche Verbesserung der Symptome ein (Thorlacius *et al.*, 1988).

Ein weitere Möglichkeit ist die sehr teure Behandlung mit intravenösem Immunglobulin (IVIg). IVIg besteht aus gereinigten Antikörpern von bis zu 20.000 gesunden Spendern und besitzt wie die Plasmapherese die Eigenschaft, die Symptome der Patienten in kurzer Zeit zu verbessern. Der Wirkmechanismus beruht auf der Neutralisation von pathogenen Auto-Antikörpern durch idiotypische Antikörper, Verstärkung des Antikörper-Katabolismus durch Sättigung von FcRn Transportrezeptoren, Unterdrückung von pathogenen Cytokinen, Hemmung der Komplementbildung und der Ausbildung des membranangreifenden Komplexes, Blockade des Fc Rezeptors, sowie die Modulation der T-Lymphozyten Funktion (Dalakas, 1999).

„Rebooten“ des Immunsystems

Durch die Gabe von hohen Dosen an Cyclophosphamid können alle Zellen des Immunsystems ausgeschaltet werden, ohne die Stammzellen des Knochenmarks zu schädigen (Brodsky *et al.*, 1996). Verantwortlich dafür ist das Enzym Aldehyddehydrogenase, welches von den Stammzellen exprimiert wird und in der Lage ist Cyclophosphamid zu deaktivieren. Drachman *et al.* beschrieben die Behandlung von Patienten mit Myasthenia gravis mit Hilfe dieser Methode (Drachman *et al.*, 2003).

Sie konnten zeigen, dass das neu gebildete Immunsystem eine Toleranz gegenüber dem Autoantigen AChR entwickelt. Die Patienten, die nicht durch konventionelle immunsuppressive Therapien behandelt werden konnten, zeigten nach der Behandlung mit Cyclophosphamid keine myasthenen Symptome mehr.

1.2.5. Experimentelle autoimmune Myasthenia gravis (EAMG)

Ein etabliertes Tiermodell zur *in vivo* Untersuchung von Myasthenia gravis, ist die sog. Experimentelle autoimmune Myasthenia gravis (EAMG) (Lennon *et al.*, 1975). Patrick *et al.* beschrieben erstmals 1973 die Ausbildung einer Muskelschwäche in Hasen durch die Immunisierung mit aus *Electrophorus electricus* isoliertem, komplettem AChR. Die Symptome konnten wie bei humaner Myasthenia gravis durch die Gabe von Acetylcholinesterasehemmern verbessert werden.

Seybold *et al.* konnten das Modell auf Ratten übertragen und lieferten einen detaillierten Überblick über die klinischen und elektrophysiologischen Eigenschaften der Erkrankung (Seybold *et al.*, 1976). Sie verwendeten 10 Wochen alte Lewis-Ratten zur Immunisierung mit unterschiedlich hohen Dosen an AChR.

Seybold *et al.* beschrieben den Krankheitsverlauf der EAMG bei Ratten wie folgt: Es konnten zwei Episoden charakterisiert werden. Nach einer Gabe von hohen Dosen an AChR, beobachteten sie zwischen Tag 7 und 15 nach Immunisierung, eine akute Phase der Erkrankung. Eine Verbesserung der Symptome fand dann nach weiteren 2 bis 3 Tagen statt. In den folgenden Tagen verhielten sich die Ratten völlig normal, bis eine Episode mit starker Schwäche zwischen Tag 26 und 35 begann. In dieser Zeit kam es zu merklichem Gewichtsverlust und zu einer Schwäche der Kaumuskulatur, charakterisiert durch das starke Wachstum der Zähne. Der Gewichtsverlust konnte durch die Gabe von weichem Futter auf dem Käfigboden verzögert werden. Beim Fortschreiten der Erkrankung kam es langsam zum Tod der Tiere.

Der Ausbruch der Erkrankung ist bei kleinen Dosen oftmals nur durch elektrophysiologische Untersuchungen erkennbar (Kreilinger, 2001). Bei der Reizung des Ischiasnerv (*Nervus ischiadicus*) und der Messung der Ableitung an der Muskulatur des Unterschenkels, kam es bei einer repetitiven Nervenstimulation (RNS) zu einer deutlichen Signalabnahme. Bei der Durchführung der Messung zeigte sich bei Kreilinger, dass selbst Ratten mit einem hohen Dekrementwert optisch keine myasthenen Symptome zeigen müssen.

1.3. Antigen-spezifische Immunsuppression

Aufgrund der großen Anzahl von Nebenwirkungen von unspezifischen immunsuppressiven Therapien, wäre eine spezifische immunsuppressive Therapie für den Patienten wünschenswert. Da sowohl die

antigene Struktur des nikotinischen AChR, als auch die pathologischen Mechanismen bei Myasthenia gravis bekannt sind, gibt es eine Reihe viel versprechender Ansätze. Allerdings ist der Auslöser für Myasthenia gravis bisher unbekannt. Daher beschränken sich die Therapieansätze auf die Ausschaltung oder Unterdrückung autoreaktiver B- oder T-Lymphozyten, sowie auf Versuche zur Toleranzinduktion.

1.3.1. B-Zellen im Visier - Immuntoxine

Im Arbeitskreis von Prof. Dr. W. E. Trommer gelang die Synthese eines chemisch gekoppelten T-AChR-Gelonin-Konjugats, bei dem der komplette AChR aus *Torpedo californica* mit Gelonin gekoppelt wurde (Brust *et al.*, 1987). Urbatsch *et al.* konnten durch elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, dass eine Gabe des Konjugats die Zahl der funktionsfähigen AChR deutlich steigerte (Urbatsch *et al.*, 1993). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Einsatz des Konjugats zu einer antigenspezifischen Immunsuppression führte, da das Immunsystem normale Reaktion gegen Kontrollantigene zeigte. Allerdings kam es zu einem Anstieg des Antikörpertiters gegen den AChR. Vermutlich ausgelöst durch die Immunantwort gegen pathologisch irrelevante Teile des Rezeptors. Auch konnte das Konjugat nicht vollständig von ungekoppeltem T-AChR säulenchromatographisch getrennt werden, da sich die Molekularmassen aufgrund des Einsatzes des kompletten T-AChR kaum unterschieden (280 zu 250 kD) und eine quantitative Kopplung nicht gelang.

Die Verwendung von AChR-Ricin Konjugaten bei der antigenspezifischen Immunsuppression von EAMG *in vitro* wurde bereits beschrieben (Killen und Lindstrom, 1984; Olsberg *et al.*, 1985). In einem anderen Versuch konnten Sterz *et al.* die Ausbildung der EAMG, durch Gabe von radioaktiv markiertem Acetylcholinrezeptor verhindern (Sterz *et al.*, 1985).

1.3.2. T-Zellen im Visier

Der Einsatz von Immuntoxinen gegen B-Lymphozyten besitzt einen Nachteil. Sie sezernieren Antikörper, die gegen die Immuntoxine spezifisch binden. Bei einer ausgebrochenen Autoimmunerkrankung befinden sich diese Antikörper im Blut des Patienten und sind so in der Lage Immuntoxine abzufangen. Ein weiterer Ansatzpunkt zur antigenspezifischen Therapie von Autoimmunerkrankungen wäre das Ausschalten von T-Lymphozyten.

Immunsierung mit dem TCR

Für T-Lymphozyten vermittelte Autoimmunerkrankungen zeigten Cohen *et al.* eine Möglichkeit Unempfindlichkeit gegen ein Antigen auszulösen, wenn die Tiere mit dem spezifischen TCR immunisiert wurden (Cohen *et al.*, 1983). Die Übertragbarkeit auf eine humoral-vermittelte Erkrankung wie Myasthenia gravis wurde untersucht, führte allerdings zu keinem Erfolg (Kahn *et al.*, 1990).

Suppressive Makrophagen

McIntosh und Drachman beschrieben die Auslösung von Apoptose in aktivierten Blasten von T-Lymphozyten durch suppressive Makrophagen *in vitro* (McIntosh und Drachman, 1999). Dabei wurden große suppressive Makrophagen (LSM, *engl.*: large suppressive macrophages) aus Milzzellen von EAMG-Ratten mit dem Autoantigen AChR und Cyclosporin A *in vitro* restimuliert. Diese LSM bewirkten die Apoptose von spezifisch gegen den AChR gerichteten T-Lymphozyten.

Antiidiotypische Antikörper

Ein weiterer antigenspezifischer Weg der Therapie wäre das Design von antiidiotypischen Antikörpern gegen die pathogenen Anti-AChR-Antikörper und/oder die TCR der pathogenen T-Lymphozyten. Araga *et al.* beschrieben die computerunterstützte Synthese von Peptiden, komplementär zu den krankheitsauslösenden Epitopen bei EAMG. Werden diese Peptide appliziert, bilden die Tiere Antikörper gegen diese Peptide, welche Kreuzreaktionen mit anti-AChR-Antikörpern und/oder T- und B-Zell Rezeptoren eingehen könnten (Araga *et al.*, 2000). Sie konnten zeigen, dass die gebildeten Antikörper die Proliferation von AChR-spezifischen Lymphozyten inhibieren, den AChR-Antikörpertiter senkten, AChR-Abbau verhinderten und die Schwere der EAMG lindern konnten.

1.3.3. Verwendung von APC

Die autoimmunen T-Lymphozytenklone bei Myasthenia gravis sind gegen eine große Anzahl von Epitopen auf dem AChR gerichtet (Fujii und Lindstrom, 1988; Brocke *et al.*, 1988; Melms *et al.*, 1989; Melms *et al.*, 1992). Aufgrund dieser Heterogenität der Erkrankung ist eine Therapie gegen einzelne Klone nicht in Betracht zu ziehen. Da T-Lymphozyten Peptide nur nach Präsentation mit MHC-Proteinen erkennen, kommt aufgrund deren Unterschiede von Patient zu Patient eine weitere Stufe der Heterogenität dazu. Das Immunsystem bietet allerdings eine Möglichkeit, alle T-Lymphozytenklone spezifisch zu erreichen. Das ist die Aufgabe der APC. B-Lymphozyten prozessieren und präsentieren nur Antigene, die sie an ihren spezifischen IgM Oberflächenrezeptoren gebunden haben. Gibt man zu B-Lymphozyten AChR, sowie einen bifunktionellen Antikörper gegen IgM und den AChR, so prozessieren diese Zellen den AChR und sind in der Lage antigenspezifisch T-Lymphozyten zu erkennen (Reim *et al.*, 1992). Nach der Fixierung waren diesen Zellen in der Lage, antigenspezifisch Anergy in T-Lymphozyten zu induzieren.

1.3.4. Orale Toleranz

Die Ausbildung von Toleranz gegenüber oral aufgenommenen Proteinen ist schon lange bekannt (Mowat, 1987). Die Ausnutzung oraler und nasaler Wege bei der Verhinderung und Behandlung von Autoimmunerkrankungen ist eine neuere Entwicklung (Weiner und Mayer, 1996). Die meis-

ten Studien zur oralen Toleranz in Autoimmunerkrankungen beschäftigten sich mit Zell-vermittelten Erkrankungen wie Uveitis, Arthritis und Multiple Sklerose (Nussenblatt *et al.*, 1990; Nagler-Anderson *et al.*, 1986; Bitar und Whitacre, 1988). Bei Antikörper-vermittelten Erkrankungen wie Myasthenia gravis zeigten Okumura *et al.*, dass die orale Gabe von T-AChR vor der Immunisierung der Ratten die Ausbildung klinischer Zeichen der EAMG verhinderte und die Autoantikörperproduktion und Zellproliferation inhibierte (Okumura *et al.*, 1994). Bei laufender EAMG konnte im besten Fall ein fehlender Einfluss auf die Erkrankung beobachtet werden. Klinische Studien bei Multiple Sklerose und rheumatischer Arthritis verliefen enttäuschend (Weiner *et al.*, 1993; Trentham, 1998). Die spezifische Therapie von Autoimmunerkrankungen wie Myasthenia gravis durch Induktion von oraler Toleranz erscheint nicht viel versprechend.

1.4. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor

Beim nikotinische Acetylcholinrezeptor (AChR) handelt es sich um einen Ionenkanal, der nach seinem Agonisten Nikotin benannt ist. Er befindet sich in der Membran der Neuronen und Muskelzellen und ist an der Übertragung der Nervenimpulse beteiligt. Der Mechanismus der Ionenkanalöffnung wurde von Miyazawa *et al.* aufgeklärt (Miyazawa *et al.*, 2003).

1.4.1. Struktur

Der nikotinische AChR gehört zur Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle, zu denen auch die GABA_A und Glycinrezeptoren gehören. Sie besitzen eine gemeinsame Organisation von hydrophilen und hydrophoben Domänen. Der AChR besitzt eine heteropentamere Struktur, bestehend aus vier homologen Untereinheiten. Bisher wurden 16 Typen von Untereinheiten unterschiedlicher Spezies identifiziert. Diese beinhalten α 1-9, β 1-4, sowie die γ , δ und ϵ -Untereinheit. Bei muskulären AChR findet man die Stöchiometrie $(\alpha 1)_2(\beta 1)\epsilon\delta$. In der fetalen Form wird dabei ϵ durch γ ersetzt. Die Organisation der Untereinheiten um den zentralen Ionenkanal entspricht symmetrisch angeordneten Zylindern in der Reihenfolge $\alpha\epsilon\alpha\delta\beta$ (Kreienkamp *et al.*, 1995). Im Zytoplasma bindet der AChR an Rapsyn, ein Protein das die AChR mit dem Zytoskelett verbindet und zur dichten Packung der AChR beiträgt (Sanes und Lichtman, 1999).

In einer Kristallstruktur des T-AChR mit einer Auflösung von 4,6 Å wurde dessen Durchmesser zu 80 Å und die Länge auf 120 Å bestimmt (Miyazawa *et al.*, 1999). Davon entfallen 65 Å auf den extrazellulären Bereich, 40 Å auf den Transmembranbereich und 15 Å auf den intrazellulären Bereich.

Die Untereinheiten bestehen aus einem N-terminalen extrazellulären Bereich der ca. 220 Aminosäuren umfasst, gefolgt von 4 Transmembrandomänen und einem kleinen C-terminalen extrazellulären Bereich. Von entscheidender Bedeutung für den AChR ist der N-terminale extrazelluläre Bereich der

Spezies	MIR (H- α -AChR ₆₇₋₇₆)	cys-loop (H- α -AChR ₁₈₅₋₁₉₅)
Mensch	<u>WNPDDYGGVK</u>	<u>KHSVTYSCCPD</u>
Maus (<i>Mus musculus</i>)	<u>WNPDDYGGVK</u>	<u>KHWVYFYSCCPT</u>
Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)	<u>WNPDDYGGVK</u>	<u>KHWVYFYSCCPN</u>
Motte (<i>Heliothis virescens</i>)	<u>WEPREYGGVE</u>	<u>RNEKFYTCCTD</u>
Wanderheuschrecke (<i>Locusta migratoria</i>)	<u>WNPDDYGGVD</u>	<u>RNEKFYTCCTD</u>
Kugelfisch (<i>Takifugu rubripes</i>)	<u>WNPDDYGGIR</u>	<u>KHWVYTYTCPPD</u>
Zitterrochen (<i>Torpedo californica</i>)	<u>WNPADYGGIK</u>	<u>KHWVYTYTCPPD</u>
AChBP	<u>WNSSH--SPD</u>	<u>KNSVTYSCCPE</u>

Tab. 1.1.: Aminosäuresequenz der MIR und des cys-loop bei verschiedenen Spezies. Zum Vergleich ist die jeweils homologe Sequenz beim AChBP aufgeführt (AChBP₆₆₋₇₄ bzw. AChBP₁₈₂₋₁₉₂). Zur humanen Sequenz identische Aminosäuren sind unterstrichen dargestellt.

α -Untereinheit.

1.4.2. Der extrazelluläre Teil der α -Untereinheit

Die Bindungsstelle für den Agonisten Acetylcholin befindet sich auf dem extrazellulären Bereich der α -Untereinheit bei den Aminosäuren 149 und 190-198 (Dennis *et al.*, 1988). Allerdings tragen auch Aminosäuren im extrazellulären Bereich der γ bzw. ϵ zur Ligandenbindung bei. Die kleine extrazelluläre C-terminale Domäne der α -Untereinheit spielt dabei eine zu vernachlässigende Rolle (Eisele *et al.*, 1993). Zur Öffnung des Ionenkanals müssen beide ACh-Bindungsstellen besetzt sein. Die Bindung eines Antagonisten verhindert die Öffnung des Ionenkanals.

Der Mensch besitzt neben der $\alpha 1$ -UE zusätzlich eine um 25 Aminosäuren verlängerte Isoform $\alpha 1^+$ (Beeson *et al.*, 1990). Die $\alpha 1^+$ -UE bindet analog zur $\alpha 1$ -UE α -Bungarotoxin und monoklonale Antikörper gegen die hauptimmunogene Region (MIR, *engl.*: main immunogenic region). Die Ausbildung von funktionsfähigen Rezeptoren wurde nicht beobachtet (Newland *et al.*, 1995). Die Funktion der Isoform ist bis heute unklar.

Der extrazelluläre Teil der α -Untereinheit ist nicht nur aufgrund der Bindungsstelle für die Agonisten und Antagonisten interessant, sondern auch im Hinblick auf Myasthenia gravis. Der größte Teil der Autoantikörper (mehr als 60%) bindet an die MIR, die sich bei den Aminosäuren 67-76 auf dem extrazellulären Teil der α -Untereinheit befindet (Tzartos *et al.*, 1988). Allerdings wird nicht ausgeschlossen, dass auch andere Aminosäuren an der Bindung der Antikörper beteiligt sind, indem sie u.a. zur Faltung der MIR beitragen. Durch die Lokalisierung der MIR konnte die Kreuzreaktion der Autoantikörper bei AChR unterschiedlicher Spezies erklärt werden. Diese Sequenz ist hoch konserviert (Tab. 1.1).

2001 gelangen Brejc *et al.* die Lösung einer hochaufgelösten Kristallstruktur eines Acetylcholinbindenden Proteins (AChBP) aus *Lymnaea stagnalis*. In Hefe rekombinant exprimiert, bildete es Ho-

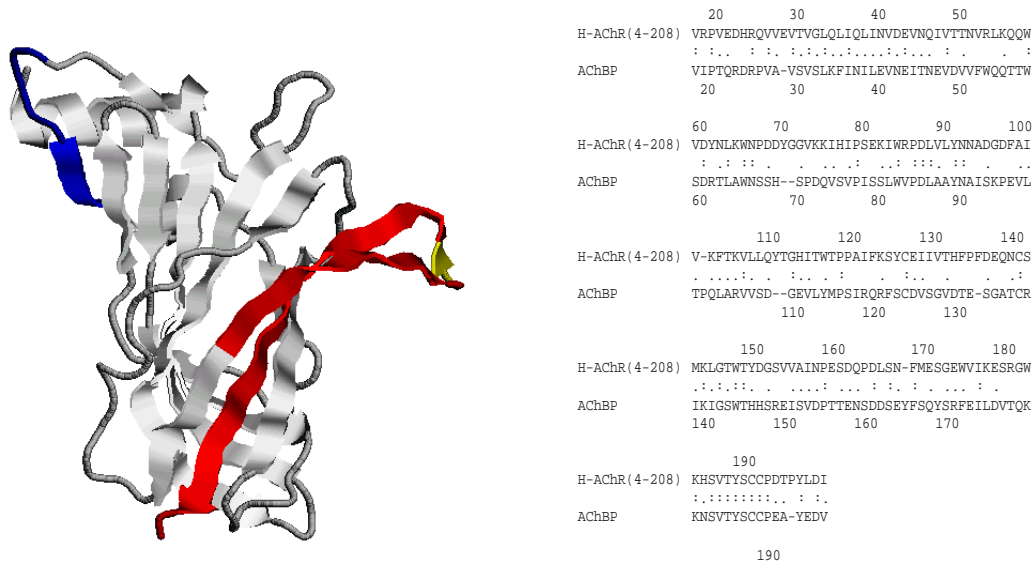


Abb. 1.8.: Struktur und Aminosäuresequenz des AChBP - (a) Struktur eines AChBP-Monomers, hervorgehoben ist der cys-loop bei den Aminosäuren 189/190 (gelb) und die zur MIR auf dem AChR homologe Region (blau). (b) Sequenzvergleich AChBP und H- α -AChR₄₋₂₀₈. Gleiche Aminosäuren sind mit einem Doppelpunkt (:) gekennzeichnet, homologe mit einem Punkt (.).

mopentamere, und in Ligandenbindungsassays zeigte es Eigenschaften von nikotinischen und muskarinischen AChR (Brejc *et al.*, 2001; Smit *et al.*, 2001). Das Protein wird bei der Aktivierung von Rezeptoren auf Gliazellen durch ACh ausgeschüttet und moduliert im synaptischen Spalt die ACh-Konzentration. Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenz mit dem extrazellulären Bereich der α -UE des humanen nikotinischen AChR zeigte sich eine hohe Homologie der strukturbildenden Aminosäuren, wie z.B. dem cys-loop bei den Aminosäuren 189/190 im AChBP (siehe auch Abb. 1.8).

Auf Grundlage der Struktur des AChBP konnte die Bedeutung der aromatischen Tasche, die durch Trp-Reste gebildet wird, bei der Ligandenerkennung gezeigt werden (Hansen *et al.*, 2002). Auch zeigten die Bindungskinetiken der Liganden eine Übereinstimmung mit denen für viele Subtypen des nikotinischen AChR. Somit kann das AChBP als Modellprotein für den extrazellulären Teil der α -Untereinheit des nikotinischen AChR (α -AChR_{ex}) angesehen werden, für den bisher, aufgrund zu geringer Mengen an rekombinantem Protein, noch keine Kristallisation gelang.

Die Expression von α -AChR_{ex} gelang bisher in *E.coli* verschiedenen Gruppen unter Verwendung von T- α -AChR_{ex,1-209} (Schrattenholz *et al.*, 1998; Alexeev *et al.*, 1999) und H- α -AChR_{ex,1-207} (Tsouloufis *et al.*, 2000). Alle Gruppen konnten das Protein nur in unlöslichen *inclusion bodies* exprimieren. Daher musste es denaturierend aufgearbeitet und rückgefaltet werden. Dies ist mit hohem Aufwand und Proteinverlust verbunden. Die renaturierten Proteine zeigten eine geringe Löslichkeit und waren nicht für Kristallisationsexperimente geeignet. Die unabhängige Faltung der N-terminalen extrazellulären und der membrangebundenen Domäne der α -Untereinheit wurde mit Hilfe von Chimärenrezeptoren gezeigt (Eisele *et al.*, 1993).

1.5. Ribosomen-inaktivierende Proteine

Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIP) gehören zur Klasse der Polynukleotid-Adenosin Glykosidasen (PNAG) (EC 3.2.2.22). Sie sind in der Lage eukaryontische Ribosomen durch Deaktivierung der 60S Untereinheit zu hemmen und so die Bindung des Elongationsfaktors zu verhindern. Die Wirkung ist irreversibel, da die Enzyme eine Purinbase abspalten. Die Substratspezifität ist allerdings viel größer als angenommen. So depurinieren alle Enzyme DNA, manche von ihnen auch andere Polynukleotide, wie nicht-ribosomale RNA und poly(A) (Barbieri *et al.*, 1997). Bis heute ist die natürliche Rolle der RIP in der Pflanze unbekannt. Aufgrund der großen Substratspezifität wird angenommen, dass RIP verschiedene Aufgaben ausfüllen. Diskutiert werden antivirale und antifungale Aufgaben (Leads *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1992), eine Rolle bei der Abwehr von Fraßfeinden, sowie beim programmierten Stoppen des Metabolismus bei Alterungsprozessen (Barbieri *et al.*, 1993).

Man unterscheidet zwei verschiedene Typen von RIP. RIP des Typ I sind Einzelkettenproteine, die nur aus einer aktiven Polypeptidkette (A-Kette) bestehen und nicht ohne fremde Hilfe in intakte Zellen gelangen können. Diese sind sehr stabil über einen großen Bereich von physiko-chemischen Bedingungen. Die RIP des Typs II besitzen zusätzlich zur aktiven A-Kette eine zweite Polypeptidkette, die durch eine Disulfidbrücke mit der A-Kette verbunden ist. Diese B-(bindende) Kette ermöglicht den Transport des RIP in eine intakte Zelle. Aufgrund dieser Eigenschaft sind RIP vom Typ II um viele Zehnerpotenzen potentere Toxine gegenüber intakten Zellen.

1.5.1. Einsatz in der Medizin

Beim Eindringen von RIP in Zellen, sterben diese aufgrund der Hemmung der Proteinbiosynthese. Da die selektive Ausschaltung von pathogenen Zellen von großem Interesse in der Therapie von Autoimmunerkrankungen und Krebs ist, wird der Einsatz von RIP intensiv untersucht. Nach der Kopplung mit einem Antigen (bei Autoimmunerkrankungen), Antikörper (bei Krebs) oder einem anderen Carrier, könnten diese Proteinkonjugate zur selektiven Therapie eingesetzt werden (Brust *et al.*, 1987; Urbatsch *et al.*, 1993; Lambert *et al.*, 1988; Rybak *et al.*, 1994; Vitetta und Uhr, 1985). Der mögliche Einsatz gegen Malaria (Surolia und Misquith, 1996; Nicolas *et al.*, 1997) und AIDS (Zarling *et al.*, 1990) wurde ebenfalls berichtet. Beim Einsatz in Immunkonjugaten erwies sich Gelonin effektiver als die A-Kette von Ricin (Fishwild *et al.*, 1994).

1.5.2. Wirkmechanismus

RIP spalten katalytisch eine N-glykosidische Bindung eines spezifischen Adenin-Restes in der 28S ribosomalen RNA der 60S Untereinheit von eukaryontischen Ribosomen. Bei der Inkubation mit

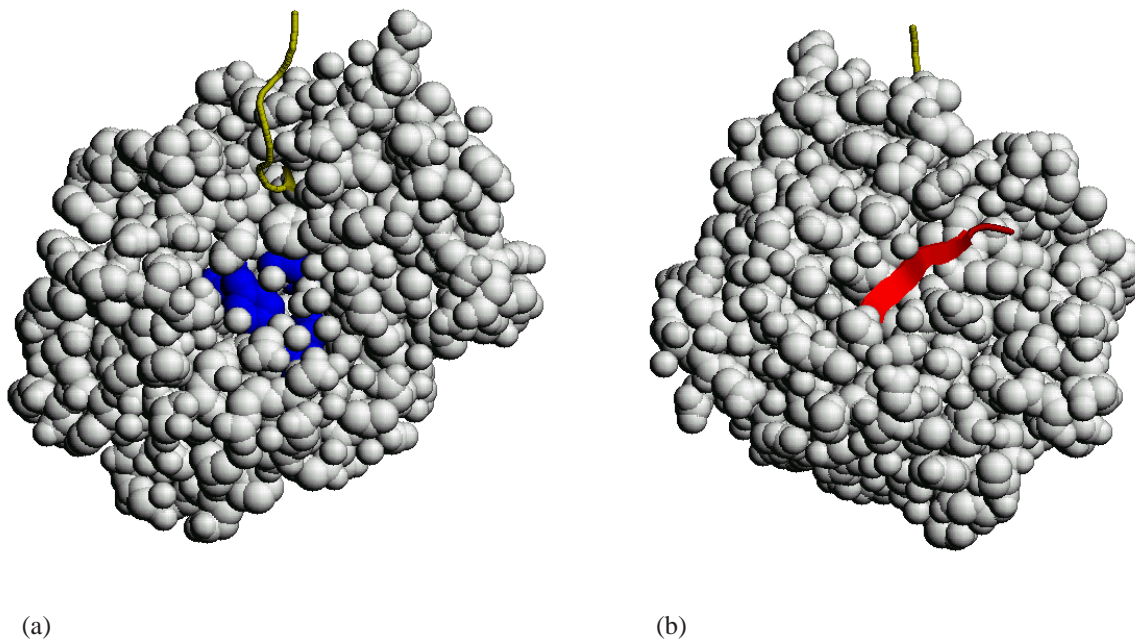


Abb. 1.9.: Struktur von rekombinantem Ricin (A-Kette). Eingezeichnet sind der N-Terminus (rot), der C-Terminus (gelb) und die katalytisch aktiven Aminosäuren Tyr80, Glu177, Arg180 und Tyr123 (blau). Die Abb. (a) und (b) sind um 180° gedreht.

isolierter rRNA, zeigen RIP die gleiche Reaktivität, allerdings ist ihre Aktivität merklich reduziert. Es konnte gezeigt werden, dass das Substrat eine Haarnadelschleife ist, welches die Sequenz GAGA enthält. Dabei wird das erste Adenin durch eine Hydrolysereaktion abgespalten (Endo *et al.*, 1987). Die Erklärung für die Spezifität kann durch spezifische Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Adenin und dem RIP erklärt werden. Auf Basis von Röntgenstrukturen wurden zwei mögliche Mechanismen für die Hydrolysereaktion vorgeschlagen (Ren *et al.*, 1994; Monzingo und Robertus, 1992).

1.5.3. Gelonin

Gelonin ist ein Glykoprotein, das in den Samen von *Gelonium multiflorum* gefunden und erstmals von Stirpe isoliert wurde (Stirpe *et al.*, 1980). Es handelt sich um ein RIP des Typ I und ist somit untoxisch bei intakten Zellen.

Hosur *et al.* gelangen die Lösung einer Röntgenstruktur von Gelonin mit einer Auflösung von $1,8 \text{ \AA}$ (Abb. 1.9) (Hosur *et al.*, 1995). Sie konnten zeigen, dass Gelonin eine ähnliche Faltung wie die A-Kette von Ricin besitzt. Die Aminosäuren Tyr74, Gly111, Tyr113, Glu166, Arg169 und Trp198 formen das aktive Zentrum, wie es auch bei anderen RIP gefunden wird (Kim und Robertus, 1992; Ren *et al.*, 1994). In der Röntgenstruktur konnten drei Wassermoleküle in der Höhle des aktiven Zentrums aufgelöst werden. Jedes dieser Moleküle könnte das Substratmolekül sein, das an der Hydrolysereaktion beteiligt ist, welche Gelonin katalysiert. Gelonin besitzt in seiner Aminosäuresequenz zwei

mögliche Stellen für eine N-Glykosylierung. Der Ort wurde von Hosur *et al.* aufgrund eines Unterschiedes in der Elektronendichte bei Asn189 bestimmt. Die zweite mögliche Bindungsstelle ist unbesetzt. Die Zuckerzusammensetzung konnte bisher nicht genau bestimmt werden. Weiterhin besitzt Gelonin eine Disulfidbrücke bei Cys44 und Cys50.

In vivo Versuche zeigten, dass Gelonin nach i.v. Gabe sehr schnell in der Leber endozytiert wird (Colaco *et al.*, 2002). Gelonin konnte dabei in der zytosolischen Fraktion der Leberzellen nachgewiesen werden. Der Übergang von Endosomen und Lysosomen ins Zytosol wurde von Selbo *et al.* gezeigt (Selbo *et al.*, 2000).

2. Problemstellung

Wie bereits beschrieben, ist bisher keine kausale Therapie der Autoimmunerkrankung Myasthenia gravis bekannt. Durch die etablierten Behandlungsmethoden werden bisher nur die Symptome der Erkrankung bekämpft. Von großem Vorteil für die Patienten wären spezifische immunsuppressive Therapien, die nur Immunzellen im Körper ausschalten, welche für die Immunantwort gegen den körpereigenen AChR verantwortlich sind. Ein möglicher Ansatz sind Konjugate aus dem Autoantigen AChR und einem Zellgift. Während der AChR von den autoreaktiven Immunzellen erkannt wird und für die Aufnahme des Konjugats in die Immunzelle sorgt, entwickelt das Toxin in der Zelle seine toxischen Eigenschaften und tötet sie.

Der Einsatz von chemisch gekoppelten Konjugaten aus dem kompletten AChR und dem Pflanzentoxin Gelonin führte im Rattenmodell der Myasthenia gravis zu einer deutlichen Erhöhung der AChR-Zahl im synaptischen Spalt (Brust *et al.*, 1987; Urbatsch *et al.*, 1993). Bei der Therapie kam es allerdings zum Anstieg des Antikörpertiters gegen den AChR, was durch Kreuzreaktionen mit pathologisch irrelevanten Teilen erklärt werden konnte. Bei der Synthese der Konjugate wurde der komplette AChR aus *Torpedo californica* eingesetzt. Da dessen Abtrennung vom Konjugat aufgrund des geringen Molekularmassenunterschieds nicht vollständig möglich war, wurden Versuche unternommen, nur α -AChR_{ex}-Fragmente bei der Synthese der Konjugate einzusetzen.

Die Isolierung von nativen α -AChR_{ex}-Fragmenten schlug im Arbeitskreis fehl (Rousselle, 1996; Kreilinger, 2001; Hossann, 2001). Ursache dürfte das Fehlen von strukturbildenden Aminosäuren gewesen sein. Die Synthese eines Konjugats aus chemisch gekoppelten T- α -AChR₁₋₂₀₉-Fragmentes (Schrattenholz *et al.*, 1998), das uns freundlicherweise von Prof. Maelicke zur Verfügung gestellt wurde und Gelonin aus *Gelonium multiflorum* gelang schließlich (Kreilinger, 2001; Hossann, 2001). Aufgrund der geringen uns zur Verfügung stehenden Menge und der Instabilität des T- α -AChR₁₋₂₀₉-Fragmentes waren allerdings keine weiterführenden Versuche möglich.

Im Arbeitskreis gelang Li die Synthese eines Expressionsplasmids für ein Fusionsprotein aus einem Gelonin- und H- α -AChR_{ex}-Fragment (His₆^(T)-Gelonin₁₋₂₄₆-H- α -AChR₄₋₁₈₁) (Li, 2002). Li isolierte das Protein mit Hilfe von Größenausschluss- und Ionenaustauscherchromatographie, obwohl im Fusionsprotein ein N-terminaler HisTag vorlag. Ein Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung des Fusionsproteins mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie und der Einsatz in der antigenspezifischen Immunsuppression im Rattenmodell der Myasthenia gravis.

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob auch das von Li isolierte rekombinante

Gelonin über einen HisTag verfügte. Beim Vorliegen sollte das Protein exprimiert und die Nickel-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung des Proteins verwendet werden. Anschließend sollte der HisTag abgespalten und dessen Einfluss auf die Toxizität bestimmt werden.

Um die Expression von nativen α -AChR_{ex}-Fragmenten zu ermöglichen, sollte die DNA-Information für α -AChR₄₋₁₈₁ auf dem Plasmid p α HE706 durch molekularbiologische Arbeiten verlängert werden. Dazu sollte mit synthetischen Oligonukleotiden die Information für α -AChR₁₈₂₋₂₀₈ in den Vektor inkloniert werden.

In einem abschließenden Teil der Arbeit, sollte eine mögliche antigenspezifische immunsuppressive Wirkung des Fusionsproteins *in vivo* untersucht werden. Dazu war in Ratten, mit Hilfe des T-AChR, das Tiermodell der Myasthenia gravis zu induzieren. Mit Hilfe von im Arbeitskreis zu etablierenden elektrophysiologischen Untersuchungen, der sog. repetitiven Nervenstimulation (RNS) des Ischiasnerv (*Nervus ischiadicus*), sollte das Vorliegen der Erkrankung nachgewiesen und durch Gabe des Fusionsproteins therapiert werden.

3. Chemische Deglykosylierung von natürlichem Gelonin

3.1. Aufgabenstellung

Die Aminosäuresequenz des aus *Gelonium multiflorum* isoliertem Gelonin wurde erstmals 1993 von Nolan *et al.* bestimmt (Nolan *et al.*, 1993). Es gelang die Klonierung und Expression von rekombinantem Gelonin in *E.coli* als Fusionsprotein mit einer Leadersequenz, welche die Sekretion des Proteins durch die zytoplasmatische Membran der *E.coli* erlaubte. Die Aminosäuresequenz wurde dabei durch PCR Amplifikation von cDNA mit Oligonukleotiden bestimmt und umfasste 251 Aminosäuren. Rosenblum *et al.* fanden 1995 eine um 7 Aminosäuren längere Sequenz (Rosenblum *et al.*, 1995). Hier gelang die Aufklärung der Aminosäuresequenz durch Proteinsequenzierung. Die Sequenzunterschiede sind in Abb. A.1 dargestellt. Bis heute konnte nicht gezeigt werden, welche der beiden Sequenzen dem natürlichen Gelonin entspricht. Ein Hinweis auf die von Nolan bestimmte Aminosäuresequenz lieferte die Lösung der Röntgenstruktur (Hosur *et al.*, 1995).

Natürliches Gelonin besitzt eine posttranslationale Modifizierung durch Zuckerreste (Glykosylierung) (Stirpe *et al.*, 1980). Dabei existieren unterschiedlich stark glykosylierte Spezies (Hossann, 2001). Durch vollständige Deglykosylierung des natürlichen Gelonins mit Hilfe chemischer Methoden und anschließender massenspektrometrischer Analyse, sollte in Kooperation mit Prof. Dr. Niedner-Schatteburg (Physikalische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern) untersucht werden, welche Aminosäuresequenz im natürlichen Gelonin vorliegt.

3.2. Chemische Deglykosylierung mit TFMS

Zur Deglykosylierung wurden unter Stickstoffatmosphäre lyophilisiertes Gelonin mit 150 µl Trifluormethansulfonsäure (TFMS) pro mg Protein umgesetzt und bei 0 °C für 2 Stunden inkubiert. Eine Inkubation über 4 h führte dabei zur Zersetzung des Gelonins, was durch niedermolekulare Fragmente auf einem SDS-Gel sichtbar wurde (nicht gezeigt). Die Neutralisation der Säure erfolgte mit 60 %iger Pyridinlösung bei -20 °C. Das mit dieser Methode deglykosylierte Gelonin wurde anschließend gegen Wasser dialysiert. Bei der Neutralisation kam es zur Aggregation der Proteine. Daher konnte das deglykosylierte Gelonin nur mit Hilfe der SDS-PAGE untersucht werden. In Abb. 3.1(a) ist der Erfolg der Deglykosylierung gezeigt. Es war ein deutlicher Massenverlust auf dem SDS-Gel zu erkennen.

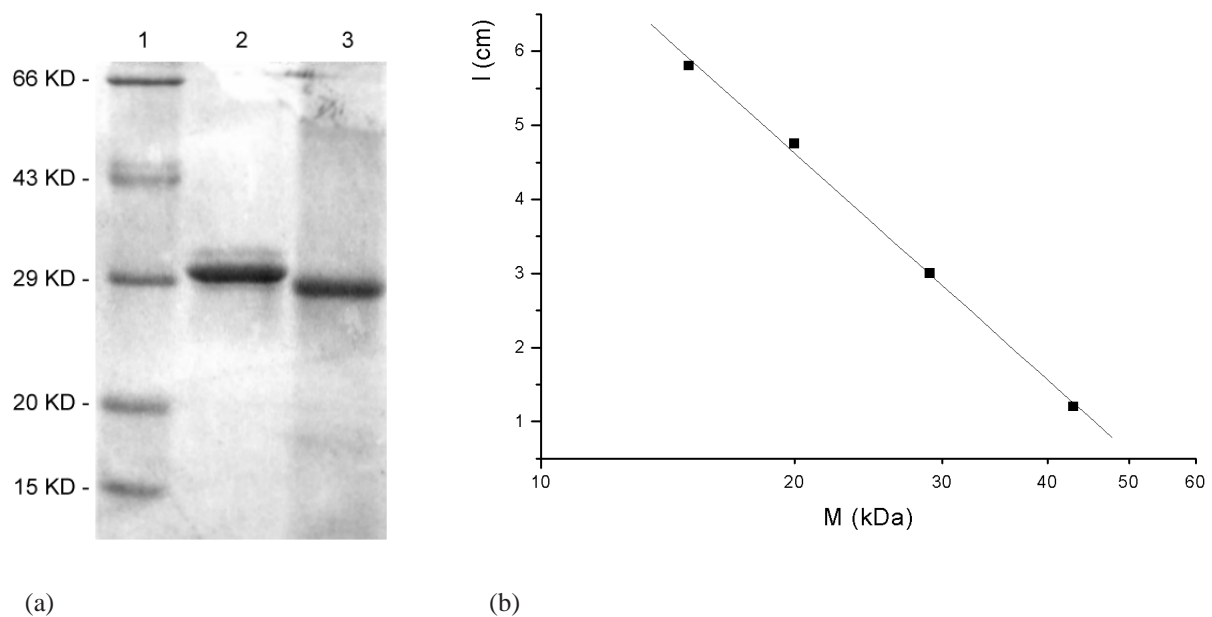


Abb. 3.1.: (a) SDS-PAGE (12%iges Trenngel) zur Kontrolle der Deglykosylierung von natürlichem Gelonin mit TFMS; Bahn 1: Proteinmarker, Bahn 2: unbehandeltes Gelonin, Bahn 3: mit TFMS deglykosyliertes Gelonin. (b) Regressionsgerade der Markerproteine zur Bestimmung der Molekularmasse von Gelonin. Aufgetragen wurde die Laufstrecke gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes.

3.3. Berechnung des Massenunterschieds

Zur Bestimmung der Molekularmasse von Proteinen auf SDS-Gelen, lässt sich die Laufstrecke von bekannten Proteinen gegen den Logarithmus ihrer Molekularmassen auftragen. Man erhält eine Eichgerade, die zur Berechnung der Molekularmassen unbekannter Proteine verwendet werden kann. Wurden die Molekularmassen aus dem in Abb. 3.1(a) dargestellten SDS-Gel berechnet, so ergab sich für natürliches Gelonin eine Molekularmasse von 29,5 kDa, während für mit TFMS umgesetztes Gelonin eine Molekularmasse von 28,2 kDa gefunden wurde.

3.4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die chemische Deglykosylierung von natürlichem Gelonin mit Hilfe von TFMS, sowie die Berechnung eines möglichen Glykosylierungsmusters, welches das Vorliegen der von Nolan *et al.* bestimmten Aminosäuresequenz (Nolan *et al.*, 1993) bestätigen würde. Bei der Umsetzung von natürlichem Gelonin mit TFMS zeigte sich bei einer Inkubationszeit unter vier Stunden eine diskrete Proteinbande auf einem SDS-Gel. Die Molekularmasse wurde zu 28,2 kDa bestimmt. Nicht umgesetztes Gelonin zeigte eine Molekularmasse von 29,5 kDa. Wurde die Probe länger als vier Stunden mit TFMS inkubiert, so wurden auch niedermolekulare Banden gefunden. Die

Intensität dieser Bande nahm dabei proportional mit der Inkubationszeit zu, bis die 28,2 kDa große Bande nicht mehr zu sehen war. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass bis zu einer Inkubationszeit von vier Stunden eine Deglykosylierung stattfand, während sich bei längerer Inkubationszeit das Protein zersetzte. Der aus dem SDS-Gel berechnete Massenverlust betrug 4,4 %, was dem von Falasca *et al.* bestimmten Zuckergehalt entsprach (Falasca *et al.*, 1982).

Zuckergehalt und Aminosäuresequenz im natürlichen Gelonin

Die N-Glykosylierung erfolgt bei Proteinen am Asn-Rest des Tripeptides Asn-X-Ser/Thr, wobei X jede Aminosäure, außer Pro und Asp, sein kann (Kornfeld und Kornfeld, 1985). In der Sequenz von Gelonin wurden zwei mögliche N-Glykosylierungsstellen gefunden, von denen in der Röntgenstruktur nur der Asn189-Rest als glykosyliert erschien (Hosur *et al.*, 1995). Die Zuckerzusammensetzung der Glykosylierung wurde von Falasca *et al.* bestimmt (Falasca *et al.*, 1982). Sie fanden Xylose, Mannose und Glucosamin. Die Anzahl der Zucker wurde von ihnen zu 1,1 Xylose, 1,6 Glucosamin und 6,9 Mannose pro Geloninmolekül bestimmt. Der Gesamtzuckergehalt betrug 4,46 %.

Im ESI-FT Massenspektrum von natürlichem Gelonin wurden 6 Spezies, mit mittleren molekularen Massen von 29.137,8 bis 29.519,2 Da gefunden (Hossann, 2001). Wurden von diesen Massen die, in dieser Arbeit bestimmten, 4,4 % Zuckergehalt abgezogen, so berechneten sich die mittleren molekularen Massen von unglykosyliertem Gelonin zu 27.855,7 bis 28.221,9 Da. Wurden die berechneten mittleren molekularen Massen aus den Aminosäuresequenz von Nolan *et al.* bzw. Rosenblum *et al.* (Abb. A.1) zugrunde gelegt, schien die von Nolan *et al.* gefundene Sequenz der des natürlichen Gelonins zu entsprechen. Dass in der Röntgenstruktur an der Position 239 ein Lys-Rest gefunden wurde (Hosur *et al.*, 1995), sprach ebenfalls für das Vorliegen dieser Sequenz. Im Rahmen seiner Diplomarbeit unterzog Daubenfeld natürliches Gelonin einem tryptischen Verdau und analysierte die erhaltenen Peptide massenspektrometrisch (Daubenfeld, 2003). Es wurden von ihm keine Peptide gefunden, die auf die von Rosenblum *et al.* bestimmte Aminosäuresequenz schließen ließen.

Daher wurde vom Vorliegen der von Nolan *et al.* bestimmten Aminosäuresequenz im natürlichen Gelonin ausgegangen.

Vorschlag für das Glykosylierungsmuster von natürlichem Gelonin

Auf der Grundlage der von Falasca *et al.* bestimmten Zuckerzusammensetzung wurde ein mögliches Glykosylierungsmuster für Gelonin errechnet. Anstatt D-Glucosamin, wurde N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) bei der Berechnung zu Grunde gelegt, da in Oligosaccharidstrukturen von Glykoproteinen nur diese Form gefunden wird. Falasca *et al.* bestimmten den Zuckergehalt nach der Methode von Dunstan *et al.* (Dunstan *et al.*, 1974). Dabei wurde das Glykoprotein einer sauren Hydrolyse in methanolischer HCl-Lösung mit anschließender zweistündiger Inkubation bei 90 °C unterzogen. Eine Hydrolyse von N-Acetyl-D-Glucosaminen zu D-Glucosamin unter diesen Bedingungen war dabei sehr wahrscheinlich.

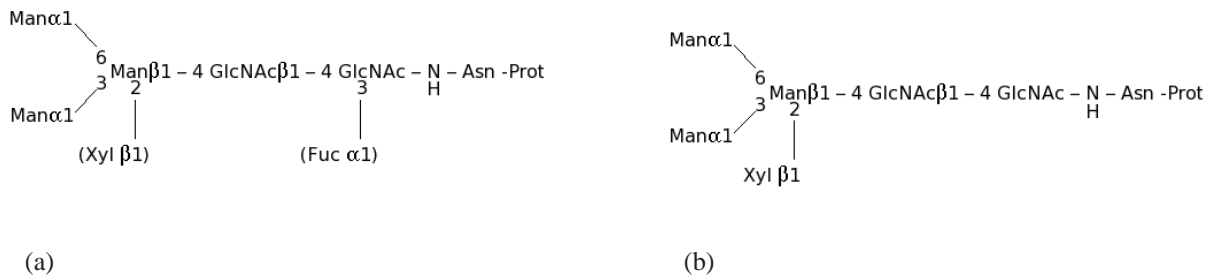


Abb. 3.2.: Mögliche Zuckerzusammensetzung der Spezies 1 und 4 - (a) Glykosylierungsmuster des paucimannosidischen Typs. (b) Vorgeschlagenes Glykosylierungsmuster der Spezies 1 und 4 von Gelonin. In Ricin D wurde neben der Glykosylierung $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{Xyl}_1\text{Fuc}_1$ zu 8% auch diese Struktur gefunden (Kimura et al., 1988).

Alle N-Glykosylierungen von Pflanzenproteinen haben eine minimale Struktur gemeinsam (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Diese besteht aus der Struktur $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ und wird als Kern-Struktur bezeichnet. Glykoproteine aus Pflanzen werden in vier verschiedene Typen eingeteilt (Lerouge et al., 1998). Es werden mannosereiche, komplexe, hybride und paucimannosidische Typen unterschieden. Der letzte Typ (Abb. 3.2(a)) wurde bisher in einer großen Zahl von Pflanzenproteinen gefunden, darunter auch Ricin D (Kimura et al., 1988). Er ist charakterisiert durch die Zusammensetzung $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{Xyl}_{0,1}\text{Fuc}_{0,1}$. Das Vorliegen von Xylose (Xyl) bzw. Fucose (Fuc) ist dabei optional und hat keine Auswirkung auf die Substratspezifität (Johnson und Chrispeels, 1987; Tezuka et al., 1992; Zeng et al., 1997).

Wurde die Kern-Struktur zu Grunde gelegt, konnte eine mögliche Zuckerzusammensetzung für vier der sechs gemessenen Gelonin-Spezies gefunden werden (Tab. 3.1). Für diese vier Spezies wurde eine allgemeine Zuckerzusammensetzung von $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_x\text{Xyl}_1$ bestimmt. Die Anzahl der Mannose-Moleküle variierte von 2 bis 5. Die heterogene Besetzung von Glykosylierungsstellen wurde auch für andere Glykoproteine in Pflanzen gefunden (Oxley und Bacic, 1995; Sturm, 1991; Takahashi et al., 1990). Der berechnete Zuckergehalt von 4,6% für die Spezies 3 deckte sich sehr gut mit dem aus dem SDS-Gel der Deglykosylierung und dem von Falasca et al. bestimmten Zuckergehalt von 4,46% (Falasca et al., 1982).

Die Spezies 4, mit einer mittleren molekularen Masse von 29.212,8 Da, könnte durch die Zuckerzusammensetzung $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{Xyl}_1$ charakterisiert werden (Tab. 3.1, Spezies 4). Die verbliebene Massendifferenz von ca. 17 Da wäre durch eine Oxidation (+16 Da) eines Methionin-Schwefelatoms erklärbar, wie es bei der massenspektrometrischen Analyse des tryptischen Verdau von natürlichem Gelonin gefunden wurde (Daubenfeld, 2003). Die verbliebene Differenz von 1 Da wäre durch eine Desaminierung eines Asn-Restes zu erklären. Die Desaminierung findet an Asn- und Gln-Resten statt. Wird Asn desaminiert, muss in der folgenden Position ein Gly-Rest vorhanden sein. Die Nolan-Sequenz enthält bei den Aminosäuren 211 und 212 eine solche Aminosäureabfolge. Daubenfeld konnte diese Modifizierung ebenfalls massenspektrometrisch nachweisen.

Spezies	1	2	3	4
Protein				
$M_{AS,ber}$ (Da)	28.172,2	28.172,2	28.172,2	28.172,2
$M_{AS,ber}-H_2O$ (Da)	28.154,2	28.154,2	28.154,2	28.154,2
Disulfidbrücke Cys44-Cys50 (Da)	-2,0	-2,0	-2,0	-2,0
Zucker				
N-GlcNAc	2	2	2	2
Man	3	4	5	3
Xyl	1	1	1	1
$M_{Zucker,ber}$ (Da)	1.043,0	1.205,1	1.367,2	1.043,0
Modifizierungen				
Oxidation	-	-	-	1
Desaminierung	-	-	-	1
$M_{Mod.,ber}$ (Da)	0	0	0	17,0
$M_{Gelolin,ber}$ (Da)	29.195,1	29.357,3	29.519,4	29.212,1
$M_{Gelolin,gem}^{\dagger}$ (Da)	29.195,1	29.357,9	29.519,2	29.212,8
Differenz (Da)	0,0	-0,6	0,2	-0,7
Zuckergehalt (%)	3,6	4,1	4,6	3,6

Tab. 3.1.: Vorschlag für die Zusammensetzung der im Massenspektrum von natürlichem Gelonin gefundenen Massen $M_{Gelolin,gem}$. Der Zuckergehalt berücksichtigt nicht die posttranslationalen Modifizierungen. [†] (Hossann, 2001).

Auch die zwei verbliebenen Spezies bei 29.137,9 und 29.300,0 Da könnten durch das Vorliegen der Kern-Struktur mit unterschiedlicher Anzahl an Mannose-Molekülen ($GlcNAc_2Man_{2-3}Xyl_1$) erklärt werden. Die Differenz zur experimentell bestimmten Masse, lässt sich hier durch eine Phosphorylierung des Proteins (+79,98 Da) und der Anlagerung eines Natrium-Ions (+22,99 Da) aus dem Puffer erklären. Allerdings fehlte die für Na-Addukte charakteristische Verteilung von Peaks mit 22-Da-spacing im ESI-FT Massenspektrum (Daubenfeld, 2003). Auch fehlte in der Literatur ein Hinweis auf eine mögliche Phosphorylierung von Gelonin.

Die von Falasca *et al.* gefundenen Spuren von Fucose (Falasca *et al.*, 1982) konnten durch die Auswertung des Massenspektrums nicht bestätigt werden. Allerdings hängt die Zusammensetzung der Glykosylierung von Gelonin von saisonalen Faktoren ab (Trommer und Surolia, persönliche Mitteilung).

Vorkommen von Gelonin in der Pflanzenzelle

Gelonin findet man in den Samen von *Gelonium multiflorum*. Für das hier vorgeschlagene Glykosylierungsmuster des paucimannosidischen Typs spricht, dass Glykoproteine aus Vakuolen und Pflanzensamen hauptsächlich diesen Typ aufweisen.

4. Expression und Isolierung von rekombinantem Gelonin

4.1. Aufgabenstellung

Die Isolierung von rekombinantem Gelonin aus *E.coli* gelang Li (Li, 2002) und Büttner (Büttner, 2002), unter Verwendung von Ionenaustauscherchromatographie, direkt aus dem Zelllysat.

Li verwendete in einem ersten Säulenschritt einen starken Kationenaustauscher (SP-Sepharose ff). Sie eluierte die Proteine durch eine stufenweise Erhöhung der NaCl-Konzentration im PBS-Puffer (pH 6,5). Nach einer Dialyse gegen Tris-Puffer, pH 10,5, wurde die Fraktion, welche das rekombinante Gelonin enthielt, erneut über SP-Sepharose ff gesäult und die Proteine im Gradienten eluiert. Da durch den Wechsel des pH-Wertes von 6,5 nach 10,5 der isoelektrische Punkt des rekombinanten Gelonins durchschritten wurde (berechneter Wert: 9,22), kam es bei der Dialyse zu dessen Präzipitation und somit zu erheblichen Ausbeuteverlusten.

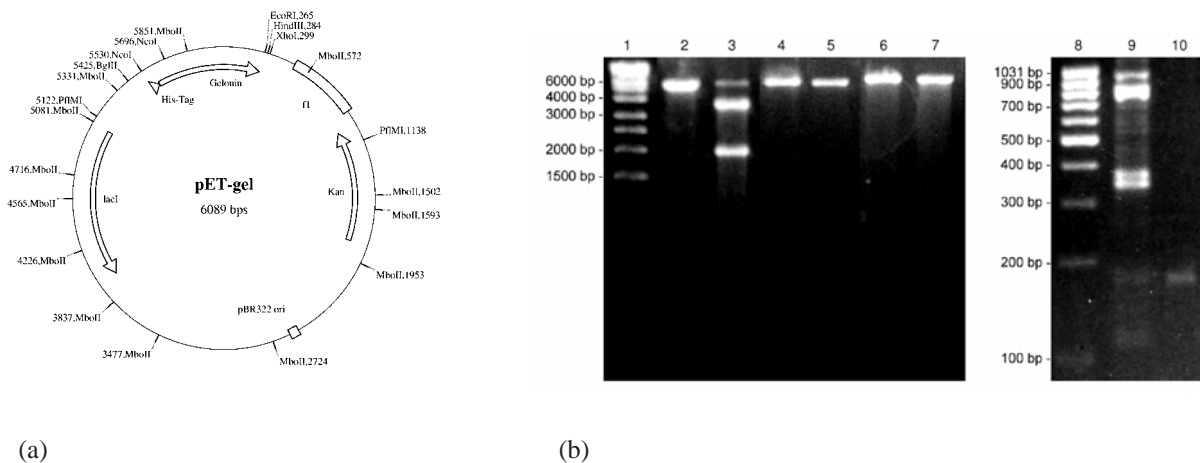
Büttner gelang die Optimierung der Aufreinigung durch Verwendung eines einzigen Säulenschrittes unter Verwendung von SP-Sepharose ff bei einem pH-Wert von 6,5 und einer Gradientenelution mit steigender NaCl-Konzentration.

Die Überprüfung der DNA-Sequenz des Expressionsvektors führte zu der Entdeckung, dass das rekombinante Gelonin über einen N-terminalen HisTag verfügte. Ein HisTag ist ein Oligopeptid, welches mehrere Histidinreste enthält und in der Lage ist Schwermetallionen zu binden. Dieses erlaubt eine einfache Aufreinigung eines fusionierten Proteins mit Hilfe von Nickel-Affinitätschromatographie.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das rekombinante Gelonin mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie isoliert, der HisTag mit Thrombin abgespalten und das Protein erneut durch ELISA und einen Toxizitätstest charakterisiert werden. Dabei sollte der Einfluss des HisTag auf die Toxizität des Proteins untersucht werden.

4.2. Plasmidcharakterisierung

Vor der Durchführung der Expression wurde der Expressionsvektor pET-gel überprüft. Dazu wurde das Plasmid aus vorhandenen Glycerinkulturen isoliert und durch Restriktionsverdau mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen charakterisiert.



<i>BglIII</i>	1	6.089
<i>EcoRI</i>	1	6.089
<i>HindIII</i>	1	6.089
<i>MboII</i>	13	930, 810, 791, 753, 520, 369, 360, 345, 340, 339, 250[†], 171, 111
<i>NcoI</i>	2	5.923, 166
<i>PflMI</i>	2	3.984, 2.105
<i>XhoI</i>	1	6.089

(c)

Abb. 4.1.: Charakterisierung von pET-gel durch Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen - (a) Plasmidkarte von pET-gel inkl. der verwendeten Restriktionsenzyme. (b) 0,9 bzw. 2 %iges Agarosegel: Bahn 1: DNA-Marker λ -DNA HindIII, Bahn 2: HindIII, Bahn 3: PflMI, Bahn 4: XhoI, Bahn 5: NcoI, Bahn 6: EcoRI, Bahn 7: BglII, Bahn 8: DNA-Marker MassRuler DNA Ladder (Low Range), Bahn 9: MboII, Bahn 10: NcoI. (c) Verwendete Restriktionsenzyme mit Anzahl Schnittstellen (kursiv) und erwartete Größe der Fragmente; auf dem Agarosegel gefundene Fragmente sind **fett** gedruckt. Fragmente die nicht eindeutig identifiziert werden konnten sind unterstrichen dargestellt. [†] sehr schwach auf dem Agarosegel sichtbar.

Von einer Glycerinkultur wurde ein Verdünnungsausstrich auf LBK-Agarplatten erstellt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Eine Kolonie wurde gepickt und damit 25 ml LBK-Flüssigmedium angeimpft. Diese Übernachtskultur wurde dann bei 37 °C und 300 U/min inkubiert. Mit dem Plasmidisolierungskit QIAprep Spin Miniprep Kit (Fa. Qiagen) konnte anschließend aus den Übernachtskulturen Plasmid isoliert werden.

Zur Charakterisierung wurden die Restriktionsendonukleasen *BglIII*, *EcoRI*, *HindIII*, *MboII*, *NcoI*, *PflMI* und *XhoI* verwendet. Das Ergebnis des Verdau ist in Abb. 4.1 dargestellt. Bei den Enzymen mit einer Schnittstelle (*BglIII*, *EcoRI*, *HindIII* und *XhoI*) war wie erwartet nur eine Bande bei 6.089 bp zu sehen. Der Verdau mit *NcoI* zeigte eine Bande bei 5.923 bp (Bahn 5). Die zweite Bande bei 166 bp war nur auf dem 2,5 %igem Agarosegel sichtbar (Bahn 10). Bei *PflMI* waren deutlich die beiden Banden bei 3.984 und 2.105 bp zu sehen. Die Bande bei ca. 6.000 bp entstand durch unvollständigen

Verdau und repräsentierte das einfach geschnittene Plasmid mit 6.089 bp. *Mbo*II schnitt den Vektor 13 mal und erzeugte Fragmente unter 1.000 bp (Bahn 9). Bis auf das Fragment bei 250 bp, das nur sehr schwach auf dem Agarosegel detektierbar war, konnten alle Fragmente nachgewiesen werden. Möglicherweise wurde das Plasmid nur unvollständig verdaut, was durch die Instabilität des Enzyms erklärt werden könnte. *Mbo*II ist laut Herstellerangabe nur ca. 15 Minuten bei einer Inkubation unter Standardbedingungen stabil.

Aufgrund dieser Ergebnisse war der Vektor pET-gel ausreichend charakterisiert und konnte für die Expression von Gelonin eingesetzt werden.

4.3. Expression

Der Vektor pET-gel kodierte für rekombinantes Gelonin mit N-terminalem 6 fach HisTag und einer Schnittstelle für die Endoprotease Thrombin (His_6^T -Gelonin₁₋₂₅₁, Abb. 4.2). Das Protein enthielt alle 251 Aminosäuren des natürlichen Gelonins (Swissprot: P33186, Nolan *et al.*, 1993). Die Endoprotease Thrombin erkennt die Aminosäuresequenz LysValProArgGlySer und spaltet die Peptidbindung C-terminal des Gly-Restes. Durch die Inkubation von His_6^T -Gelonin₁₋₂₅₁ mit Thrombin sollte Gelonin₁₋₂₅₁ erhalten werden.

Zur Expression wurden von einer Glycerinkultur BL21(DE3) pET-gel Verdünnungsaustrieche auf LBK-Agarplatten angelegt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Mit je einer einzelnen Kolonie wurden Übernachtskulturen angeimpft und bei 37 °C und 300 U/min inkubiert. Mit 5 - 10 ml dieser Übernachtskulturen wurden jeweils 500 ml LBK-Flüssigmedium angeimpft und bei 37 °C im Wasserbadsschüttler bei 220 U/min inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) verfolgt. Bei einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ zwischen 0,5 und 1,0 wurde die Expression mit IPTG induziert. Beim Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden die Zellen durch Inkubation in einem Eiswasser-Bad geerntet und bei 6.400 xg abzentrifugiert. In allen Versuchen erzielten die Zellen beim Erreichen der stationären Phase nur eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von bis zu 2.

4.4. Lyse der Zellen

Die Zellpellets wurden nach zweimaligem Waschen mit Pellet-Waschpuffer (20 mM Tris, pH 7,6) in Resuspendierungspuffer (50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 0,5 M Natriumchlorid, 20 mM Imidazol, 1,5 mM PMSF, pH 7,2) aufgenommen und durch die Zugabe von Lysozym und mittels Ultraschall lysiert. Durch die Zentrifugation bei 30.000 xg erhielt man die löslichen Zellproteine im Überstand, während die unlöslichen Zelltrümmer und *inclusion bodies* im Pellet verblieben. Das Auftragen des Zelllysats auf ein SDS-Gel, und die Untersuchung der entsprechenden Bande mit einem Densitometer



Abb. 4.2.: Primärstruktur des rekombinanten Gelonins (schematisch), kodiert im Vektor pET-gel - **(a)** His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁: Das exprimierte Protein enthielt alle 251 Aminosäuren von natürlichem Gelonin (schwarz). Zusätzlich besitzt es einen N-terminalen 6xHisTag (schraffiert) und eine Schnittstelle für Thrombin (Pfeil). **(b)** Gelonin₁₋₂₅₁: Rekombinantes Gelonin nach der Abspaltung des HisTag. N-terminal verblieben die Aminosäuren GSHM des Vektors fusioniert.

(Abb. 4.3(a)) zeigte einen Gehalt von 17 % von Proteinen der gesuchten Molekularmasse (ca. 31 kDa) im Überstand der Zellyse.

4.5. Isolierung mit Hilfe von Nickel-Ionen-Affinitätschromatographie

Bei den Isolierungen von Li und Büttner lag His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ nativ im Zelllysate vor (Li, 2002; Büttner, 2002). Aufgrund des HisTag war eine Isolierung mit Hilfe von an HiTrap Chelating immobilisierten Nickel-Ionen direkt aus dem Zelllysate möglich. Um optimale Trenneigenschaften auf der Säule zu erhalten, wurden 0,5 M NaCl in den Puffer gegeben, um die Ionenaustauschereigenschaften des Säulenmaterials zu unterdrücken. Die Zugabe von 20 mM Imidazol zum Puffer verringerte die unspezifische Bindung von unerwünschten Proteinen an die immobilisierten Nickel-Ionen.

4.5.1. Elution mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen

Um Schwebstoffe und andere größere Aggregate abzutrennen, welche die HiTrap Chelating Affinitätsäule verstopfen könnten, wurde das Zelllysate 60 Minuten in der Ultrazentrifuge (400.000 xg, 4 °C) zentrifugiert. Wurde die Proteinlösung nach der Zentrifugation bei -20 °C eingefroren, so bildeten sich nach Lagerung erneut größere Aggregate, möglicherweise von verbliebenen Zelltrümmern, die vor dem Auftragen auf die Säule erneut abzentrifugiert werden mussten.

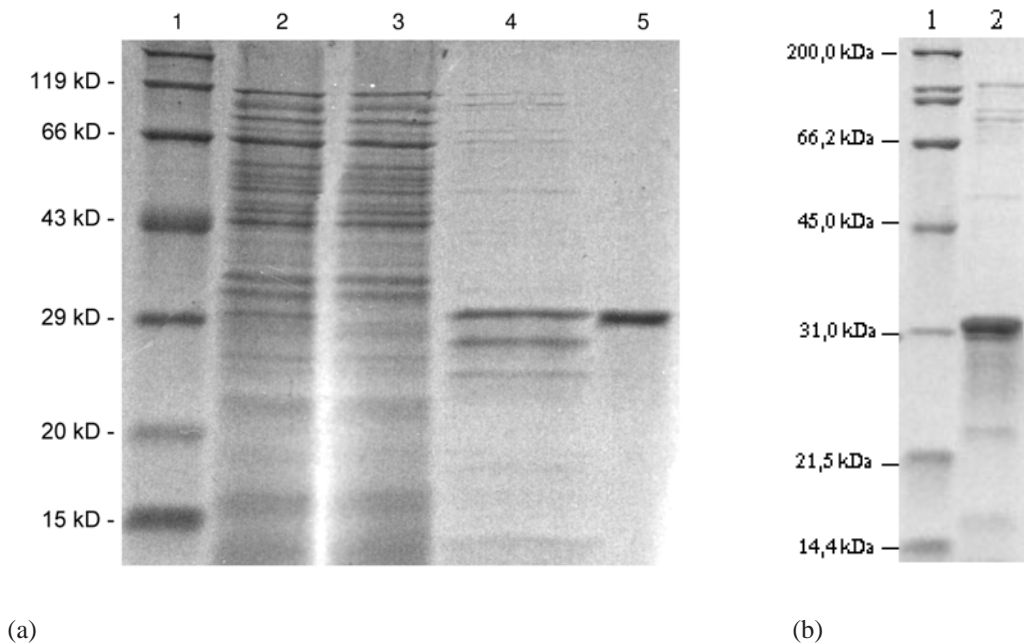


Abb. 4.3.: SDS-PAGE - Isolierung von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ (Elution mit Imidazol) - **(a)** SDS-PAGE (12 %iges Trenngel) der Säulenfraktionen, Bahn 1: Proteinmarker, Bahn 2: Zellysate (30 µg), Bahn 3: Durchlauf (30 µg), Bahn 4: Waschfraktion (10 µg), Bahn 5: His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ (10 µg). **(b)** SDS-PAGE (12 %iges Trenngel) der Isolierung nach Büttner (Büttner, 2002). Bahn 1: Proteinmarker, Bahn 2: His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ (10 µg).

Zur Isolierung von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ wurde der Überstand der Zellyse nach der Ultrazentrifugation direkt auf die Säule aufgetragen und solange mit Bindungspuffer gewaschen, bis keine Absorption bei 280 nm mehr detektiert werden konnte. Die Säule wurde mit Waschpuffer (50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 0,5 M Natriumchlorid, 100 mM Imidazol, pH 7,2) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu entfernen. Reines His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ konnte mit Elutionspuffer (50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 0,5 M Natriumchlorid, 500 mM Imidazol, pH 7,2) von der Säule eluiert werden. Man erhielt aus 11 Schüttelkultur ca. 2,4 mg rekombinantes Gelonin. Die Konzentration betrug ca. 0,5 mg/ml. Eine Aufkonzentration bis zu 1,5 mg/ml war möglich.

Der Verlauf der Aufreinigung ließ sich anhand der auf ein SDS-Gel aufgetragenen Säulenfraktionen verfolgen (Abb. 4.3(a)). Im Überstand der Zellyse (Bahn 2) war deutlich bei ca. 31 kD die Bande von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ zu sehen, welches komplett an die Säule gebunden hatte und im Durchlauf nicht mehr detektierbar war (Bahn 3). In Abb. 4.3(b) ist in Bahn 2 His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ zu sehen, das nach der Methode von Büttner isoliert wurde. Deutlich sind Verunreinigungen zu sehen, die bei der Isolierung mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie nicht auftraten.

Vergleich man beide Isolationsmethoden mit Hilfe einer densitometrischen Analyse der Banden auf den SDS-Gelen, so konnte bei der Isolierung mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie ein Reinheitsgrad von 95 % erzielt werden, während die Methode nach Büttner nur ein Reinheitsgrad von

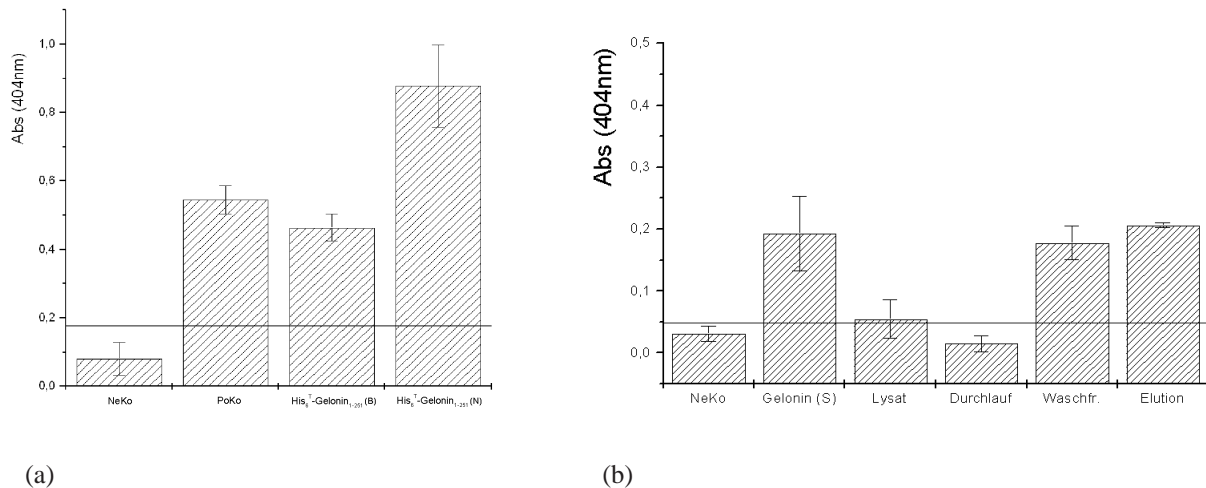


Abb. 4.4.: Isolationskontrolle und Charakterisierung von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ mit ELISA - (a) ELISA mit polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern (1:1000), Vergleich von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ isoliert nach der Methode von Büttner (B, 5 µg) bzw. mit Nickel-Affinitätschromatographie (N, 5 µg), Negativkontrolle: Glucose-Dehydrogenase (10 µg), Positivkontrolle: Gelonin aus *Gelonium multiflorum* (5 µg). (b) ELISA mit polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern (1:1000), Untersuchung der aufgefangenen Säulenfraktionen, Zelllysat (44 µg), Durchlauf (5 µg), alle anderen Fraktionen 4 µg. Negativkontrolle: Rinderserumalbumin (4 µg), Positivkontrolle: Gelonin aus *Gelonium multiflorum* (Gelonin (S), 8 µg).

92 % erbrachte. Dieses Ergebnis zeigte sich auch im ELISA (Abb. 4.4). Wurde His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ aus beiden Isolierungen mit polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern getestet, so zeigte das mit Hilfe der Affinitätschromatographie aufgereinigte Gelonin eine deutlich positivere Reaktion. Der Erfolg der Aufreinigung ließ sich auch durch die Kontrolle der Fraktionen mit Hilfe eines ELISA bestimmen (Abb. 4.4(b)). Dazu wurden alle Fraktionen mit polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern getestet. Es war deutlich die vollständige Bindung von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ an die Nickel-Affinitätssäule erkennbar. Im Durchlauf durch die Säule ließ sich sowohl mittels SDS-PAGE, als auch durch ELISA kein His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ detektieren. Allerdings zeigte sich, dass ein Teil des gewünschten Proteins bereits beim Waschschrift von der Säule eluiert wurde. Dies ließ sich aufgrund der geringen Menge vernachlässigen. In der Waschfraktion befanden sich ca. 400 µg Gesamtprotein, von denen His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ nur ein geringer Prozentsatz darstellte. Nach der Dialyse gegen 3 mal 5 l Dialysepuffer (20 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 7,2) konnte das Protein weitergehend charakterisiert werden.

4.5.2. Abspaltung des HisTag

In einem *in vitro* Translationstest zeigte His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ eine Toxizität von 3,0 ng/ml (Büttner, 2002). Um den Einfluss des HisTag auf die Toxizität zu beurteilen, sollte dieser mit Thrombin abgespalten und die Toxizität von Gelonin₁₋₂₅₁ bestimmt werden. Thrombin erkennt die Aminosäurese-

quenz LeuValProArgGlySer und spaltet die Polypeptidkette N-terminal des Glycin. Dabei kommt es zu einem Massenverlust von ca. 2 kDa, der auf einem SDS-Gel beobachtet werden kann. Zur Optimierung der Bedingungen wurden zeit- und dosisabhängige Versuche durchgeführt.

In einem ersten Versuch, zur Bestimmung der benötigten Thrombinmenge, wurden 30 µg His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ mit 5, 10, 20 und 40 mU Thrombin umgesetzt und 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Bei allen Proben wurde der HisTag vollständig abgespalten und Gelonin₁₋₂₅₁ erhalten (Abb. 4.5, oben). In einem weiteren Versuch wurden 40 µg His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ mit 5 mU Thrombin bei Raumtemperatur inkubiert und in bestimmten Zeitintervallen Proben mit je 5 µg Protein entnommen. Das Ergebnis der zeitabhängigen Thrombinspaltung ist in Abb. 4.5 dargestellt. Nach 7 Stunden war immer noch eine schwache Bande des ungeschnittenen His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ zu erkennen. Während nach 10 Stunden diese Bande nicht mehr auf dem SDS-Gel zu erkennen war, erkannte man deutlich die schwächere Bande von geschnittenem His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁, im Vergleich mit der Bande bei der 20 stündigen Inkubation. Daher konnte von einer unvollständigen Spaltung zu diesem Zeitpunkt ausgegangen werden.

Die optimalen Bedingungen für die Entfernung des HisTag wurden bei diesen Versuchen zu 1 mU Thrombin pro µg Protein, bei einer Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml und einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei Raumtemperatur festgelegt.

4.5.3. Elution mit Thrombin

Wurde His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁, welches durch die in Kap. 4.5.1 beschriebene Methode isoliert wurde, in großen Mengen (> 30 µg) auf ein SDS-Gel aufgetragen, so fand man eine höhermolekulare Verunreinigung (Abb. 4.6, Bahn 7). Durch Variation der Methode sollte untersucht werden, ob His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ durch Thrombin von der Säule eluiert werden konnte. Durch die Inkubation des immobilisierten His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ mit Thrombin sollte der HisTag abgespalten und Gelonin₁₋₂₅₁ von der Säule eluiert werden.

Hierzu wurde das Zelllysate der Expression von BL21(DE3) pET-gel, wie oben beschrieben, auf die Nickel-Affinitätssäule aufgetragen und unspezifisch gebundene Proteine mit Waschpuffer entfernt. Die Elution von Gelonin₁₋₂₅₁ erfolgte durch eine 16 stündige Inkubation mit 2,2 U Thrombin bei Raumtemperatur. Dazu wurde Bindungspuffer mit Thrombin versetzt und mit einer 1 ml Spritze auf die Säule aufgetragen. Um die Hemmwirkung des im Puffer vorhandenen 500 mM NaCl auf Thrombin auszugleichen, wurde die doppelte Menge der Endoprotease eingesetzt. Durch den Pufferwechsel wurde kein Protein eluiert. Nach Abschluss der Inkubation konnte das Protein mit Bindungspuffer

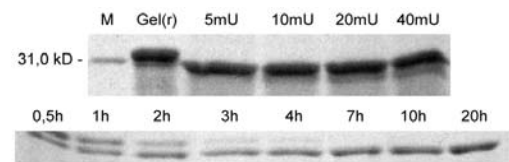


Abb. 4.5.: Abspaltung des HisTag. Verwendung verschiedener Thrombinkonzentrationen (oben) bzw. unterschiedlicher Inkubationszeiten (unten).

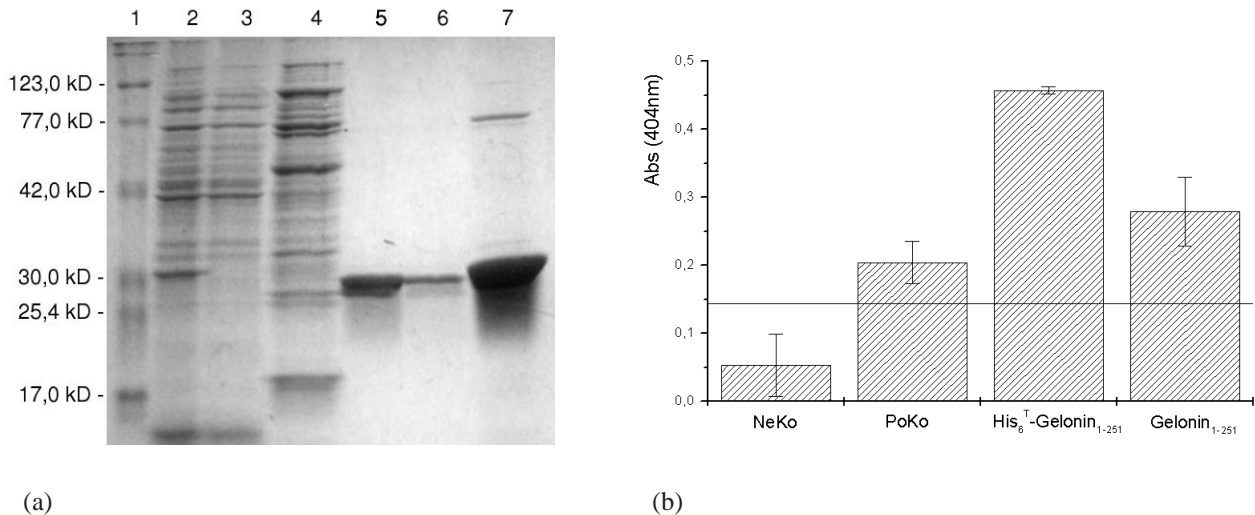


Abb. 4.6.: SDS-PAGE und ELISA der Isolierung von Gelonin₁₋₂₅₁ (Elution mit Thrombin) - (a) SDS-PAGE der Säulenfraktionen von der Nickel-Säule (12 %iges Trenngel), Bahn 1: Proteinstandard, Bahn 2: Zelllysat (40 µg), Bahn 3: Durchlauf (40 µg), Bahn 4: Waschfraktion (30 µg), Bahn 5 und 6: Gelonin₁₋₂₅₁ (15 bzw. 5 µg), Bahn 7: His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ eluiert mit 500 mM Imidazol (30 µg). (b) ELISA mit polyklonalen Anti-Gelonin-Antikörpern (1:4.000), His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ und Gelonin₁₋₂₅₁ (8 µg), Positivkontrolle: natürliches Gelonin (8 µg), Negativkontrolle: Rinderserumalbumin (20 µg).

eluiert werden. Der Erfolg der Isolierung wurde durch das in Abb. 4.6 gezeigte SDS-Gel deutlich. His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ band vollständig an die Nickel-Affinitätssäule. Während im Zelllysat die Bande bei ca. 31 kD sichtbar war (Bahn 2), fehlte sie im Durchlauf völlig (Bahn 3). In Bahn 5 ist Gelonin₁₋₂₅₁ in großer Reinheit zu sehen. Die Ausbeute betrug 2,6 mg pro 1 l Schüttelkultur, mit einer Konzentration von 1 mg/ml. Eine densitometrische Analyse ergab eine Reinheit von 99 %. Allerdings konnte nicht das gesamte Gelonin mit dieser Methode eluiert werden. Durch anschließende Elution mit Elutionspuffer wurden weitere 0,2 mg His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ erhalten. Möglicherweise reichte die Thrombinmenge nicht aus, um Gelonin₁₋₂₅₁ vollständig von der Säule zu entfernen. Laut Herstellerangabe ist zur Spaltung von immobilisierten HisTag-Proteinen eine höhere Thrombinmenge notwendig, als bei der Spaltung der gleichen Proteinmenge in Lösung. Auch eine Deaktivierung von Thrombin aufgrund der langen Inkubationszeit bei Raumtemperatur konnte nicht ausgeschlossen werden.

Im ELISA mit polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern zeigte sich eine stärkere Reaktion bei His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ als mit Gelonin₁₋₂₅₁ (Abb. 4.6(b)). Möglicherweise erkannten die verwendeten polyklonalen Antikörper den stark polaren, immunogenen HisTag und führten so zu einer stärkeren Reaktion. Nach der Abspaltung des HisTag zeigte Gelonin₁₋₂₅₁ eine mit aus *Gelonium multiflorum* isoliertem Gelonin vergleichbare Aktivität.

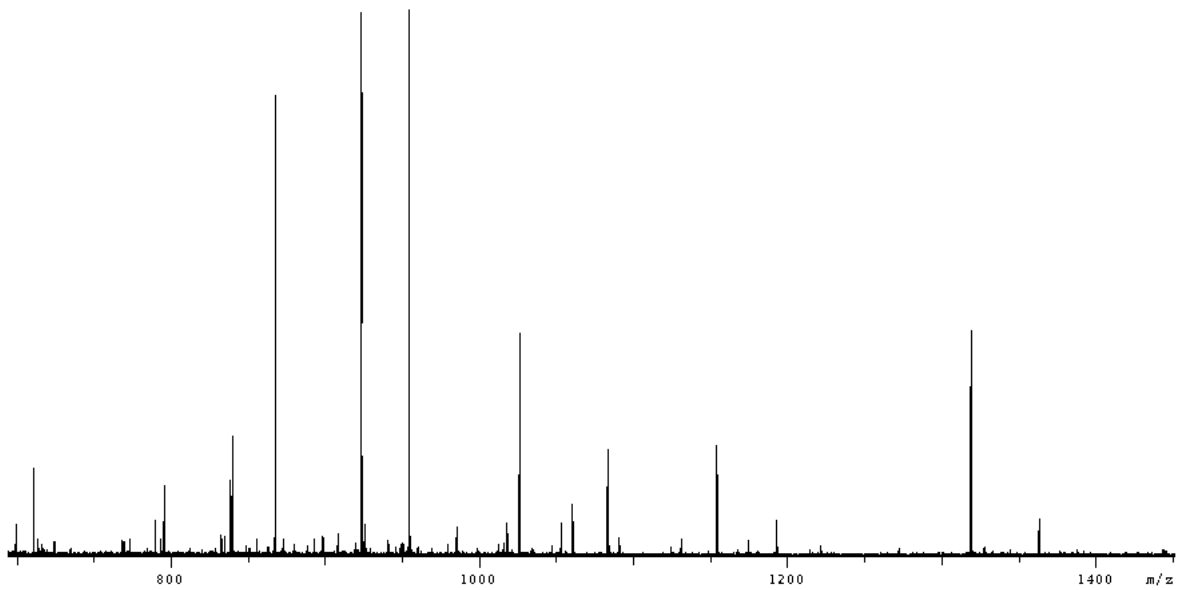


Abb. 4.7.: ESI-FT Massenspektrum von rekombinantem Gelonin: das gemessene Spektrum zeigt die mehrfach positiv geladenen Analytmoleküle.

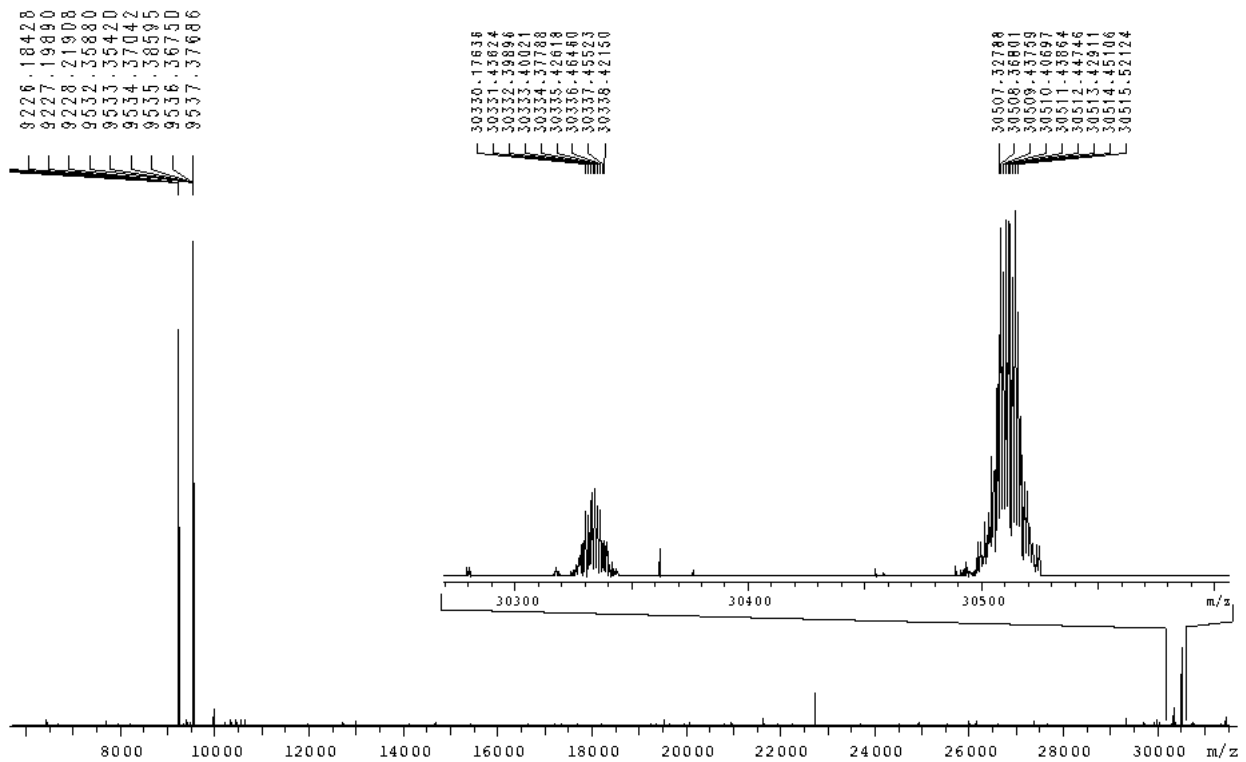


Abb. 4.8.: ESI-FT Massenspektrum (mass-deconvoluted) von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁.

4.6. Charakterisierung

4.6.1. ESI-FT Massenspektrometrie

Zur Kontrolle der Aminosäuresequenz des exprimierten His₆^T-Gelonin_{1–251} wurde ein Massenspektrum mit einem Elektrospray-Ionisations-Fouriertransformations-Massenspektrometer (ESI-FT-MS) bei der Fa. Bruker Daltonik in Bremen aufgenommen.

Die Probe wurde vor der Messung entsalzt, da anorganische Salze und Detergentien einen negativen Einfluss auf die Ionisierungseffizienz in der ESI-Quelle besitzen. Puffersalze können die Analytmoleküle während der Verdampfung des Lösungsmittels in der ESI-Quelle durch Auskristallisation einschließen bzw. den Prozess der Ionenbildung behindern. Experimentell werden Puffersalzkonzentrationen von 0,1 bis 1 mM toleriert (Kay und Mallet, 1993; Lehmann, 1996).

Zur Entsalzung wurden 5 ml einer 0,11 mg/ml Lösung von His₆^T-Gelonin_{1–251} viermal gegen 5 l bidestilliertes Wasser dialysiert und danach mit YM10-Centricon-Konzentratoren bis zu einer Konzentration von 0,65 mg/ml aufkonzentriert. Die Ausbeute an salzfreiem His₆^T-Gelonin_{1–251} betrug 64 %.

Neben drei anderen Peaks, wurde im *mass deconvoluted* Spektrum ein Peak mit einer mittleren molekularen Masse von 30.512 Da gefunden. Wurde die Aminosäuresequenz im Vektor zu Grunde gelegt und die Formylierung der Startaminosäure Methionin durch die *E.coli* berücksichtigt, dann berechnete sich eine mittlere molekulare Masse von 30.496 Da. Die mittlere molekulare Masse der anderen gefundenen Peaks betrug 9.225 Da, 9.535 Da und 30.334 Da. Eine quantitative Aussage über die Menge der Verunreinigungen im Vergleich mit His₆^T-Gelonin_{1–251} ließ sich allerdings mit dieser Methode nicht treffen.

4.6.2. Western Blot

In einem Western Blot mit polyklonalen Anti-Gelonin bzw. Anti-HisTag Antikörpern konnte die bei ca. 31 kD im SDS-PAGE auftretende Bande als His₆^T-Gelonin_{1–251} identifiziert werden (Abb.

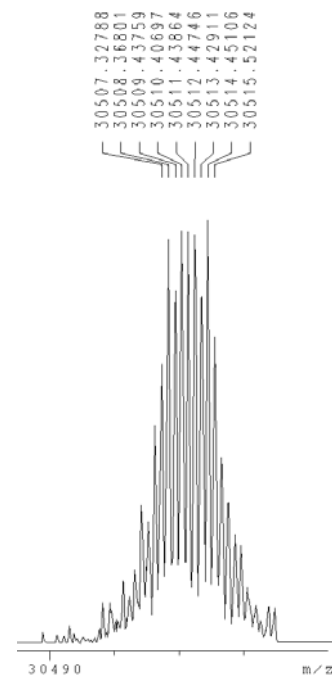


Abb. 4.9.: ESI-MS Massenspektrum von His₆^T-Gelonin_{1–251} (mass-deconvoluted). Der Peak repräsentiert eine Spezies mit einer mittleren molekularen Masse von 30.512 Da.

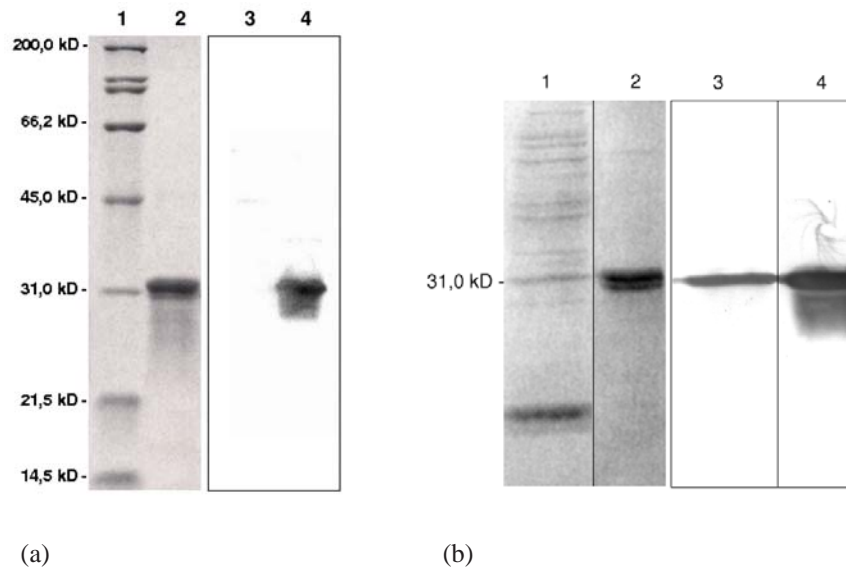


Abb. 4.10.: Immunologische Charakterisierung von $\text{His}_6^T\text{-Gelolin}_{1-251}$ mit Hilfe von Western Blot; SDS-PAGE (Bahn 1 und 2) und Western Blot (Bahn 3 und 4) - (a) polyklonale Anti-Gelolin-Antikörper (1:1000), Bahn 1 und 3: Proteinstandard, Bahn 2 und 4: $\text{His}_6^T\text{-Gelolin}_{1-251}$ (10 μg). (b) Anti-Tetra-His-Antikörper (1:500), Bahn 1 und 3: Zelllysate (60 μg), Bahn 2 und 4: $\text{His}_6^T\text{-Gelolin}_{1-251}$ (10 μg).

4.10(a). Zusätzlich zum aufgereinigten Protein wurde im Western Blot mit den monoklonalen Anti-HisTag Antikörpern auch die nicht aufgereinigten Proteine nach der Lyse der Zellen aufgetragen (Abb. 4.10(b), Bahn 1 und 3). Die Antikörper reagierten nur mit $\text{His}_6^T\text{-Gelolin}_{1-251}$ und konnten so im ELISA als Isolationskontrolle von in *E.coli* exprimierten Proteinen mit 6xHisTag verwendet werden.

4.6.3. Toxizitätstest

Mit Hilfe eines Kaninchen-Retikulozyten-Lysat ließ sich die Toxizität von Gelolin_{1-251} in einem zellfreien System bestimmen. Das Lysat enthielt alle zellulären Komponenten, die zur Proteinbiosynthese notwendig sind, wie ^tRNA , Ribosomen, Aminosäuren, Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren. Als Energielieferant diente ein System aus Creatinphosphat und Creatinkinase.

Die Messung beruhte auf der Synthese eines Testproteins (Globin) an den Ribosomen des Lysats, wobei die radioaktive Aminosäure ^{14}C -Valin eingebaut wurde. Nach dem Abstoppen der Translation durch Inkubation in kaltem Wasser, wurden die Proteine durch Trichloressigsäure gefällt. Die ausgefallenen Proteine wurden über Whatman GF/C filtriert und nicht eingebautes radioaktives Valin abgetrennt. Durch die Bestimmung der Radioaktivität des Filterpapiers mit einem β -Szintillationszähler konnte die Menge an gebildetem Protein bestimmt werden. RIP hemmen eukaryontische Ribosomen und somit die Biosynthese des Testproteins im Lysat. Es findet sich daher weniger Radioaktivität

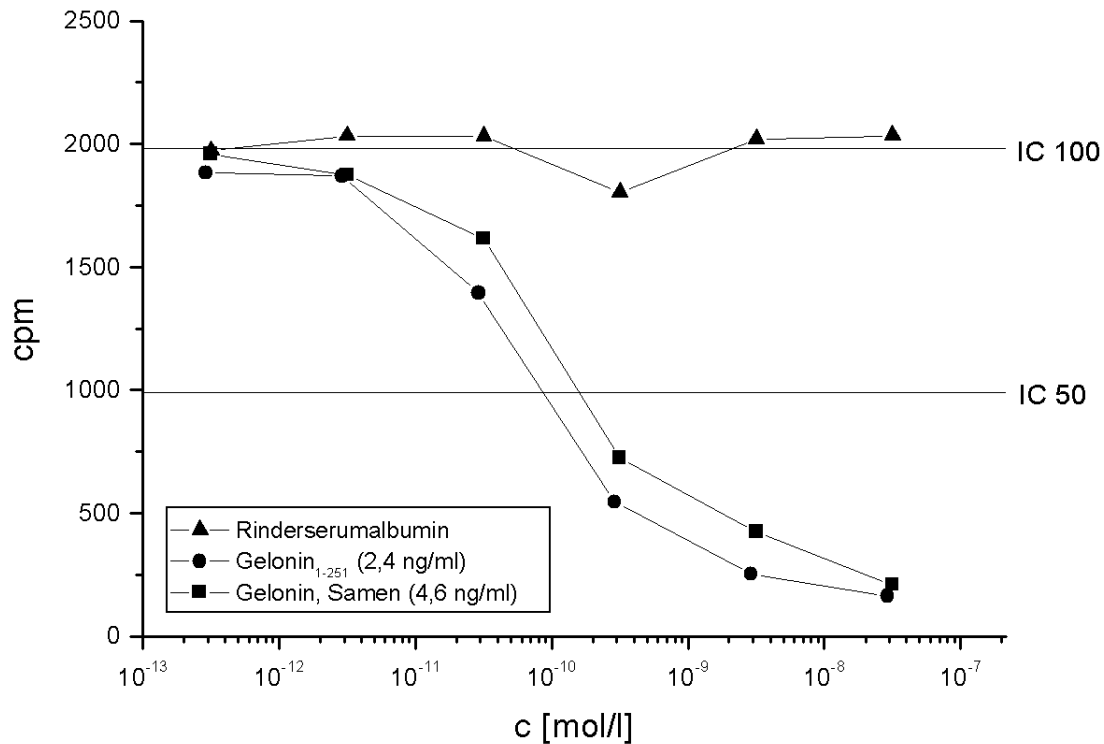


Abb. 4.11.: In vitro Translationstest von Gelonin₁₋₂₅₁ im Vergleich mit natürlichem, aus *Gelonium multiflorum* isoliertem Gelonin. Als Negativkontrolle diente Rinderserumalbumin. (IC100 = 1.981 cpm, IC50 = 991 cpm).

auf dem Filterpapier. Die Toxizität wurde durch das Messen von Proteinproben unterschiedlicher Konzentration bestimmt. Es wurden Proteinproben von toxischen bis zu untoxischen Konzentrationen vermessen. Die Auswertung der entstandenen Messkurven erfolgte wie beschrieben: Untoxische Proteine wie Rinderserumalbumin hemmten die Translation nicht, daher fand man im Idealfall eine Gerade. Diese beschrieb den sog. IC 100-Wert (IC, engl. *incorporation concentration*). Die Toxizität eines Proteins ließ sich aus dem Schnittpunkt der Kurve für das Protein mit der Geraden des IC 50-Wertes berechnen.

Zur Bestimmung der Toxizität von Gelonin₁₋₂₅₁ wurde der HisTag von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ mit Thrombin entfernt und die Lösung sofort in einer Verdünnungsreihe in die zu messenden Konzentrationen verdünnt. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit 6 Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-7,5}$ bis $1 \cdot 10^{-12,5}$ mol/l angesetzt. Als Kontrolle fand natürliches Gelonin Verwendung, das aus *Gelonium multiflorum* isoliert und auf die gleiche Weise verdünnt wurde. Als Negativkontrolle diente Rinderserumalbumin, wobei eine Umsetzung mit Thrombin unter den gleichen Bedingungen wie für Gelonin₁₋₂₅₁ erfolgte. Ziel war es, einen möglichen Einfluss von Thrombin auf den Toxizitätstest zu untersuchen. Man fand für Gelonin₁₋₂₅₁ eine Toxizität von 2,4 ng/ml, während für natürliches Gelonin als Positivkontrolle eine Toxizität von 4,6 ng/ml gemessen wurde. Thrombin besaß keinen Einfluss auf den Toxizitätstest, wie mit den konstanten Messwerten für Rinderserumalbumin gezeigt werden konnte (Abb. 4.11).

4.7. Diskussion

Isolierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der N-terminale HisTag von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ zur Isolierung benutzt. Ein N-terminaler HisTag ist ein Oligopeptid, der mehrere (in diesem Fall 6), Histidin-Reste enthält und die Bindung an, am Säulenmaterial immobilisierte, Schwermetallionen ermöglicht. Zur Abtrennung von Membrantrümmern und Schwebstoffen, die nicht durch eine Zentrifugation bei 30.000 xg abgetrennt werden konnten, wurde das Zelllysate in einer Ultrazentrifuge bei 400.000 xg zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde anschließend direkt auf die Nickel-Affinitätssäule aufgetragen und die gebundenen Proteine schrittweise durch Puffer mit ansteigender Imidazolkonzentration eluiert. Imidazol besitzt eine höhere Bindungsaffinität an die immobilisierten Nickel-Ionen und ist so in der Lage die gebundene Proteine zu verdrängen. Der Waschschrift mit 100 mM Imidazol war ausreichend, um nahezu alle unspezifisch gebundenen Proteine von der Säule zu waschen. Nur ein ca. 77 kD schweres Protein blieb bei der Elution mit 500 mM Imidazol auf der Säule (Abb. 4.6, Bahn 7), war allerdings aufgrund der im Densitometer bestimmten Menge (5 %) zu vernachlässigen. Die Ausbeute und Reinheit lag deutlich über den Isolierungen von Li und Büttner (Tab. 9.1). Ursache war die Verwendung einer spezifischen Chromatographiemethode. Nur Proteine mit hoher Affinität an Schwermetallionen banden an die Nickel-Affinitätssäule. Unspezifisch gebundene Proteine konnten mit Puffern geringerer Imidazolkonzentrationen eluiert werden, während Proteine mit einem N-terminalen HisTag erst von Puffern mit hoher Imidazolkonzentration eluiert wurden. Durch Verwendung der Nickel-Affinitätschromatographie konnte der Zeitaufwand für die Isolierung von 5 Tagen (Li, 2002) auf 3 Tage reduziert werden.

Der HisTag konnte durch Verwendung von Thrombin abgespalten werden. Die Endoprotease Thrombin erkennt spezifisch die Aminosäuresequenz LeuValProArgGlySer und spaltet die Peptidbindung N-terminal des Glycin-Restes. Diese Eigenschaft wurde ebenfalls dazu verwendet, Gelonin₁₋₂₅₁ spezifisch von der Affinitätssäule zu eluieren. Dazu wurde das Zelllysate auf die mit Nickel-Ionen beladene HiTrap-Chelating Affinitätssäule aufgetragen, ungebundene Proteine mit Bindungspuffer, unspezifisch gebundene Proteine mit Waschpuffer eluiert und danach die Säule mit Thrombin-haltigem Elutionspuffer über Nacht inkubiert. Der HisTag von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ wurde direkt auf der Säule gespalten und Gelonin₁₋₂₅₁ in hoher Ausbeute, Konzentration und Reinheit eluiert, da das ca. 77 kDa schwere Protein nicht eluierte. Die Elution mit Thrombin besaß gegenüber der herkömmlichen Elution mit Imidazol den Vorteil, dass ein zusätzlicher Dialyseschrift, zum Entfernen des Imidazols und des HisTag-Oligopeptides aus dem Puffer, entfallen konnte. Weiterhin erhielt man Gelonin₁₋₂₅₁ in hoher Konzentration (bis 1,5 mg/ml), was eine Aufkonzentration nach der Isolierung überflüssig machte. Aufkonzentrationsschritte sind immer mit einem Verlust an Protein verbunden, die Vermeidung dieses Schrittes war ein weiterer Vorteil der Elution mit Thrombin. Der Waschschrift mit 100 mM Imidazol-haltigem Waschpuffer war notwendig, um eine mögliche unspezifische Spaltung von an die Säule

gebundenen Proteinen, durch vorzeitiges Entfernen dieser Proteine, zu vermeiden. Eine Datenbankanalyse nach *E.coli*-Proteinen mit einer Thrombin-Schnittstelle blieb erfolglos.

Die Expression in *E.coli* und Isolierung eines rekombinanten Gelonins wurde zuerst von Nolan *et al.* beschrieben (Nolan *et al.*, 1993). Sie beschrieben die Klonierung eines Fusionsproteins mit N-terminaler *leader*-Sequenz, welche die Sekretion des exprimierten Proteins durch die Zytoplasmamembran ermöglichte. Das exprimierte Protein zeigte eine mit natürlichem Gelonin vergleichbare Aktivität (Tab. 4.1), wobei der Einfluss der *leader*-Sequenz auf die Toxizität nicht bestimmt wurde.

ESI-FT Massenspektrum

Vor der Messung im Massenspektrometer musste His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ gegen bidestilliertes Wasser dialysiert werden. Anschließend konnte das Protein bis zu einer Konzentration von 0,65 mg/ml aufkonzentriert werden, wobei keine Aggregation des Proteins festgestellt wurde. Der bei der Dialyse und Aufkonzentration aufgetretene Proteinverlust von 36 % lag dabei im üblichen Rahmen. His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ erwies sich als sehr stabil in wässriger, salzfreier Lösung.

Im ESI-FT Massenspektrum von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ wurden zwei Massen gefunden, die rekombinantem Gelonin zugeordnet werden konnten. Die Spezies bei 30.512 Da entsprach His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ mit formyliertem Methionin (30.496 Da). Die Differenz von 16 Da zur berechneten Masse ließ sich durch ein oxidiertes Schwefelatom an einem Methionin erklären, wie es auch bei natürlichem Gelonin gefunden wurde (Daubenfeld, 2003). Das Signal bei 30.334 Da könnte His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ entsprechen, bei dem das formylierte Methionin posttranslational abgespalten wurde. Neben den Signalen für His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁, wurden zwei weitere Signale mit einer mittleren molekularen Masse von 9.225 Da und 9.535 Da detektiert. Eine Detektion dieser niedermolekularen Proteinen im SDS-PAGE gelang nicht. Möglicherweise handelte es sich bei ihnen um Fragmente des rekombinanten Gelonins, die beim Ionisierungsprozess gebildet wurden. Eine Aussage über die Menge der möglichen Verunreinigungen in der Isolierung ließ sich allerdings mit Hilfe des ESI-FT Massenspektrums nicht treffen. Zwar ist die quantitative Analyse eine der zentralen Anwendungsgebiete der Massenspektrometrie (Lehmann und Schulten, 1978; Haskins, 1982; Lehmann, 1996), allerdings erfolgen quantitative Messungen immer durch die Einbeziehung eines internen Standards. Die absolute Signalthöhe wird durch eine große Anzahl von instrumentellen Parametern, wie z.B. der Ionisierungsausbeute, beeinflusst. Verwendung finden daher isotope-markierte Analoga der Analyt-Moleküle.

Faltung

Aufgrund der Ergebnisse des ELISA und des *in vitro* Translationstests konnte von einer nativen Faltung des rekombinanten Gelonins ausgegangen werden. Im ELISA wurde bei der Verwendung von polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern bei abgespaltenem HisTag eine mit natürlichem Gelonin vergleichbare Aktivität gezeigt. Die verwendeten polyklonalen Antikörper waren allerdings nicht auf ihre Spezifität bezüglich nativem oder denaturiertem Gelonin getestet, daher konnte der ELISA nicht als

Protein		IC50 (pM)	Literatur
Gelonin _{1–251}	251 AS	80	Kap. 4.6.3
His ₆ ^T -Gelonin _{1–251}	251 AS	100	(Büttner, 2002)
rek. Gelonin	251 AS, inkl. <i>leader</i> -Sequenz	26	(Nolan <i>et al.</i> , 1993)
	258 AS	7	(Rosenblum <i>et al.</i> , 1995)
nat. Gelonin		426 [†]	(Stirpe <i>et al.</i> , 1980)
		25	(Hofmann, 1988)
		18	(Nolan <i>et al.</i> , 1993)
		14 [†]	(Rosenblum <i>et al.</i> , 1995)

Tab. 4.1.: Vergleich der Toxizitäten von rekombinantem und natürlichem Gelonin. [†] zur Berechnung wurde eine mittlere Molekularmasse von 29.329 Da angenommen (Hossann, 2001).

ausreichendes Mittel zur Bestimmung der nativen Faltung herangezogen werden. Die native Faltung wurde durch den *in vitro* Translationstest bestätigt.

Toxizität

In einem *in vitro* Translationstest zeigte sich das rekombinante Gelonin toxisch bei der Inhibierung eukaryontischer Ribosomen, ein Beweis für die native Faltung des Proteins. Wurde die Toxizität von Gelonin_{1–251} unter Zuhilfenahme der aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekularmasse (28.585 Da) berechnet, so erhielt man einen Wert von 80 pM. Büttner verwendete im Toxizitätstest His₆^T-Gelonin_{1–251}. Wurde die Masse von 30.495 Da berücksichtigt, so errechnete sich ein IC₅₀ von 100 pM. Der HisTag besaß somit keinen Einfluss auf die Toxizität des rekombinanten Gelonins. Wurde der unterschiedliche Reinheitsgrad zu Grunde gelegt, so waren beide Werte als identisch anzusehen. Der fehlende Einfluss des HisTag auf die Toxizität des rekombinanten Gelonins, ließ sich durch die Lage des aktiven Zentrums erklären. Der HisTag war N-terminal an das rekombinante Gelonin fusioniert und befand sich, unter Annahme der gleichen Faltung wie bei rekombinantem Ricin (Hosur *et al.*, 1995), auf der abgewandten Seite des Proteins (Abb. 1.9).

Bei der massenspektrometrischen Analyse von natürlichem Gelonin wurden eine Reihe von unterschiedlich glykosylierten Geloninmolekülen gefunden (Hossann, 2001). Wurde ein mittleres Molekulargewicht von 29.329 Da zu Grunde gelegt, berechnete sich ein IC₅₀-Wert von 160 pM für natürliches Gelonin. Ein Vergleich mit der Toxizität von Gelonin_{1–251} zeigte, dass dieses um den Faktor 2 toxischer war als natürliches Gelonin. Allerdings variierte die Toxizität von natürlichem Gelonin je nach Isolierungsmethode (Tab. 4.1), daher war diese Aussage mit großer Vorsicht zu treffen.

Bei einem Vergleich der Toxizität von His₆^T-Gelonin_{1–251}, mit den von Nolan *et al.* und Rosenblum *et al.* exprimierten rekombinanten Proteinen (Nolan *et al.*, 1993; Rosenblum *et al.*, 1995), zeigten sich große Unterschiede im absoluten Wert der Toxizität (Tab. 4.1). Da sich die Aminosäuresequenzen der rekombinanten Proteine unterschieden, war ein Vergleich mit den in dieser Arbeit gemessenen Werten nicht sinnvoll. Während bei Nolan *et al.* eine *leader*-Sequenz an das rekombinante Gelonin fusioniert

war, dessen Einfluss auf die Toxizität nicht bestimmt wurde, verfügte das rekombinante Gelonin von Rosenblum *et al.* über sieben zusätzliche Aminosäuren (Abb. A.1).

Die große Diskrepanz der in dieser Arbeit bestimmten Toxizität von natürlichem Gelonin und des von Hofmann gemessenen Wertes (Hofmann, 1988), beruhte auf der unterschiedliche Reinheit der verwendeten Gelonin-Isolierungen. Hofmann rechromatographierte das isolierte Gelonin, worauf in dieser Arbeit aufgrund des hohen Zeitaufwands verzichtet wurde.

Glykosylierung und Toxizität

Bei natürlichem Gelonin handelt es sich um ein Glykoprotein (Kap. 3). Die Modifizierung des Proteins mit Zuckerresten fehlt bei in *E.coli* exprimierten Proteinen. Aus den Ergebnissen des *in vitro* Translationstests zeigte sich, dass die Glykosylierung keinen Einfluss auf die Toxizität von Gelonin besitzt. Ein direkter Einfluss der Glykosylierung auf die Toxizität war bei der Betrachtung der Röntgenstruktur von Gelonin nicht zu erwarten (Abb. 1.9). Der Asparagin-Rest, der laut Hosur *et al.* die Glykosylierung trägt, lag auf der zum aktiven Zentrum entgegengesetzten Seite. Ein Einfluss der Oligosaccharidreste auf die Substratspezifität oder Aktivität von Glykoproteinen aus Pflanzen wird bis heute ausgeschlossen (Lerouge *et al.*, 1998).

Der Einfluss der Glykosylierung auf die Toxizität von natürlichem Gelonin wurde schon von Hofmann bestimmt (Hofmann, 1988). Er deglykosylierte natürliches Gelonin enzymatisch mit Exo- α -Mannosidase und erhielt ein 20 kD schweres Protein, das in einem *in vitro* Translationstest eine Toxizität von 150 pg/ml aufwies. Wurde die mit 20 kD bestimmte Molekularmasse herangezogen, dann berechnete sich die Toxizität zu 10 pM. Daraus ergab sich eine um den Faktor 8 gesteigerte Toxizität von deglykosyliertem Gelonin. Die von Hofmann bestimmte Molekularmasse lag allerdings deutlich unter der aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekularmasse von 28.172 Da. Möglicherweise kam es bei den Versuchen zu einer Fragmentierung des Gelonins. Ein Vergleich mit Gelonin_{1–251} erschien daher nicht sinnvoll.

Immunogenität

Auch wenn der HisTag keinen Einfluss auf die Toxizität hatte, so könnte er beim späteren Einsatz *in vivo*, in chemisch gekoppelten Immuntoxinen, einen Einfluss auf das Immunsystem des Versuchstiers haben. Aufgrund der stark polaren Histidin-Reste, könnte der HisTag stark immunogen wirken und bei mehrmaliger Gabe zur Therapie der EAMG eine Immunreaktion gegen das Konjugat auslösen. Diese Immunogenität zeigte sich im ELISA mit polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern. Die Antikörper wurden im Arbeitskreis durch die Immunisierung von Mäusen mit Gelonin gewonnen. Allerdings erfolgte keine Aufreinigung der spezifisch gegen Gelonin gerichteten Antikörper. Die Antikörperreaktion war deutlich positiver bei His₆^T-Gelonin_{1–251}, als bei Gelonin_{1–251}.

Ausblick

Der HisTag könnte sich als nützlich bei der chemischen Kopplung von Gelonin mit exprimierten Fragmenten des AChR erweisen. Nach der Kopplung wäre es möglich, den HisTag zur Aufreinigung der Konjugate zu verwenden, und diese so von den ungekoppelten AChR-Fragmenten abzutrennen. Ein weiterer Vorteil von rekombinantem Gelonin ist die fehlende Glykosylierung. Die Oligosaccharide besitzen ein hohes immunogenes Potential (Lerouge *et al.*, 1998; Conrad *et al.*, 1995; Faye *et al.*, 1993). Es wurde gezeigt, dass D-Fucose und D-Xylose Ziele von Immunglobulinen der Klasse E (IgE) bei Patienten mit Allergien gegen Pflanzenpollen sind (Bardor *et al.*, 2003). Eine Antigenität von natürlichem Gelonin zeigte Brust beim Einsatz von Ovalbumin-Gelonin-Konjugaten in Ratten (Brust *et al.*, 1987). Bei den Ratten konnten im Verlauf der Behandlung Antikörper gegen Gelonin gefunden werden. Ein Einsatz von Konjugaten mit natürlichem Gelonin wäre mit immer größeren Dosen an Konjugat verbunden, um den Verlust durch Komplexbildung mit Anti-Gelonin Antikörpern im Blut auszugleichen. Daher ist rekombinantes Gelonin, bei gleicher Toxizität, von größerem Interesse im *in vivo* Einsatz als natürliches Gelonin.

5. Klonierung, Expression und Isolierung von H- α -AChR_{4–208}

5.1. Aufgabenstellung

Ein Ziel dieser Arbeit war die Synthese von Immuntoxinen aus dem Pflanzentoxin Gelonin und dem nikotinischen AChR, dem Autoantigen bei Myasthenia gravis. Die Synthese von Immuntoxinen mit dem kompletten Rezeptor und der Einsatz in *in vivo* Versuchen gelangen im Arbeitskreis Brust und Urbatsch (Brust *et al.*, 1987; Urbatsch *et al.*, 1993). Allerdings war die Aufreinigung des chemisch gekoppelten Konjugats aufgrund des geringen Molekularmassenunterschieds zwischen dem kompletten Rezeptor (250 kD) und dem Immuntoxin (280 kD) nicht vollständig möglich. Auch zeigte sich trotz der Therapieerfolge beim Einsatz des Immuntoxins *in vivo* ein Anstieg des Antikörpertiters gegen den AChR. Dies ließ sich durch mögliche Bildung von Antikörpern gegen pathologisch irrelevante Teile des Rezeptors erklären.

Da der größte Teil der Autoantikörper im Blut myasthener Patienten gegen den extrazellulären Teil der α -Untereinheit des Rezeptors gerichtet ist, wäre ein Einsatz solcher Fragmente in Immuntoxinen sinnvoll. Allerdings gestaltete sich die gentechnische Isolierung schwierig. Versuche zur Isolierung im Arbeitskreis mit Fragmenten unterschiedlicher Größe scheiterten daran, dass sich diese nicht nativ isolieren ließen (Rousselle, 1996; Kreiling, 2001; Hossann, 2001). Ursache schien das Fehlen des sog. *cys-loop* bei den Aminosäuren 192/193 in allen verwendeten Fragmenten zu sein. Die Expression und native Isolierung durch denaturierende Aufarbeitung und Rückfaltung von α -AChR_{ex} gelang seit 1998 bisher in *E.coli* nur unter Verwendung von T- α -AChR_{ex,1–209} (Schrattenholz *et al.*, 1998; Alexeev *et al.*, 1999) und H- α -AChR_{ex,1–207} (Tsouloufis *et al.*, 2000). In allen Fragmenten lag der strukturbildende *cys-loop* vor.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Expressionsvektor p α HE706, der für die Aminosäuren 4-181 des extrazellulären Teils der α -Untereinheit des humanen nikotinischen AChR kodiert, um die DNA-Sequenz, welche für die Aminosäuren 182-208 kodiert, erweitert werden. Nach erfolgreicher Klonierung sollten Expressionsversuche durchgeführt und überprüft werden, ob sich natives H- α -AChR_{4–208} isolieren lässt.

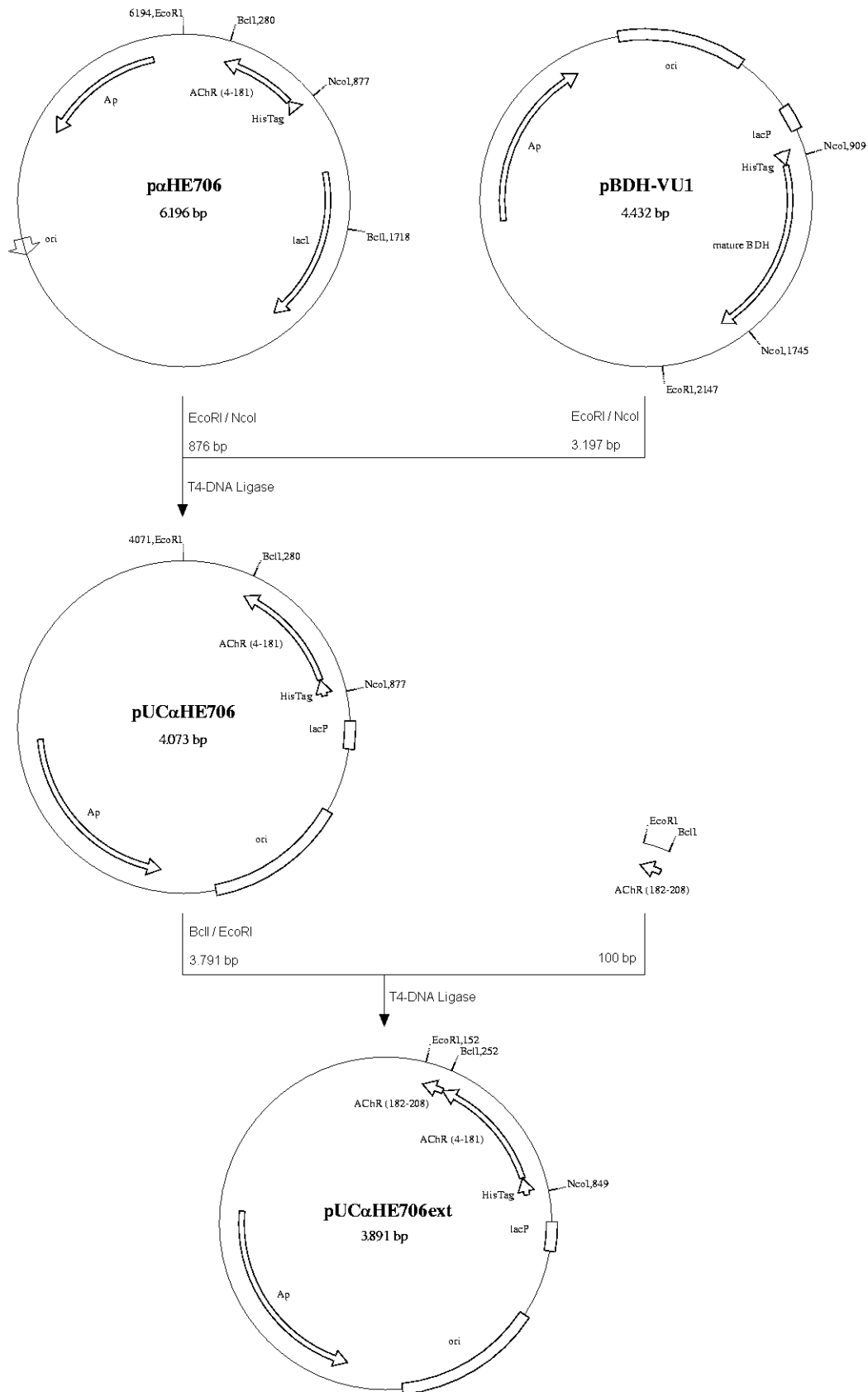


Abb. 5.1.: Synthesestrategie für das Plasmid $p\alpha HE706_{ext}$ (Teil 1): Synthese von $pUC\alpha HE706_{ext}$ durch Umklonieren der DNA-Information für H- α -AChR₄₋₁₈₁ in den Klonierungsvektor $pBDH-VU1$ und Einfügen der DNA-Information für H- α -AChR₁₈₂₋₂₀₈ durch eine 100 bp-Box aus synthetischen Oligonukleotiden.

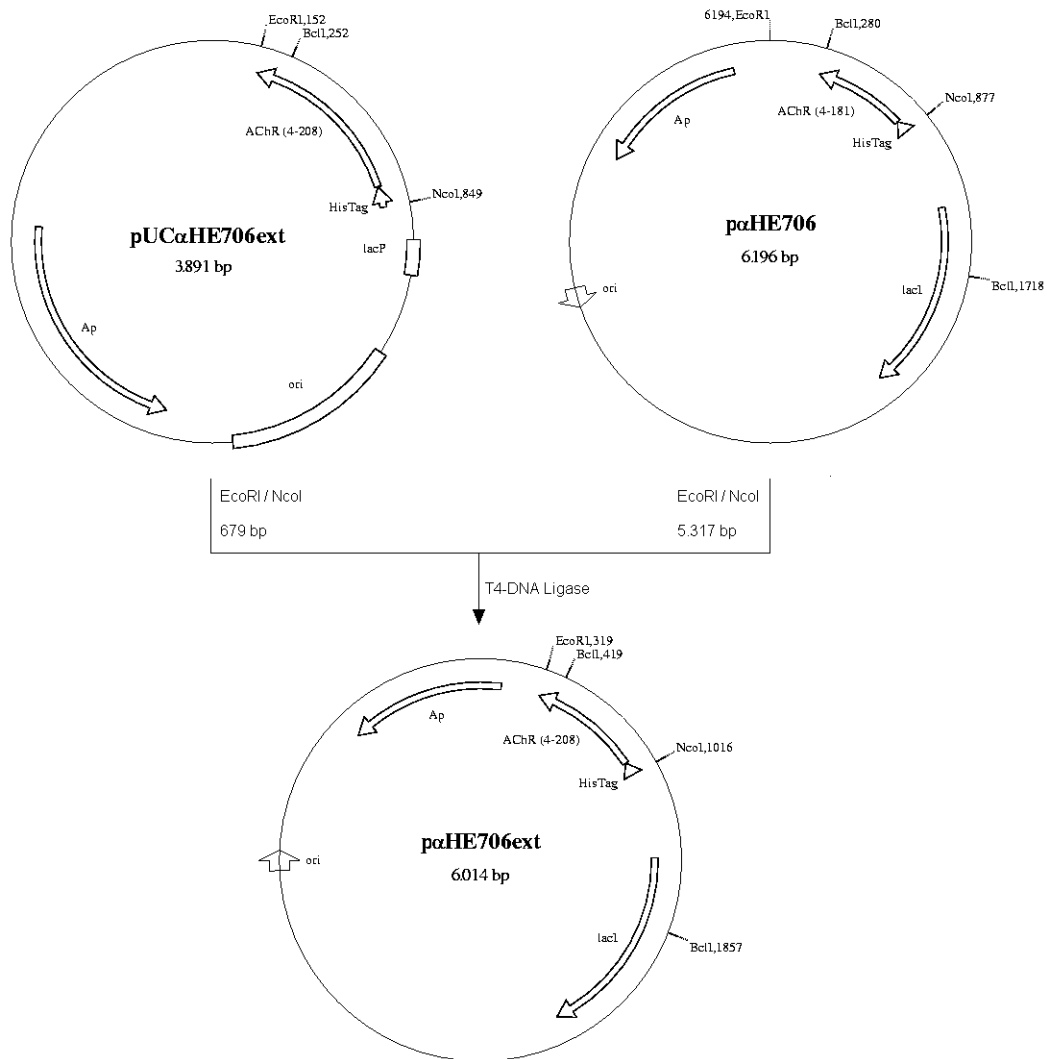


Abb. 5.2.: Synthesestrategie für das Plasmid p α HE706ext (Teil 2): Synthese von p α HE706ext durch Umklonieren der DNA-Information für H- α -AChR₄₋₂₀₈ aus pUC α HE706ext in den Expressionsvektor p α HE706.

5.2. Klonierungsstrategie von p α HE706ext

Die Synthese des Plasmids p α HE706ext sollte nach dem in Abb. 5.1 und 5.2 dargestellten Schema erfolgen. In einem ersten Schritt sollte die Sequenz für den AChR mit den Enzymen *EcoRI* und *NcoI* aus p α HE706 herausgeschnitten und in den, mit den gleichen Enzymen geöffneten, pBDH-VU1-Klonierungsvektor einkloniert werden. pBDH-VU1 eignete sich für diesen Klonierungsschritt besonders, da es sich um ein sog. *high-copy* Plasmid handelte und es außerdem nur eine Schnittstelle für *BclII* besaß. Im nächsten Schritt sollte der erhaltene pUC α HE706-Vektor mit den Enzymen *BclII* und *EcoRI* geöffnet und die aus synthetischen Oligonukleotiden synthetisierte DNA-Sequenz für H- α -AChR₁₈₂₋₂₀₈ einkloniert werden. Aus dem so erhaltenen Vektor pUC α HE706ext sollte anschließend durch Verdau mit *NcoI* und *EcoRI* die DNA-Information für H- α -AChR₄₋₂₀₈ in den Expressionsvek-

tor p α HE706 zurück kloniert werden. Der so synthetisierte Expressionsvektor p α HE706ext sollte schließlich in der Lage sein, das gewünschte Protein zu exprimieren. Zusätzlich verfügte der Vektor über einen N-terminalen HisTag, der die Aufreinigung des Proteins mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie ermöglichen sollte.

5.3. Charakterisierung der Ausgangsvektoren

5.3.1. p α HE706

Um an p α HE706 gentechnische Arbeiten durchführen zu können, musste dessen DNA-Sequenz bekannt sein. Der Vektor wurde uns freundlicherweise von Dr. D. Beeson (Institute of Molecular Medicine, Oxford, England) zur Verfügung gestellt, allerdings ohne genaue DNA-Sequenz-Angaben. Bekannt war allerdings, dass ein kommerziell erhältlicher pet19b-Vektor (Fa. Novagen) zur Synthese verwendet wurde. Im Rahmen ihrer Dissertation wurde der Vektor von Kreilinger zur Kontrolle der AChR-DNA-Information sequenziert (Kreilinger, 2001), allerdings keine komplette Plasmidkarte erstellt.

Durch Auswertung der Sequenzierungsdaten konnte gezeigt werden, dass die Information für H- α -AChR₄₋₁₈₁ über die *Xho*I und *Esp*I (*Bpu*1102I)-Schnittstellen in den pet19b-Vektor inkloniert wurde. Das α -AChR-Insert besaß dabei an seinen Enden Schnittstellen für die Enzyme *Xho*I und *Bpu*10I. Damit ergab sich die in Abb. A.5 dargestellte Plasmidkarte.

Die Charakterisierung von p α HE706 durch Verdau mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen wurde bereits durchgeführt (Hossann, 2001). Sie führte zu Fragmenten mit den nach der neu erstellten Plasmidkarte erwarteten Größen. Somit wurde das Plasmid p α HE706 ausreichend charakterisiert und konnte in gentechnischen Versuchen eingesetzt werden.

5.3.1.1. pBDH-VU1

Der Klonierungsvektor pBDH-VU1 kodierte für den Wildtyp der lecithinabhängigen (R)-3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase (BDH) und wurde von Jehl im Arbeitskreis zu deren Expression eingesetzt (Jehl, 2002). Der Vektor wurde von ihm durch Restriktionsverdau charakterisiert und konnte daher in gentechnischen Versuchen eingesetzt werden. Die Plasmidkarte ist in Abb. A.4 dargestellt und zeigt die für diese Arbeit relevanten Schnittstellen für Restriktionsenzyme.

5.3.2. Synthese von pUC α HE706

Zur Synthese von pUC α HE706 wurden Glycerinkulturen mit BL21(DE3) p α HE706 und DH5 α pBDH-VU1 auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Aus den erhaltenen Einzelkolonien wurden Übernachtkulturen angelegt und daraus am nächsten Tag die Plasmide mit dem QIAprep-Kit (Fa. Qiagen) isoliert. Durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NcoI* erhielt man die gewünschten Fragmente, die auf einem Agarosegel aufgetrennt werden konnten (Abb. 5.3). Mit Hilfe des QIAEX II-Kits (Fa. Qiagen) wurde das 879 bp (p α HE706) und das 3.194 bp (pBDH-VU1) große Fragment aus dem Agarosegel isoliert und mit T4 DNA-Ligase ligiert.

Im folgenden Schritt wurde zur Synthese von pUC α HE706ext das Restriktionsenzym *BclI* benötigt, welches nur die unmethylierte DNA-Sequenz TGATCA erkennt und schneidet. Daher musste das Plasmid pUC α HE706 in einen *E.coli*-Stamm mit der *dam*- Mutation transformiert werden. *E.coli* besitzen zwei spezifische Methylationssysteme für DNA (Marinus und Morris, 1973; May und Hattman, 1975). Die Methylase Dam methyliert spezifisch die N6-Position des Adeninrestes in der Sequenz GATC (Hattman *et al.*, 1978) und verhindert so die Restriktion mit *BclI*. Für die weiteren Versuche eigneten sich GM2163-Zellen, die die Mutation *dam*- tragen und im Arbeitskreis verwendet wurden.

Nach der Inaktivierung der Ligase durch Inkubation bei 65 °C, wurde die Ligationslösung daher in kompetente GM2163 Zellen transformiert. Durch Restriktionsverdau wurden die entstandenen Transformanten charakterisiert (Abb. 5.4). Es wurden die Enzyme *BclI*, *BglII*, *DraII*, *HindIII*, *EcoRI* und *MboII* verwendet. Beim Verdau mit dem Enzym *MboII* war die Zuordnung aufgrund der Verwendung eines 0,9 %igen Agarosegels nur bedingt möglich. Die anderen eingesetzten Enzyme zeigten das erwartete Bandenmuster. Daher konnte vom Vorliegen von pUC α HE706 ausgegangen werden.

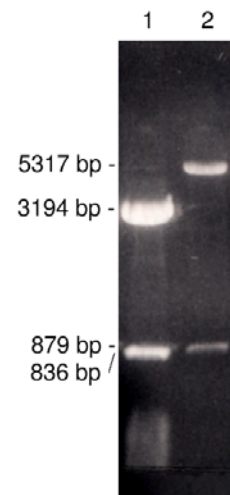
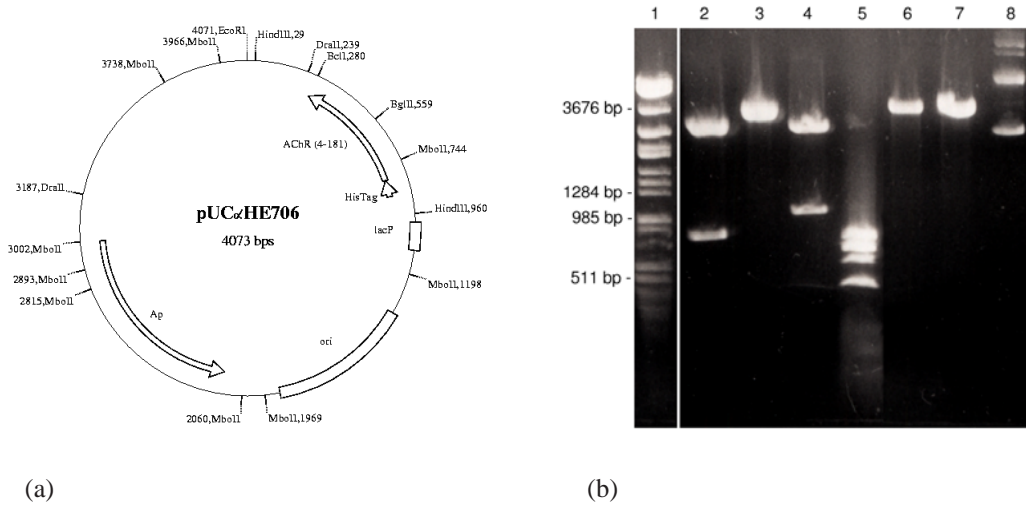


Abb. 5.3.: 0,9 %iges Agarosegel - Verdau der Ausgangsvektoren mit *EcoRI* und *NcoI*; Bahn 1: pBDH-VU1, Bahn 2: p α HE706

5.3.3. Synthese der 100 bp-Box

Die 100 bp-Box (Abb. 5.5 und 5.6), welche die Information für die fehlenden Aminosäuren enthielt, wurde auf zwei verschiedenen Wegen synthetisiert. Es wurden 5 bzw. 2 synthetische Oligonukleotide zusammengefügt. An den Enden dieser 100 bp-Box waren die Basensequenzen für eine *EcoRI* bzw.



<i>BcII</i>	1	4.073
<i>BglIII</i>	1	4.073
<i>DraII</i>	2	2.946, 1.125
<i>EcoRI</i>	1	4.073
<i>HindIII</i>	2	3.142, 931
<i>MboII</i>	9	851, 791, 756, 755, 454, 208[†], 109[†], 78[†], 71[†]

(c)

Abb. 5.4.: Charakterisierung von pUC α HE706 - (a) Plasmidkarte mit den verwendeten Restriktionsenzymen. (b) 0,9%iges Agarosegel: Bahn 1: DNA-Marker λ -DNA AvalI, Bahn 2: HindIII, Bahn 3: BglIII, Bahn 4: DraII, Bahn 5: MboII, Bahn 6: BcII, Bahn 7: EcoRI, Bahn 8: unverdautes Plasmid, (c) Verwendete Restriktionsenzyme mit Anzahl der Schnittstellen (kursiv) und erwartete Größe der Fragmente. Auf dem Agarosegel gefundene Fragmente sind **fett** gedruckt. [†] nicht aufgelöst, nur als verwaschene Bande sichtbar.

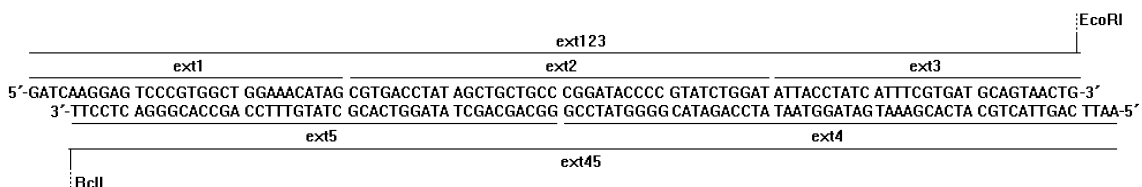


Abb. 5.5.: DNA-Sequenz der 100 bp-Box. Die zur Synthese verwendeten 2 bzw. 5 synthetischen Oligonukleotide sind markiert.

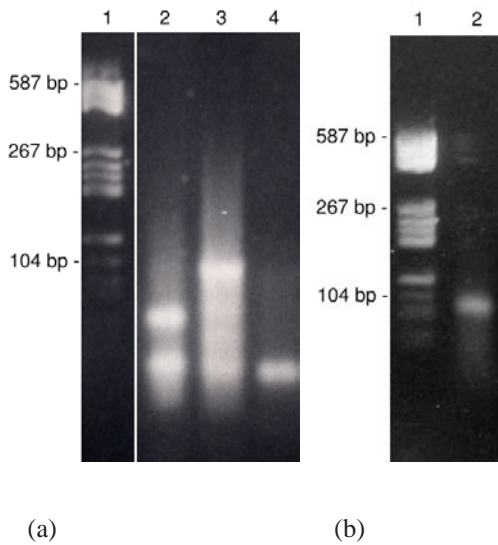


Abb. 5.6: Nachweis der synthetisierten 100 bp-Box durch Agarosegele - (a) 3%iges Agarosegel zum Nachweis der 100 bp-Box synthetisiert aus 5 Oligonukleotiden; Bahn 1: DNA-Marker pBR322 BsuRI, Bahn 2: Annealing der Oligonukleotide ext2, ext3 und ext4, Bahn 3: Annealing der Oligonukleotide ext1 bis ext5 zur 100 bp-Box, Bahn 4: Annealing der Oligonukleotide ext1 und ext5. (b) 2%iges Agarosegel zum Nachweis der 100 bp-Box synthetisiert aus den Oligonukleotiden ext123 und ext45; Bahn 1: DNA-Marker pBR322 BsuRI, Bahn 2: 100 bp-Box.

*Bcl*I-Schnittstelle in Form von überhängende Enden enthalten.

Verwendung von 5 Oligonukleotiden

Die Zusammenlagerung der Oligonukleotide wurde durch zehnmünütige Inkubation bei 70 °C und anschließendem langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur in Annealing-Puffer (100 mM Tris, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, pH 7,5) erreicht. Alle 5 Oligonukleotide (je 200 pmol) wurden zusammen unter diesen Bedingungen inkubiert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Man erhielt in geringer Ausbeute und Reinheit ein 100 bp großes Fragment (Abb. 5.6(a), Bahn 3). Die niedermolekularen Fragmente stammten aus unvollständig zusammengelagerten Oligonukleotiden. Wurden nur die Oligonukleotide ext1 und ext5 (Bahn 4) bzw. ext2, ext3 und ext4 (Bahn 2) umgesetzt, so wurden die entsprechenden niedermolekularen Banden erhalten.

Die so synthetisierte 100 bp-Box konnte allerdings nicht verwendet werden, da die *Eco*RI-Schnittstelle nicht richtig gebildet wurde. Während die Ligation mit T4-DNA-Ligase und einem Fragment mit *Bcl*I-Schnittstelle gelang, konnte die andere Seite der 100 bp-Box nicht ligiert werden (nicht gezeigt).

Verwendung von 2 Oligonukleotiden

Zur Ligation mussten die Oligonukleotide am 5'-Ende phosphoryliert werden. Dazu wurden die Oligonukleotide ext123 und ext45 (je 100 pmol) mit 20 µmol ATP und 10 U T4-Polynukleotid Kinase in T4-Polynukleotid Kinase Puffer für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die beiden Phosphorylierungsansätze wurden zum Annealing der Oligonukleotide vereint und mit 10xAnnealing-Puffer (100 mM Tris, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, pH 7,5) versetzt. Die Lösung wurde 10 Minuten bei 70 °C inkubiert, wodurch auch die T4-Polynukleotid Kinase deaktiviert wurde. Das Zusammenlagern der Oligonukleotide erfolgte beim langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur. Beim Auftragen der Lösung auf ein Agarosegel, fand sich ein einziges Produkt mit der Größe von ca. 100 bp (Abb. 5.6(b),

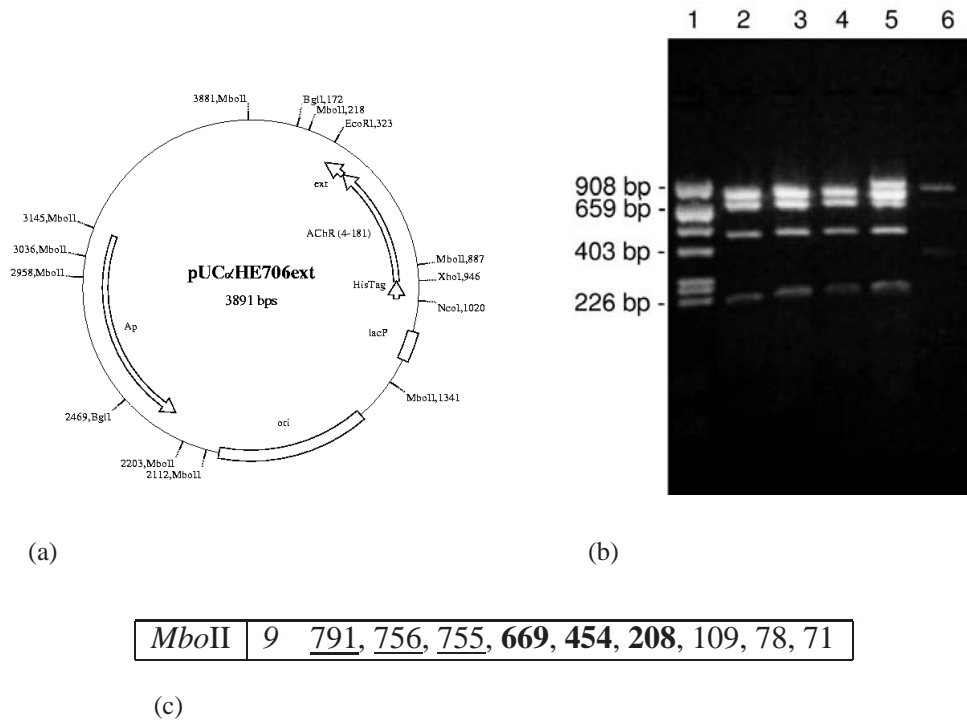
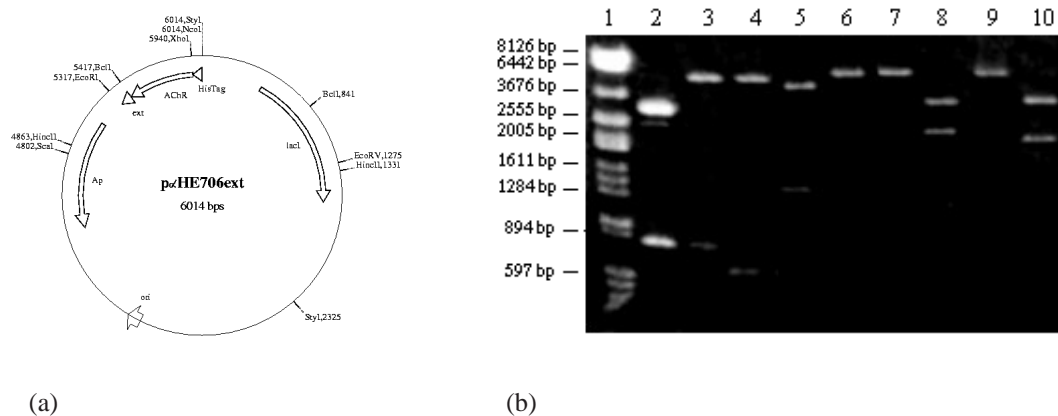


Abb. 5.7.: Charakterisierung von *pUCαHE706ext* durch Verdau mit *MboII* - (a) Plasmidkarte mit den zur Charakterisierung verwendeten Restriktionsenzymen, (b) 2,5 %iges Agarosegel, Bahn 1: DNA-Marker *pBR322/AluI*, Bahn 2-4: *pUCαHE706ext* (Klon 1-3) *MboII*, Bahn 5: *pUCαHE706 MboII*, Bahn 6: *pαHE706 MboII*, (c) Verwendete Restriktionsenzyme mit Anzahl der Schnittstellen (kursiv) und erwartete Größe der Fragmente. Auf dem Agarosegel gefundene Fragmente sind **fett** gedruckt. Fragmente die nicht eindeutig identifiziert werden konnten, sind unterstrichen dargestellt.

Bahn 2). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde, bei den weiteren Versuchen, auf die aus 2 Oligonukleotiden synthetisierte 100 bp-Box zurückgegriffen.

5.3.4. Synthese von *pUCαHE706ext*

Zur Synthese von *pUCαHE706ext* wurde *pUCαHE706* mit den Enzymen *EcoRI* und *BclI* geschnitten. Von den erhaltenen Fragmenten wurde das Größere (3.791 bp) isoliert und mit der 100 bp-Box ligiert. Nach der Transformation in kompetente GM2163 *E.coli*-Zellen erhielt man Transformanden. 10 der Transformanden wurden zur Plasmidisolierung verwendet und diese mittels Restriktionsverdau charakterisiert. 3 Plasmide zeigten das erwartete Bandenmuster, die restlichen Plasmide wurden verworfen. In Abb. 5.7 ist der Verdau von *pUCαHE706ext* mit dem Restriktionsenzym *MboII* dargestellt. Ein Verdau mit den Enzymen *EcoRI*, *NcoI*, *BglII*, *XhoI* wurde ebenfalls durchgeführt und zeigte die erwarteten Bandenmuster (nicht gezeigt). Bis auf die niedermolekularen Fragmente des *MboII*-Verdau, die auf dem 0,9 %igen Agarosegel nicht aufzutrennen waren, fanden sich nur Banden der erwarteten Größen. Die unterstrichenen Fragmente konnten aufgrund der ähnlichen Größe nicht aufgelöst wer-



<i>BclI</i>	2	4.576, 1.438
<i>EcoRI / NcoI</i>	2	5.317, 697
<i>EcoRV</i>	1	6.014
<i>HincII</i>	2	3.532, 2.482
<i>ScaI</i>	1	6.014
<i>StyI</i>	2	3.689, 2.325
<i>XhoI</i>	1	6.014

(c)

Abb. 5.8.: Charakterisierung von $p\alpha HE706ext$ durch Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen - (a) Plasmidkarte mit den zur Charakterisierung verwendeten Restriktionsenzymen. (b) 0,9%iges Agarosegel, Bahn 1: DNA-Marker λ -DNA/Eco47I (AvaII), Bahn 2: $pUC\alpha HE706$ NcoI und EcoRI, Bahn 3: $p\alpha HE706$ NcoI und EcoRI, Bahn 4: EcoRI und NcoI, Bahn 5: BclI, Bahn 6: ScaI, Bahn 7: EcoRV, Bahn 8: HincII, Bahn 9: XhoI, Bahn 10: StyI. (c) Verwendete Restriktionsenzyme mit Anzahl der Schnittstellen (kursiv) und erwartete Größe der Fragmente. Auf dem Agarosegel gefundene Fragmente sind **fett** gedruckt.

den. Zum Vergleich sind der Verdau der Plasmide $pUC\alpha HE706$ (Bahn 5) und $p\alpha HE706$ (Bahn 6) mit *MboII* dargestellt. Das Bandenmuster beim Verdau von $pUC\alpha HE706ext$ und $pUC\alpha HE706$ unterschieden sich in einer einzigen Bande: Die Bande bei 669 bp, die beim Verdau von $pUC\alpha HE706ext$ auftrat, wurde beim Verdau von $pUC\alpha HE706$ durch eine Bande bei 851 bp ersetzt. Die abschließende Charakterisierung von $pUC\alpha HE706ext$ erfolgte durch Sequenzierung. Dabei wurde der Bereich der 100 bp-Box mit Standard-Sequenzierprimern für pUC-Vektoren sequenziert. Es zeigte sich, dass bei allen drei isolierten Klonen die richtige DNA-Sequenz der 100 bp-Box vorlag. Zur Lagerung der Zellen wurden Glycerinkulturen hergestellt.

5.3.5. Synthese von $p\alpha HE706ext$

Der pUC-Klonierungsvektor $pUC\alpha HE706ext$ war für Expressionsversuche nicht geeignet. Daher musste die Information für das verlängerte AChR-Fragment in einen Expressionsvektor einkloniert

werden. Dazu wurde das Fragment mit den Enzymen *NcoI* und *EcoRI* aus dem Plasmid herausgeschnitten und über diese Schnittstellen in den p α HE706-Vektor eingebaut. Nach erfolgter Ligation wurde das Plasmid in kompetente BL21(DE3) *E.coli*-Zellen transformiert, 8 Transformanten gepickt, Übernachtskulturen angelegt und aus diesen Zellen Plasmid isoliert. Sieben Klone zeigten bei einem Restriktionsverdau das erwartete Bandenmuster. Dies ist in Abb. 5.8 für einen Klon dargestellt.

Da die Klonierung mit Hilfe der Enzyme *NcoI* und *EcoRI* erfolgte, wurde zur Kontrolle p α HE706 erneut mit diesen Enzymen verdaut und im Agarosegel aufgetragen (Bahn 3). Der Verdau von p α HE706ext zeigte zwei Banden, wobei die höhermolekulare Bande, wie erwartet, die identischer Größe, wie die 5.317 bp Bande beim Verdau von p α HE706, zeigte. Der Verdau von pUC α HE706 wurde ebenfalls als Vergleich aufgetragen (Bahn 2). Die niedermolekulare Bande ist deutlich größer, als beim Verdau von p α HE706ext. Alle anderen verwendeten Restriktionsenzyme zeigten ebenfalls die erwarteten Banden.

Damit wurde p α HE706ext ausreichend charakterisiert und konnte in Expressionsversuchen eingesetzt werden. Zur Lagerung der Zellen wurden Glycerinkulturen hergestellt.

5.4. Expression und Lyse der Zellen

Das Plasmid p α HE706ext kodierte für den N-terminalen extrazellulären Teil der α -Untereinheit des humanen, nikotinischen Acetylcholinrezeptors mit den Aminosäuren 4 bis 208 (Swiss-Prot P02708, Noda *et al.*, 1983). Während das in p α HE706 kodierte His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₁₈₁ nur die Aminosäuren 4 bis 181 enthielt, besaß His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈ den strukturbildenden *cys-loop* (TYSCCPD). Zur Aufreinigung mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie war ein N-terminaler HisTag mit 10 Histidin-Resten vorhanden, der mit Hilfe von Enterokinase abgespalten werden konnte. Dabei entstand H- α -AChR₄₋₂₀₈ (Abb. 5.9).

Zur Expression wurden Glycerinkulturen von BL21(DE3) p α HE706ext auf LBA-Agarplatten als Verdünnungsausstrich angelegt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde je eine einzelne Kolonie gepickt und damit je 25 ml LBA-Medium angeimpft. Diese Übernachtskulturen wurden bei 37 °C und 300 U/min im Wasserbadschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde die optische Dichte der Kulturen bestimmt. Mit 10 ml der Kultur mit dem höchsten OD_{600nm}-Wert wurden 500 ml LBA-Medium angeimpft und bei 37 °C und 250 U/min im Luftschüttler inkubiert. Zur Wachstumskontrolle wurde die OD_{600nm} stündlich gemessen. Erreichte die Kultur einen Wert zwischen 1 und 1,2, erfolgte die Induzierung mit 1 mM IPTG. Anschließend wurden die Schüttelkulturen unter den gleichen Bedingungen wie zuvor inkubiert. Nach dreistündigem Wachstum wurden die Zellen in ein Eiswasser-Bad gestellt und das Wachstum gestoppt. Durch Zentrifugation bei 6.400 xg gelang die Abtrennung der Zellen vom Nährmedium. Die Zellpellets wurden zweimal mit Pellet-Waschpuffer gewaschen und bis zum Zellaufschluss auf Eis gelagert. Zum Auf-

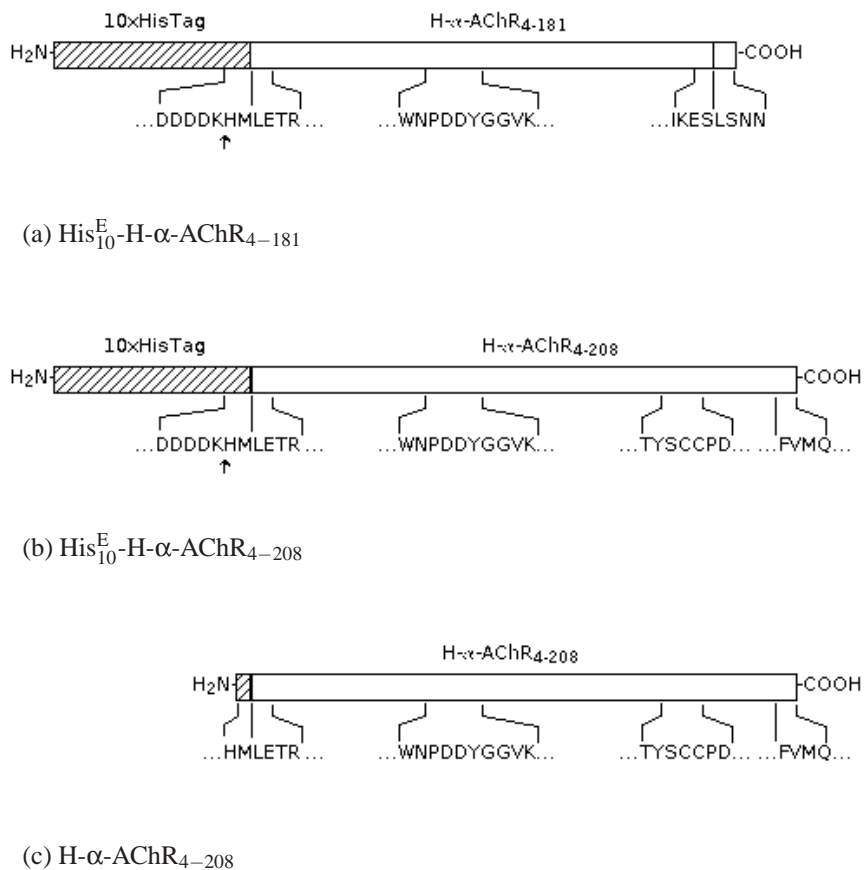


Abb. 5.9.: Primärstruktur der rekombinanten H-α-AChR_{ex}-Fragmente (schematisch) - (a) His₁₀^E-H-α-AChR₄₋₁₈₁ besaß die Aminosäuren 4-181 der α Untereinheit des humanen, nikotinischen AChR (weiß), mit einem N-terminalen 10xHisTag (schraffiert) und einer Enterokinase-Schnittstelle (Pfeil). Die Sequenz enthielt die MIR (WNPDDYGGVK). (b) Das verlängerte Protein His₁₀^E-H-α-AChR₄₋₂₀₈ enthielt zusätzlich den strukturbildenden cys-loop (TYSCCPD). (c) H-α-AChR₄₋₂₀₈: Inkubation von His₁₀^E-H-α-AChR₄₋₂₀₈ mit Enterokinase führte zur Abspaltung des HisTag.

schluss der Zellen wurden diese mit Resuspendierpuffer (20 mM PBS, 500 mM Natriumchlorid, pH 7,4) resuspendiert und mit PMSF-Stammlösung (1 µl/ml) und 1 mg/ml Lysozym versetzt. Nach dreißigminütiger Inkubation wurden die Zellen mit Ultraschall lysiert, bei 30.000 xg dreißig Minuten zentrifugiert und so das Zelllysate von den *inclusion bodies* und Zelltrümmern abgetrennt.

5.5. Aufarbeitung der *inclusion bodies*

Um eine optimale Isolierungsmethode für H-α-AChR₄₋₂₁₀ zu finden, wurden die folgenden Versuche mit NiCAM-Säulenmaterial (Fa. Sigma) im Batchverfahren durchgeführt. Das Säulenmaterial ermöglichte eine Isolation im kleinem Maßstab und im Batch-Verfahren. Außerdem tolerierte es bis zu 20 mM Mercaptoethanol und eignete sich dadurch besonders zur Aufreinigung von Proteinen aus

inclusion bodies.

Die *inclusion bodies* wurden mit denaturierendem Puffer (6 M Guanidin-hydrochlorid, 500 mM Natriumchlorid, 50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 20 mM Imidazol, 1 mM Mercaptoethanol, pH 8) resuspendiert und über Nacht unter leichtem Rühren inkubiert. Nach dreißigminütiger Zentrifugation (30.000 xg) erhielt man die gelösten *inclusion bodies* im Überstand. Die Lösung wurde ultrazentrifugiert (400.000 xg, 4 °C, 60 Minuten) und der Überstand direkt auf das Säulenmaterial aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden durch Denaturierungspuffer entfernt und die gebundenen Proteine mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen (100, 200, 500 mM) im Denaturierungspuffer eluiert. Bereits bei der Inkubation mit 100 mM Imidazol wurde der größte Teil der gebundenen Proteine eluiert. Die Untersuchung der Fraktionen in der SDS-PAGE ergab, dass kein Protein mit der erwarteten Molekularmasse von ca. 27 kD an die Säule gebunden hatte (nicht gezeigt).

5.6. Aufarbeitung des Zellüberstandes mit Nickel-Affinitätschromatographie

In Vorversuchen wurden Proteine mit der für His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈ erwarteten Molekularmasse von ca. 27 kD im Zellysate gefunden (nicht gezeigt). Zur Untersuchung, ob sich His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈ möglicherweise im Zellysate befand, wurden 1,5 ml (ca. 10 mg) des in der Ultrazentrifuge zentrifugierten Zellysates auf 50 μ l Säulenmaterial (Bindungskapazität ca. 20-25 mg Protein/ml Säulenmaterial) aufgetragen und eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde das Säulenmaterial abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Anschließend wurde 4 bis 6 mal mit je 1 ml Resuspendierpuffer gewaschen, um alle ungebundenen Proteine zu entfernen.

5.6.1. Versuche zur Elution mit Imidazol

Zur Elution der gebundenen Proteine wurden Puffer mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen verwendet. Puffer mit 100 und 500 mM Imidazol wurden nacheinander auf die Säule gegeben. In beiden Fraktionen konnten Proteine eluiert werden. In Abb. 5.10 ist das SDS-Gel und der ELISA der Säulenfraktionen dargestellt.

Im ELISA zeigte nur die Elutionsfraktion mit 500 mM Imidazol, bei Verwendung von Anti-His und konformationsabhängigen mAb 35 Antikörpern (α -AChR, human, native MIR), eine deutliche Reaktion. Dies ließ auf die erfolgreiche Expression von nativem His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈ schließen. Die leicht positive Reaktion des Durchlaufs war auf eine unvollständige Bindung von H- α -AChR₄₋₂₀₈ zurückzuführen. In der entsprechenden Fraktion im SDS-PAGE (Abb. 5.10, Bahn 3) waren allerdings eine große Zahl von Proteinen zu sehen. Ein Protein der gesuchten, berechneten Molekularmasse von 27 kD, war in der Fraktion, die mit 500 mM Imidazol eluiert wurde, zu finden.

In einem Western Blot der Säulenfraktionen mit Anti-His-Tag Antikörpern zeigte sich beim Zellysate

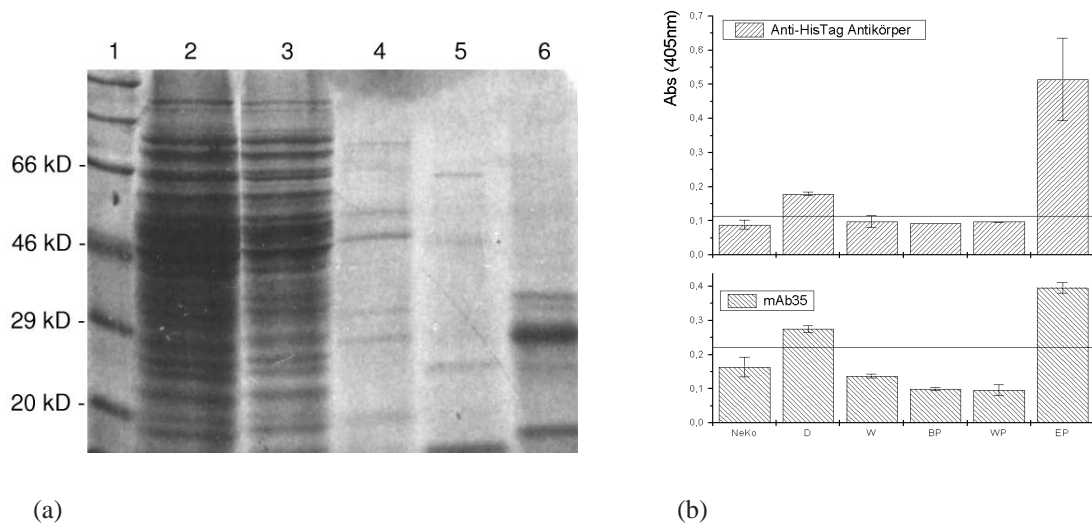


Abb. 5.10.: Isolierungsversuch von $\text{His}_{10}^E\text{-H-}\alpha\text{-AChR}_{4-208}$ durch Elution mit Imidazol - (a) SDS-PAGE (12 %iges Trenngel, Silberfärbung) der Säulenfraktionen, Bahn 1: Proteinmarker, Bahn 2: Zelllysat (80 μg), Bahn 3: Durchlauf (80 μg), Bahn 4: Durchlauf (20 μg), Bahn 5: Elution mit 100 mM Imidazol (20 μg), Bahn 6: Elution mit 500 mM Imidazol (20 μg) - (b) ELISA der Säulenfraktionen mit mAb 35 (1:1000) und Anti-HisTag Antikörpern (1:1000), Durchlauf und Waschfraktion (20 μg), Elution mit 100 und 500 mM Imidazol (2 μg), als Negativkontrolle wurde BSA (5 μg) verwendet.

eine sehr schwache Reaktion im Bereich zwischen 20-30kD mit einer breiten Bande (nicht gezeigt). Möglicherweise eigneten sich die Antikörper nicht für den im Protein vorliegenden HisTag, da es sich nicht um einen 6x, sondern um einen 10xHisTag handelte. Ein Western Blot mit den im ELISA positiv reagierenden mAb 35 war nicht möglich, da es sich um einen konformationsabhängigen Antikörper handelte, der nur native Antigene erkennt.

5.6.2. Versuche zur Elution mit Enterokinase

Da eine Isolierung durch die Elution mit Imidazol scheiterte, sollte das Protein durch direkte Abspaltung des HisTag mit Enterokinase von der Säule eluiert werden. Enterokinase ist eine Endoprotease, welche die Aminosäuresequenz AspAspAspAspLys erkennt und C-terminal des Lys eine Peptidbindung spaltet.

Das Säulenmaterial wurde wie oben beschrieben mit dem Zelllysat beladen und so lange mit Resuspendierpuffer gewaschen bis keine ungebundenen Proteine mehr im Säulenmaterial vorlagen. Anschließend wurde mit 1 ml Enterokinasepuffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Calciumchlorid, pH 7,4) equilibriert. Da durch den Pufferwechsel die Bindungseigenschaft des Säulenmaterials verändert werden könnte, wurde überprüft, ob Protein von der Säule eluiert wurde. In einer Proteinbestimmung konnte kein Protein detektiert werden. Anschließend wurde das Säulenma-

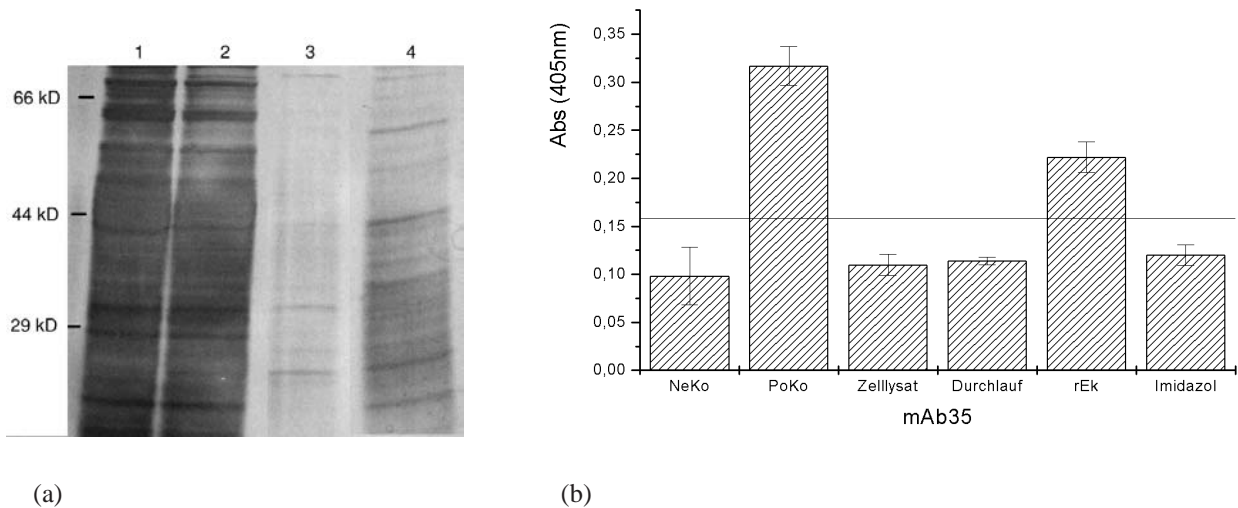


Abb. 5.11.: Isolierungsversuch von H- α -AChR₄₋₂₁₀ durch Elution mit Enterokinase - (a) SDS-PAGE (12 %iges Trenngel, Silber-Färbung) der Säulenfraktionen, Bahn 1: Zelllysate (70 μ g), Bahn 2: Durchlauf (70 μ g), Bahn 3: Elutionsfraktion mit Enterokinase (7 μ g), Bahn 4: Elutionsfraktion mit 500 mM Imidazol (17 μ g) - (b) ELISA der Säulenfraktionen mit mAb 35 Antikörpern (1:1000), Zelllysate (10 μ g), Durchlauf (10 μ g), Fraktion eluiert mit Enterokinase (rEk, 2 μ g), Fraktion eluiert mit 500 mM Imidazol (Imidazol, 2 μ g), Negativkontrolle BSA (5 μ g).

terial mit 100 μ l Enterokinasepuffer und 1 μ l rekombinanter Enterokinase (1,7 U/ μ l) für 19 Stunden bei 20 °C im Wasserbad inkubiert und die Elutionsfraktion durch Zentrifugation gesammelt. Zum Entfernen aller weiteren gebundenen Proteine wurde das Säulenmaterial schließlich mit 500 mM Imidazol inkubiert und die restlichen Proteine eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden durch Lowry, ELISA und SDS-PAGE charakterisiert. Bei der Abspaltung des HisTag durch die Enterokinase verringerte sich die berechnete Molekularmasse von H- α -AChR₄₋₂₀₈ auf ca. 24,2 kDa. Im SDS-PAGE war in der Fraktion, die mit Enterokinase eluiert wurde, ein Protein mit der Molekularmasse von ca. 26 kD neben zwei höhermolekularen Verunreinigungen zu sehen (Abb. 5.11, Bahn 3). Die Konzentration der eluierten Fraktion lag bei 0,11 mg/ml. In der Fraktion, die mit 500 mM Imidazol von der Säule eluiert wurde, war eine große Anzahl verschiedenster Proteine zu sehen (Bahn 4).

5.6.3. Filtration mit Amicon Ultra-Konzentratoren (MWCO 30.000)

Bei der Elution mit Enterokinase zeigten sich vor allem höhermolekulare Verunreinigungen. Durch eine Filtration durch eine Polymermembran mit einem Ausschlussvolumen von 30 kD, sollte es möglich sein, die Verunreinigungen abzutrennen. Für diesen Zweck wurden Amicon Ultra Konzentratoren (MWCO 30.000) verwendet. Die Proteinlösung wurde eingefüllt und bei 3.291 xg durch die Membran zentrifugiert. Eine Analyse des Filtrats mit Hilfe von Lowry und SDS-PAGE zeigte, dass das gewünschte 24 kD große Protein die Membran nicht passiert hatte (nicht gezeigt).

5.7. Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Plasmid p α HE706, welches für H- α -AChR_{4–181} kodiert, um die DNA-Information für H- α -AChR_{182–208} erweitert und erfolgreich exprimiert. Dabei konnte zum ersten Mal ein α -AChR_{ex}-Fragment nach der Expression in *E.coli* nativ im Zelllysate nachgewiesen werden.

Die Expression von α -AChR_{ex}-Fragmenten in *E.coli* ist bekannt (Schrattenholz *et al.*, 1998; Alexeev *et al.*, 1999; Tsouloufis *et al.*, 2000). Allerdings lag in allen beschriebenen Isolierungen das gewünschte Protein in *inclusion bodies* vor und musste denaturierend aufgearbeitet werden. Die Expression in CHO K1 Zellen (West jr. *et al.*, 1997) und *Xenopus* Eizellen (Wells *et al.*, 1998) führte zwar zu nativ gefalteten, löslichen Proteinen, allerdings in geringen Ausbeuten und Konzentrationen. Für Kopplungs- und Kristallisationsexperimente waren diese Isolierungen nicht geeignet. In Tab. 5.2 ist ein Vergleich der bisher beschriebenen Expressionen mit dem hier exprimierten α -AChR_{ex}-Fragment aufgeführt.

Klonierung

In einem ersten Schritt musste eine Plasmidkarte für den Ausgangsvektor p α HE706 erstellt werden, um gentechnische Arbeiten durchführen zu können. Dazu wurden die Sequenzierungsdaten von Kreilinger (Kreilinger, 2001), die Ergebnisse des Restriktionsverdau des Vektors (Hossann, 2001) und die Angaben von Dr. D. Beeson ausgewertet. Es stellte sich heraus, dass die Information für H- α -AChR_{4–181} über die *Xho*I und *Esp*I (*Bpu*1102I)-Schnittstellen in den pet19b-Vektor inkloniert wurde. Die im Restriktionsverdau gefundenen Fragmente bestätigten die neu erstellte Plasmidkarte.

Unter Berücksichtigung der Aminosäuresequenz für H- α -AChR (Swissprot P02708) wurden synthetische Oligonukleotide herausgesucht, welche, nach erfolgter Zusammenlagerung zu einer 100 bp-Box, die DNA-Information für H- α -AChR_{182–208} bildeten. Mit Hilfe des in den Abb. 5.1 und 5.2 dargestellten Klonierungsschemas, gelang die Synthese eines Expressionsplasmids für His₁₀^E-H- α -AChR_{4–208}. Es enthielt zusätzlich die DNA-Information für einen N-terminalen 10xHisTag und eine Schnittstelle für Enterokinase.

Eine Verlängerung des Gens für den extrazellulären Teil der α -Untereinheit des nikotinischen AChR von den Aminosäuren 4-181 auf 4-208 ließ aus mehreren Gründen eine erfolgreiche native Isolierung von H- α -AChR_{ex} erwarten. Neben den strukturbildenden Cys-Resten der Aminosäuren 192/193 (Brejic *et al.*, 2001), war auch der komplette N-terminale extrazelluläre Teil enthalten. Chavez und Hall bestimmten durch die Klonierung und Expression von Chimärenrezeptoren, dass α 207 noch aus der Membranoberfläche herausragt (Chavez und Hall, 1992). Durch ELISA mit konformationsabhängigen Antikörpern und einem α -Bungarotoxin-Bindungsassay zeigten Im *et al.*, das ein H- α -AChR_{1–210}-Fragment eine deutlich nativere Struktur ausbildet, als ein H- α -AChR_{1–205}-Fragment (Im *et al.*, 2000).

Tab. 5.1: Vergleich der aus den SDS-Gelen bestimmten Molekularmassen (M_{SDS}) mit den aus den Aminosäuresequenzen berechneten Molekularmassen ($M_{kalk.}$). [†] (Schrattenholz et al., 1998), [‡] (Hossann, 2001)

	$M_{kalk.}$ (Da)	M_{SDS} (kDa)
His ₁₀ ^E -H- α -AChR ₄₋₂₀₈	26.817,3	27,6
H- α -AChR ₄₋₂₀₈	24.159,6	26,0
T- α -AChR ₁₋₂₀₉	24.796,3 [†]	26,0 [‡]

Isolierung mit Nickel-Affinitätschromatographie

Durch eine Analyse des Zelllysates und der *inclusion bodies* mit Hilfe einer SDS-PAGE, wurde deutlich, dass His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈ nach der Expression im Zelllysate vorlag. Nur dort konnte ein Protein mit der gesuchten Molekularmasse von ca. 27 kD nachgewiesen werden. Zur Isolierung wurde das Zelllysate auf mit Nickel-Ionen beladenes NiCAM Säulenmaterial aufgetragen und im Batch-Verfahren eluiert. Bei der Elution mit steigender Imidazol-Konzentration konnte das gewünschte Protein isoliert werden, allerdings mit einer großen Anzahl von weiteren höher- und niedermolekularen Proteinen verunreinigt. Die Elution mit Enterokinase lieferte H- α -AChR₄₋₂₀₈ in größerer Reinheit, allerdings immer noch durch zwei weitere höhermolekulare Proteine verunreinigt. Möglicherweise kam es zu einer unspezifischen Spaltung höhermolekularer Peptide aufgrund der langen Inkubationsdauer. Eine Datenbanksuche nach *E.coli*-Proteinen mit Schnittstellen für Enterokinase führte allerdings zu keinem positiven Ergebnis. Durch Optimierung der Aufreinigung sollte allerdings eine Isolierung von nicht verunreinigtem H- α -AChR₄₋₂₀₈ möglich sein. Ein zusätzlicher Waschschritt mit Imidazolkonzentrationen um 200 mM könnte die Menge der unspezifisch gebundenen Proteine reduzieren und die Spezifität der Enterokinase-Reaktion erhöhen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt. In Tab. 5.1 sind die aus den SDS-Gelen bestimmten Molekularmassen mit den aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekularmassen gezeigt. Die Masse von H- α -AChR₄₋₂₀₈ stimmte mit der für T- α -AChR₁₋₂₀₉ bestimmten Masse überein (Hossann, 2001).

Faltung

Überraschenderweise fand sich das exprimierte His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈ nativ im Zelllysate und nicht in den *inclusion bodies*. Die native Faltung von His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈ bzw. H- α -AChR₄₋₂₀₈ ließ sich mit Hilfe eines ELISA mit mAb 35 Antikörpern nachweisen. Diese konformationsabhängigen Antikörper erkennen nur die nativ gefaltete MIR und ergaben eine deutlich positive Reaktion. Die Schnittstelle für Enterokinase in His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈ war intakt, da die Abspaltung des HisTag direkt auf der Säule gelang. Untersuchte man die Säulenfraktionen beider Isolationsmethoden im ELISA, so fand sich bei der Elution mit Imidazol das His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈-Fragment in der Fraktion, die mit 500 mM Imidazol eluiert wurde. Bei der Untersuchung der Fraktionen der Enterokinaseelution befand sich H- α -AChR₄₋₂₀₈ ausschließlich in der Fraktion, die mit Enterokinase eluiert wurde. Die restlichen, noch gebundenen Proteine wurden danach mit 500 mM Imidazol von der Säule eluiert und zeigten im ELISA keine Reaktion.

Literatur	H- α -AChR ₄₋₂₀₈	H- α -AChR ₄₋₁₈₁	M- α -AChR ₁₋₂₁₀	T- α -AChR ₁₋₂₀₉	T- α -AChR ₁₋₂₀₉	H- α -AChR ₁₋₂₀₇	M- α -AChR ₁₋₂₁₁	AChBP
	(Hossann, 2001)	(West jr. et al., 1997)	(Schraattenholz et al., 1998)	(Alexeev et al., 1999)	(Tsolouloufis et al., 2000)	(Yao et al., 2002)	(Brejc et al., 2001)	
Expression	human	human	Maus	<i>Torpedo californica</i>	<i>Torpedo californica</i>	human	Maus	<i>Lymnaea stagnalis</i>
Ursprung	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Xenopus</i> Eizellen	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>	Hefe (<i>Pichia pastoris</i>) löslich	Hefe (<i>Pichia pastoris</i>) löslich
Wirt	löslich	i.b.	löslich	i.b.	i.b.	i.b.	löslich	löslich
Ausbeute (mg/l Schüttelkultur)	n.g.	n.g.	µg Maßstab	k.A.	ca. 10	ca. 10	3	k.A.
Tag	N-terminal 10xHis	N-terminal 10xHis	GPI-Anker		C-terminal 6xHis	N-terminal 6xHis	N-terminal FLAG + C-terminal His	FLAG
max. Konzentration (mg/ml)	0,1	n.g.	0,2	10 / 0,2 [†]	k.A.	0,04	30	20
Struktur								
M_{ber.} (Da)	26.817,3	23.987,0	k.A.	24.796,3	29.380	k.A.	k.A.	24.649
M_{exp.} (kD)	27,6	24,5	31,5	26 / 26,0 [†]	29,568	k.A.	31	26.544 (MALDI)
Glykosylierung	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	ja
Bildung von Oligomeren	ja	n.g.	nein	k.A. / ja [†]	Dimer (MS) / Oligomer (HPLC)	k.A.	Monomer	Pentamer
CD Spektren, α-Helix (%)	n.g.	n.g.	12	15	35 ¹ /36 ²	n.g.	14	n.g.
β-Faltblatt (%)	n.g.	n.g.	51	45	56 ¹ /32 ²	n.g.	46	n.g.
β-Schleife (%)	n.g.	n.g.	18	k.A.	0 ¹ /20 ²	n.g.	21	n.g.
random coil (%)	n.g.	n.g.	20	k.A.	10 ¹ /11 ²	n.g.	19	n.g.
α-Bgtx-Bindung, K_D (nM)	n.g.	n.g.	3	4	141	sehr schwach ³	0,2	3,5
ELISA / Immunpräzipitation	+	-	+	n.g. / - [†]	n.g.	+	+	n.g.
mAb 35-Bindung								

Tab. 5.2.: Vergleich von H- α -AChR₄₋₂₀₈ mit den in der Literatur beschriebenen Expressionen von α -AChR_{ex}-Fragmenten; Verwendete Abkürzungen: i.b.: inclusion bodies, GPI: Glykophosphatidylinositol, +: positiv, -: negativ, n.g.: nicht getestet, k.A.: keine Angabe. [†] (Hossann, 2001), ¹Tris-HCl-Puffer (pH 8), ²PBS-Puffer (pH 7,3), 0,2% SDS, ³H-AChR bindet α -Bgtx um eine Größenordnung schwächer als T-AChR (Vincent et al., 1998).

Die Versuche der nativen Isolierung von H- α -AChR_{ex}-Fragmenten im Arbeitskreis schlug bisher fehl (Rousselle, 1996; Kreilinger, 2001). Die erfolgreiche Expression von His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₁₈₁ konnte zwar massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Hossann, 2001), doch konnte das Fragment nicht rückgefaltet werden. Das Fehlen des *cys-loop* bei den Aminosäuren 192/193 wurde als mögliche Ursache diskutiert. Die bisher in der Literatur beschriebenen Expressionen von α -AChR_{ex}-Fragmenten in *E.coli* führten jeweils zur Bildung von *inclusion bodies*, obwohl in allen Isolierungen der *cys-loop* vorlag. Tsouloufis *et al.* konnten dabei die gewünschten Fragmente nur in Konzentrationen um 40 μ g/ml isolieren. Das uns von Schrattenholz zur Verfügung gestellte T-AChR₁₋₂₀₉-Fragment war, entgegen der in der Literatur angegebenen Konzentration von 10 mg/ml (Schrattenholz *et al.*, 1998), nur bis Konzentrationen von 0,2 mg/ml stabil (Hossann, 2001).

Da His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈ nativ isoliert werden konnte, enthielt es alle Aminosäuren, die für die korrekte Faltung des Proteins notwendig waren. Proteine falten sich aufgrund der Wechselwirkung einer kleinen Anzahl von Schlüsselresten, um die sich die übrige Struktur verdichtet (Fersht, 2000; Dobson, 2003). Bei Proteinen mit mehr als 100 Aminosäuren erfolgt die Faltung über Intermediate und auch unabhängig in einzelnen Domänen (Sanchez und Kiefhaber, 2003; Roder und Colon, 1997). Der Ausschluss von Wasser aus dem Kern des neu gefalteten Proteins ist der letzte Schritt der Faltung (Cheung *et al.*, 2002).

Bildung von Oligomeren

Die Abtrennung höhermolekularer Verunreinigungen, durch die Verwendung von Amicon Ultra Konzentratoren mit einer Membran, die nur Proteine unter 30 kD durchließen, scheiterte. Ursache könnte die Bildung von Oligomeren des H- α -AChR₄₋₂₀₈ gewesen sein. Die Bildung von Oligomeren bei T- α -AChR₁₋₂₀₉ wurde bereits gezeigt (Hossann, 2001). Auch beim AChBP wurde eine Oligomerenbildung gefunden. Wurde es in Hefe rekombinant exprimiert und unter nativen Bedingungen chromatographisch untersucht, so eluierte es als lösliches Protein mit einer Molekularmasse von ca. 160 kD (Smit *et al.*, 2001). In der Röntgenstrukturanalyse zeigte sich die Bildung von Homopentameren (Brejc *et al.*, 2001). Die Bildung von Homo- und Heteropentameren bei neuronalen AChR wurde sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* gezeigt (Drisdell und Green, 2000; Green, 1999).

Die native Faltung von H- α -AChR₄₋₂₀₈ war erst durch die zusätzlichen Aminosäuren möglich. Diese bilden in der Struktur des AChBP ein β -Faltblatt (Brejc *et al.*, 2001), welches möglicherweise bei der Ausbildung der oligomeren Struktur beteiligt ist. Durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen solchen Strukturen könnte die native Faltung des Proteins begünstigt werden. Strukturelle Monomere von oligomeren Proteinen besitzen in freier Form eine andere Struktur als im Gesamtprotein (Jaenicke und Rudolph, 1986; Bennett und Huber, 1984). Sie falten sich erst in Gegenwart der anderen Unterheiten richtig. Dies liegt daran, dass sich die Umgebungen in beiden Formen stark unterscheiden können. Ein Abschirmung von hydrophoben Oberflächenstrukturen in oligomeren Proteinen erhöht deutlich deren Faltungseffizienz (Jaenicke und Rudolph, 1986).

6. Isolierung von His₆^(T)-Gelonin₁₋₂₄₆-H- α -AChR₄₋₁₈₁

6.1. Aufgabenstellung

Li gelang die Synthese eines Expressionsvektors für ein His₆^(T)-Gelonin₁₋₂₄₆-H- α -AChR₄₋₁₈₁-Fusionsprotein, sowie die anschließende Expression in *E.coli* und Aufreinigung durch klassische Chromatographiemethoden (Li, 2002). Das Protein lag nach der Expression in *inclusion bodies* vor und musste denaturierend aufgearbeitet werden. Bei der Rückfaltung durch Verdünnung in Renaturierungspuffer aggregierten bis zu 90 % der Proteine und es kam zu erheblichen Proteinverlusten. Die Aufreinigung mit Größenausschluss- und Ionenaustauscherchromatographie ergab reines Protein, unter hohem materiellem Aufwand und Ausbeuteverlust.

Die Klonierung der Information für das Fusionsprotein in den käuflich erhältlichen pET28a-Vektor (Fa. Novagen) führte zu der Frage, warum der im Vektor kodierte N-terminale HisTag nicht zur Aufreinigung verwendet wurde. Dieser ermöglicht eine Isolierung mit Hilfe von Nickel-Affinitätschromatographie. Daher sollte die Klonierungsstrategie von Li überprüft werden. War der HisTag vorhanden, sollte das Fusionsprotein mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt, der HisTag abgespalten und das Protein mit Hilfe von SDS-PAGE, Western Blot, ELISA und Toxizitätstest charakterisiert werden.

Das Fusionsprotein konnte aufgrund des Fehlens eines S2-Labors nicht exprimiert werden. Li gelang die Expression des Fusionsproteins mit dem Expressionsvektor pET-GA in BL21(DE3) Zellen, im Rahmen ihrer Dissertation an der Shanxi-University, Taiyuan, China. Zur Untersuchung der Isolationsmethode wurden uns die *inclusion bodies* und vorgereinigtes Fusionsprotein zur Verfügung gestellt. Li lysierte nach der Expression die Zellen durch Lysozym und mit Ultraschall. Sie trennte die *inclusion bodies* und Zelltrümmer durch Zentrifugation von den löslichen Proteinen und wusch das Pellet mehrmals mit B-Per-Reagenz. Anschließend konnte sie die *inclusion bodies* in 6 M Guanidin-hydrochlorid, 20 mM Tris, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, pH 8 lösen und von den unlöslichen Zelltrümmern durch Zentrifugation abtrennen.

6.2. Untersuchung der Klonierungsstrategie von Li

Der letzte Schritt der Klonierung des Fusionsproteins erfolgte durch Öffnen eines käuflich erhältlichen pET28a-Vektors (Fa. Novagen) und des Klonierungsvektors pGel-AChR, der die Information für das

pET 28a (NdeI geschnitten):

```

    _NcoI_                               _NdeI_
    ...ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATAGCAGCGGCTGGTGCCGCGGGCAGCCA
      MetGlySerSerHisHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySer
      ----- HisTag -----
  
```

pGelAChR (NdeI geschnitten):

```

    _NdeI_
    TATGGGCTGGATACCGTG...
      MetGlyLeuAspThrVal...
      - Fusionsprotein -
  
```

pET-GA (ligiert):

```

                                _NdeI_
    ...CATCATAGCAGCGGCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGGGCTGGATACCGTGAGCTTCAGC...
      HisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySerHisMetGlyLeuAspThrValSerPheSer
  
```

Abb. 6.1.: Klonierung der DNA-Information für das Fusionsprotein in den pET28a-Vektor über die NdeI Schnittstelle. Dabei wurde die DNA-Sequenz für das Fusionsprotein C-Terminal an die DNA-Sequenz des HisTag in den Vektor pET28a einkloniert.

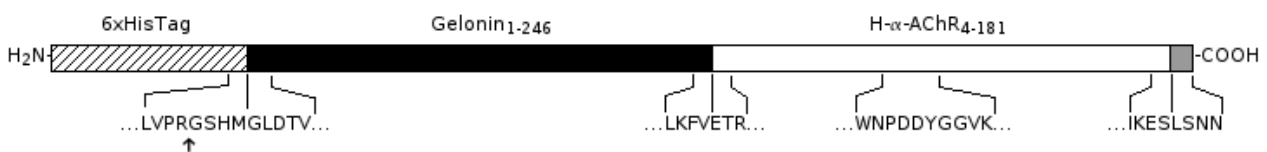


Abb. 6.2.: Das His₆^(T)-Gelonin₁₋₂₄₆-H- α -AChR₄₋₁₈₁-Fusionsprotein enthält eine am C-Terminus um 5 Aminosäuren verkürzte Form von Gelonin (schwarz), welches an den N-Terminus eines Fragmentes des extrazellulären Teils der α -Untereinheit des nikotinischen AChR (weiß) gekoppelt wurde. Die Sequenz enthält die MIR (WNPDDYGGVK). N-terminal wurde ein 6xHisTag fusioniert (schraffiert), der über eine Schnittstelle für Thrombin verfügte (Pfeil). Die 4 Aminosäuren LSNN am C-Terminus gehören zum Vektor (grau).

Fusionsprotein enthielt. Dabei wurden die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *NdeI* verwendet (Li, 2002). In Abb. 6.1 ist dieser Schritt für die *NdeI* Schnittstelle dargestellt. Es war zu erkennen, dass die DNA-Information für das Fusionsprotein C-terminal an die DNA-Sequenz für den HisTag in den Vektor pET28a einkloniert wurde. Das exprimierte Protein sollte daher über einen N-terminalen HisTag verfügen, der die Isolierung des Proteins mittels Nickel-Affinitätschromatographie ermöglichen würde.

Die im Anhang dargestellte Plasmidkarte (Abb. A.7) wurde auf Grundlage der Klonierungsinformation von Li erstellt und konnte nicht durch den Verdau des Vektors mit Hilfe von Restriktionsenzymen bestätigt werden. Das Projekt wurde als S2 eingestuft und es stand kein geeignetes S2-Labor zur Kultivierung von pET-GA in *E.coli* zur Verfügung. Die Primärsequenz des Fusionsproteins ist schematisch in Abb. 6.2 dargestellt. Das H- α -AChR₄₋₁₈₁-Fragment war an den C-Terminus des Gelonin₁₋₂₄₆-Fragmentes fusioniert. Die C-terminalen Aminosäuren LSNN gehörten zum Vektor. Zur Aufreinigung des Fusionsproteins war ein N-terminaler HisTag mit 6 Histidin-Resten und einer Schnittstelle für Thrombin fusioniert. Das H- α -AChR₄₋₁₈₁-Fragment enthielt die MIR, allerdings fehlte der strukturbildende *cys-loop*, der die native Expression von H- α -AChR₄₋₂₀₈ ermöglichte (Kap. 5).

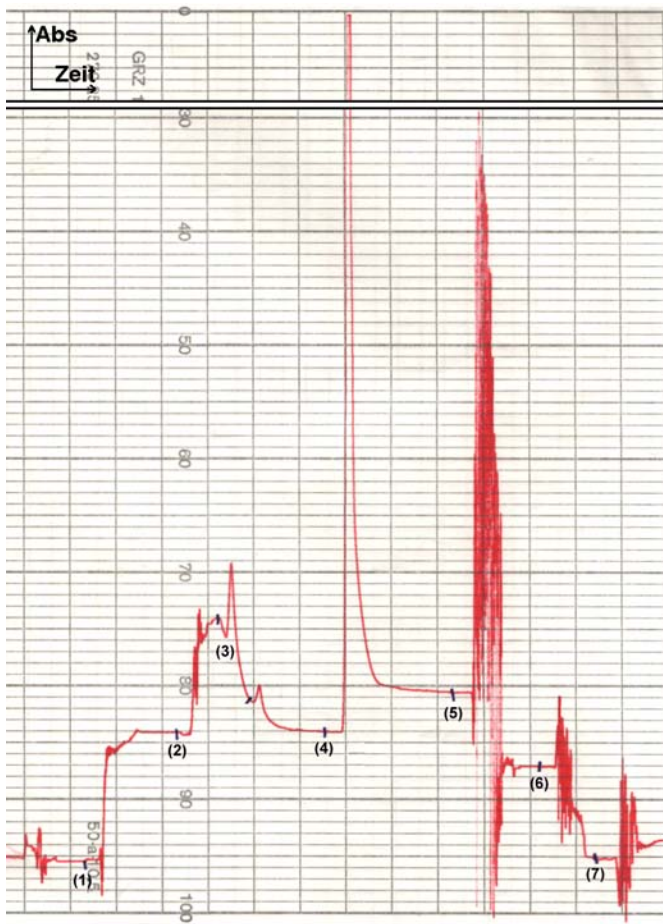


Abb. 6.3: Elutionsdiagramm einer Fusionsprotein-Isolierung aus den vorgereinigten inclusion bodies. Aufgezeichnet wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm. - (1) Denaturierungspuffer zum Equilibrieren der Nickel-Affinitätssäule. (2) Proteinlösung. (3) Denaturierungspuffer zum Entfernen ungebundener Proteine. (4) Elutionspuffer zur Elution des Fusionsproteins. (5) Regenerierungspuffer. (6) Wasser zum Entfernen aller Pufferbestandteile. (7) 20% Ethanol zum Lagern der Säule bei Raumtemperatur.

6.3. Isolierung

6.3.1. Aufreinigung des vorgereinigten Fusionsproteins

Li reinigte die gelösten *inclusion bodies* durch Größenausschlusschromatographie an Sephacryl S-200 Säulen. Die Fraktionen mit dem Fusionsprotein wurden uns von ihr zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung gestellt.

Vor dem Beladen der HiTrap Chelating Affinitätssäule, musste zum vorgereinigten Fusionsprotein festes Natriumchlorid und Imidazol zugegeben werden, dass eine Konzentration von 0,5 M bzw. 20 mM vorlag. Natriumchlorid unterdrückte die Ionenaustauschereigenschaften des Säulenmaterials, und das Imidazol verhinderte, in dieser Konzentration, die unspezifische Bindung eines Teils der Proteine. Die Proteinlösung wurde steril filtriert und auf die mit Nickel-Ionen beladene und mit Denaturierungspuffer (6 M Guanidin-hydrochlorid, 0,5 M Natriumchlorid, 20 mM Tris-HCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) equilibrierte HiTrap Chelating Affinitätssäule aufgetragen. Nachdem nicht gebundene Proteine mit Denaturierungspuffer von der Säule gewaschen wurden, konnte mit Imidazol-haltigem Elutionspuffer (6 M Guanidin-hydrochlorid, 0,5 M Natriumchlorid, 500 mM Tris-HCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) das Fusionsprotein von der Säule eluiert werden. Durch eine Proteinbestimmung wurde

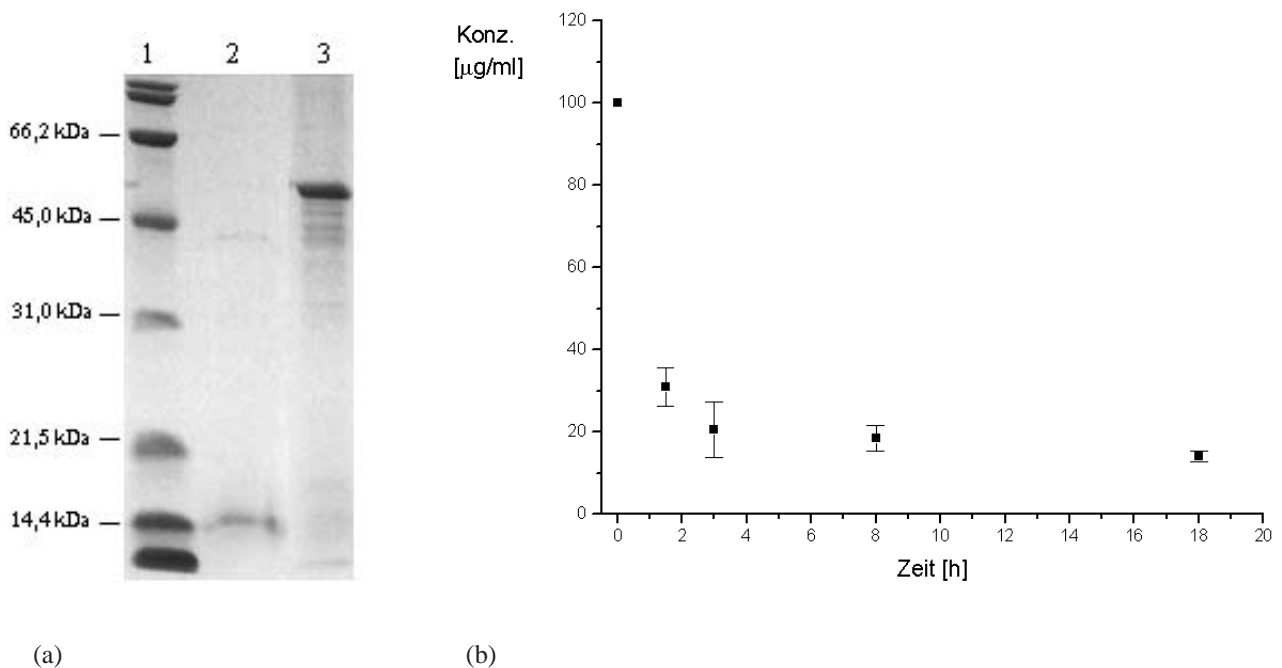


Abb. 6.4.: SDS-PAGE der Säulenfraktionen und zeitlicher Verlauf der Renaturierung - **(a)** SDS-PAGE (12%iges Trenngel), Bahn 1: Proteinmarker, Bahn 2: Durchlauf (5 µg), Bahn 3: Eluat (15 µg), **(b)** Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung des Fusionsproteins. Die Konzentration entspricht den in löslicher Form vorliegenden Proteinen.

festgestellt, dass alle Proteine quantitativ von der Säule eluiert werden konnten. Der Reinheitsgrad des eluierten Fusionsproteins wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE überprüft (Abb. 6.4(a)). Nur das gewünschte Fusionsprotein war in der Elutionsfraktion enthalten.

6.3.2. Rückfaltung des Fusionsproteins

Methode nach Li

Da das Fusionsprotein unter denaturierenden Bedingungen aufgearbeitet werden musste, lag es nach der Isolierung in inaktiver, ungefalteter Form vor. Die Renaturierung erfolgte nach der Vorschrift von Li, bei der das gereinigte Fusionsprotein (ca. 0,5 - 1,5 mg/ml) durch Zugabe von Renaturierungspuffer I (20 mM Tris, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 2 mM GSH, 0,2 mM GSSG, pH 8) auf 100 µg/ml verdünnt, kurz gevortext und dann 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die bei der Renaturierung ausgefallenen, falsch-gefalteten Proteinaggregate wurden bei 4.166 xg abzentrifugiert und es wurde das nativ gefaltete Protein im Überstand mit einer Konzentration von ca. 10 µg/ml erhalten. Der Erfolg der Renaturierung zeigte sich im ELISA mit konformationsabhängigen mAb 35 und polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern (Tab. 6.1).

	Renaturierungspuffer I (5 mM DTT)		Renaturierungspuffer II (0 mM DTT)	
	Abs _{405nm}	B	Abs _{405nm}	B
mAb 35 Antikörper (native MIR, 1:4000)				
His ₆ ^(T) -Gelolin ₁₋₂₄₆ -H- α -AChR ₄₋₁₈₁	0,399 ± 0,240	+	0,430 ± 0,168	+
T-AChR	0,104 ± 0,071	+	0,797 ± 0,400	+
BSA	0,036 ± 0,006	-	0,046 ± 0,024	-
anti-Gelolin (polyklonal, 1:2000)				
His ₆ ^(T) -Gelolin ₁₋₂₄₆ -H- α -AChR ₄₋₁₈₁	0,272 ± 0,004	+	0,323 ± 0,013	+
Gelolin	0,737 ± 0,058	+	0,496 ± 0,093	+
BSA	0,083 ± 0,050	-	0,060 ± 0,047	-

Tab. 6.1.: ELISA zum Vergleich der verschiedenen Renaturierungsmethoden durch Verwendung verschiedener Puffer; Renaturierungspuffer I (20 mM Tris, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 2 mM GSH, 0,2 mM GSSG, pH 8), Renaturierungspuffer II (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM GSH, 0,2 mM GSSG, pH 8); His₆^(T)-Gelolin₁₋₂₄₆-H- α -AChR₄₋₁₈₁ (2 μ g), T-AChR (5 μ g), Gelolin (5 μ g), Rinderserumalbumin (BSA, 5 μ g), Abs_{405nm}: Absorbtion bei 405 nm, B: Bewertung.

Rückfaltung ohne DTT im Puffer

Da bei der Rückfaltung nur ca. 10 % des Fusionsproteins renaturiert werden konnten, sollte die Methode zur Verbesserung der Ausbeute optimiert werden. In einem ersten Versuch wurde die Renaturierung ohne DTT im Puffer durchgeführt. DTT ist in der Lage Disulfidbrücken im Protein zu reduzieren und wird daher bei der Rückfaltung von Proteinen eingesetzt, die keine Disulfidbrücken in der nativen Form besitzen (Rudolph und Lilie, 1996). Bei Proteinen mit Disulfidbrücken, wie beim Fusionsprotein, sollte daher das System aus oxidiertem und reduziertem Glutathion (GSSG/GSH) zum Herstellen der richtigen Disulfidkombination im Protein ausreichen.

Die Verdünnung des gereinigten Fusionsproteins mit Renaturierungspuffer II (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM GSH, 0,2 mM GSSG, pH 8) auf 100 μ g/ml, Inkubation für 24 Stunden bei Raumtemperatur und Zentrifugation, ergab eine Ausbeute des Fusionsproteins im Überstand von 22-27 μ g/ml. Der Erfolg der Renaturierung wurde im ELISA mit den konformationsabhängigen mAb 35 Antikörpern ersichtlich (Tab. 6.1). Die nach beiden Methoden rückgefalteten Fusionsproteinproben zeigten eine deutlich positive Reaktion.

Recycling der ausgefallenen Proteinaggregate

Auch bei der verbesserten Renaturierungsmethode fielen noch 70-75 % des Fusionsproteins als falschgefaltete Aggregate aus. Diese wurden durch Zentrifugation vom nativ gefalteten Fusionsprotein abgetrennt und erneut in Denaturierungspuffer (5 M Guanidin-hydrochlorid, 20 mM Tris-HCl, 0,5 M Natriumchlorid, pH 8,0) aufgenommen. Zum Auflösen der bei der Renaturierung gebildeten Disulfidbrücken wurde von einer 1 M DTT-Stammlösung zugegeben, bis eine Konzentration von 30 mM

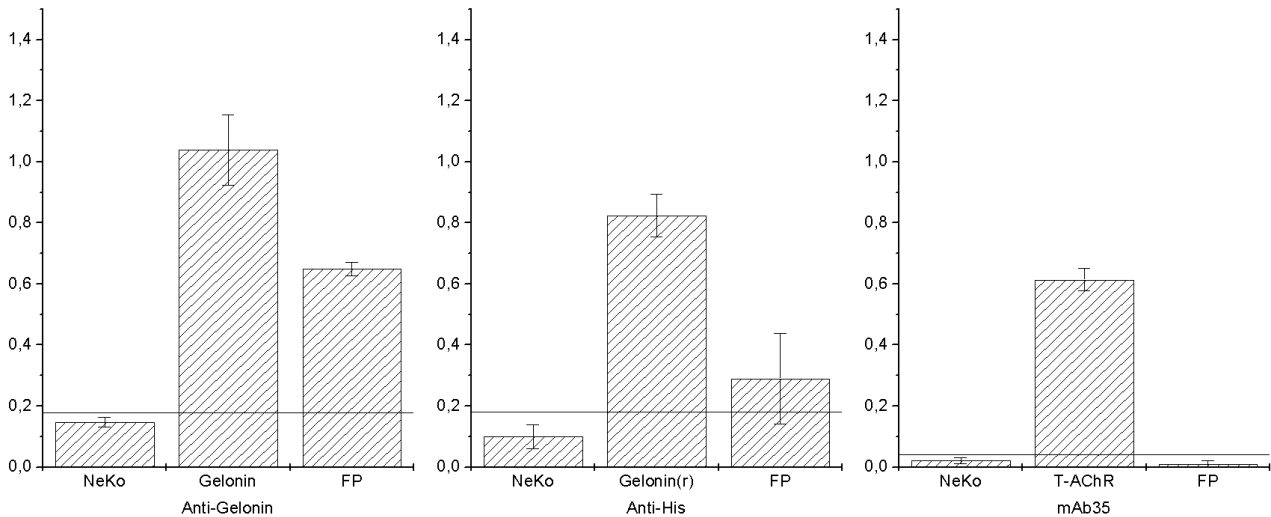


Abb. 6.5.: ELISA des Fusionsproteins (FP) nach der Renaturierung in PBS-Puffer. Die verwendeten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde Rinderserumalbumin verwendet, alle Proben enthielten 5 μ g Protein.

erreicht war. Nach einer vierundzwanzigstündigen Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren, war das Fusionsprotein denaturiert und konnte einer erneuten Rückfaltung unterzogen werden. Das Recycling der ausgefallenen Proteinaggregate war zwei bis dreimal möglich. Danach ließen sich die Proteinaggregate nicht mehr lösen. Bei der Renaturierung des nach dieser Methode wieder verwerteten Fusionsproteins wurde dieses in den gleichen Ausbeuten wie bei der ersten Renaturierung erhalten. Mit dem Einsatz dieser Methode ließ sich die Ausbeute an Fusionsprotein deutlich erhöhen.

Renaturierung des Fusionsproteins in PBS-Puffer

Es sollte untersucht werden, ob das Fusionsprotein auch in physiologischem PBS-Puffer (130 mM Natriumchlorid, 4,5 mM di-Natriumhydrogenphosphat, 2,5 mM Natriumdihydrogenphosphat, pH 7,2) stabil war, um die Ratten bei der Therapie mit dem Fusionsprotein nicht übermäßig zu belasten. Dazu wurde mit Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigtes Fusionsprotein in PBS-Renaturierungspuffer mit oxidiertem und reduziertem Glutathion (130 mM Natriumchlorid, 4,5 mM di-Natriumhydrogenphosphat, 2,5 mM Natriumdihydrogenphosphat, 4 mM GSH, 0,4 mM GSSG, pH 7,2) renaturiert. Die löslichen Proteine wurden von den falsch gefalteten Proteinaggregaten durch Zentrifugation abgetrennt. Die Ausbeute an löslichem Protein betrug dabei 15 %. Die Lösung konnte auf eine maximale Konzentration von 85 μ g/ml aufkonzentriert werden. Bei Versuchen eine höhere Konzentration zu erreichen, kam es zu einem Verlust des größten Teils des Proteins.

Die Charakterisierung des rückgefalteten Proteins erfolgte mit einem ELISA, unter Verwendung von polyklonalen Anti-Gelonin, Anti-HisTag und mAb 35 Antikörpern (Abb. 6.5). Das Fusionsprotein zeigte nur mit den polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern eine deutlich positive Reaktion. Die Anti-HisTag Antikörper reagierten nur sehr schwach, während die konformationsabhängigen mAb 35 An-

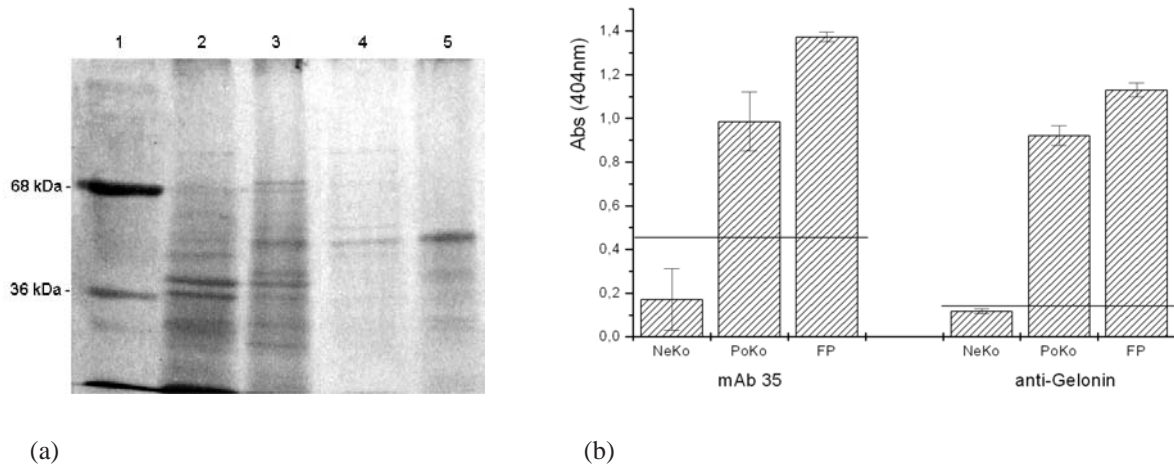


Abb. 6.6.: *Isolierung und Charakterisierung des Fusionsproteins aus den inclusion bodies - (a) SDS-PAGE (10%iges Trenngel) der Aufreinigung mit Nickel-Affinitätschromatographie; Bahn 1: Proteinmarker, Bahn 2: gelöste inclusion bodies (40 µg), Bahn 3: Durchlauf (40 µg), Bahn 4: Waschfraktion mit 100 mM Imidazol (40 µg), Bahn 5: Elutionsfraktion mit 500 mM Imidazol (20 µg), (b) ELISA mit mAb 35 (1:500) und polyklonalen-anti-Gelonin Antikörpern (1:1000) zum Nachweis der nativen Struktur des Fusionsproteins (FP, 4 µg). Als Positivkontrolle diente T-AChR (mAb 35, 20 µg) bzw. natürliches Gelonin (polyklonale Anti-Gelonin Antikörper, 2 µg), als Negativkontrolle wurde BSA (10 µg) verwendet.*

tikörper gar nicht mit dem Fusionsprotein reagierten. Die MIR lag nicht richtig gefaltet vor, somit gelang eine Renaturierung in PBS-Puffer nicht.

6.3.3. Isolierung aus *inclusion bodies*

Da die Verwendung einer Größenausschlusschromatographie zur Vorreinigung zeitaufwendig war, wurde untersucht, ob das Fusionsprotein auch direkt aus den *inclusion bodies* mit Hilfe der Nickel-Ionen Affinitätschromatographie isoliert werden konnte.

Dazu wurden die *inclusion bodies* in Denaturierungspuffer (5 M Guanidin-hydrochlorid, 0,5 M Natriumchlorid, 20 mM Tris-HCl, 20 mM Imidazol, pH 8) gelöst und mit der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt auf die mit Nickel-Ionen beladene und mit Denaturierungspuffer equilibrierte HiTrap Chelating Affinitätssäule aufgetragen. Nach dem Spülen der Säule mit Denaturierungspuffer zum Entfernen von ungebundenen Proteinen, wurden unspezifisch gebundene Proteine mit Waschpuffer (Denaturierungspuffer mit 100 mM Imidazol) eluiert. Das Fusionsprotein konnte anschließend mit Elutionspuffer (Denaturierungspuffer mit 500 mM Imidazol) von der Säule eluiert werden.

Alle Fraktionen des Säulenganges wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 6.6). Man erkannte deutlich den Erfolg der Isolierung. Während im Durchlauf (Bahn 3) nahezu kein Fusionsprotein

vorhanden war, fand es sich in der Wasch- und Elutionsfraktion. In der Waschfraktion befand sich allerdings neben dem Fusionsprotein noch eine große Menge weiterer Proteine. Die Elutionsfraktion enthielt das Fusionsprotein neben zwei niedermolekularen Verunreinigungen, die nicht abgetrennt werden konnten. Das so isolierte Fusionsprotein wurde direkt einer Renaturierung unterzogen und der Erfolg mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Dabei zeigte die Fraktion mit dem Fusionsprotein sowohl mit den anti-Gelonin, als auch mit den mAb 35 Antikörpern eine stark positive Reaktion (Abb. 6.6(b)). Eine Aufkonzentration des Fusionsproteins bis auf 0,15 mg/ml war möglich.

6.4. Versuche zur Abspaltung des HisTag

Wie His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ besaß das Fusionsprotein eine Schnittstelle für Thrombin, um die Abspaltung des HisTag zu ermöglichen. Das frisch zurückgefaltete und aufkonzentrierte Fusionsprotein (0,1 mg/ml) wurde dazu mit Thrombin (0,14 U) für 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Trug man die Lösung zusammen mit ungeschnittenem Fusionsprotein auf ein SDS-Gel auf, so war kein Masseunterschied zu erkennen (nicht gezeigt). Daraus konnte geschlossen werden, dass die Abspaltung nicht erfolgreich war. Da sich im Puffer nach der Renaturierung immer noch ca. 0,3 M Guanidinhydrochlorid befand, sollte dessen mögliche Hemmwirkung auf Thrombin mit einem Testprotein untersucht werden.

6.4.1. Einfluss von Guanidin-hydrochlorid auf Thrombin

Als Testprotein eignete sich His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁, da die benötigten Bedingungen zur Abspaltung des HisTag bereits ermittelt waren (Kap. 4.5.2). Zur Untersuchung wurden jeweils 15 μ g des rekombinanten Gelonins mit 56 mU Thrombin bei unterschiedlichen Guanidin-hydrochlorid-Konzentrationen im Puffer eingesetzt. Die Lösungen wurden für 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, die Proteine durch Trichloressigsäure gefällt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die prozentuale Menge an geschnittenem Gelonin wurde durch densitometrische Analyse des SDS-Gels bestimmt (Abb. 6.7). Bis zu einer Konzentration von 250 mM Imidazol entfernte Thrombin ungehindert den HisTag von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁. Bei einer Konzentration von 1 M Guanidin-hydrochlorid wurden immer noch knapp 37 % geschnitten. Da nach der Renaturierung das Fusionsprotein in Puffern mit Guanidin-hydrochlorid-Konzentrationen unter 1 M vorlag, sollte zumindest ein Teil des Fusionsproteins geschnitten werden.

Möglicherweise lag eine Mutation in der Erkennungssequenz von Thrombin im Protein vor. Aufgrund der Einstufung als S2-Projekt, war allerdings keine Sequenzierung des Expressionsvektors pET-GA möglich. Eine weitere Möglichkeit war die sterische Hinderung der Thrombin-Schnittstelle. Dies sollte in einem weiteren Versuch untersucht werden.

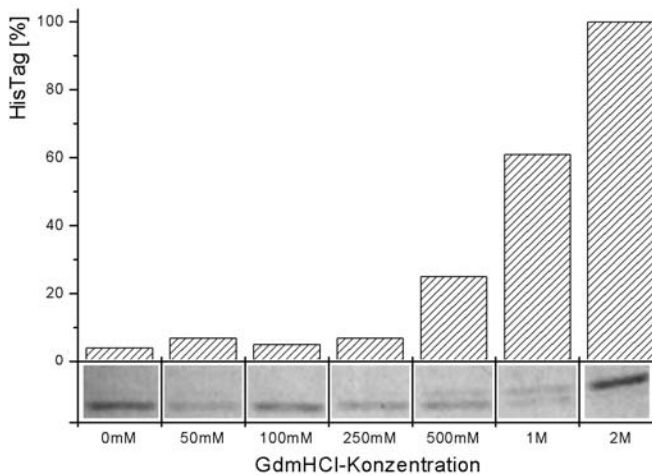


Abb. 6.7: Bestimmung der Hemmwirkung von Thrombin bei verschiedenen Guanidin-hydrochlorid-Konzentrationen im Reaktionspuffer. Die Werte wurden durch densitometrische Analyse des SDS-Gels bestimmt. Pro Bahn wurden $15\ \mu\text{g}$ His₆^T-Gelonin_{1–251} aufgetragen.

6.4.2. Bestimmung der sterischen Zugänglichkeit des HisTag

Denaturiertes Fusionsprotein band an immobilisierte Nickel-Ionen. Da sich der HisTag nach einer Renaturierung nicht abspalten lies, lag dieser möglicherweise für Thrombin unzugänglich vor. Daher sollte untersucht werden, ob der HisTag auch nach einer Renaturierung noch an, auf einer HiTrap Chelating Affinitätssäule, immobilisierten Nickel-Ionen binden konnte. Dazu wurde renaturiertes Fusionsprotein in Bindungspuffer (0,3 M Guanidin-hydrochlorid, 0,5 M Natriumchlorid, 100 mM Tris, pH 8) auf eine mit Nickel-Ionen beladene HiTrap-Chelating Affinitätssäule aufgetragen. Die Säule wurde nach dem Entfernen aller ungebundenen Proteine mit Elutionspuffer (Bindungspuffer mit 200 mM Imidazol) inkubiert. Die aufgefangenen Fraktionen wurden mit Lowry und SDS-PAGE untersucht. Nur eine geringe Proteinmenge band an die HiTrap Chelating Affinitätssäule. In der entsprechenden Fraktion war auf dem SDS-Gel kein Fusionsprotein zu erkennen. Wurde der Durchlauf durch die Säule untersucht, so befand es sich in dieser Fraktion (nicht gezeigt).

Offensichtlich war der N-terminale HisTag im Fusionsprotein sterisch gehindert oder nicht an der Oberfläche des Proteins lokalisiert. Dies war aufgrund seiner Polarität erstaunlich. Im rekombinanten Gelonin, das den gleichen N-terminalen HisTag besaß, lag dieser in nativer Form zugänglich an der Oberfläche des Proteins vor. Da der HisTag am Fusionsprotein nicht abgespalten werden konnte, ließ sich dessen Einfluss auf die Toxizität des Fusionsproteins nicht bestimmen.

6.5. Charakterisierung

6.5.1. Western Blot

Mit einem Western Blot sollte untersucht werden, ob die Bande bei ca. 51 kD auf dem SDS-Gel immunologisch als His₆^T-Gelonin_{1–246}-H- α -AChR_{4–181}-Fusionsprotein nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden die Proteine vom SDS-Gel durch Elektrophorese auf eine Nitrozellulose-Membran

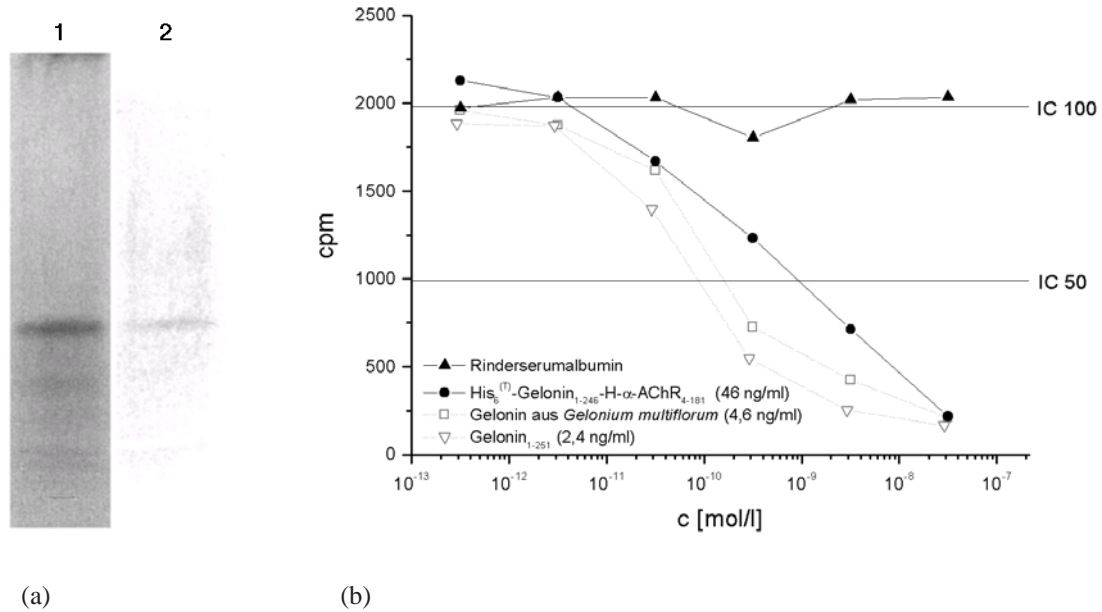


Abb. 6.8.: Charakterisierung des Fusionsproteins. (a) Western Blot des Fusionsproteins mit polyklonalen Anti-Gelonin-Antikörpern (1:1000), Bahn 1: SDS-PAGE (5 μ g), Bahn 2: Western Blot (5 μ g). (b) Toxizitätstest des Fusionsproteins im Vergleich mit natürlichem und rekombinantem Gelonin (Gelonin₁₋₂₅₁). Als Negativkontrolle diente Rinderserumalbumin. (IC100 = 1.981 cpm, IC50 = 991 cpm).

übertragen und die Membran mit polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern behandelt. In Abb. 6.8(a) ist die Färbung der ca. 51 kD großen Bande zu erkennen. Damit konnte diese eindeutig als His₆^T-Gelonin₁₋₂₄₆-H- α -AChR₄₋₁₈₁-Fusionsprotein nachgewiesen werden. Ein Western Blot mit Anti-His Antikörpern schlug fehl. Die Antikörper reagierten nur sehr schwach mit dem Fusionsprotein (nicht gezeigt). Ein Western Blot mit mAb 35 Antikörpern gegen die α -Untereinheit des AChR war nicht möglich, da diese konformationsabhängigen Antikörper nur die nativ gefaltete MIR erkennen.

6.5.2. Toxizitätstest

Wie in Kap. 4.6.3 beschrieben, wurde ein Toxizitätstest mit dem Fusionsprotein durchgeführt. Nur wenn das Fusionsprotein toxische Eigenschaften besitzen würde, wäre ein Einsatz in der antigenspezifischen Immunsuppression sinnvoll. Sollte sich das Fusionsprotein nicht toxisch genug zeigen, so müsste in den *in vivo* Versuchen eine sehr hohe Dosis gegeben werden.

Der Toxizitätstest wurde mit Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-7,5}$ bis $1 \cdot 10^{-12,5}$ mol/l durchgeführt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit 6 Proben angesetzt. Als Negativkontrolle diente Rinderserumalbumin (BSA). Für das Fusionsprotein konnte eine Toxizität von 46 ng/ml ermittelt werden (Abb. 6.8(b)). Zum Vergleich sind die Messwerte von natürlichem und rekombinantem Gelonin eingezeichnet. Deutlich erkennt man die geringere Toxizität des Fusionsproteins.

6.6. Diskussion

Isolierung

Nach der Expression lag das Fusionsprotein in Form von unlöslichen *inclusion bodies* vor. Diese wurden mit Hilfe von Guanidin-hydrochlorid gelöst. Guanidin-hydrochlorid eignet sich besonders für das Denaturieren von unlöslichen Proteinaggregaten, da in konzentrierter Lösung keine oder nur wenige Elemente der Sekundärstruktur übrig bleiben (Tanford *et al.*, 1966). Auf die Verwendung von Harnstoff als denaturierendes Mittel wurde aufgrund der möglichen, kovalenten Modifizierung von Amino- und Thiolgruppen in Proteinen verzichtet (Stark *et al.*, 1960).

Das Fusionsprotein ließ sich aus den gelösten *inclusion bodies* durch Nickel-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen isolieren. Dazu wurde die HiTrap Chelating Affinitätsäule mit Nickel-Ionen beladen, mit Denaturierungspuffer equilibriert und die gelösten *inclusion bodies* direkt auf die Säule aufgetragen. Durch die Verwendung von Puffern mit steigender Imidazolkonzentration konnte das Fusionsprotein erhalten werden. Dennoch ließ sich das Fusionsprotein nicht von allen Verunreinigungen abtrennen. Auf dem SDS-Gel konnten zwei niedermolekulare Proteine schwach detektiert werden. Mit Hilfe dieser Methode konnte His₆^(T)-Gelonin₁₋₂₄₆-H- α -AChR₄₋₁₈₁ allerdings in hoher Ausbeute isoliert werden. Durch Verwendung eines einzigen Säulenschritts konnte auch der Zeitaufwand im Vergleich mit der Methode von Li erheblich reduziert werden.

Wurde eine Vorreinigung durch Größenausschlusschromatographie verwendet, dann traten keine sichtbaren Verunreinigungen auf dem SDS-Gel auf. Allerdings war dies mit einem großen materiellen Aufwand und Verlust an Fusionsprotein verbunden. Aufgrund der begrenzten, zur Verfügung stehenden Menge an Fusionsprotein, wurde zur Isolierung auf die Nickel-Affinitätschromatographie direkt aus den gelösten *inclusion bodies* zurückgegriffen und die Verunreinigungen toleriert.

Rückfaltung

Das das Fusionsprotein unter denaturierenden Bedingungen isoliert werden musste, war eine Rückfaltung in die native Form notwendig. Eine Renaturierung des Fusionsproteins gelang bei Raumtemperatur durch eine Verdünnung mit Renaturierungspuffer auf eine Konzentration von 100 μ g/ml. Durch den Verzicht von DTT im Renaturierungspuffer konnte die Ausbeute an Fusionsprotein deutlich erhöht werden. DTT ist in der Lage, Disulfidbrücken zu reduzieren und wird daher nur bei der Rückfaltung von Proteinen ohne Disulfidbrücken in der nativen Struktur eingesetzt (Rudolph und Lilie, 1996). Die Ausbildung der richtigen Disulfidbrücken-Bindungen wurde durch ein System aus oxidiertem und reduziertem Glutathion (GSSG/GSH) erreicht. Allerdings konnten pro Renaturierungsschritt nur ca. 25 % an Fusionsprotein in nativer Form isoliert werden.

Die Verdünnung in Renaturierungspuffer geschah sehr schnell, um hohe lokale Proteinkonzentrationen zu vermeiden (Jaenicke und Rudolph, 1986). Es wurde gezeigt, dass inaktive Aggregate partiell

strukturiert sein können (Zettlmeissl *et al.*, 1979). Kommt es bei der Renaturierung zu intermolekularen Wechselwirkungen zwischen solchen Strukturen, wäre eine Aggregation des Proteins die Folge. Für den extrazellulären Teil der α -Untereinheit des nikotinischen AChR bestimmten West *et al.* einen β -Faltblatt-Anteil von 51 % (West jr. *et al.*, 1997). Ein Zusammenlagern dieses sekundären Strukturmerkmals zu unlöslichen Plaques, wie es für Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson beschrieben wurde (Sunde und Blake, 1997; Dobson, 2003), könnte die Ausbildung von unlöslichen, unvollständig gefalteten Aggregaten bei der Renaturierung zur Folge haben und die Tendenz des Fusionsproteins zur Ausbildung von *inclusion bodies* bei der Expression erklären.

Bei der Rückfaltung wurde trotz Optimierung der Methode immer noch ein Proteinverlust von bis zu 75 % durch Bildung von unlöslichen Aggregaten beobachtet. Um den Proteinverlust zu minimieren, wurde eine Methode entwickelt, die falsch-gefalteten, unlöslichen Proteinaggregate erneut zu denaturieren und rückzufalten. Dazu wurden die unlöslichen Aggregate abzentrifugiert in einem denaturierenden Puffer gelöst und erneut renaturiert. Dies konnte bis zu dreimal durchgeführt und die Ausbeute an Fusionsprotein damit deutlich erhöht werden.

Kontrolle der nativen Struktur

Zur Kontrolle der nativen Struktur des H- α -AChR-Fragmentes im Fusionsprotein, wurden die konformationsabhängigen, monoklonalen Anti-MIR Antikörper mAb 35 eingesetzt. Diese Antikörper binden sehr schwach die denaturierte α -Untereinheit von einigen Spezies, allerdings nicht die des humanen AChR (Tzartos *et al.*, 1998; Tzartos *et al.*, 1981). Daher eignete sich dieser Antikörper sehr gut zur Kontrolle der Proteinfaltung. Eine positive Reaktion zeigte das Vorliegen der nativen Struktur der MIR. Allerdings konnte über andere Bereiche auf dem H- α -AChR-Fragment keine Aussage getroffen werden. Die korrekte Faltung des α -AChR-Fragmentes im Fusionsprotein war überraschend. Wurde das α -AChR₄₋₁₈₁-Fragment allein exprimiert, so lag es ausschließlich in den *inclusion bodies* vor und konnte nicht renaturiert werden (Rousselle, 1996; Kreilinger, 2001). Die Fusion des α -AChR₄₋₁₈₁-Fragments an Gelonin ermöglichte offensichtlich die native Faltung. Die Verbesserung der *in vitro* Faltung von Proteinen durch genetische Kombination mit einem hydrophilen Fusionspartner ist bekannt (Samuelsson *et al.*, 1991). Hydrophile Peptidfragmente beeinflussen die Wasserlöslichkeit von teilgefalteten Polypeptidketten und erhöhen somit die Faltungseffizienz. Die richtige Faltung der MIR war aber von entscheidender Bedeutung, da nur dann ein Einsatz des Proteins im Tierversuch sinnvoll ist. Ziel des Fusionsproteins sind *in vivo* die autoreaktiven B-Lymphozyten, die für die Sezernierung der autoreaktiven Anti-AChR Antikörper verantwortlich sind.

Die Toxizität des Fusionsproteins im *in vitro* Translationstest, sowie die positive Reaktion mit den polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern zeigte die korrekte Faltung des Gelonin-Fragmentes.

Eine Möglichkeit die Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten bei der Renaturierung zu umgehen, wäre die Renaturierung des immobilisierten Fusionsproteins direkt auf der HiTrap Chelating Affinitätssäule gewesen (Colangeli *et al.*, 1988). Doch durch die Bindungsexperimente des nativen

Fusionsproteins an die Nickel-Affinitätssäule konnte gezeigt werden, dass der HisTag im Fusionsprotein nach der Rückfaltung nicht mehr zugänglich war. Daher wurde auf eine Renaturierung direkt auf der Säule verzichtet.

Faltung in physiologischem Kochsalzpuffer

Beim *in vivo* Einsatz des Fusionsproteins wäre die Verwendung einer physiologischen Kochsalzlösung bei der Applikation des Proteins wünschenswert. Rückfaltungsexperimente in diesem Puffer schlugen allerdings fehl. Das Protein wurde nur zu 15 % in löslicher Form erhalten, während der Rest als unlösliche Aggregate ausfiel. Die maximale Konzentration des Fusionsproteins betrug dabei nur bis zu 0,09 mg/ml. Außerdem zeigte es keine Reaktion mit den konformationsabhängigen mAb 35 Antikörpern. Daher wurde bei den *in vivo* Versuchen auf das mit Tris-haltigem Renaturierungspuffer rückgefaltete Protein zurückgegriffen (Kap. 8).

Einfluss des HisTag

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es nicht, den HisTag vom Fusionsprotein abzuspalten. Guanidiniumhydrochlorid lag im Puffer in einer Konzentration vor, die Thrombin nicht hemmen konnte. Dies wurde anhand der Versuche mit His₆^T-Gelonin_{1–251} gezeigt. Eine mögliche sterische Hinderung konnte durch die Bindungsversuche von renaturiertem Fusionsprotein an die Nickel-Affinitätssäule gezeigt werden. Aber auch eine Mutation in der DNA-Sequenz im Bereich der Thrombinschnittstelle, welche die Abspaltung des HisTag verhindern würde, konnte nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der vergleichbaren Lage des N-terminalen HisTag, war, wie beim rekombinanten Gelonin, allerdings kein Einfluss auf die Toxizität zu erwarten.

Toxizität

Für das Fusionsprotein wurde in einem *in vitro* Translationstest eine Toxizität von 46 ng/ml bestimmt. Wurde die aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekularmasse von 50.869 Da berücksichtigt, so betrug die Toxizität 900 pM. Für Gelonin_{1–251} wurde ein IC₅₀-Wert von 80 pM gemessen. Somit zeigte sich das rekombinante Gelonin um den Faktor 11 toxischer als das Fusionsprotein. Dies ließ sich durch die Betrachtung der Röntgenstruktur des zu Gelonin homologen RIP Ricin erklären. Die Bindungstasche für das Substrat liegt in der Nähe des C-Terminus (Abb. 1.9). Beim Fusionsprotein His₆^(T)-Gelonin_{1–246}-H- α -AChR_{4–181} wurde das Rezeptorfragment an den C-Terminus des Gelonin-Fragmentes fusioniert. Möglicherweise überdeckte das H- α -AChR_{4–181}-Fragment die Bindungstasche, was zu einer sterischen Hinderung führen würde. Die Einführung eines Proteinlinkers aus hydrophilen Aminosäuren könnte möglicherweise nicht nur die Toxizität des Gelonin-Fragmentes, sondern auch die Antigenität des H- α -AChR_{4–181}-Fragmentes erhöhen. So führte die Verwendung eines Linkers zwischen zwei Proteinfragmenten in einem Fusionsprotein zu einer erheblichen Bindungssteigerung an einen Rezeptor *in vitro* (Chandler *et al.*, 1998).

	Faktor	Literatur
Fusionsproteine		
His ₆ ^(T) -Gel ₁₋₂₄₆ -H- α -AChR ₄₋₁₈₁	11	
hFGF-Saporin	10	(McDonald <i>et al.</i> , 1996)
HBEGF-Saporin	23	(Chandler <i>et al.</i> , 1998)
Chemisch gekoppelte Konjugate		
Gel ₁₋₂₄₆ -gp330	1,1	(Misquith und Surolia, 1995)
Gel ₁₋₂₄₆ -HRP	1,2	(Schäfer, 1995)
RIP-Antikörper-Konjugate	35	(Barbieri <i>et al.</i> , 2000)

Tab. 6.2.: Vergleich der Toxizitätsverluste von RIP in Fusionsproteinen - Der Faktor gibt den Toxizitätsverlust im Vergleich mit freiem Toxin an.

Die niedrigere Toxizität von Fusionsproteinen bzw. chemisch gekoppelten Konjugaten im Vergleich mit ungekoppeltem Toxin ist bekannt. Barbieri *et al.* koppelten verschiedene RIP an Antikörper (Barbieri *et al.*, 2000). Die Bedingungen wurden so gewählt, dass ein Antikörpermolekül mit 1-2 RIP-Molekülen gekoppelt wurde. Dabei kam es zu einem mittleren Aktivitätsverlust um den Faktor 35. Als Ursache wurde von Barbieri *et al.* sterische Hinderung des aktiven Zentrums diskutiert.

Der Einsatz von RIP in Fusionsproteinen war in der Literatur bekannt (Chandler *et al.*, 1998; Arora und Leppä, 1994; al Jaufy *et al.*, 1994; McDonald *et al.*, 1996). Chandler *et al.* klonierten zwei Fusionsproteine aus dem RIP Saporin und einem Heparin-bindenden epidermalen Wachstumsfaktor (HBEGF, *engl.*: heparin-binding epidermal growth factor), zum gezielten Ausschalten von Tumorzellen. Beide Proteine unterschieden sich nur durch die Verwendung, bzw. des Fehlens eines flexiblen Linkers von 22 Aminosäuren zwischen beiden Domänen. Für natives Saporin wurde eine Toxizität von 7 pM bestimmt, während die Fusionsproteine eine um den Faktor 23 niedrigere Toxizität von ca. 160 pM im zellfreien Assay besaßen. Der Linker zeigte dabei keinen Einfluss auf die Toxizität. Wurden die beiden Proteine in der Zellkultur getestet, zeigte das Fusionsprotein mit vorhandenem Linker eine größere Bindungsaffinität gegenüber dem HBEGF-Rezeptor. Als Ursache wurde die sterische Hinderung, verursacht durch das Toxinfragment, bei der Bindung an den Rezeptor diskutiert. *In vivo* zeigte nur das Fusionsprotein mit Linker eine Hemmwirkung auf das Tumorstadium.

7. Isolierung des AChR aus *Torpedo californica*

7.1. Aufgabenstellung

Um die Induzierung der EAMG in Ratten zu ermöglichen, musste der komplette AChR aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens *Torpedo californica* isoliert werden. Das spannungserzeugende elektrische Organ aus Fischen, wie z.B. dem Zitterrochen *Torpedo californica*, ist aus sog. Elektroplaques aufgebaut, die sich im Laufe der Evolution aus Muskelzellen entwickelt haben. Aufgrund ihres Reichtums an cholinergen postsynaptischen Membranen und des Fehlens eines kontraktile Apparates kommt es zum Aufbau eines elektrischen Potentials von 150 mV pro Zelle. Die Reihenschaltung einer großen Anzahl solcher Zellen erlaubt die Bildung sehr hoher Spannungen. Aufgrund der großen Anzahl an T-AChR eignen sich diese Organe besonders zu dessen Isolierung.

Im Arbeitskreis gelang Urbatsch die Isolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation (Urbatsch, 1990). Grundlage der Isolation war ein Verfahren, das erstmals von Hertling-Jaweed beschrieben wurde (Hertling-Jaweed *et al.*, 1988). Allerdings konnte der T-AChR nicht komplett von Verunreinigungen befreit werden. So trat bei 80-90kD im SDS-Gel eine Bande auf, die einer ATPase zugeordnet wurde. Sehnert setzte in einer Modifikation zusätzlich zur Dichtegradientenzentrifugation eine Affinitätschromatographie nach einem Verfahren von Mosckovitz ein (Sehnert, 1994; Mosckovitz und Gershoni, 1988).

Der AChR besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu Schlangengiften wie α -Bungaro- oder α -Cobratoxin. Diese Gifte binden an den N-terminalen Teil der α -Untereinheit und blockieren die Bindung des Neurotransmitters Acetylcholin. Bindet man α -Cobratoxin kovalent an eine feste Matrix, eignet es sich zur Reinigung des AChR. Das Säulenmaterial war bis vor kurzem käuflich erhältlich (Fa. Sigma). Es handelte sich um mit CNBr-aktivierter Sepharose, an die das 7 kD schwere α -Cobratoxin gekoppelt war.

Die Elution des immobilisierten Rezeptors von der Säule gelingt durch Carbamylcholin-haltigen Puffer. Aufgrund des Aufwands einer Dichtegradientenzentrifugation eliminierte Sehnert diese probe-weise und konnte ebenfalls gereinigten Rezeptor isolieren. Auch nach langer Lagerung bei 4 °C in 20%iger ethanolischer Lösung konnte das Säulenmaterial noch zur Isolierung von T-AChR verwendet werden (Hossann, 2001).



Abb. 7.1: *Elektrisches Organ des Zitterrochenes *Torpedo californica*. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß dient als Größenvergleich.*

7.2. Aufarbeitung des elektrischen Organs

Das tiefgefrorene elektrische Organ (Abb. 7.1) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut, zerkleinert und mit Puffer bei 4 °C in einem Mixer bei maximaler Leistung homogenisiert. Zur Vermeidung von Überhitzung wurde die Homogenisierung in kleinen Intervallen und mit großen Abständen durchgeführt. Durch die Filtration des Homogenisats über ein Mulltuch konnten grobe Gewebestücke abgetrennt werden. Das Filtrat wurde anschließend für sechzig Minuten bei 13.000 xg zentrifugiert und das erhaltene Pellet je nach verwendeter Isolationsmethode weiter verarbeitet.

7.3. Isolierung mit α -Cobratoxin-Affinitätschromatographie

7.3.1. Durchführung der Isolierung im Durchflussverfahren

Das Pellet wurde in Cholat-haltigem Puffer unter Ultraschallbehandlung resuspendiert und für 2 Stunden geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation befand sich der Rezeptor aufgrund des Natriumcholat im Überstand. Der Überstand wurde direkt auf eine α -Cobratoxin-Säule gegeben. Nach dem Spülen der Säule und 45 minütiger Inkubation, wurde der Rezeptor mit 1 mM Carbamylcholinchlorid-haltigem Puffer von der Säule eluiert. Eine zweite Fraktion an Rezeptor erhielt man nach 20 stündiger Inkubation der Säule im gleichen Puffer. Nach zweimaliger Dialyse gegen 5 l Dialysepuffer wurden beide Fraktionen durch SDS-PAGE und ELISA charakterisiert. Die Säule wurde anschließend mit verdünnter Essigsäure und Tris-gepufferter Kochsalzlösung regeneriert.

Es konnten in der ersten Fraktion 0,9 und in der zweiten Fraktion 0,8 mg T-AChR aus 100 g elektrischem Organ isoliert werden. Beide Fraktionen zeigten im SDS-PAGE das erwartete Bandenmuster und reagierten im ELISA mit mAb 35 Antikörpern positiv (nicht gezeigt).

Während der chromatographischen Aufreinigung setzte sich das α -Cobratoxin-Säulenmaterial langsam zu, bis kein Durchlauf mehr möglich war. Die Säule musste daraufhin neu gegossen werden. Möglicherweise war das Säulenmaterial aufgrund der nicht durchgeführten Vorreinigung der aufge-

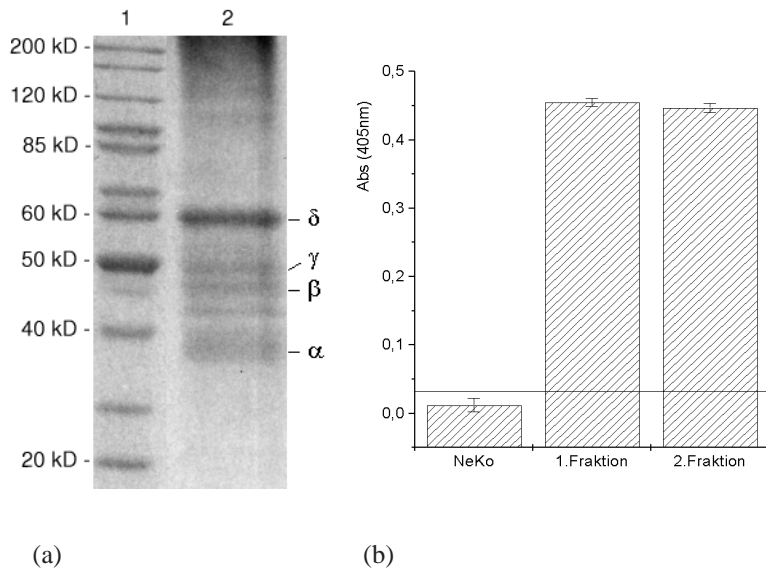


Abb. 7.2: Isolierung von T-AChR im Batch-Verfahren - (a) SDS-PAGE (10%iges Trenngel), Bahn 1: Proteinstandard, Bahn 2: T-AChR (30 μ g). (b) ELISA mit mAb 35 Antikörpern (1:1000), Sekundärantikörper Anti-Ratte IgG-AP-Konjugat (1:1000), 1. und 2. Fraktion je 2 μ g, Negativkontrolle: Rinderserumalbumin (20 μ g).

tragenen Proteinlösung zu stark verunreinigt. In weiteren Versuchen wurde überprüft, ob das Säulenmaterial noch im Batch-Verfahren verwendet werden konnte.

7.3.2. Durchführung der Isolierung im Batch-Verfahren

Das Pellet wurde, wie oben beschrieben, unter Ultraschallbehandlung in Cholat-haltigem Puffer resuspendiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand direkt zum α -Cobratoxin-Säulenmaterial gegeben. Um die Bindung des T-AChR zu ermöglichen, wurde die Suspension für eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 4.170 xg. Die Zentrifugation bei 4.170 xg war zwar ausreichend um das Säulenmaterial im Pellet zu erhalten, allerdings zeigte sich dieses sehr labil. Der Überstand musste sehr vorsichtig mit einer Pipette entfernt werden. Ein Dekantieren des Überstands war nicht möglich. Das Säulenmaterial wurde nacheinander mit den Puffern A, B und C gewaschen. Anschließend wurde der Rezeptor mit 4 ml Puffer D eluiert. Zusätzlich wurde das Säulenmaterial mit Puffer D über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert und eine 2. Fraktion erhalten. Beide Proteinfractionen wurden nach der Elution sofort zweimal gegen 5 l Dialysepuffer dialysiert.

Durch eine Proteinbestimmung wurde die Ausbeute an T-AChR bestimmt. In Fraktion 1 befanden sich 96 μ g Protein, während durch die Übernachtinkubation 544 μ g Protein isoliert werden konnte. Damit ergab sich eine Gesamtausbeute von 0,64 mg aus 100 g elektrischem Organ. Auf dem SDS-PAGE zeigte sich das typische Bandenmuster des T-AChR (Abb. 7.2(a)). Durch die denaturierenden Bedingungen wurden die 4 Untereinheiten getrennt und als einzelne Banden bei 39 kDa (α), 47 kDa (β), 51 kDa (γ) und 60 kDa (δ) sichtbar. Bei 43 kDa war eine Verunreinigung sichtbar. Durch einen ELISA mit den konformationsabhängigen, Anti-MIR Antikörpern mAb 35 konnte in beiden Fraktionen der T-AChR immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 7.2(b)). Beide Fraktionen zeigten eine

				Ausbeute	
UE	M_{SDS} (kDa)	M_{kalk} (kDa)	M_{MS} (kDa)	(mg)	
α	39	50,1	53,0	(Sehnert, 1994)	4,3
β	47	53,7	56,5	(Milosavljevic, 1998)	3,7
γ	51	56,3	62,9	(Hossann, 2001)	4,3
δ	60	57,6	65,3	Durchflussverfahren	1,7
				Batch-Verfahren	0,64

(a) (b)

Tab. 7.1.: *Isolierung des T-AChR - Molekularmassen der Untereinheiten und Vergleich der Ausbeuten - (a) Molekularmassen der Untereinheiten des T-AChR - M_{SDS} : aus dem SDS-Gel bestimmte Molekularmasse, M_{kalk} : aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekularmasse, M_{MS} : durch Massenspektrometrie bestimmte Molekularmasse (Kasheverov et al., 1998). (b) Vergleich der Ausbeuten vergangener Isolierungen (pro 100 g elektrisches Organ).*

starke positive Reaktion im Vergleich mit der Negativkontrolle.

7.4. Diskussion

Aus dem elektrischen Organ von *Torpedo californica* ließ sich T-AChR durch α -Cobratoxin-Affinitätschromatographie isolieren. Sowohl die kontinuierliche Elution, als auch die Elution im Batch-Verfahren war erfolgreich. Allerdings zeigte das Säulenmaterial eine deutlich verringerte Bindungskapazität für T-AChR, im Vergleich mit bereits durchgeführten Isolierungen. Während mit der neuen Affinitätssäule aus 100 g elektrischem Organ üblicherweise bis zu 4,3 mg T-AChR isoliert wurden (Sehnert, 1994), nahm die Ausbeute nach Regenerierung und Lagerung des Säulenmaterials ab (Tab. 7.1(b)). Ein Ausbeuteverlust aufgrund der langen Lagerung des elektrischen Organs bei -80°C konnte ausgeschlossen werden, da für die Isolierung im Batch-Verfahren frisch erworbenes elektrisches Organ verwendet wurde.

Die erfolgreiche Isolierung konnte durch das typische Bandenmuster auf dem SDS-Gel und durch die positive Reaktion mit mAb 35 Antikörper im ELISA gezeigt werden. Wurde die aus dem SDS-Gel bestimmten Molekularmassen der Untereinheiten mit den aus der Aminosäuresequenz und Massenspektrometrie bestimmten Molekularmassen verglichen, so zeigten sich die, aus der Literatur bekannten, Massendifferenzen (Utkin *et al.*, 2000). Die Unterschiede lassen sich durch die unterschiedlich stark ausgeprägte posttranslationale Modifizierung der Untereinheiten erklären. So ist die elektrophoretische Wanderung der Proteine abhängig vom Grad der posttranslationalen Modifizierung. Die 43 kD schwere Verunreinigung ist bekannt (Frail *et al.*, 1988). Es handelt sich um Rapsyn (*engl.*: receptor associated protein of SYNapse), ein Protein, dass bei der Ausbildung der AChR-Cluster (Froehner *et al.*, 1990) und deren Bindung an das Zytoskelett beteiligt ist (Apel *et al.*, 1995).

8. Versuche zur antigenspezifischen Immunsuppression *in vivo*

8.1. Aufgabenstellung

Wie bereits in der Problemstellung beschrieben, findet bei der Autoimmunerkrankung Myasthenia gravis nur eine Behandlung der Symptome statt. Eine spezifische, gegen die Ursache der Erkrankung gerichtete Therapie ist bis heute nicht bekannt. Spezifische, immunsuppressive Ansätze sind Gegenstand der Forschung (Kap. 1.3).

Im Arbeitskreis von Prof. Dr. W. E. Trommer gelang die Synthese eines chemisch gekoppelten T-AChR-Gelonin-Konjugats (Brust *et al.*, 1987). Es konnte gezeigt werden, dass eine Gabe des Konjugats *in vivo* die Zahl der funktionsfähigen AChR deutlich steigerte (Urbatsch *et al.*, 1993). Die Wirkungsweise war dabei antigenspezifisch, da das Immunsystem eine normale Reaktion gegen Kontrollantigene zeigte. Ein Anstieg des Antikörpertiters gegen den AChR, vermutlich ausgelöst durch die Immunantwort gegen pathologisch irrelevante Teile des Rezeptors, konnten aufgrund der Verwendung des kompletten Rezeptors nicht verhindert werden. Li gelang die Synthese eines Expressionssystems für ein gentechnisch gekoppeltes Fusionsprotein aus einem Gelonin_{1–246}- und einem H- α -AChR_{4–181}-Fragment (Li, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Protein unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie isoliert werden (Kap. 6). Eine Renaturierung war möglich, nach der das Protein eine native Faltung der MIR und eine Toxizität gegenüber eukaryontischen Ribosomen zeigte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine mögliche antigenspezifische, immunsuppressive Wirkung des Fusionsproteins *in vivo* untersucht werden. Dazu sollten weibliche Lewis-Ratten mit T-AChR immunisiert werden. Diese sollten EAMG ausbilden und das Vorliegen der Erkrankung durch repetitive Nervenstimulation (RNS) des *Nervus ischiadicus* nachgewiesen werden. Dazu sollten die Versuche in Homburg im Arbeitskreis von PD Dr. S Jung (Nervenklinik und Poliklinik, Neurologie, Universitätskliniken des Saarlandes) erlernt und danach in Kaiserslautern etabliert werden. Beim Vorliegen der Erkrankung sollte das Fusionsprotein den erkrankten Ratten appliziert und dessen Einfluss auf die Erkrankung untersucht werden.

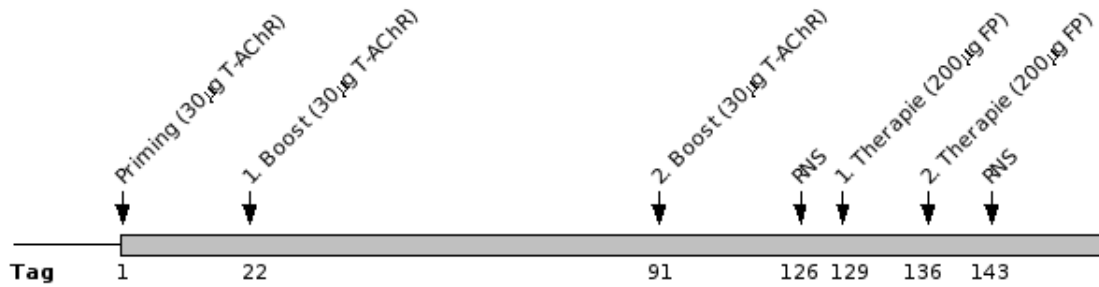


Abb. 8.1.: Verlauf der in vivo Versuche. Nach der ersten Immunisierung (Priming) mit T-AChR am 1. Tag wurde den Ratten eine zweimalige Auffrischung (Boost) appliziert (Tag 22 und 91). Am Tag 126 wurde der Erfolg der Immunisierung durch RNS getestet und anschließend die Therapie durch Gabe des Fusionsproteins (FP) gestartet.

8.2. Verlauf der Tierversuche

Die Tierversuche wurden nach dem in Abb. 8.1 aufgeführten Schema durchgeführt. Nach der ersten Immunisierung (Priming) der Ratten mit T-AChR, sollte nach drei Wochen eine Auffrischungsinjektion (Boost) gegeben werden. Da die Ratten nach dem Boost keine Symptome der Erkrankung zeigten, wurde ein weiteres Mal geboostet. Am 126ten Versuchstag wurde der Erfolg der Immunisierung durch RNS überprüft. Nach der Therapie mit Fusionsprotein wurde dessen Wirkung auf die Erkrankung erneut durch RNS überprüft.

8.2.1. Verwendete Ratten

Für die *in vivo* Versuche wurden 21 weibliche Lewis-Ratten (Fa. Charles River, Sulzfeld) verwendet. Bei Lieferung waren die Tiere 12 Wochen alt. Sie wurden in zwei Gruppen eingeteilt. 12 Ratten wurden zur Ausbildung von EAMG mit T-AChR immunisiert (Gruppe I), die restlichen 9 Ratten wurden nicht behandelt (Gruppe K) und dienten als Negativkontrolle.

8.2.2. Haltungsbedingungen

Die Haltung der Ratten erfolgte im Tierhaus der Technischen Universität Kaiserslautern. Zur Unterscheidung der Tiere, wurden jeweils zwei Ratten in einem Käfig (ca. 21 x 38 x 17 cm) gehalten und eine durch eine Ohrmarke aus Metall gekennzeichnet. Nach der Lieferung akklimatisierten sich die Tiere für eine Woche in ihrer neuen Umgebung, ohne dass Versuche durchgeführt wurden. Als Nahrung erhielten sie eine Standard-Diät für Ratten und Mäuse (Fa. Atromin), sowie Wasser aus Trinkflaschen. Zur Kontrolle des Gesundheitszustands wurde in regelmäßigen Abständen das Körpergewicht der Ratte überprüft.

opt.	Beschreibung
Bew.	
-	keine Symptome
+	allgemeine Schwäche bei Belastung
++	Schwäche, charakteristische Körperhaltung mit dem Kopf auf den Füßen
+++	Gewichtsverlust, Zittern, Gabe von Mestinon zur Stabilisierung erforderlich

Tab. 8.1: Optische Bewertung (opt. Bew.) der myasthenen Symptome.

8.2.3. Bewertung der Erkrankung

Die Bewertung der Erkrankung erfolgte optisch und durch repetitive Nervenstimulation. Während bei der optischen Bewertung auf die typisch myasthenen Symptome, wie Körperhaltung, Schwäche und Muskelzittern geachtet wurde (Tab. 8.1), erfolgte die Bewertung mittels RNS durch Auswertung von Elektromyogrammen (EMG), die durch eine repetitive Nervenstimulation erhalten wurden. Wird der Ischiasnerv bei einer gesunden Ratte repetitiv gereizt, so bleibt die detektierte Amplitudenhöhe konstant. Bei myasthenen Ratten nimmt die Amplitude innerhalb den ersten Reizungen ab und pendelt sich dann auf einem konstanten Wert ein. Diese prozentuale Abnahme der Amplitudenhöhe ist ein direktes Maß für die Stärke der Erkrankung und wird als Dekrement (D) bezeichnet. Ein Dekrementwert über 10 % wird als pathologisch eingestuft (Seybold *et al.*, 1976; Thompson *et al.*, 1992).

8.3. Immunisierung der Ratten

Vor der Immunisierung der Ratten (Gruppe I) musste der T-AChR (Kap. 7) in einem geeigneten Puffer vorliegen. Dazu wurde die Proteinlösung gegen physiologischen PBS-Puffer dialysiert und anschließend auf ca. 1 mg/ml aufkonzentriert. Zur ersten Immunisierung (Priming) wurden die Tiere mit 30 µg T-AChR und 20 µg Ovalbumin, emulgiert im 4 fachen Volumen kompletten Freund's Adjuvans (CFA), immunisiert. Danach wurde die Emulsion auf Raumtemperatur erwärmt und langsam intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Ovalbumin diente als Kontrollantigen. Das Auffrischen (Boosten) erfolgte analog, allerdings wurde die Proteinlösung in inkomplettem Freund's Adjuvans emulgiert.

8.4. Elektrophysiologische Untersuchungen - Repetitive Nervenstimulation

8.4.1. Narkose

Vor der Durchführung der Versuche mussten die Ratten narkotisiert werden. Das für die repetitive Nervenstimulation übliche Narkosemittel HypnormTM war nicht mehr erhältlich. Daher wurde auf

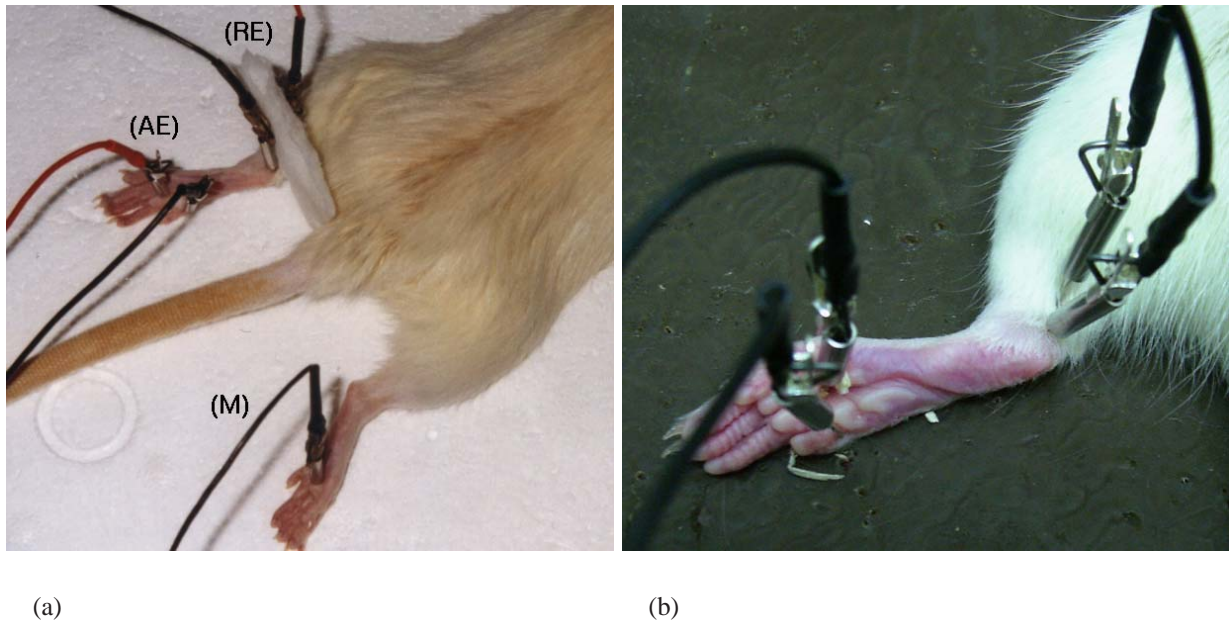


Abb. 8.2.: Platzierung der Reiz- und Ableitungselektroden zur Messung der RNS am Ischiassnerv (Nervus ischiadicus). **(RE)** Reizelektroden. **(AE)** Ableitungselektroden. **(M)** Masse-Elektrode. Die EEG-Nadelelektroden wurden auch zur Fixierung der Ratte auf einer Styropor- bzw. Wachsplatte verwendet.

7%ige Chloralhydrat-Lösung als Narkosemittel zurückgegriffen. Die Gabe erfolgte nach Körpergewicht der Ratte ($400 \mu\text{g}/\text{kg}$) durch intraperitoneale Injektion. Die so behandelte Ratte wurde zum Einschlafen in einen ruhigen und dunklen Raum gebracht, da durch Stress die Wirkung des Narkosemittels beeinträchtigt werden konnte. Nach ca. 30 Minuten war die Ratte immobilisiert und konnte vermessen werden. Üblicherweise schliefen die Ratten bis zu 4 Stunden und zeigten sich am folgenden Tag noch benommen.

8.4.2. Versuchsaufbau

Für die repetitive Nervenstimulation des *Nervus ischiadicus* wurde eine distale Stimulation gewählt. Verwendung fanden EEG-Nadelelektroden ($l = 1,2 \text{ cm}$, $\varnothing = 0,4 \text{ mm}$) der Firma Neurokard GmbH. Vor der Platzierung der Elektroden musste überprüft werden, ob die Ratte vollständig immobilisiert war. Durch einen Drucktest mit den Fingernägeln in den Hinterlauf der Ratte konnte überprüft werden, ob das Tier noch Reaktionen zeigte. War das der Fall, musste eine geringe Menge Chloralhydrat nachgespritzt werden.

Die Platzierung der Elektroden am Hinterlauf erfolgte wie in Abb. 8.2 gezeigt. Zuerst wurden die Reizelektroden am Unterschenkel gesetzt, wobei die Nadeln durch die Muskulatur gesteckt und die Ratte auf einer Styropor- bzw. Wachsplatte fixiert wurde. Die Ableitelektroden wurden durch die Hinterhand gesteckt. Dabei war darauf zu achten, dass sowohl die beiden Reiz-, als auch die beiden

Ableitelektroden nahe zusammen saßen. Der Abstand der Reiz- und Ableitelektroden zueinander war ebenfalls ausschlaggebend. Je geringer der Abstand der Elektroden war, desto größer war das detektierte Ableitungssignal (nicht gezeigt).

8.4.3. Versuchsparameter

Zur Reizung wurde ein Reizgerät verwendet, dass von der Elektronikwerkstatt der Technischen Universität Kaiserslautern angefertigt wurde.

Die Reizung erfolgte mit dem in Abb. 8.3 schematisch dargestellten Pulssignal. Es wurden Frequenzen von 2, 4 und 10 Hz verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem Oszilloskop, dessen Bild (EMG) elektronisch zur späteren Auswertung auf eine Diskette gespeichert werden konnte. Die Skalen der Achsen, der in dieser Arbeit dargestellten EMG, ist bei den jeweiligen Abbildungen in der Form Wert/div angegeben. Div entspricht dabei einem Kästchen im EMG.

In ersten Vorversuchen, mit je einer Ratte aus beiden Gruppen, wurden die optimalen Einstellungen für die Durchführung der RNS getestet. Es stellte sich heraus, dass mit einer Pulshöhe von 20 V und einer Pulsdauer von 0,2 ms die besten Ergebnisse bei den eingestellten Frequenzen von 1, 2, 4 und 10 Hz erhalten wurden. Die Absolutwerte der Amplituden im EMG zeigten eine starke Abhängigkeit von der Lage der Elektroden (nicht gezeigt). Eine Berücksichtigung der Absolutwerte bei der Auswertung war daher nicht möglich. Auch musste darauf geachtet werden, dass bei sehr nahe zusammen liegenden Elektroden ein Stück Papier als Isolierung dazwischen gesteckt wurde. Die Folge war eine Reduzierung des Grundrauschens der abgeleiteten Signale im EMG.

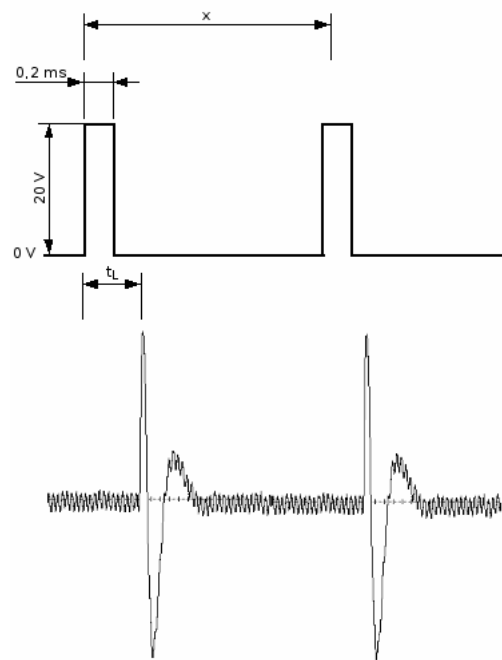


Abb. 8.3.: Schematische Darstellung von Puls (oben) und Antwort (unten) bei der repetitiven Nervenstimulation. t_L : Latenzzeit. x = Pulsabstand in ms, $x = 0,5$ entspricht z.B. 2 Hz.

8.4.3.1. Überprüfung des Pulssignals

Das Ausgangssignal des Reizgeräts wurde zur Überprüfung mit dem Oszilloskop detektiert. Getestet wurde mit einer Frequenz von 4 Hz, einer Pulsdauer von 0,2 ms und einer Pulshöhe von 20 V. Dies

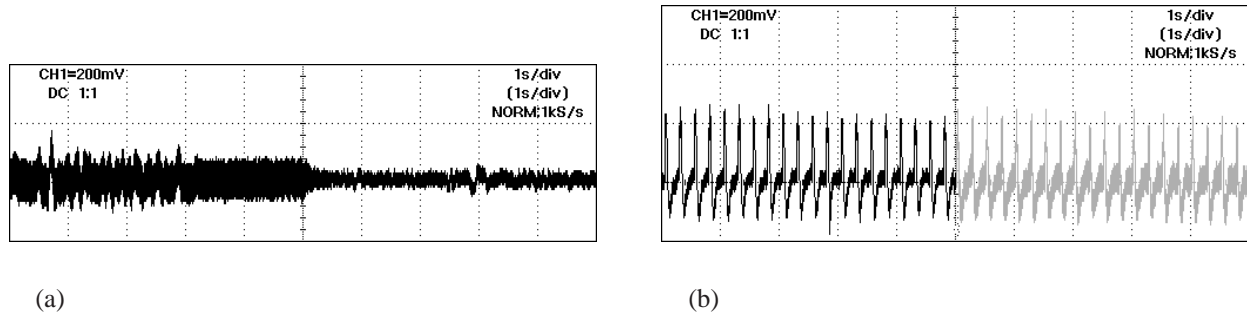


Abb. 8.4.: Einfluss der Masse-Elektrode auf die Auswertung der RNS. **(a)** Messung des Grundsignals der Ableitelektrode ohne Reizung. Nach 5 s erfolgte die Zuschaltung der Masse-Elektrode. **(b)** Messung mit einer Frequenz von 4 Hz mit (schwarz) und ohne (grau) Masse-Elektrode. Mittelwerte der Amplituden: $A_{mit} = 368 \pm 21$ mV, $A_{ohne} = 360 \pm 22$ mV.

entsprach den Bedingungen, die bei den durchgeführten Untersuchungen verwendet wurden. Die gemessene Amplitudenhöhe betrug $20,0 \pm 0,2$ V mit einer Frequenz von $4,0 \pm 0,1$ Hz.

8.4.3.2. Einfluss einer Masse-Elektrode

Bei der Demonstration der repetitiven Nervenstimulation in Homburg wurde zusätzlich zu den Reiz- und Ableitelektroden eine Masse-Elektrode an einem Hinterlauf der Ratte platziert. Deren Notwendigkeit wurde durch eine Versuchsreihe in Kaiserslautern überprüft (Abb. 8.4). Durch das Zuschalten der Masse-Elektrode konnte das Grundrauschen von 149 ± 8 mV auf 63 ± 9 mV reduziert werden. Eine Auswirkung auf die repetitive Nervenstimulation wurde durch eine Stimulation mit 4 Hz untersucht. Die Auswertung der Amplitudenhöhen zeigte, dass eine Masse-Elektrode nicht für die Durchführung der Messung notwendig war. Beide Messmethoden führten zu vergleichbaren Werten. Während die mittlere Amplitude mit Masse-Elektrode zu 368 ± 21 mV bestimmt wurde, ergab sich ohne Masse-Elektrode eine Amplitude von 360 ± 22 mV. Die Abweichung von 2,2% war vernachlässigbar. Daher wurde bei den weiteren Versuchen auf eine Masse-Elektrode verzichtet, auch um die Belastung der Tiere so gering wie möglich zu halten.

8.4.3.3. Einfluss der Nadelposition

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Daten, wurden mehrere Ratten mit unterschiedlichen Positionen der Reiz- und Ableitelektroden stimuliert und die erhaltenen Diagramme ausgewertet (Tab. 8.2). Es wurden je zwei Ratten der Gruppe I und K verwendet. Für die Messung wurden 3 verschiedene Nadelpositionen pro Ratte untersucht und der Mittelwert von D berechnet.

	Ratte			
	I8	I9	K2	K9
D (%)	12	47	6	-11
	13	61	-4	-17
	8	47	2	1
\bar{D} (%)	11 ± 3	51 ± 8	1 ± 5	-9 ± 9

Tab. 8.2: Einfluss der Nadelposition bei der RNS. Durchgeführt wurden pro Ratte drei Messungen mit unterschiedlichen Nadelpositionen. \bar{D} : Mittelwert von D .

Messung	Frequenz (Hz)	D (%)
1	10	62
2	10	60
3	4	60
4	4	52
5	4	64
6	2	55

Tab. 8.3: Einfluss der Frequenz auf den Dekrementwert. Ratte III wurde mehrmals einer repetitiven Nervenstimulation bei verschiedenen Frequenzen unterzogen und die Dekrementwerte bestimmt. Der Mittelwert über alle Messwerte betrug 59 ± 4 %.

8.4.3.4. Einfluss der Stimulationsfrequenz

Eine Ratte der Kontrollgruppe K wurde einer repetitiven Nervenstimulation mit verschiedenen Frequenzen unterzogen. Bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz waren die abgeleiteten Signale sehr gut aufgelöst (Abb. 8.5(a)). Stimulierte man mit einer Frequenz von 4 Hz, so war diese Bedingung immer noch erfüllt (Abb. 8.5(b)). Die Stimulation mit 10 Hz führte zu einer Überlagerung der Signale im EMG (Abb. 8.5(c)). Die Messung war unter diesen Bedingungen nicht mehr auswertbar. In Abb. 8.5(d) ist ein Diagramm zu sehen, bei dem nach den ersten Signalen ein Dekrement vorzuliegen schien. Nach sechs Sekunden zeigte sich allerdings ein Anstieg der Signalamplituden. Dies ist möglicherweise auf die Überlagerung der Signale zurückzuführen. Interessant war allerdings, dass eine weitere Messung bei 10 Hz bei einer anderen Ratte auswertbar war. Es zeigte sich bei Verwendung der gleichen Messparameter ein auswertbares Diagramm (Abb. 8.5(e)). Zur Entscheidung, ob eine Auswertung bei Stimulationen mit 10 Hz möglich war, musste eine Messung mindestens 10 Sekunden dauern. Auf dies wurde allerdings mit Rücksicht auf die Tiere verzichtet. Die repetitive Nervenstimulation wurde bei allen weiteren Versuchen mit einer Frequenz von 4 Hz durchgeführt.

8.4.4. Auswertung

Für die Berechnung des Dekrementwerts, war eine Auswertung der Amplituden notwendig. Der Wert berechnet sich durch die prozentuale Abnahme der Amplitude von der ersten zur vierten (Rubin *et al.*, 2004), bzw. fünften Antwort (Thompson *et al.*, 1992). Bei der Messung stellte sich allerdings heraus,

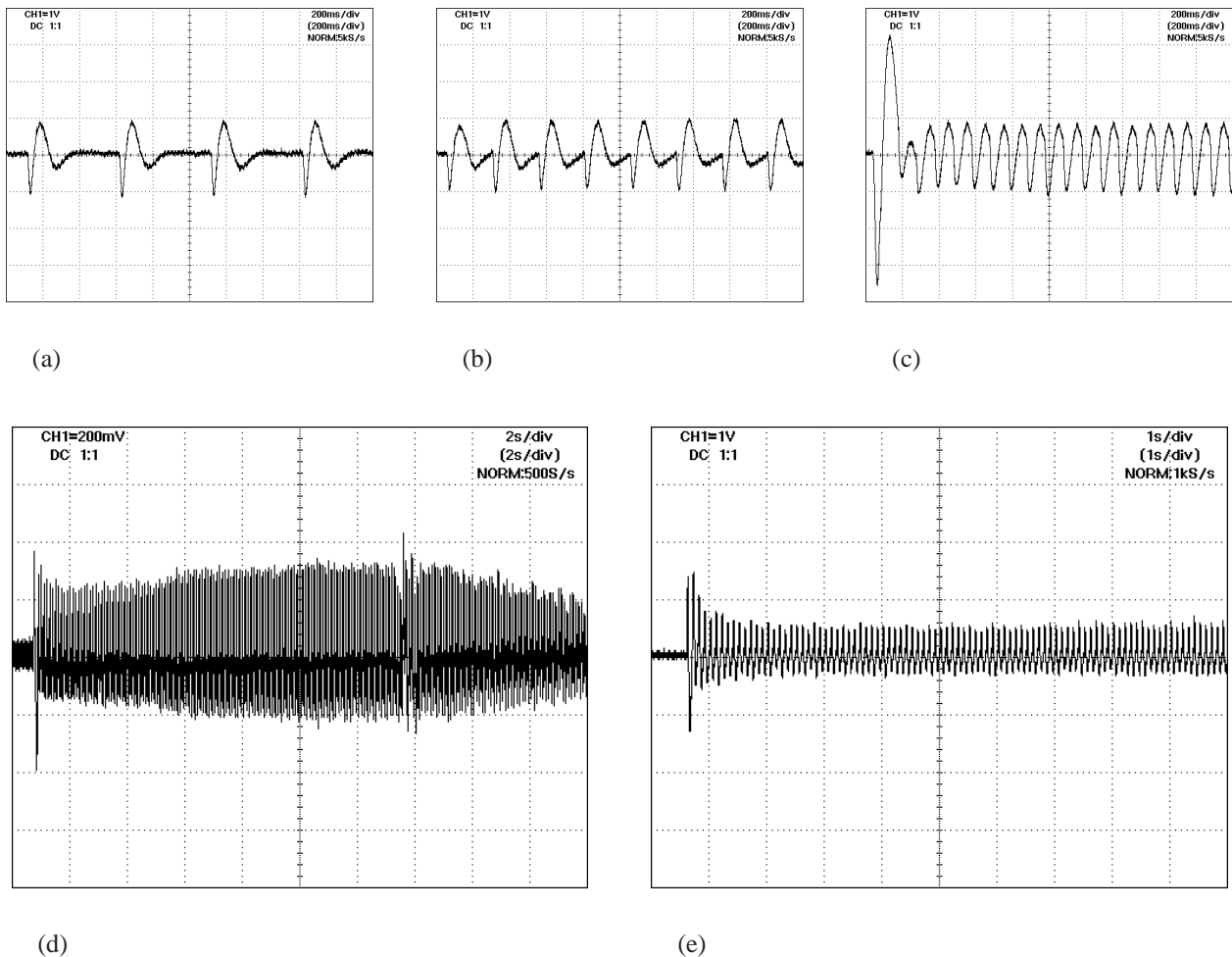


Abb. 8.5.: Einfluss der Frequenz auf die Auswertbarkeit der RNS. Die Stimulation erfolgte mit einer Amplitude von 20 V und einer Pulsdauer von 0,2 ms. - (a) Stimulationsfrequenz von 2 Hz bei 2 s Messzeit. (b) Stimulationsfrequenz von 4 Hz bei 2 s Messzeit. (c) Stimulationsfrequenz von 10 Hz bei 2 s Messzeit. (d) Ratte K5: Stimulationsfrequenz von 10 Hz bei 20 s Messzeit. (e) Ratte III: Stimulationsfrequenz von 10 Hz bei 10 s Messzeit.

dass eine Auswertung des ersten Signals der RNS nicht immer möglich war (Abb. 8.6). Es zeigte sich, dass beim Starten der RNS durch das Reizgerät, häufig ein zu großes erstes Signal im EMG detektiert wurde. Wurden nur Einzelreizungen durchgeführt, waren die detektierten Signale immer im erwarteten Messbereich (nicht gezeigt). Dass es sich bei diesem Signal um ein Artefakt handelte, wurde durch ein Vermessen der Signalabstände deutlich. War der Abstand zwischen dem ersten und zweiten Signal kleiner als bei den Folgesignalen, konnte vom Vorliegen eines Artefakts ausgegangen werden (Abb. 8.6(a) und 8.6(b)).

Um einfacher entscheiden zu können, ob es sich beim ersten Signal der RNS um ein Artefakt handelte, wurde bei jeder Messung vor der RNS mehrere Einzelpulse gemessen (Abb. 8.6(c)). Waren die Einzelsignale genauso groß wie das erste Signal der repetitiven Nervenstimulation, dann wurde aus diesen Werten der Mittelwert ($\overline{A_{1S}}$) gebildet. Nach ca. 10 Stimulationen waren die gemessenen

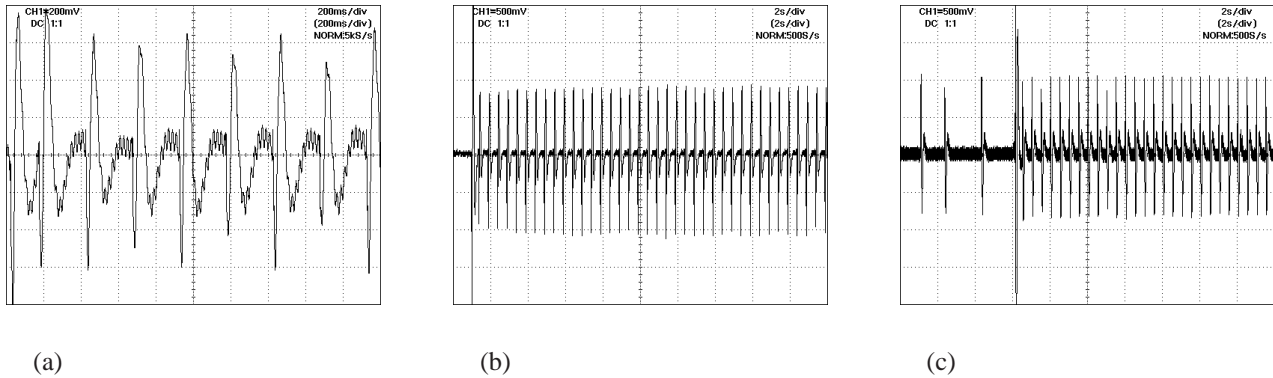


Abb. 8.6.: Das erste Signal der RNS zeigte häufig eine starke Abweichung, möglicherweise ausgelöst durch den Reizgenerator. Vermessen wurde eine gesunde Ratte der Kontrollgruppe - (a) Hochauflösender Ausschnitt eines EMG. Das erste und zweite Signal lagen deutlich näher, als die Folgesignale. (b) Messung der RNS über 20 s. Erstes Signal zeigte eine deutlich zu hohe Amplitude. Der Abstand zwischen dem ersten und dem zweiten Signal war kleiner als bei den Folgesignalen. (c) Durch Messung zweier Einzelpulse vor der RNS konnte entschieden werden, ob das erste Signal der RNS durch ein Artefakt verfälscht wurde.

Amplituden konstant. Aus mindestens 5 dieser Amplituden (A_{nS}) wurde der Mittelwert $\overline{A_{nS}}$ berechnet und der Dekrementwert mit Formel 8.1 bestimmt.

$$D[\%] = 100 - \left(\frac{100 \cdot \overline{A_{nS}}}{A_{1S}} \right) \quad (8.1)$$

Zeigte das erste Signal der RNS ein Artefakt, so wurden nur die Einzelpulse bei der Berechnung von $\overline{A_{1S}}$ verwendet.

8.4.5. Versuche zur Bestimmung der Latenzzeit

Zur Messung der Latenzzeit wurde sowohl das Ableitungs-, als auch das Reizsignal im Oszilloskop detektiert. Zur Vermeidung einer Überlagerung der beiden Signale, wurde die Polarität des Reizsignals umgedreht. Vermessen wurde die Ratte K2 mit 2 Hz. Detektiert wurde über einen Bereich von 200 ms. Wie in Abb. 8.8 gezeigt, war in dieser Auflösung die Latenzzeit nicht bestimmbar. Das Ableitungssignal war im gleichen Augenblick wie das Pulssignal im EMG detektierbar.

Wurde der Messbereich unter 200 ms verkleinert, um die Auflösung zu erhöhen, waren beide Signale nicht mehr detektierbar. Ursache war, dass das detektierte Signal auf dem Oszilloskop manuell eingefroren werden musste. Trotz zahlreicher Versuche konnte kein auswertbares Signal mit höherer Auflösung detektiert werden.

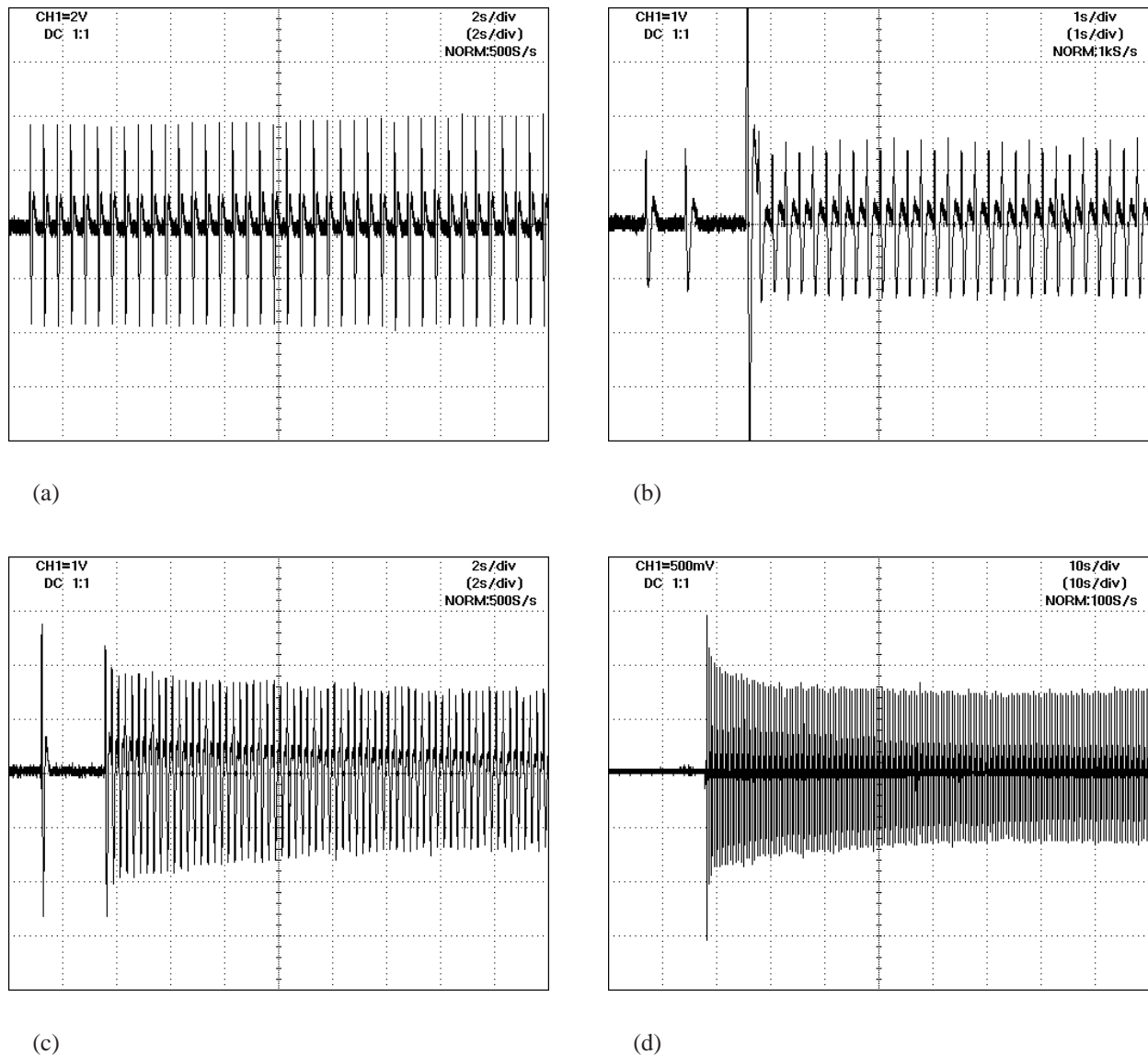


Abb. 8.7.: Beispiele für Elektromyogramme bei der repetitiven Nervenstimulation - (a) Ratte K2: optisch keine Symptome, optimal auswertbar, Dekrement: $0 \pm 4\%$. (b) Ratte I6: optisch keine Symptome, Erster Peak der Messung durch Artefakt verfälscht, Dekrement: $-1 \pm 10\%$. (c) Ratte I12: Optisch schwache Symptome erkennbar, optimal auswertbar, Dekrement: $24 \pm 10\%$. (d) Ratte I11: Optisch schwache Symptome erkennbar, optimal auswertbar, Dekrement: $59 \pm 5\%$. - Die Dekrementwerte geben die Mittelwerte mehrerer Messungen an.

8.4.6. Einfluss der RNS auf die Ratte

Bei der Kontrolle der Körpergewichte fiel auf, dass die RNS belastend für die Ratte war. In Abb. 8.9 sind die Körpergewichte der Kontrollratten vor und nach einer RNS dargestellt. Die Ratten die einer RNS unterzogen wurden, verloren innerhalb von 6 Tagen im Mittel 12 g ihres Körpergewichts, bevor sie sich wieder stabilisierten. Die Ratten die keiner RNS unterzogen wurden zeigten im gleichen Zeitraum keinen Gewichtsverlust.

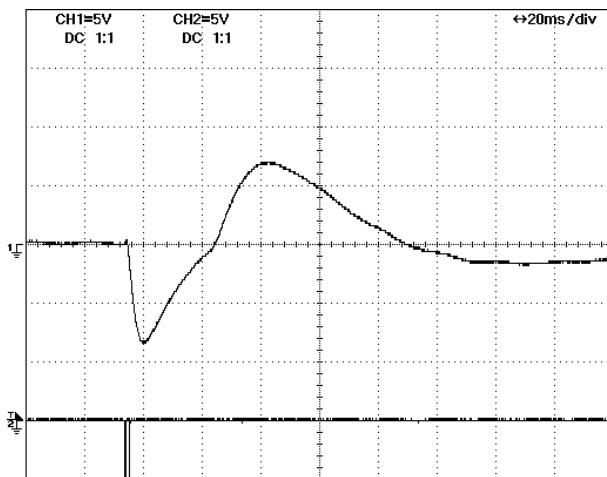


Abb. 8.8: Versuche zur Bestimmung der Latenzzeit t_L . Messung einer RNS mit 2 Hz bei Ratte K2. Kanal 1: Ableitungssignal, Kanal 2: Reizsignal. Zur besseren Übersichtlichkeit, wurde die Polarität der Reizung umgedreht, damit es zu keiner Überlagerung der beiden Signale kam.

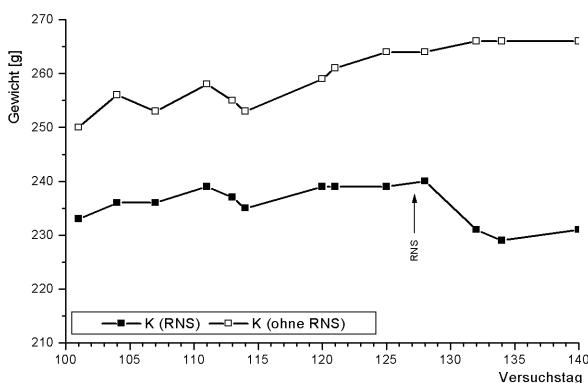


Abb. 8.9: Einfluss der RNS auf die Ratengewichte. Nur bei den Kontrollratten, die einer RNS unterzogen wurden, zeigte sich ein Gewichtsverlust in den Folgetagen.

8.5. Krankheitsverlauf

Nach der Immunisierung der Ratten (Gruppe I) wurde der Krankheitsverlauf durch optische Bewertung und Messung des Körpergewichts kontrolliert.

8.5.1. Ratte I5

Sieben Tage nach dem Boost zeigte Ratte I5 myasthene Symptome. Bei Belastung kam es zu starkem Zittern der kompletten Körpermuskulatur, anschließend legte sich die Ratte mit dem Kopf auf den Füßen hin. Ein kontinuierlicher Gewichtsverlust von 20% innerhalb von zwei Wochen zeigte die deutliche Verschlechterung des gesundheitlichen Zustands (Abb. 8.10(a)). Durch die orale Gabe von 0,3 mg Mestinon in 1,5 ml Wasser besserten sich die Symptome innerhalb weniger Minuten. Die Ratte bewegte sich schneller, das Zittern schwächte sich deutlich ab. Durch Gabe von Mestinon über das Trinkwasser (50 mg/l) wurden die Symptome weitestgehend unterdrückt. Trotz regelmäßiger oraler Gabe von Mestinon konnte der Gewichtsverlust, abgesehen von einer leichten Steigerung am 36ten Versuchstag, nicht gestoppt werden. Ab dem 42ten Tag, nachdem die Ratte innerhalb von 21 Tagen 37% ihres Gewichtes verloren hatte, kam es zu einem plötzlichen Anstieg des Gewichtes. Allerdings verstarb sie Tage später.

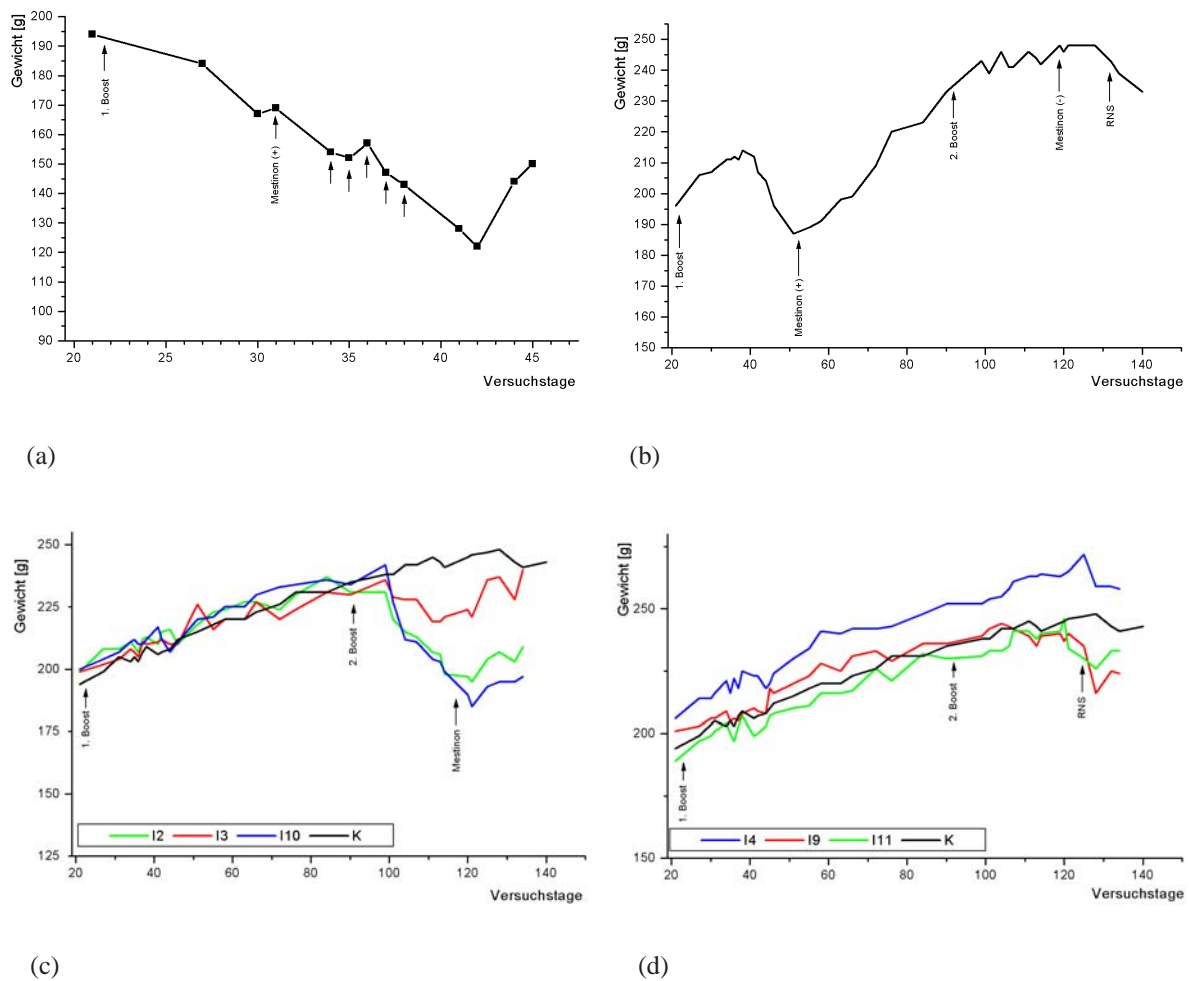


Abb. 8.10.: Gewichtskontrolle der Ratten - **(a)** Gewichtsverlauf der Ratte I5. Die Pfeile ohne Beschriftung zeigen den Zeitpunkt einer oralen Mestinon-Gabe. Die Ratte verstarb am 46ten Versuchstag. **(b)** Gewichtsverlauf der Ratte I6. Die Ratte zeigte ab dem 52ten Versuchstag myasthene Symptome und wurde mit Mestinon behandelt. Ab dem 120ten Versuchstag wurde Mestinon abgesetzt. Bei der RNS zeigte die Ratte keinen pathologischen Dekrementwert. **(c)** Gewichtsverlauf der Ratten I2, I3 und I10. **(d)** Gewichtsverlauf der Ratten I4, I9 und I11.

8.5.2. Ratte I6

Nach der Immunisierung mit T-AChR zeigte Ratte I6 ab Tag 41 eine Gewichtsabnahme (Abb. 8.10(b)). Außerdem war eine allgemeine Schwäche und Zittern bemerkbar. Die Ratte konnte nur schwer den Kopf anheben und das Kinn und die Ellbogen tendierten Richtung Boden. Unter Belastung verschlechterten sich die Symptome. Die Gabe von Mestinon war notwendig. Eine orale Gabe zeigte Wirkung und die Symptome besserten sich deutlich (opt. Bew.: +++). Durch die Gabe von 50 mg/l Mestinon über das Trinkwasser ab Tag 52 kam es zu einer kontinuierlichen Gewichtszunahme und die myasthenen Symptome waren verschwunden. Mestinon konnte am 120ten Versuchstag abgesetzt werden. Die myasthenen Symptome traten ab diesem Zeitpunkt nicht mehr auf. Bei der Kontrolle der

Erkrankung durch RNS zeigte die Ratte einen Dekrementwert von $-1 \pm 10\%$. Daher wurde die Ratte als gesund eingestuft (opt. Bewertung: -).

8.5.2.1. Ratte I2, I3 und I10

Nachdem die Ratten I5 und I6 nach dem ersten Boost bereits EAMG ausgebildet hatten, entwickelten die Ratten I2, I3 und I10 erst ein bis zwei Wochen nach dem zweiten Boost sehr starke myasthene Symptome. Nach einem erheblichen Gewichtsverlust von bis zu 57 g in drei Wochen, war ab Versuchstag 114 die Gabe von Mestinon notwendig (Abb. 8.10(c)). Der Gewichtsverlust wurde dadurch gestoppt (opt. Bew.: +++). Zwei Tage vor den elektrophysiologischen Untersuchungen wurde Mestinon abgesetzt, um die Messung zu ermöglichen. Am Tag der Messung zeigten sich erneut starke myasthene Symptome. Nach der Gabe von Chloralhydrat zum Immobilisieren verstarben alle drei Ratten bevor eine Messung möglich war.

8.5.3. Ratte I4, I7, I9, I11 und I12

Die Ratten I4, I7, I11 und I12 zeigten bis zur Kontrolle der Erkrankung am Versuchstag 126 keinen Gewichtsverlust. Allerdings waren deutliche myasthene Symptome, wie Schwäche bei Belastung zu sehen. Die Gabe von Mestinon war allerdings nicht notwendig (opt. Bew.: ++). Bei der ersten RNS zeigten alle einen pathologischen Dekrementwert (Tab. 8.4).

Die Ratte I9 verlor 18 Tage nach dem 2. Boost innerhalb von einer Woche 8 g Körpergewicht und zeigte sehr starke myasthene Symptome. Nach der Gabe von Mestinon über das Trinkwasser stabilisierte sich der Gesundheitszustand und die Ratte nahm wieder zu (opt. Bew.: +++). Zwei Tage vor der Krankheitskontrolle wurde das Mestinon abgesetzt. Ein gemessener Dekrementwert von 59 % bestätigte die optische Beurteilung.

8.5.4. Ratte I1, I6 und I8

Die Ratten I1, I6 und I8 zeigten auch nach dem 2. Boost nur eine allgemeine Schwäche der Körpermuskulatur (opt. Bew.: +). Bei der Krankheitskontrolle zeigte keine der Ratten einen pathologischen Dekrement.

8.6. Therapie

8.6.1. Durchführung

Anhand der Ergebnisse der Krankheitskontrolle durch RNS wurden die Ratten in vier neue Gruppen eingeteilt. Die Ratten I4, I9 und I11 zeigten einen hohen Dekrementwert ($> 45\%$) und wurden der Therapiegruppe (Gruppe I-T) zugeteilt. Ihnen wurde das Fusionsprotein appliziert. Die Ratten I7 und I12 zeigten einen Dekrementwert, wurden allerdings nicht mit Fusionsprotein behandelt und dienten als Kontrolle (Gruppe I-D). Die restlichen Ratten der Gruppe I (I1, I6 und I8) zeigten keinen Dekrementwert und wurden der Gruppe I-O zugeteilt. Diese Ratten wurden weiter beobachtet und auf Symptome der EAMG kontrolliert.

In Anlehnung an die Versuche von Urbatsch *et al.* (Urbatsch *et al.*, 1993) wurde den Ratten der Gruppe I-T zweimal je $200\ \mu\text{g}$ His₆^(T)-Gelolin₁₋₂₄₆-H- α -AChR₄₋₁₈₁ Fusionsprotein i.p. gespritzt. Die Gabe erfolgte im Abstand von einer Woche. Da das Fusionsprotein in einer Konzentration von $0,12\ \text{mg/ml}$ vorlag, musste die Dosis an zwei aufeinander folgenden Tagen gegeben werden. Das maximale Volumen für eine i.p. Injektion bei Ratten beträgt zwar $10\ \text{ml}$ pro kg Körpergewicht (Sharp und La Regina, 1998), allerdings sollten die Ratten nicht übermäßig durch große Volumina belastet werden.

8.6.2. Therapiekontrolle durch optische Beobachtung

Eine Woche nach der ersten i.p. Gabe von Fusionsprotein zeigten die Ratten I4 und I11 eine deutlich gesteigerte Aktivität. Die Symptome der EAMG waren verschwunden und es war keine Schwäche mehr bemerkbar (opt. Bew.: -). Ratte I9 zeigte sich immer noch schwach und bekam bis 4 Tage vor der zweiten RNS Mestinon über das Trinkwasser. Das Verhalten und die hell-rosa farbigen Augen ließen eine Erblindung der Ratte vermuten. Ob dies im Zusammenhang mit der Therapie stand, konnte nicht gesagt werden. Nach dem Absetzen des Acetylcholinesterasehemmers konnte nur eine allgemeine Schwäche beobachtet werden (opt. Bew.: +). Die Ratten der Gruppen I-O und I-D zeigten ebenso eine leichte Schwäche (opt. Bew.: +).

8.6.3. Therapiekontrolle durch RNS

Der Erfolg der Therapie wurde am 143 ten Versuchstag durch eine erneute RNS überprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 8.4 und in Abb. 8.11 aufgeführt. Für die Ratten der Gruppe I-O, die bei der Krankheitskontrolle keine pathologischen Dekrementwerte zeigten, konnten jetzt pathologische Werte nachgewiesen werden. Die Ratten der Kontrollgruppe I-D zeigten eine deutliche Verringerung bei den Dekrementwerten. So reduzierte sich bei Ratte I7 der Dekrement von 52 auf 11% und bei Ratte I12 von 24 auf 11% . Beide Werte konnten allerdings noch als pathologisch eingestuft werden. Die Rat-

Ratte	T-AChR	FP	vor Therapie		nach Therapie		Bemerkung
			opt.	D (%)	opt.	D (%)	
Gruppe K							
K1	nein	nein	-	2±2	-	-1±17	
K2	nein	nein	-	0±4	-	4±5	
K6	nein	nein	-	-4±13	-		
K7	nein	nein	-	4±20	-		
K8	nein	nein	-	4±6	-		
K9	nein	nein	-	2±8	-	-7±15	
Gruppe I-D							
I7	ja	nein	++	52±8	+	11±7	
I12	ja	nein	++	24±10	+	11±5	
Gruppe I-T							
I4	ja	ja	++	45±6	-	0±4	
I9	ja	ja	+++	51±8	+	3±9	
I11	ja	ja	++	59±5	-	-1±1	
Gruppe I-O							
I1	ja	nein	+	-5±4	+	21±2	
I6	ja	nein	+	-1±10	+	12±4	
I8	ja	nein	+	0±2	+	13±3	
Gestorbene Ratten							
I2	ja	nein	+++				bei Narkose gestorben
I3	ja	nein	+++				am 46 ten Tag gestorben
I5	ja	nein	+++				bei Narkose gestorben
I10	ja	nein	+++				bei Narkose gestorben

Tab. 8.4.: Übersicht über die Ratten des in vivo Versuchs. Opt. Bew.: Optische Bewertung der myasthenen Symptome (Tab. 8.1).

ten der Therapiegruppe I-T zeigten bei der Therapiekontrolle keinen pathologischen Dekrementwert ($D < 3\%$), während sie bei der Krankheitskontrolle deutliche pathologische Dekrementwerte gezeigt hatten ($D > 45\%$).

8.7. Diskussion

Vorteile und Nachteile des eingesetzten Fusionsproteins

Während bei den Versuchen von Urbatsch *et al.* keine komplette Abtrennung des ungekoppelten T-AChR vom chemisch gekoppeltem Konjugat möglich war und so eine Reimmunisierung der Tiere mit ungekoppeltem T-AChR, bzw. Kreuzreaktionen gegen pathologisch irrelevante Teile nicht auszuschließen waren (Urbatsch *et al.*, 1993), verfügte das von Li synthetisierte (Li, 2002) und in dieser Arbeit durch Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigte und rückgefaltete Fusionsprotein nur über

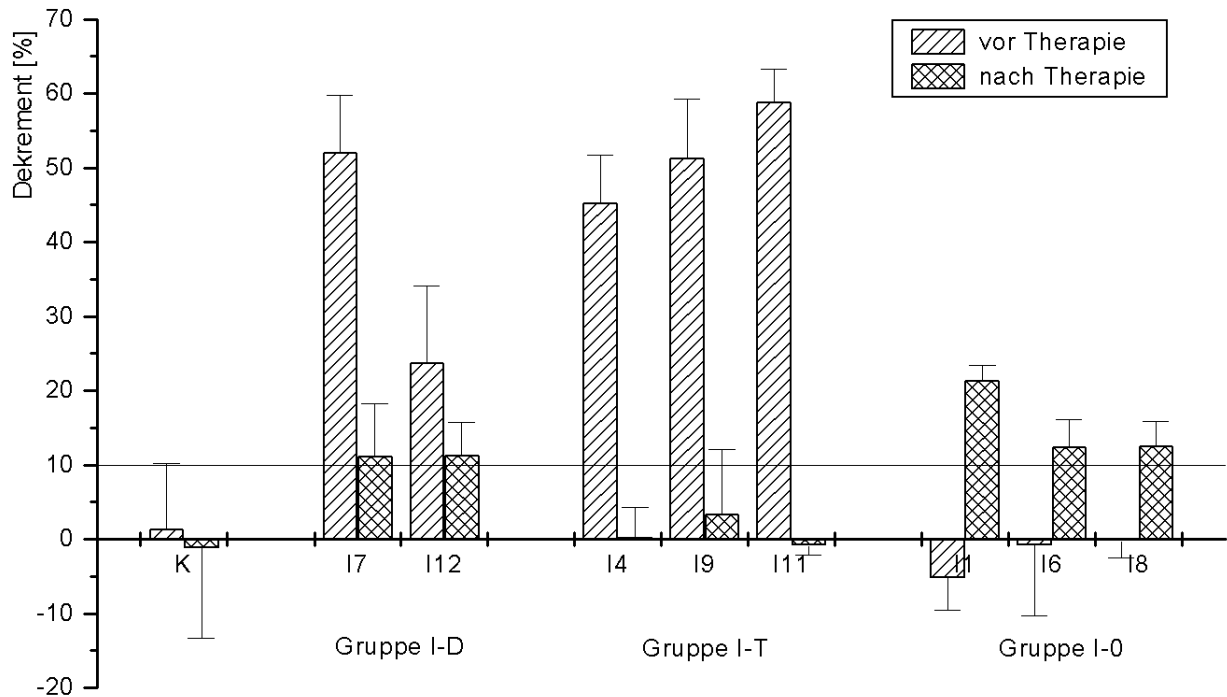


Abb. 8.11.: Ergebnisse der RNS vor und nach der Therapie mit dem Fusionsprotein. Der Schwellenwert von 10% für die Unterscheidung eines normalen von einem pathologischen Dekrement ist eingezeichnet.

geringe Verunreinigungen. Außerdem war nur der für EAMG hauptsächlich verantwortliche Bereich des AChR im AChR-Fragment enthalten. Es enthielt den extrazelluläres Fragment der α -Untereinheit, mit der hauptimmunogenen Region (MIR), an die der größte Teil der Autoantikörper im Blut myasthener Patienten binden (Tzartos *et al.*, 1988). Ein Nachteil des eingesetzten Fusionsproteins war der fusionierte HisTag. Eine Abspaltung war nicht möglich. Die stark polaren Reste könnten einen Einfluss auf das Immunsystem der Tiere haben. Eine gesteigerte Antwort des Immunsystems gegen das Protein wäre die Folge. Ein Einsatz des Fusionsproteins über einen längeren Zeitraum wäre so nicht möglich. Gegen das Fusionsprotein gebildete Antikörper könnten zu dessen Komplexierung führen und die Halbwertszeit im Körper senken. Eine Gabe von immer höheren Dosen bei der Therapie wäre die notwendige Folge. Die Reduzierung der Immunogenität und Erhöhung der Halbwertszeit *in vivo* könnte durch Kopplung des Fusionsproteins mit Polyethylenglykol erreicht werden, wie es in der Literatur bereits für Antikörper und kleine Proteine beschrieben wurde (Kitamura *et al.*, 1991; Chapman *et al.*, 1999; Trakas und Tzartos, 2001).

Induktion von EAMG

Das Tiermodell von Myasthenia gravis konnte durch Immunisierung von weiblichen Lewis-Ratten mit T-AChR erfolgreich induziert werden. Allerdings reichte eine Auffrischung der Immunisierung mit T-AChR nicht aus. Ein zweiter Boost war notwendig, um deutlich sichtbare optische Symptome

in einem Großteil der Ratten (opt. Bew.: ++/+++ bei 75 bzw. +++ bei 42 %) zu induzieren. Diese Heterogenität der Ausbildung von EAMG wurde auch von Kreilinger beobachtet (Kreilinger, 2001).

Die Wahl des Rattenstamms war von entscheidender Bedeutung. So konnten Zoda und Krolick zeigen, dass nach der Immunisierung von verschiedenen Rattenstämmen mit AChR große Unterschiede bei der Ausbildung von EAMG auftraten (Zoda und Krolick, 1993). Einige Rattenstämme zeigen sich immun gegen die Induzierung der EAMG. Der Vergleich des Wistar Furth mit dem Lewis Stamm zeigte, dass eine erhöhte enzymatische Stickstoffmonoxid-Produktion möglicherweise für die Resistenz gegenüber der EAMG-Induktion verantwortlich war (Garcia *et al.*, 2003). Auch genetische Unterschiede werden zur Erklärung der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber der EAMG-Induktion angeführt (Christadoss *et al.*, 1985; Bellone *et al.*, 1991). Daher wurden für die Versuche weibliche Lewis-Ratten verwendet, die bekannt für die erfolgreiche Induktion der EAMG sind (Patrick *et al.*, 1973; Seybold *et al.*, 1976; Lindstrom *et al.*, 1988; Christadoss, 1989).

Repetitive Nervenstimulation

Zum Nachweis der EAMG wurde die Methode der repetitiven Nervenstimulation etabliert. Bei dieser Methode wird ein Nerv (Ischiasnerv, *Nervus ischiadicus*) durch Nadelelektroden im Oberschenkel gereizt und das Ableitungssignal am Fuß der Ratte detektiert. Das Auftreten von Dekrementwerten $> 10\%$ bei der repetitiven Nervenstimulation gilt als eindeutiger Nachweis der Myasthenie (Lennon *et al.*, 1975; Thompson *et al.*, 1992) und wird auch bei der Diagnose von Myasthenia gravis beim Menschen routinemäßig eingesetzt (Rubin *et al.*, 2004).

Eine Fixierung der Ratten durch die Elektroden auf einer Styropor- bzw. Wachsplatte war notwendig, um ein mögliches Auftreten von Bewegungsartefakten in der Ableitung zu verhindern (Rubin *et al.*, 2004). Die Reizung führte zu deutlich sichtbarer Muskelarbeit. Durch Untersuchung der Messparameter wurden die optimalen Bedingungen für die RNS herausgefunden. Bei der Durchführung der Versuche war darauf zu achten, dass die Reiz- bzw. Ableitungsnadeln nahe zusammen saßen, um ein gut auswertbares EMG zu bekommen. Die Verwendung einer Masse-Elektrode war nicht notwendig. Zwar konnte das Grundrauschen deutlich reduziert werden, allerdings war kein Einfluss auf die Amplituden der im EMG detektierten Signale erkennbar. Um die Belastung der Tiere zu reduzieren, wurde auf die Verwendung einer Masse-Elektrode bei den Versuchen verzichtet.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden Stimulationen bei verschiedenen Nadelpositionen durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die Nadelposition einen geringen Einfluss, auf die aus den EMG berechneten Dekrementwerte, besaß. Die Standardabweichung lag bei $< 9\%$. Bei Messungen, die mit einer konstanten Frequenz von 4 Hz, einer Pulshöhe von 20 V und einer Pulsdauer von 0,2 ms durchgeführt wurden, waren ebenfalls Standardabweichungen bis zu 5 % vorhanden. Und dies, obwohl die Nadelposition nicht variiert wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte die Ableitung der EMG bei der Krankheits- und Therapiekontrolle durch die Messung bei konstanten Messparametern und unterschiedlicher Nadelposition, um den geringen Einfluss der Nadelposition zu

berücksichtigen.

Bei der Messung wurde in vielen Fällen ein übermäßig großes erstes Signal im EMG detektiert. Dies war auf ein Artefakt beim Einschalten des Reizgenerators zurückzuführen. Wurde eine Reihe von Einzelpulsen vermessen, so trat dies nicht auf. Da die Amplitude des ersten Signals für die Auswertung des EMG und die Berechnung des Dekrements von entscheidender Bedeutung war, musste eine Methode entwickelt werden, zu entscheiden, ob es sich beim ersten Signal im EMG um ein Artefakt handelte. Zum einen konnte durch Ausmessen der Signalabstände eine Entscheidung getroffen werden. War der Abstand zwischen dem ersten und zweiten Signal kleiner, als bei den Folgesignalen, dann konnte vom Vorliegen eines Artefakts ausgegangen werden. Einfacher war allerdings das Vorschalten von Einzelpulsen. War das erste Signal größer als die Amplituden der Einzelpulse, konnte ebenfalls vom Vorliegen eines Artefakts ausgegangen werden.

Die RNS war belastend für die Ratte. Die vermessenen Kontrollratten der Gruppe K zeigten einen deutlichen Gewichtsverlust nach der RNS. Eine Gewichtszunahme wurde im Mittel erst nach 6 Tagen wieder beobachtet. Ursache dafür dürfte die Narkose gewesen sein, da die Tiere auch einen Tag danach noch deutlich benommen waren. Eine direkte Auswirkung der RNS, z.B. durch die Schädigung der Muskulatur, wurde nicht beobachtet. Die Ratten konnten sich sofort nach dem Aufwachen aus der Narkose problemlos und ohne sichtbare Einschränkung bewegen.

Narkose

Zur Durchführung der RNS mussten die Ratten vollständig immobilisiert werden. Um dies zu erreichen, wurde den Tieren Chloralhydrat i.p. gespritzt. Die Verwendung von Hypnorm wäre allerdings Chloralhydrat vorzuziehen gewesen, war aber nicht möglich, da nicht mehr erhältlich. Hypnorm war ein Kombinationspräparat mit den Wirkstoffen Fentanyl und Fluanison. Fluanison sediert die Ratte, während Fentanyl schmerzlindernd wirkt (Sharp und La Regina, 1998). Chloralhydrat zählt zu den leichten Betäubungsmitteln. Nach der i.p. Injektion ist die Ratte für drei bis vier Stunden immobilisiert, kann aber auf schmerzhafte Stimulation reagieren (Sharp und La Regina, 1998). Die behandelnde Tierärztin Frau Dr. Westermilies empfahl uns den Wirkstoff Propofol zur Narkose. Propofol ist ebenfalls ein leichtes Betäubungsmittel, das bei Hunden zur Durchführung wenig schmerzhafter und kurzer Eingriffe verwendet wird. Allerdings hätte das Präparat i.v. gespritzt werden müssen, um eine Narkosedauer von bis zu 10 Minuten zu erreichen (Sharp und La Regina, 1998). Aufgrund der sehr kurzen Wirkdauer von Propofol, und da eine i.v. Gabe schwerer durchzuführen ist als eine i.p. Gabe, wurde auf das einfacher zu handhabende Chloralhydrat bei den Versuchen zurückgegriffen.

Krankheitsverlauf

Bei Ratten die starke myasthene Symptome in Verbindung mit Gewichtsverlust zeigten, war die Gabe von Mestinon über das Trinkwasser notwendig. Dass sich bei diesen Ratten nach der Gabe von Mestinon die Symptome deutlich besserten, war ein eindeutiger Hinweis auf das Vorliegen von EAMG.

Bei Menschen wird die Gabe von Acetylcholinesterasehemmern dazu verwendet, das Vorliegen von Myasthenia gravis zu diagnostizieren (Pascuzzi, 2001). Die Gabe des Mestinon musste kontinuierlich über das Trinkwasser erfolgen, da nach oraler Verabreichung der Wirkstoff Pyridostigminbromid innerhalb von 24 Stunden über Niere und Darm ausgeschieden wird (Husain *et al.*, 1968).

Bei Ratte I6 konnte bei der Krankheitskontrolle am Tag 126 kein pathologischer Dekrementwert gemessen werden. Der Wert von $-1 \pm 10\%$ ließ nicht auf eine ausgebrochene EAMG schließen. Dies war überraschend, da sie ab Tag 41 die typischen, myasthenen Symptome zeigte (Seybold *et al.*, 1976). Dass die Ratte zu diesem Zeitpunkt an EAMG erkrankt war, zeigte sich auch durch die Wirkung von Mestinon. Nach der Gabe über das Trinkwasser zeigte sie keine Symptome mehr und nahm wieder an Gewicht zu. Ab Tag 120 war kein Mestinon mehr notwendig. Erst bei der Therapiekontrolle zeigte sich ein pathologischer Dekrementwert von 12%. Die Ratten I4, I7 und I11 zeigten einen sehr hohen Dekrementwert ($> 45\%$) bei der Krankheitskontrolle, allerdings keine starken myasthenen Symptome (opt. Bew.: ++). Die Beobachtung, dass selbst bei hohen Dekrementwerten optisch keine myasthenen Symptome sichtbar sein müssen, zeigte Kreilinger bei ihren RNS-Untersuchungen an Ratten (Kreilinger, 2001). Lennon *et al.* zeigten, dass selbst bei einer Blockade von 60% der AChR in Ratten, optisch keine Symptome der Schwäche sichtbar werden müssen (Lennon *et al.*, 1978).

Therapie

Das Fusionsprotein zeigte schon wenige Tage nach der ersten Gabe Wirkung bei den Ratten der Gruppe I-T. Zwei der drei Ratten wirkten lebhafter und zeigten keine sichtbaren Symptome mehr. Dies konnte bei der Therapiekontrolle eine Woche nach der zweiten Gabe von Fusionsprotein im EMG bestätigt werden. Beide Ratten wiesen keinen pathologischen Dekrementwert mehr auf. Die dritte Ratte zeigte noch eine allgemeine Schwäche, allerdings war auch hier kein pathologischer Dekrementwert messbar. Daher wurden die Ratten als gesund eingestuft. Ob eine Überwindung der EAMG erfolgt war, ließ sich durch die Kürze des Versuchs nicht überprüfen. In diesem Fall wären Langzeitstudien erforderlich. Im gleichen Zeitraum kam es bei den Ratten der Gruppe I-D, die nicht mit Fusionsprotein therapiert wurden, zu einer deutlichen Abnahme des Dekrementwertes. Allerdings waren die gemessenen Werte bei der Therapiekontrolle noch als pathologisch einzustufen. Die Ratten der Gruppe I-0 zeigten bei der Krankheitskontrolle keinen pathologischen Dekrementwert. Bei der Therapiekontrolle wurden sie erneut vermessen und bei allen drei Ratten war jetzt ein pathologischer Dekrementwert detektierbar. Möglicherweise setzte die Wirkung des 2. Boost erst später bei diesen Ratten ein.

Die sehr schnelle Genesung der Ratten der Gruppe I-T bzw. die Verbesserung der Dekrementwerte bei den Ratten der Gruppe I-D könnte durch die schnelle Wiederherstellung einer ausreichenden AChR-Zahl im synaptischen Spalt erklärt werden. Im Verlauf der EAMG fanden Asher *et al.* eine spezifische Erhöhung der mRNA-Level für die α -UE des AChR (Asher *et al.*, 1993). Der Rezeptorverlust in

der postsynaptischen Membran wäre nach dem Ausschalten der autoreaktiven B-Lymphozyten bzw. Antikörper sehr schnell ausgeglichen. Dies wird auch bei Myasthenia gravis im Menschen beobachtet. Nach der Entfernung der Autoantikörper durch Plasmapherese oder der Gabe von IVIg besserten sich die Symptome der Patienten innerhalb kurzer Zeit (Dalakas, 1999; Pascuzzi, 2001).

Der *in vivo* bzw. *in vitro* Einsatz von RIP zur Ausschaltung von spezifischen Zellen ist bekannt (Kap. 6.6) (Chandler *et al.*, 1998; Arora und Leppla, 1994; al Jaufy *et al.*, 1994; McDonald *et al.*, 1996). Weiterhin wurden auch Proteine bakteriellen Ursprungs in Fusionsproteinen eingesetzt. Chaudhary *et al.* verwendeten ein Exotoxin-Fragment aus *Pseudomonas*, welches nach der Fusion mit rekombinanten humanen CD4 *in vitro* das selektive Abtöten von HIV-infizierten Zellen ermöglichte (Chaudhary *et al.*, 1988). Der vielversprechende Ansatz wurde 1992 von Aullo *et al.* bestätigt (Aullo *et al.*, 1992). Bei der Verwendung eines rekombinanten Fusionsproteins aus humanem CD4 und einem Fragment des Diphtherie-Toxins konnten HIV-infizierte Zellen *in vitro* abgetötet werden.

Fazit

Eine eindeutige Aussage über die Wirksamkeit des Fusionsproteins bei der antigenspezifischen Immunsuppression der EAMG war mit diesen Ergebnissen nicht möglich. Als Ursache für die klar nachgewiesene Genesung der therapierten Ratten könnten die folgenden Mechanismen diskutiert werden.

1. Das Fusionsprotein wirkte und führte zu einer Immunsuppression. Dafür gibt es zwei mögliche Mechanismen. Eine Ausschaltung autoreaktiver B-Lymphozyten würde die Produktion von autoreaktiven Antikörpern stoppen. Allerdings müssten alle Klone ausgeschaltet werden, um einen erneuten Ausbruch der Erkrankung zu verhindern. Neben der Ausschaltung der autoreaktiven B-Lymphozyten, wäre auch eine Komplexbildung durch pathogene Anti-AChR Antikörper möglich. Dies würde die Immunreaktion gegen den AChR abstoppen, ohne allerdings die Ursache zu beheben (McIntosh *et al.*, 1998). Dies könnte durch eine vorherige Plasmapherese verhindert werden. Die humoralen Komponenten des Immunsystems würden entfernt werden, so dass das Fusionsprotein nicht Gefahr läuft, von den Antikörpern komplexiert zu werden. Eine Aussage, ob das Protein auf humoraler oder zellulärer Ebene wirkt, konnte mit diesen Versuchen nicht überprüft werden. Der Wirkmechanismus des Fusionsproteins muss daher durch *in vitro* Versuche an antigenspezifischen B-Lymphozyten überprüft werden. Die antigenspezifische immunsuppressive Wirkung von Gelonin-T-AChR-Konjugaten wurden bereits *in vivo* von Urbatsch *et al.* gezeigt (Urbatsch *et al.*, 1993). Die Gabe führte zu einem Therapieerfolg, ohne die Immunreaktion gegen Kontrollantigene zu unterdrücken.
2. Eine weitere Erklärung für das Ergebnis des *in vivo* Versuchs wäre die spontane Genesung der Ratten. Dieses Phänomen ist bekannt und tritt bei schwacher Ausprägung der akuten bzw. chronischen Phase der EAMG auf (Lindstrom *et al.*, 1988; Lindstrom *et al.*, 1998). Dagegen spricht allerdings, dass vor der Therapie 45 % der Tiere sehr starke myasthene Symptome zeigten.

Bei den Ratten der Gruppe I-D war auch bei der Therapiekontrolle noch ein pathologischer Dekrement nachweisbar. Die Ratten der Gruppe I-0 zeigten nur schwache myasthene Symptome, was sie zu optimalen Kandidaten für die spontane Genesung gemacht hätte. Allerdings wurde bei ihnen eine Ausbildung der EAMG mit den pathologischen Dekrementwerten bei der Therapiekontrolle nachgewiesen und keine Remission beobachtet. Die Problematik der spontanen Remission bei Myasthenia gravis, wurde schon 1937 von Kennedy und Moersch erkannt. Sie vertraten die These, dass eine genaue Aussage, ob eine Therapie greift, oder eine spontane Remission beobachtet wurde, sehr schwer zu treffen sei (Kennedy und Moersch, 1937)

Welche Ursache der Genesung zugrunde lag, muss durch weiterführende Untersuchungen überprüft werden. Als abschließende Aussage läßt sich allerdings sagen, dass durch das Fusionsprotein eine deutliche Verbesserung des Krankheitszustandes auftrat. Die Ratten I4 und I11 der Therapiegruppe zeigten keine Ansätze der Muskelschwäche mehr und zeigten auch bei der Therapiekontrolle keinen pathologischen Dekrementwert mehr. Dagegen zeigten die Ratten der Therapiekontrollgruppe I-D immer noch myasthene Symptome und einen pathologischen Dekrementwert.

9. Zusammenfassung

9.1. Chemische Deglykosylierung von natürlichem Gelonin

Natürliches Gelonin, isoliert aus den Samen von *Gelonium multiflorum*, konnte mit Hilfe von Trifluormethansulfonsäure (TFMS) chemisch deglykosyliert werden. Aus einem SDS-Gel errechnete sich ein Masseverlust von 4,4 %, wie er auch in der Literatur gefunden wurde (Falasca *et al.*, 1982). Es werden zwei mögliche Aminosäuresequenzen für natürliches Gelonin diskutiert (Nolan *et al.*, 1993; Rosenblum *et al.*, 1995). Unter Einbeziehung der Ergebnisse der Deglykosylierung und der massenspektrometrischen Untersuchungen von Daubenfeld (Daubenfeld, 2003), scheint die Aminosäuresequenz von Nolan *et al.* im natürlichen Gelonin vorzuliegen.

Durch Auswertung des Massenspektrums von natürlichem Gelonin (Hossann, 2001) konnte ein Vorschlag für ein mögliches Glykosylierungsmuster erstellt werden. So deckten sich die kalkulierten mittleren molekularen Massen sehr gut mit den im ESI-Massenspektrum gefundenen Massen, wenn eine Glykosylierung von $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_x\text{Xyl}_1$ ($x = 2-5$) angenommen wurde. Dieses Glykosylierungsmuster enthält die Kern-Struktur des paucimannosidischen Typs. Glykoproteine dieses Typs kommen unter anderem in Pflanzensamen vor (Lerouge *et al.*, 1998).

9.2. Expression und Isolierung von rekombinantem Gelonin

Unter Verwendung des Expressionsvektors pET-gel konnte rekombinantes Gelonin in hohen Ausbeuten und Reinheit aus *E.coli* isoliert werden. Dazu wurde das Expressionsplasmid in kompetente BL21(DE3) Zellen transformiert, in LBK-Medium kultiviert und das Protein exprimiert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach Inkubation mit Lysozym und durch Ultraschall. Das Zelllysate konnte nach einem Ultrazentrifugationsschritt direkt auf die Nickel-Affinitätssäule aufgetragen werden und His_6^T -Gelonin₁₋₂₅₁ durch eine schrittweise Erhöhung der Imidazolkonzentration vom größten Teil der Verunreinigungen abgetrennt werden. Mit 500 mM Imidazol im Puffer gelang die Elution von der Säule. Es wurden ca. 2,4 mg Protein aus 1 l Schüttelkultur erhalten.

Eine zweite Möglichkeit zur Isolierung bestand durch die direkte Abspaltung des HisTag auf der Säule. Der größte Teil der unspezifisch gebundenen Proteine konnte mit Imidazol-haltigem Waschpuffer von der Säule gewaschen werden. Zur Elution von Gelonin₁₋₂₅₁ wurden die gebundenen Proteine mit Thrombin inkubiert, der HisTag abgespalten und das Protein spezifisch eluiert. Die Methode

Isolationsmethode	Reinheit (%)	Ausbeute (mg/l)	Toxizität (pM)
Ionenaustauscher (Li, 2002)	n.b.	n.b.	1150
Ionenaustauscher (Büttner, 2002)	92	1,6	100
Nickel-Affinitätschromatographie (Elution mit Imidazol)	95	2,4	80 [†]
Nickel-Affinitätschromatographie (Elution mit Thrombin)	99	2,6	n.b.

Tab. 9.1.: Vergleich der Reinheit, Ausbeute und Toxizität der Isolierung von rekombinantem Gelonin bei verschiedenen Isolationsmethoden. Die Reinheit wurde durch densitometrische Analyse der SDS-Gele bestimmt. Ausbeute in mg pro l Schüttelkultur; n.b. : nicht bestimmt, [†] bei abgespaltenem HisTag.

führte zu größerer Reinheit des isolierten Proteins (Tab. 9.1). Die Ausbeute an reinem Protein betrug 2,6 mg aus 1 l Schüttelkultur. Da Thrombin durch 0,5 M Natriumchlorid gehemmt wird, musste die doppelte Menge zur Abspaltung des HisTag verwendet werden.

Durch ESI-FT-MS konnte His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ als 30.512 Da bzw. 30.334 Da schweres Protein identifiziert werden. Die Masse von 30.512 Da stimmte mit der berechneten Molekularmasse von 30.496 Da überein, wenn eine Oxidation eines Schwefelatoms (+16 Da) im Protein angenommen wurde. Die Masse von 30.334 Da entsprach His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ bei abgespaltenem Formyl-Methionin.

Im ELISA und Western Blot zeigte His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ mit polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern eine, mit natürlichem Gelonin, vergleichbare Reaktivität. Somit konnte vom Vorliegen einer nativen Struktur ausgegangen werden. Deutlich gezeigt werden konnte die Immunogenität des HisTag beim Test mit polyklonalen Anti-Gelonin Antikörpern. Bei gleicher eingesetzter Proteinmenge zeigte His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ eine deutlich positivere Reaktion als Gelonin₁₋₂₅₁.

In einem *in vitro* Translationstest zeigte sich Gelonin₁₋₂₅₁ um den Faktor 2 toxischer als natürliches Gelonin. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der HisTag keinen Einfluss auf die Toxizität des Proteins besitzt.

9.3. Klonierung, Expression und Isolierung von H- α -AChR₄₋₂₀₈

Mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden gelang die Synthese des Expressionsvektors für H- α -AChR₄₋₂₀₈. Aus zwei Oligonukleotiden wurde eine 100 bp Box synthetisiert, welche die Sequenz für H- α -AChR₁₈₂₋₂₀₈ enthielt. Nach der Umklonierung der DNA-Sequenz für H- α -AChR₄₋₁₈₁ in den Klonierungsvektor pBDH-VU1, wurde der erhaltene Vektor erneut mit Restriktionsenzymen geöffnet, die 100 bp-Box eingebaut und mit T4-DNA Ligase ligiert. Das Vorliegen der richtigen DNA-Sequenz für H- α -AChR₄₋₂₀₈ wurde dabei durch Sequenzierung eines Teils des Klonierungsvektors pUC α HE706ext nachgewiesen. Nach der Umklonierung der DNA-Sequenz für H- α -AChR₄₋₂₀₈ in einen Expressionsvektor wurde p α HE706ext erhalten. Der Expressionsvektor verfügte über einen N-terminalen HisTag mit 10 Histidinresten und einer Schnittstelle für Enterokinase.

Nach der Expression in *E.coli* und der Lyse der Zellen durch Lysozym und mit Ultraschall, fand sich das exprimierte Protein nicht wie erwartet in den *inclusion bodies*, sondern als lösliches, nativ gefaltetes Protein im Zellüberstand. Dies ließ sich durch die deutlich positive Reaktion mit den konformationsabhängigen Anti-MIR Antikörpern mAb 35 nachweisen. Eine Isolierung über Nickel-Affinitätschromatographie führte aber nicht zu sauberem H-α-AChR₄₋₂₀₈. Während bei der Isolierung durch die schrittweise Elution mit Imidazol in der 500 mM-Fraktion noch eine große Zahl von unspezifisch gebundenen Proteinen vorhanden war, war die Elution durch Enterokinase erfolgreicher. Allerdings zeigten sich auf einem SDS-Gel noch zwei weitere Proteine neben H-α-AChR₄₋₂₀₈.

Um höhermolekulare Verunreinigungen abzutrennen, wurde H-α-AChR₄₋₂₀₈ durch eine Membran mit einem Ausschlussvolumen von 30 kD zentrifugiert. Allerdings passierte das 24 kD schwere Protein nicht die Membran. Daher wurde eine Oligomerenbildung diskutiert, wie es auch bei anderen exprimierten α-AChR_{ex}-Fragmenten gefunden wurde. Im Rahmen dieser Arbeit war keine Optimierung der Isolierungsmethode mehr möglich.

Die Charakterisierung des exprimierten Proteins war nur durch ELISA und Molekularmassenbestimmung der SDS-PAGE Fraktionen möglich. Ein Western Blot mit Anti-HisTag Antikörpern war nicht erfolgreich. Während die Antikörper im ELISA mit der 500 mM-Imidazol, bzw. Enterokinase-Fraktion der Nickel-Affinitätschromatographie, deutlich positiv reagierten, zeigten sie im Western Blot keine eindeutige Reaktion.

9.4. Isolierung von His₆^(T)-Gelonin₁₋₂₄₆-H-α-AChR₄₋₁₈₁

Mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie gelang die Isolierung des His₆^(T)-Gelonin₁₋₂₄₆-H-α-AChR₄₋₁₈₁ Fusionsproteins. Eine direkte Isolierung über Nickel-Affinitätschromatographie nach dem Lösen der *inclusion bodies* in denaturierendem Puffer war möglich. Da das Fusionsprotein denaturierend aufgearbeitet wurde, musste es renaturiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Rückfaltungsmethode von Li deutlich optimiert werden. Durch die Rückfaltung ohne DTT im Puffer erhöhte sich die Ausbeute von 10 auf bis zu 27 %. Die bei der Rückfaltung ausgefallenen, falschgefalteten Aggregate konnten wieder in denaturierendem Puffer aufgelöst und erneut renaturiert werden. Durch diese Recycling-Methode konnte die Ausbeute noch einmal erhöht werden. Nach der Rückfaltung konnte das Fusionsprotein bis auf Konzentrationen von 0,15 mg/ml aufkonzentriert werden.

Das Fusionsprotein wurde durch SDS-PAGE, ELISA, Western Blot und einen *in vitro* Translations-test charakterisiert. Es zeigte sich, dass im renaturierten Protein das H-α-AChR₄₋₁₈₁-Fragment nativ gefaltet vorlag. Dies war überraschend, da die Expression und Isolation des H-α-AChR₄₋₁₈₁-Fragments ohne Gelonin als Fusionspartner bisher nicht zu nativem Protein führte. Die korrekte Faltung der MIR wurde durch die Bindung von konformationsabhängigen Anti-MIR Antikörper gezeigt.

In einem Toxizitätstest zeigte sich die richtige Faltung des Gelonin₁₋₂₄₆-Fragments. Das Fusionsprotein war um den Faktor 11 weniger toxisch als das rekombinante Gelonin. Dies ließe sich durch eine sterische Hinderung des aktiven Zentrums des Gelonin-Fragments durch das AChR-Fragment erklären.

Der HisTag war nicht abspaltbar und somit der Einfluss auf die Toxizität nicht bestimmbar. Ursache könnte eine sterische Hinderung der Thrombin-Schnittstelle gewesen sein, da rückgefaltetes Fusionsprotein nicht mehr an immobilisierte Nickel-Ionen band.

Eine Rückfaltung in physiologischem PBS-Puffer führte nicht zum Erfolg. Das Fusionsprotein zeigte nach der Renaturierung keine Reaktion mit den konformationsabhängigen Anti-MIR Antikörpern. Außerdem aggregierte es bei Konzentrationen über 90 µg/ml. Daher wurde bei den *in vivo* Versuchen auf das mit Tris-Renaturierungspuffer rückgefaltete Fusionsprotein zurückgegriffen.

9.5. Isolierung des AChR aus *Torpedo californica*

Aus dem elektrischen Organ von *Torpedo californica* konnte T-AChR in ausreichenden Mengen zur Induktion der EAMG in Ratten isoliert werden. Dabei gelang die Affinitätschromatographie an α -Cobratoxin-Säulen sowohl im Durchfluss-, als auch im Batch-Verfahren. Eine Verunreinigung bei 43 kD wurde aufgrund der geringen Menge vernachlässigt.

9.6. Versuche zur antigenspezifischen Immunsuppression *in vivo*

Mit Hilfe von aus *Torpedo californica* isoliertem T-AChR gelang die Induktion von EAMG in weiblichen Lewis-Ratten. Die Ratten zeigten optisch myasthene Symptome wie Schwäche, Zittern und die typische Körperhaltung. Die Ausprägung variierte von Ratte zu Ratte. Das Vorliegen der Erkrankung konnte durch eine repetitive Nervenstimulation des Ischiasnerv nachgewiesen werden, deren Etablierung im Rahmen dieser Arbeit gelang.

Zur Therapie wurde drei stark myasthenen Ratten das His₆^(T)-Gelonin₁₋₂₄₆-H- α -AChR₄₋₁₈₁ Fusionsprotein gespritzt. Nach einer Woche zeigte sich eine deutliche Besserung des Gesundheitszustands von zwei Ratten. Bei der Überprüfung des Therapieerfolgs mit RNS war bei keiner der therapierten Ratten ein pathologischer Dekrementwert feststellbar. Allerdings zeigten auch die myasthenen Ratten, die nicht mit dem Fusionsprotein therapiert wurden, eine Abnahme in den Dekrementwerten. Allerdings waren diese immer noch als pathologisch einzustufen. Die mit T-AChR immunisierten Ratten die bei der Krankheitskontrolle keine pathologischen Dekrementwerte zeigten, entwickelten EAMG.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine therapeutische Wirkung des Fusionsproteins auf EAMG nachgewiesen werden. Allerdings ließen sich keine Aussagen über den Wirkmechanismus treffen.

10. Experimenteller Teil

10.1. Materialien

10.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bei der Durchführung der Versuche wurden die folgenden Geräte verwendet:

Autoklav:	Sitram Dampfkochtopf
Chromatographie:	Beckman System Gold Nouveau (HPLC-System) Beckman Solvent Module 125 Beckman Detector Module 168 Pharmacia Peristaltikpumpe P-1 Pharmacia Peristaltikpumpe P-3
Densitometer:	Hirschmann Elscript 400
Durchflussphotometer:	LKB Pharmacia 2238 Uvicord S
EIA-Plattenreader:	Bio-Rad Typ 2550
Elektrophoresezubehör:	Elektrophoresekammern (Eigenbau der Kunststoff-verar- beitenden Werkstatt, Universität Kaiserslautern) Lichtbank Rex Sofortbildkamera Polaroid DS34
Gefriertrocknung:	Leybold-Heraeus Lyovac GT-2
Inkubatoren:	Luftschüttler New Brunswick Incubator Shaker Innova 4000 Wasserschüttler Infors AG HTBTR 112
Kanülen:	Stericam \varnothing 0,60 x 25 mm (23G x 1")
Konzentratoren:	Millipore Amicon Ultra (10.000 und 30.000 MWCO) Millipore Centriprep YM-10 (10.000 MWCO)
Küvetten:	Brand Plastibrand (Vis) Hellma Suprasil (UV)

Mixer:	Waring Blendor Typ 8011
Oszilloskop:	Yokogawa DL 1540
pH-Meter:	Knick AG StB
Rotoren:	Beckman Type 70Ti Beckman JA10, JA14 und JA20 Heraeus Rotor 2250
Spannungsgeräte:	BIO-RAD Power Pac 300 BIO-RAD Power Pac 3000 Zentro-Elektrik 150 V/0,5 A
Transilluminator:	Fröbel TFX-20.M
Ultraschall:	Branson Sonifier B-12 Brandelin Ultraschallbad Sonorex RK 106
UV/VIS-Spektrophotometer:	Beckman DU 640
Waagen:	Feinwaage Sartorius 1601 MP8-1 Sartorius L 610 D
Zentrifugen:	Beckman Optima LE-80k Ultrazentrifuge Beckman J2-21 Eppendorf Zentrifuge 5415C Heraeus Minifuge T

10.1.2. Chemikalien

Aceton	Merck
Agarose	Roth
Agarose (Metaphor)	Biowhittaker Molecular Applications
Agarose (NEEO, Rotigarose)	Roth
L-Aminosäuren-Kit	Sigma
Ammoniumhydrogencarbonat	Serva
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Roth
Bacto Agar	Difco
Bacto Peptone	Difco
BCA Protein Assay Reagenz A und B	Pierce
BCIP/NBT-Blue Liquid Substrat System	Sigma

Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma
Butanol	Riedel-de Haen
Calciumchlorid	Riedel-de Haen
Carbamoylcholinchlorid	Sigma
Cholat, Natrium-Salz	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva
Creatinphosphat, Natriumsalz	Serva
DEA	Merck
DTT	Gerbu Biotechnik GmbH
EDTA	Serva
EGTA	Serva
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	USB
Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz	Merck
Formaldehyd	Roth
Freund's Adjuvans, inkomplett	Sigma
Freund's Adjuvans, komplett	Sigma
Glutathion, oxidiert	Roth
Glutathion, reduziert	Roth
Glycerin	Caldic Deutschland
Glycin	Serva
Guanidin-hydrochlorid	Gerbu Biotechnik GmbH
Hefe-Extrakt	Difco
Hemin	Serva
Imidazol	Sigma
IPTG	Gerbu Biotechnik GmbH
Kaliumacetat	Riedel-de Haen
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Merck
Kaliumhydroxid	Riedel-de Haen
Kanamycin-Sulfat	Gerbu Biotechnik GmbH
Kaninchen Retikulozyten Lysat, unbehandelt	Promega
Kupfer(II)sulfat	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Manganchlorid	Merck
β -Mercaptoethanol	Fluka

Milchpulver	Roth
Mestinon 10, Filmtabletten (Wirkstoff: Pyridostigminbromid)	ICN
MOPS	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Riedel-de Haen
Natriumchlorid	Riedel-de Haen
Natriumcholat	Sigma
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haen
Natriumdihydrogencarbonat	Riedel-de Haen
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haen
Natriumhydroxid	Merck
Natrium-/Kaliumtartrat	Fluka
Natriumthiosulfat	Merck
Nickelsulfat	Merck
4-Nitrophenylphosphat	Boehringer Mannheim
PMSF	ICN Biomedicals
Pyridin	Merck
Rotiszint ecoplus	Roth
Rubidiumchlorid	Sigma
SDS	Roche
Silbernitrat	Merck
TEMED	Sigma
TFMS	Sigma
Trichloressigsäure	Roth
Tris	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Sigma
L-Valin	Sigma
L-[U- ¹⁴ C]Valin	Amersham Pharmacia Biotech
Wasserstoffperoxid	Riedel-de Haen

10.1.3. DNA- und Proteinmarker

Es wurden die folgenden DNA-Marker verwendet. Die Größe der Fragmente in (bp) ist angegeben. Alle DNA-Marker stammten von der Fa. Fermentas.

λ -DNA <i>Eco47I</i> (<i>AvaII</i>)	8.126, 6.555, 6.442, 3.676, 2.606, 2.555, 2.134, 2.005, 1.951, 1.611, 1.420, 1.284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 398, 345, 310, 308, 272, 242, 215, 151, 88, 73, 67, 45, 42, 32, 29, 23
λ -DNA <i>HindIII</i>	23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564, 125
DNA Ladder (Broad Range)	10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80
DNA Ladder (High Range)	10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500
DNA Ladder (Low Range)	1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80
pBR322 <i>BsuRI</i>	1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80
pBR322 <i>AluI</i>	908, 659, 656, 521, 403, 281, 257, 226, 100, 90, 63, 57, 49, 46, 19, 15, 11

Für SDS-PAGE und Western Blot wurden die folgenden Proteinmarker verwendet. Die Zahlen geben die Größe in (kDa) der Proteine im Standard an.

Bio-Rad (Broad range)	205, 116, 80, 49,5, 32,5, 27,5, 18,5, 6,5	Bio-Rad
Roti-Mark Prestained	245, 123, 77, 42, 30, 25,4 17	Roth
Roti-Mark Standard	200, 119, 66, 43, 29, 20, 14,5	Roth
Protein-Ladder 10-200kD	200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10	Fermentas

10.1.4. Säulenmaterial

Zur chromatographischen Aufreinigung wurde das folgende Säulenmaterial verwendet:

α -Cobratoxin immobilisiert an CNBr-aktivierter Agarose	Sigma
HiTrap Chelating	Amersham Pharmacia Biotech
HiTrap SP FF	Amersham Pharmacia Biotech
Ni-CAM HC Resin	Sigma

10.1.5. *E.coli*-Stämme und Plasmide

Für die gentechnischen Arbeiten wurden die folgenden *E.coli*-Stämme verwendet (Genotyp nach Sambrook *et al.*, 1989).

BL21(DE3)	F^- <i>ompT hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)
DH5 α	F^- (Φ 80d Δ (<i>lacZ</i>)M15) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁻) supE44 relA1 deoR Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169</i>

GM2163 F⁻ dcm-6 dam-13::Tn9 araC14 leuB6 fhuA13 lacY1 tsx-78glnV44(0c) galT22
LAM- mcrA0 hisG4(0c) rfbD1 rpsL136(strR) xylA5 mtl-12 thi-1 mcrB9999 hsdR2

Für die Klonierungs- und Expressionsversuche wurden die folgenden Plasmide verwendet:

pαHE706	6.196 bp	Ampicillin	(Hossann, 2001)
pαHE706ext	6.014 bp	Ampicillin	Kap. 5.3.5
pBDH-VU1	4.432 bp	Ampicillin	(Jehl, 2002)
pET19b	5.717 bp	Ampicillin	Fa. Novagen
pET-gel	6.089 bp	Kanamycin	(Li, 2002)
pET-GA	6.870 bp	Kanamycin	(Li, 2002)
pUCαHE706	4.073 bp	Ampicillin	Kap. 5.3.2
pUCαHE706ext	3.891 bp	Ampicillin	Kap. 5.3.4

Der Vektor pαHE706 wurde uns freundlicherweise von Dr. D. Beeson (Institute of Molecular Medicine, Oxford, England) zur Verfügung gestellt.

10.1.6. Proteine und Enzyme

Die für die Versuche verwendeten, käuflich erhältlichen, Enzyme und Proteine sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Creatin-Phosphokinase, Typ I (aus Hasenmuskel)	Sigma
Glucose-Dehydrogenase	Roche
Enterokinase, rekombinant (1,7 U/μl)	Novagen
Lysozym aus Hühnereiweiß (130.000 U/mg)	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Gerbu Biotechnik GmbH
T4 DNA Ligase (5 U/μl)	MBI Fermentas
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl)	MBI Fermentas
Thrombin (1,4 U/μl)	Novagen

Für die durchgeführten Restriktionsreaktionen wurden die mitgelieferten Pufferlösungen verwendet. In Klammern sind die Prototypen der Restriktionsendonukleasen angegeben.

<i>Bcl</i> II	15 U/μl	New England Biolabs
<i>Bgl</i> II	10 U/μl	MBI Fermentas
<i>Eco</i> 32I (<i>Eco</i> RV)	10 U/μl	MBI Fermentas
<i>Eco</i> 130I (<i>Sty</i> I)	10 U/μl	MBI Fermentas

<i>Eco</i> O109I (<i>Dra</i> II)	10 U/μl	MBI Fermentas
<i>Eco</i> RI	10 U/μl	MBI Fermentas
<i>Hinc</i> II (<i>Hind</i> II)	10 U/μl	MBI Fermentas
<i>Hind</i> III	10 U/μl	MBI Fermentas
<i>Mbo</i> II	5 U/μl	MBI Fermentas
<i>Nco</i> I	10 U/μl	New England Biolabs
<i>Nde</i> I	10 U/μl	MBI Fermentas
<i>Sca</i> I	10 U/μl	MBI Fermentas
<i>Van</i> 91I (<i>Pfl</i> MI)	10 U/μl	MBI Fermentas
<i>Xho</i> I	10 U/μl	MBI Fermentas

10.1.7. Antikörper

Für die immunologischen Untersuchungen wurden die in Tab. 10.10 aufgeführten Antikörper verwendet. Der Antikörper mAb 35 stammte aus der im Arbeitskreis vorhandenen Hybridomzelllinie (ATCC, HB-8857), die polyklonalen Anti-Gelonin Antikörper wurden im Arbeitskreis durch die Immunisierung von Mäusen mit Gelonin produziert. Alle anderen Antikörper waren käuflich erworben.

10.1.8. Oligonukleotide

Zur Synthese des Plasmides pαHE706ext wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten synthetischen Oligonukleotide eingesetzt. Die Oligonukleotide ext1 bis ext5 stammten von der Fa. MWG, während ext123 und ext45 von der Fa. Operon synthetisiert wurden.

ext1	5'-GATCAAGGAGTCCCGTGGCTGGAAACATAG-3'
ext2	5'-CGTGACCTATAGCTGCTGCCCGGATACCCCGTATCTGGA-3'
ext3	5'-ATTACCTATCATTTCGTGATGCAGTAACTG-3'
ext4	5'-AATTCAGTACTGCATCACGAAATGATAGGTAATATCCAGATACGGGGTATCCG-3'
ext5	5'-GGCAGCAGCTATAGGTCACGCTATGTTTCCAGCCACGGGACTCCT-3'
ext123	5'-GATCAAGGAGTCCCGTGGCTGGAAACATAGCGTGACCTATAGCTGCTGCCCCG... ...ATACCCCGTATCTGGAATTACCTATCATTTCGTGATGCAGTAACTG-3'
ext45	5'-AATTCAGTACTGCATCACGAAATGATAGGTAATATCCAGATACGGGGTATCCG... ...GGCAGCAGCTATAGGTCACGCTATGTTTCCAGCCACGGGACTCCT-3'

10.2. Allgemeine Arbeitsmethoden

10.2.1. Konzentrationsbestimmungen

10.2.1.1. UV/VIS-Bestimmung

Proteine beinhalten aromatische Gruppen, die bei einer Wellenlänge von 280 nm eine Absorptionsbande aufweisen. Durch Messung der Absorption und Einbeziehung des molaren Extinktionskoeffizienten lässt sich die Proteinkonzentration bestimmen (Peterson, 1977). Die Anwesenheit anderer Proteine stört dabei die Messung. In der folgenden Tabelle sind die molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) und Extinktionen bei einer Konzentration von 1 mg/ml (E_c) der verwendeten Proteine aufgeführt.

Protein	ϵ (cm^2/mmol)	E_c
Rinderserumalbumin	45.400	0,667
Gelonin, aus <i>Gelonin multiflorum</i>	20.100	0,670
AChR, aus <i>Torpedo californica</i>	477.500	1,910

10.2.1.2. BCA-Test

Der BCA-Test dient zur Bestimmung der Proteinmenge mit Hilfe eines Testsystems der Firma Pierce. Mit einem Gemisch aus 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolinatriumsalz (BCA, Reagenz A) und Kupfer(II)sulfat (Reagenz B) erhält man eine Lösung, die zur Proteinbestimmung herangezogen werden kann. Die Cu^{2+} -Ionen werden dabei durch oxidierbare Gruppen im Protein zu Cu^+ -Ionen reduziert, die dann von BCA komplexiert und durch photometrische Bestimmung detektiert werden können (Smith *et al.*, 1985).

10.2.1.3. Methode nach Lowry

Analog zum BCA-Test liegt bei der Proteinbestimmung nach Lowry die Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Grunde. Die entstandenen Cu^+ -Ionen bilden mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz einen instabilen blauen Komplex. Dieser dient als Maß für die Proteinkonzentration. Während die BCA-Methode durch reduzierende Substanzen (Thiolreagenzien, Lipide, SDS, u.s.w) gestört wird, zeigt sich die Methode nach Lowry, aufgrund der vorher durchgeführten TCA-Fällung, unempfindlich. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der von Peterson modifizierten Methode (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1977).

10.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE lassen sich Proteine aufgrund ihrer Molekularmassen trennen und charakterisieren. Die Methode geht auf Laemmli zurück (Laemmli, 1970). Sie wurde geringfügig modifiziert: 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 20-28 mA durchgeführt. Es wurden 4,5 %ige Sammel- und 10, 12 und 15 %ige Trenngele verwendet. Aufgrund ihrer geringen Konzentration war es bei einigen Proben erforderlich die Proteine vor Einbringen in die Taschen des Gels mit TCA (Kap. 10.2.4.2) zu fällen.

Coomassie-Färbung

Eine zur Färbung von SDS-Gelen weit verbreitete Methode ist die Färbung mit Coomassie Brilliantblau R 250. Sie zeichnet sich vor allem durch die Linearität der Proteinfärbung und geringe Hintergrundfärbung aus. Dies ermöglicht z.B. die quantitative Proteinbestimmung mit Hilfe einer densitometrischen Analyse. Nachteil im Vergleich mit der Silberfärbung ist die geringere Nachweisgrenze. Es können mit der Coomassie-Färbung noch etwa 2 µg Protein detektiert werden (de Groth *et al.*, 1963). Auf eine Fixierung mit Hilfe einer 12,5 %igen TCA-Lösung wurde verzichtet.

Silberfärbung

Die Silberfärbung ist empfindlicher als die Coomassie-Färbung. Es lassen sich noch 0,5-1 µg Protein nachweisen. Allerdings ist die Hintergrundfärbung stärker und die Färbung zeigt eine geringere Linearität (Heukeshoven und Demick, 1983).

Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht der Proteine lässt sich auf SDS-Gelen durch den Vergleich mit den bekannten Molekulargewichten von Standardproteinen bestimmen. Dazu werden der Logarithmus der Molekulargewichte der Standards gegen die Laufstrecke aufgetragen. Man erhält eine Eichgerade. Das gesuchte Molekulargewicht der Probe(n) kann dann mit Hilfe der Regressionsgeraden berechnet werden.

10.2.3. Dialyse

Die Dialyse von Proteinlösungen dient zum Pufferwechsel, bzw. zum Entfernen von niedermolekularen Substanzen.

Durchführung:

Der Dialyseschlauch (Visking Size 1-8/32“ Fa. Fischer) wird im Dialysepuffer für 10 Minuten inkubiert, an einem Ende verknotet und die Proteinlösung eingefüllt. Nach dem Verknoten des anderen Endes wird der Schlauch in 5 l Dialysepuffer gegeben und über Nacht, unter leichtem Rühren des Puffers, inkubiert. Am nächsten Tag wird der Dialysepuffer zweimal gewechselt und jeweils für ca. 2 Stunden inkubiert.

10.2.4. Proteinkonzentration**10.2.4.1. Aufkonzentration mit Amicon-Konzentratoren**

Zur Aufkonzentration von Proteinlösungen können Membranen mit definierten Porengrößen verwendet werden. Durch die Zentrifugation (4.170 xg, 20 °C, ca. 1 min/ml) der Lösung durch die Membran werden kleinere Moleküle durchgelassen, Moleküle mit größerem Durchmesser als die Pore werden zurückgehalten und aufkonzentriert.

10.2.4.2. Fällung mit Trichloressigsäure

Die Fällung und anschließende Wiederaufnahme von Proteinen in geringeren Volumina ist eine der effektivsten Methoden der Proteinkonzentration. Die Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) (Bensadoun und Weinstein, 1976) ist allerdings aufgrund der Irreversibilität nur in Verbindung mit Lowry und SDS-PAGE sinnvoll.

Benötigte Lösungen:

DOC:	0,15 g Natriumdeoxycholat ad 100 ml Wasser
TCA:	72 g Trichloressigsäure ad 100 g Wasser

Durchführung:

Die zu fällende Proteinprobe wird mit Wasser auf 1 ml verdünnt, mit 100 µl DOC-Lösung versetzt, gut durchmischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl der TCA-Lösung wird die Probe gevortext und für 20 Minuten bei 14.000 U/min (4 °C) in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Gefäß vorsichtig ausgeklopft.

Bei Guanidin-hydrochlorid-haltigen Proben wird das Pellet nach der Zentrifugation mit 100 µl eisgekühltem Ethanol gewaschen, um die Reste zu entfernen. Es wird kurz abzentrifugiert und der

Überstand entfernt. Das Gefäß wird erneut ausgeklopft und das Pellet weiterverarbeitet (SDS-PAGE, Lowry).

10.3. Gentechnische Methoden

Die hier beschriebenen Arbeitsmethoden folgen den Vorschriften von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989). Bei den Arbeiten wurden die folgenden Fest- und Flüssigmedien verwendet:

Benötigte Lösungen

Luria-Bertani (LB)-Medium:	5 g Hefe-Extrakt 10 g Bacto-Trypton (Trypton-Pepton) 10 g Natriumchlorid pH 7,5 (NaOH) ad 1 l Wasser autoklavieren
Ampicillin-Stammlösung:	130 mM Ampicillin über 0,22 µm steril filtrieren
Kanamycin-Stammlösung:	45 mM Kanamycin über 0,22 µm steril filtrieren
Agar-Platten:	Dem LB-Flüssigmedium werden 1,5 % Agar zugesetzt und autoklaviert. Die Zugabe des Antibiotikums (1 µl/ml Medium) erfolgt bei ca. 50 °C. Die Petrischalen werden mit warmer Lösung befüllt und langsam auf RT abgekühlt.
IPTG-Stammlösung:	0,5 M IPTG über 0,22 µm steril filtrieren

10.3.1. Allgemeine Arbeitsmethoden

10.3.1.1. Sterilisation von Geräten

Bei der Durchführung der Versuche ist steriles Arbeiten erforderlich. Dazu müssen alle Geräte keimfrei sein. Dies wurde durch Autoklavieren erreicht. Nicht autoklavierbare Gegenstände wurden mit Alkohollösungen (70 %iges Ethanol-Wasser-Gemisch) desinfiziert.

10.3.1.2. Kulturbedingungen

Aus einer Glycerinkultur (Kap. 10.3.1.4) wird ein Verdünnungsausstrich auf einer Agarplatte angelegt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Mit einer Einzelkolonie werden 25 ml Flüssigmedium angeimpft und unter Schütteln (Wasserbad- bzw. Luftschüttler, 270 U/min, 37 °C) über Nacht inkubiert. Ausgehend von dieser Übernachtskultur kann eine größere Kultur angeimpft werden. Als Gefäße für die Flüssigmedien dienen Erlenmeyerkolben, die bis zu maximal 25 % befüllt werden, um eine ausreichende Belüftung des Kulturmediums zu gewährleisten.

10.3.1.3. Wachstumsmessungen

Zur Kontrolle des Bakterienwachstums wird das Medium photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm im UV/VIS-Spektrophotometer untersucht. Das Licht wird beim Durchtritt durch die Suspension gestreut. Die Stärke der Streuung hängt dabei von der Anzahl und Größe der Bakterien ab (Süßmuth *et al.*, 1997). Vergleicht man die Lichtabschwächung mit ungeimpften Medium als Nullwert (Blank), so lässt sich als Maß für das Bakterienwachstum die optische Dichte (OD) einführen. Liegt die OD einer Kultur über 0,3, muss sie verdünnt werden, da die Trübung einer Flüssigkultur nur bis zu diesem Wert linear proportional zur Zellzahl ist.

10.3.1.4. Glycerinkulturen

Glycerinkulturen dienen zur Lagerung von Zellen. Zur Herstellung werden 500 µl Glycerin (80 %) in einem verschraubbaren Eppendorfgemischgefäß autoklaviert und mit 500 µl einer Übernachtskultur gemischt. Nach dem Schockgefrieren in einem Trockeneis/Ethanol-Bad werden die Röhrchen bei -80 °C gelagert.

Zur Kultivierung von Einzelkolonien aus einer Glycerinkultur wird ein Verdünnungsausstrich angelegt. Dazu wird mit einer Impföse ein kleiner Teil von der Oberfläche der tiefgefrorenen Glycerinkultur abgekratzt und ausgestrichen. Dabei sollte ein Auftauen der Glycerinkultur vermieden werden, um eine möglichst lange Lebensdauer zu gewährleisten.

10.3.2. Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmiden aus *E.coli* wurde das Plasmidisolierungskit QIAprep Spin Miniprep Kit der Fa. Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der mitgelieferten Vorschrift.

10.3.3. Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen ist bei allen Klonierungsarbeiten notwendig, um die Transformation eines Plasmides in eine Wirtszelle zu ermöglichen. Dabei ist eine sehr hohe Transformations-effizienz erwünscht. Dies erreicht man in Gegenwart von Rubidiumchlorid (Hanahan, 1983). Mit dieser Art kompetenter Zellen können, je nach verwendetem Plasmid bzw. *E.coli* Stamm, über 10^7 Transformanten pro μg eingesetzter DNA erhalten werden.

10.3.4. Transformation und Kompetenztest

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit der gewünschten Menge an Plasmid-DNA umgesetzt (2-4 μl). Es erfolgt eine einstündige Inkubation auf Eis. Anschließend werden die Zellen für 3 Minuten bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und danach sofort auf Eis abgeschreckt. Die Suspension wird in ein steriles Reagenzglas mit 1 ml LB-Flüssigmedium gegeben und für 45 Minuten bei 37°C und 270 U/min im Schüttler inkubiert. Von der Suspension werden 100 μl mit einem Trigalski-Spatel auf Agarplatten ausgestrichen, die das entsprechende Antibiotikum enthalten. Zur Auftragung aller anderen Zellen wird 30 Sekunden in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand bis auf etwa 200 μl entfernt, die Zellen resuspendiert und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Sind am nächsten Tag Kolonien entstanden, sind die Zellen kompetent.

10.3.5. Restriktionsverdau

Beim Restriktionsverdau werden DNA-Moleküle spezifisch mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Dabei erkennt das Enzym eine Basensequenz und spaltet an dieser Stelle eine chemische Bindung. Durch Verdau entsteht aus einem Plasmid ein offenes, lineares DNA-Molekül, dessen Größe im Agarose-Gel bestimmt werden kann.

Da die Reaktionsbedingungen für die meisten Restriktionsenzyme verschieden sind, müssen diese den Produktbeschreibungen der Anbieter entnommen werden. Beim Verdau mit dem Enzym *MboII* musste nach halbstündiger Inkubation erneut Enzym zur Reaktionslösung zugegeben werden, da das Enzym nur für kurze Zeit stabil war.

10.3.6. Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Die Phosphorylierung synthetischer Oligonukleotide in 5'-Position kann mit Hilfe des käuflich erhältlichen T4-Polynukleotide Kinase-Kits (Synthetic oligonucleotides 5'-end labeling kit, Fa. Fermentas) durchgeführt werden.

10.3.7. Annealing von Oligonukleotiden

Das Zusammenlagern (Annealing) von Oligonukleotiden erreicht man durch die Denaturierung und anschließendes langsames Abkühlen auf Raumtemperatur. Dabei bilden sich die korrekten Basenpaare aus.

Benötigte Lösungen:

Annealing-Puffer (10x):	100 mM Tris
	100 mM Magnesiumchlorid
	500 mM Natriumchlorid
	pH 7,5

Durchführung:

Die Oligonukleotide werden in Annealing-Puffer zehn Minuten bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wird die Lösung in 500 ml 70 °C-warmen Wasser langsam bis auf Raumtemperatur abgekühlt.

10.3.8. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung und Größenbestimmung von DNA wird die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Detektion der DNA-Moleküle erfolgt dabei durch Ethidiumbromid, das sich in die doppelsträngigen DNA-Moleküle einlagert und mit Hilfe von UV-Transilluminatoren detektiert werden kann. Es wurden 0,9, 2, 2,5 und 3%ige Trenngele in selbstgebauten Elektrophoresekammern (Kunststoffverarbeitende Werkstatt, Universität Kaiserslautern) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 110 V.

10.3.9. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Zur Isolierung der DNA-Fragmente aus den Agarosegelen wurde das QIAEX II Gel Extraction Kit der Fa. Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der mitgelieferten Vorschrift.

10.3.10. Expression

Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionen von p α HE706ext und pET-gel wurden mit verschiedenen Stamm-Plasmid-Kombinationen durchgeführt. Die Durchführung der Expression erfolgte aber immer nach identischer Methode. Die Kulturvolumen der Versuche, sowie die Menge an IPTG sind bei den entsprechenden Versuchen aufgeführt.

Durchführung:

Die Kultivierung in 500 ml Flüssigmedium erfolgt wie in Kap. 10.3.1.2 beschrieben. In regelmäßigen Abständen werden Proben zur Wachstumskontrolle entnommen. Hat die OD einen bestimmten Wert erreicht, erfolgt die Induktion mit IPTG. Das Zellwachstum wird weiter durch Messung der OD verfolgt. Bevor die Zellen in die stationäre Wachstumsphase übergehen, bzw. die OD einen Wert von 4 überschreitet, wird die Expression durch Inkubation des Kolbens auf Eiswasser gestoppt. Die Suspension wird zentrifugiert (8.700 xg, 4 °C, 10 min), der Überstand vollständig entfernt und das Pellet bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

10.3.11. Zellyse**Benötigte Lösungen:**

Pellet-Waschpuffer:	20 mM Tris pH 7,6
PMSF-Lösung:	0,75 M Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) in 2-Propanol
Resuspendierpuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 20 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2
Lysozym-Stammlösung:	10 mg/ml Lysozym in 100 mM Tris, pH 8

Durchführung:

Das Zellpellet wird zweimal mit je 50 ml Waschpuffer gewaschen, bei 6.400 xg und 4 °C zehn Minuten abzentrifugiert, in 50 ml Resuspendierpuffer resuspendiert und mit 5 ml Lysozym-Stammlösung versetzt. Die Zellen werden mit dem Sonifier (8 mal 30 sec bei 65-85 % Leistung) auf Eiswasser lysiert. Zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile, *inclusion bodies* und Zelltrümmer wird die Suspension bei 30.000 xg und 4 °C dreißig Minuten zentrifugiert und der Überstand bzw. die *inclusion bodies* bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

10.4. Proteinisolierung

10.4.1. Isolierung von rekombinantem Gelonin (His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁)

10.4.1.1. Isolierung mit Nickel-Affinitätschromatographie (Elution mit Imidazol)

Benötigte Lösungen:

Nickelsulfat-Lösung:	0,2 M Nickelsulfat
Bindungspuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 20 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2
Waschpuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 100 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2
Elutionspuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 500 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2
Regenerationspuffer:	20 mM Tris 500 mM Natriumchlorid 50 mM EDTA-Na ₂ -Salz pH 8
Dialysepuffer:	20 mM Tris 0,5 M NaCl pH 7,2

Durchführung:

Die Aufreinigung erfolgt durch Nickel-Affinitätschromatographie bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Peristaltikpumpe und eines Uvicord-Detektors bei 280 nm. Die Flußrate wird auf ca. 0,5 - 1 ml/min eingestellt. Alle Lösungen müssen vor dem Auftragen auf die Säule steril über 0,45 µm

filtriert werden, um Schwebstoffe abzutrennen. Der Überstand der Zellyse wird vor dem Säulengang in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (400.000 xg, 4 °C, 60 min). Währenddessen wird die HiTrap Chelating Affinitätssäule (1 ml) mit 10 ml Wasser gewaschen, mit Nickel-Ionen beladen (2 ml Nickelsulfatlösung) und anschließend wieder mit 10 ml Wasser gewaschen. Danach wird die Säule mit 10 ml Bindungspuffer equilibriert und der Überstand der Ultrazentrifugation auf die Säule aufgetragen. Nichtgebundene Proteine werden mit Bindungspuffer von der Säule gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm wieder die Baseline erreicht hat. Unspezifisch gebundene Proteine werden mit 10 ml Waschpuffer von der Säule eluiert, während Gelonin durch Elutionspuffer eluiert werden kann. Die erhaltene Proteinlösung wird 3 mal gegen 5 l Dialysepuffer bei 4 °C dialysiert und bei -20 °C gelagert.

Die HiTrap Chelating Affinitätssäule wird durch Spülen mit 10 ml Regenerationspuffer entladen, anschließend mit 10 ml Wasser gespült und danach in 20 %iger ethanolischer Lösung bei 4 °C gelagert.

10.4.1.2. Isolierung mit Nickel-Affinitätschromatographie (Elution mit Thrombin)

Benötigte Lösungen:

Nickelsulfat-Lösung:	0,2 M Nickelsulfat
Waschpuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 100 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2
Thrombin-Elutionspuffer:	2,3 U/ml Thrombin 50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 20 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2
Elutionspuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 500 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2

10.4.2. Isolierung des His₆^(T)-Gelonin₁₋₂₄₆-H- α -AChR₄₋₁₈₁-Fusionsproteins

10.4.2.1. Aufreinigung

Das rekombinante Fusionsprotein wurde von Li (Li, 2002) an der Shanxi-University, Taiyuan, China exprimiert und uns zur Aufreinigung zur Verfügung gestellt. Zum einen lag Protein in vorgereinigter Form, zum anderen in Form von *inclusion bodies* vor. Beide wurden mit der gleichen Methode aufgereinigt.

Benötigte Lösungen:

Nickelsulfat-Lösung:	0,2 M Nickelsulfat
Denaturierungspuffer:	5 M Guanidin-hydrochlorid 20 mM Tris-HCl 0,5 M Natriumchlorid pH 8,0
Waschpuffer:	Denaturierungspuffer mit 50 mM Imidazol
Elutionspuffer:	Denaturierungspuffer mit 500 mM Imidazol

Durchführung:

Die Aufreinigung erfolgt durch Nickel-Affinitätschromatographie bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Peristaltikpumpe und eines Uvicord-Detektors bei 280 nm. Die Flußrate wird auf ca. 0,5 - 1 ml/min eingestellt. Alle Lösungen werden vor dem Auftragen auf die Säule steril über 0,45 μ m filtriert um Schwebstoffe abzutrennen.

Die aufgereinigte Proteinprobe wird bei 4 °C dreimal gegen 500 ml Denaturierungspuffer dialysiert, während die *inclusion bodies* in Denaturierungspuffer gelöst werden (Endkonzentration: 7-10 mg/ml Gesamtprotein).

Die denaturierte Proteinlösung wird vor dem Säulengang in der Ultrazentrifuge (400.000 xg, 4 °C, 60 min) zentrifugiert. Währenddessen wird die HiTrap Chelating Affinitätssäule (1 ml) mit 10 ml Wasser gewaschen, mit Nickel-Ionen beladen (2 ml Nickelsulfatlösung) und anschließend wieder mit 10 ml Wasser gewaschen. Danach wird die Säule mit 10 ml Denaturierungspuffer equilibriert und der Überstand der Ultrazentrifugation auf die Säule aufgetragen. Nichtgebundene Proteine werden mit Denaturierungspuffer von der Säule gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm wieder die Baseline erreicht hat. Unspezifisch gebundene Proteine werden mit Waschpuffer eluiert (nur bei Aufreinigung direkt aus den *inclusion bodies*). Das Fusionsprotein kann schließlich durch Elutionspuffer eluiert werden und wird anschließend sofort zurückgefaltet (Kap. 10.4.2.2).

10.4.2.2. Renaturierung

Nach denaturierender Aufarbeitung von Proteinen ist eine Rückfaltung in die native Form notwendig. Die hier verwendete Methode der Verdünnung in nicht-denaturierende Puffer beruhte auf einer modifizierten Vorschrift nach Rudolph und Lilie (Rudolph und Lilie, 1996).

Benötigte Lösungen:

Renaturierungspuffer (Tris):	100 mM Tris
	4 mM Glutathion (red. Form)
	0,4 mM Glutathion (ox. Form)
	1 mM EDTA
	pH 8

Durchführung:

Nach einer Proteinbestimmung wird die denaturierte Proteinlösung unter starkem Rühren mit Renaturierungspuffer verdünnt. Dabei wird eine Proteinendkonzentration von 0,1 mg/ml eingestellt. Inkubation über einen Zeitraum von 24 Stunden bei Raumtemperatur ergibt aus 1 mg denaturiertem Protein 0,25 mg renaturiertes Fusionsprotein. Ausgefallene Proteinaggregate werden durch Zentrifugation abgetrennt (4.170 xg, 4 °C, 30 min).

10.4.2.3. Recycling der Proteinaggregate

Benötigte Lösungen:

Denaturierungspuffer:	5 M Guanidin-hydrochlorid
	20 mM Tris-HCl
	0,5 M Natriumchlorid
	pH 8,0
DTT-Stammlösung:	1 M DTT

Durchführung:

Die bei der Renaturierung wieder als unlösliche Aggregate ausgefallenen Proteine werden in Denaturierungspuffer aufgenommen und eine Proteinkonzentration von 3-4 mg/ml eingestellt. Zum Auflösen von Disulfidbrücken wird soviel DTT-Stammlösung zugegeben, dass eine Endkonzentration von 30 mM DTT erreicht wird. Die Suspension wird unter schwachem Rühren für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, unlösliche Aggregate durch Zentrifugation bei 4.170 xg abgetrennt und der Überstand erneut einer Renaturierung unterzogen.

10.4.3. Isolierung von His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈**10.4.3.1. Isolierung mit Nickel-Affinitätschromatographie (Elution mit Imidazol)**

Bindungspuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 20 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2
Waschpuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 100 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2
Elutionspuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 500 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2

Durchführung:

Die Aufreinigung erfolgt durch Nickel-Affinitätschromatographie bei Raumtemperatur unter Verwendung von NiCAM-Säulenmaterial (Fa. Sigma) im Batchverfahren. Dabei wird die Säulenmaterial suspension (100 μ l) bei 5.000 xg in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Das Säulenmaterial wird mit 500 μ l Wasser gewaschen, mit 500 μ l Bindungspuffer equilibriert, 1.500 μ l Zelllysat aufgetragen und für eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Entfernen aller ungebundenen Proteine wird das Säulenmaterial 4 bis 6 mal mit 1.000 μ l Bindungspuffer gewaschen. Unspezifisch gebundene Proteine werden mit 500 μ l Waschpuffer eluiert, während die His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈-haltige Fraktion mit 100 μ l Elutionspuffer eluiert wird.

10.4.3.2. Isolierung mit Nickel-Affinitätschromatographie (Elution mit Enterokinase)

Bindungspuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 20 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2
-----------------	--

Enterokinasepuffer:	20 mM Tris-HCl 50 mM Natriumchlorid 2,5 mM Calciumchlorid pH 7,4
Enterokinase-Elutionspuffer:	Enterokinasepuffer mit 17 U/ml Enterokinase

Durchführung:

Die Aufreinigung erfolgt durch Nickel-Affinitätschromatographie bei Raumtemperatur unter Verwendung von NiCAM-Säulenmaterial (Fa. Sigma) im Batchverfahren. Dabei wird die Säulenmaterial suspension (100 µl) bei 5.000 xg in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Das Säulenmaterial wird mit 500 µl Wasser gewaschen, mit 500 µl Bindungspuffer equilibriert, 1.500 µl Zelllysat aufgetragen und für eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Entfernen aller ungebundenen Proteine, wird das Säulenmaterial 4 bis 6 mal mit 1.000 µl Bindungspuffer gewaschen und danach mit 1.000 µl Enterokinasepuffer inkubiert. Die Elution der H- α -AChR₄₋₂₀₈-haltigen Fraktion erfolgt durch neunzehn-stündige Inkubation mit 100 µl Enterokinase-Elutionspuffer bei 20 °C im Wasserbad.

10.5. Spezielle Arbeitsmethoden

10.5.1. Isolierung von Gelonin aus *Gelonium multiflorum*

Die Isolierung von Gelonin aus den Samen von *Gelonium multiflorum* wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Stirpe *et al.* durchgeführt (Stirpe *et al.*, 1980; Hofmann, 1988).

10.5.2. Isolierung von T-AChR aus *Torpedo californica*

Die Isolierung erfolgte aus dem elektrischen Organ des Zitterrochen *Torpedo californica* nach einer Vorschrift von Mosckovitz, modifiziert von Sehnert (Mosckovitz und Gershoni, 1988; Sehnert, 1994). Außerdem wurde die chromatographische Aufreinigung im Batch-Verfahren durchgeführt.

Benötigte Lösungen:

Puffer A:	10 mM Tris 100 mM NaCl 1 mM EGTA 1 mM EDTA-Na ₂ -Salz 0,1 mM PMSF pH 7,4 (HCl)
-----------	--

Puffer B:	2 g Natriumcholat ad 200 ml Puffer A
Puffer C:	100 mg Natriumcholat ad 100 ml Puffer A
Puffer D:	1 M Carbamoylcholinchlorid in Puffer C
Dialysepuffer:	10 mM Tris 1 mM EGTA 1 mM EDTA-Na ₂ -Salz 0,1 mM PMSF 0,1 % Natriumcholat pH 7,4 (HCl)
Säulenmaterial:	α-Cobratoxin, immobilisiert an 4 % beaded agarose aktiviert mit Cyanobromid
Regenerierungspuffer:	0,2 M Essigsäure 1 M NaCl in Puffer A

10.5.2.1. Isolierung im Batch-Verfahren

Durchführung:

100 g des tiefgefrorenen elektrischen Organs werden bei Raumtemperatur aufgetaut, zerkleinert und mit 200 ml Puffer A bei 4 °C im Waring Blendor mit maximaler Leistung homogenisiert. Zur Vermeidung von Überhitzung wird die Homogenisierung in kleinen Intervallen mit großen Abständen durchgeführt. Durch die Filtration des Homogenisats über ein Mulltuch werden grobe Gewebestücke abgetrennt. Das Filtrat wird 60 Minuten (13.000 xg, 4 °C) zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 ml Puffer B resuspendiert und im Ultraschallbad auf der niedrigsten Stufe (in kurzen Intervallen, unter Eiskühlung) beschallt. Anschließend wird die Suspension 2 Stunden unter leichtem Schütteln bei 4 °C inkubiert und anschließend 30 Minuten zentrifugiert (13.000 xg, 4 °C). Der erhaltene Überstand wird in einem Falcon-Röhrchen mit dem mit Puffer A equilibrierten Säulenmaterial für 1 Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wird dann mit 4.170 xg für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Das Säulenmaterial wird je mit zweimal 25 ml der Puffer A, B und C gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Elution des T-AChR wird das Säulenmaterial mit 4 ml Puffer D über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert, zentrifugiert und der Überstand sofort zweimal gegen 5 l

Dialysepuffer bei 4 °C dialysiert.

Zur Regeneration wird das Säulenmaterial zweimal mit je 25 ml Regenerierungspuffer inkubiert, zentrifugiert und in 20 %iger ethanolischer Lösung gelagert.

10.5.3. Chemische Deglykosylierung von Gelonin

Die Deglykosylierung von Glykoproteinen ist notwendig, um eine Strukturaufklärung dieser Proteine zu ermöglichen. Es stehen dabei sowohl enzymatische, als auch chemische Methoden zur Verfügung. Bei der chemischen Deglykosylierung wird hauptsächlich Trifluormethansulfonsäure (TFMS) verwendet, da damit sowohl die Hydrolyse von O-, als auch N-glykosidischen Bindungen gelingt. Allerdings gelingt die Abspaltung von neutralen Zuckern besser, als die von N-Acetylhexosaminen (Sojar und Bahl, 1987; Edge, 2003).

Benötigte Lösungen:

TFMS:	in versiegelten Ampullen käuflich erhältlich
Pyridin-Lösung:	60 %ige Lösung in Wasser
Dialysepuffer:	5 mM Ammoniumhydrogencarbonat

Durchführung:

Das zu deglykosylierende Protein wird über Nacht lyophilisiert und in einem Glaskolben mit Hahn unter Stickstoff mit 150 µl TFMS pro mg Protein versetzt. Die Lösung wird unter leichtem Rühren bei 0 °C im Eisbad für 2 Stunden inkubiert. Dabei ist auf Ausschluss von Feuchtigkeit zu achten. Nach der Inkubation wird die Lösung in einem Trockeneis-Ethanol-Bad auf unter -20 °C abgekühlt und die Säure mit äquimolarer Pyridinlösung langsam neutralisiert. Dabei ist auf die Temperatur zu achten, da die Neutralisationsreaktion stark exotherm abläuft.

Die Proteinlösung wird 3 mal gegen je 5 l Dialysepuffer dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

10.5.4. *In vitro* Translationstest

Zur Bestimmung der Toxizität gegenüber eukaryontische Ribosomen, eignet sich ein *in vitro* Translationstest in einem zellfreien System (Pelham und Jackson, 1976; Jackson *et al.*, 1983).

Lösung A:	2,5 mg Creatinphosphokinase
	250 µl Wasser
	250 µl Glycerin

Lösung B:	65,2 mg Hemin in 90 ml 20 mM Tris 5 mM Kaliumchlorid pH 8,2
Lösung C:	6,7 mg Creatinphosphat 100 µl Wasser
Lösung D:	5 mM Magnesiumchlorid 2 M Kaliumchlorid
Lösung E:	L-[U ¹⁴ C]-Valin (1,85 MBq/ml entspricht 50 µCi/ml)
Lösung F:	7,5 mM Alanin 7,5 mM Leucin 5 mM Aspartat 5 mM Glutamat 5 mM Glycin 5 mM Histidin 5 mM Lysin 5 mM Serin 3,75 mM Arginin 3,75 mM Asparagin 3,75 mM Glutamin 3,75 mM Isoleucin 3,75 mM Phenylalanin 3,75 mM Prolin 3,75 mM Threonin 3,75 mM Tryptophan 3,75 mM Tyrosin 2,5 mM Cystein 2,5 mM Methionin
Valin-Lösung:	1 mg/ml Valin 1 M NaOH 0,5 M H ₂ O ₂
Lysat:	Kaninchen Retikulozyten Lysat, unbehandelt

8 %ige TCA-Lösung:	80 g TCA ad 1 l Wasser
25 %ige TCA-Lösung:	50 g TCA ad 200 ml Wasser
Szintillationscocktail:	Rotiszint ecoplus
komplementiertes Lysat:	970 μ l Lysat 10 μ l Lösung A 20 μ l Lösung B
Master Mix:	50 μ l Lösung C 50 μ l Lösung D 80 μ l Lösung E 20 μ l Lösung F

Durchführung:

Von den zu messenden Proben werden Verdünnungsreihen angelegt. Dabei ist zu beachten, dass die Proben bei der Auftragung auf die Zellkulturplatte um den Faktor 11 verdünnt werden. Eine Negativkontrolle ist bei jedem Test zur Bestimmung des IC100-Wertes mitzuführen. In eine bei 30 °C vorgewärmte 96-Loch-Zellkulturplatte (Flachboden) wird 40 μ l komplementiertes Lysat mit 5 μ l zu testender Lösung für 5 Minuten bei 30 °C inkubiert. Anschließend wird in rascher Folge 10 μ l Master Mix mit einer Multipette zugegeben und die Platte bei 30 °C inkubiert. Nach 40 Minuten wird aus jedem Napf jeweils 5 μ l Probe entnommen. Diese Proben werden direkt in 1 ml kaltes Wasser gegeben und die Translation somit gestoppt. Man gibt 500 μ l Valin-Lösung dazu und inkubiert für 15 Minuten bei 37 °C. Danach werden die Proteine mit 2 ml 25 %iger TCA-Lösung gefällt und 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird durch Whatman GF/C filtriert und zweimal mit 8 ml 8 %iger TCA-Lösung gewaschen, die Filterpapiere getrocknet und nach Zugabe von 3 ml Szintillationscocktail die Radioaktivität im β -Counter bestimmt.

10.6. Immunologische Methoden

10.6.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Dieser immunologische Test dient zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von Antikörpern bzw. Antigenen (Harlow, 1987; Peters und Baumgarten, 1990). Grundlage des Versuches ist die Bindung von Proteinen an die Oberfläche von Polystyrol. Die Nachweise dieser Proteine gelingt mit Hilfe spezifischer Antikörper, die an ein Enzym gekoppelt sind. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 10.10 und die Verdünnungen bei den jeweiligen Versuchen aufgeführt.

Antikörper	Klasse	Spezifität	Ursprung	
anti-Gelonin	-	polyklonal anti-Gelonin	Maus	Arbeitskreis
mAb 35	IgG1	monoklonal anti-AChR, α -UE, MIR, EE, T, H, nativ	Ratte	Arbeitskreis, (Tzartos <i>et al.</i> , 1981)
anti-His	IgG1	N-, C-terminale und interne 6xHis-Tags	Maus	Fa. Qiagen
anti-His	IgG1	> 5xHis	Maus	Fa. Novagen
anti-Ratte-IgG-AP	-	Ratten-IgG (ganzes Molekül)	Hase	Fa. Sigma
anti-Maus-IgG-AP	-	F _{ab} Maus IgG	Ziege	Fa. Sigma

Tab. 10.10.: *Verwendete Primär- und Sekundärantikörper; Abkürzungen: EE: Electrophorus electricus, T: Torpedo californica, H: human, AP: Alkalische Phosphatase Enzymkonjugat, -: nicht bekannt.*

10.6.2. Western Blot

Nach der Trennung eines Proteingemischs mit Hilfe der SDS-PAGE, können die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Auf dieser Membran können dann einzelne Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert werden (Kyhse-Andersen, 1984). Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 10.10 aufgeführt. Als Sekundärantikörper wurden ausschließlich Antikörper verwendet, die mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt sind. Eine Bindung der Antikörper wurde mit dem Substrat BCIP/NBT (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat/Nitroblau Tetrazolium) detektiert.

10.7. Tierversuche

10.7.1. Halten und Spritzen der Ratte

Für die Immunisierung bzw. für die Applikation des Narkosemittels ist es notwendig die Ratte zu fixieren. Dazu gibt es verschiedene Möglichkeiten (Sharp und La Regina, 1998).

Durchführung:

Die Ratte wird am Schwanzansatz mit einer Hand festgehalten und mit einem Handtuch bedeckt. Mit der anderen Hand wird der Körper fixiert. Dabei wird der Kopf der Ratte zwischen Daumen und Zeigefinger gehalten und leicht zu Boden gedrückt. Die Ratte wird in der Hautfalte im Genick gepackt und hochgehoben. Mit der anderen Hand werden die Beine festgehalten und die Ratte mit dem Kopf nach unten geneigt. Eine zweite Person setzt die Spritze im unteren rechten Quadranten des Bauchs und durchsticht die Bauchdecke im 45° Winkel.

10.7.2. Induzierung der EAMG in Lewis-Ratten

Die Induzierung der Experimentellen autoimmunen Myasthenia gravis (EAMG) in Lewis-Ratten erfolgte nach dem Schema von Urbatsch (Urbatsch, 1990).

Benötigte Lösungen:

PBS, pH 7,2:	130 mM Natriumchlorid 4,5 mM di-Natriumhydrogenphosphat 2,5 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7,2 (NaOH)
T-AChR:	Kap. 10.5.2
Ovalbumin-Lsg:	2 mg Ovalbumin ad 1 ml PBS, pH 7,2

Durchführung:

Der zur Induzierung der EAMG benötigte T-AChR muss in einem geeigneten Puffer vorliegen. Dazu wird die Proteinlösung zweimal gegen 5 l PBS, pH 7,2 dialysiert. Anschließend wird die Lösung auf ca. 1 mg/ml aufkonzentriert und die Konzentration im UV-Spektrometer bestimmt.

Zur Immunisierung werden 30 µg T-AChR und 20 µg Ovalbumin gemischt und die Lösung über einen Celluloseacetatfilter (0,45 µm) steril filtriert. Für die Erstimmunisierung (Priming) wird die Proteinlösung dann im Verhältnis 1:4 mit kompletten Freund's Adjuvans (CFA) unter Eiskühlung versetzt und emulgiert. Für die Auffrischung (Boost) wird CFA durch inkomplettes Freund's Adjuvans ersetzt.

Die Immunisierung der weiblichen Lewis-Ratten (12 Wochen, Fa. Charles River, Sulzfeld) erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Injektion.

10.7.3. Repetitive Nervenstimulation

Benötigte Lösungen:

Chloralhydrat:	7 % Chloralhydrat
----------------	-------------------

Durchführung:

Zur Immobilisierung der Ratte werden 400 µg Chloralhydrat pro kg Körpergewicht i.p. gespritzt. Die Ratte wird zum Einschlafen in einen ruhigen, dunklen Raum gebracht.

Ist die Ratte immobilisiert, wird sie in eine Wachswanne gelegt, die Hinterläufe so plaziert, dass die Unterschenkel nach außen zeigen. Danach wird die Ratte mit den Reizelektroden fixiert. Dabei

werden beide Elektroden (EEG-Nadelelektroden ($l = 1,2 \text{ cm}$, $\varnothing = 0,4 \text{ mm}$, Fa. Neurokard GmbH) direkt durch die Muskulatur des Oberschenkels gesteckt und die Ratte so fixiert. Die Ableitelektroden werden durch den Fuß gesteckt. Eine Elektrode wird zentral, die andere peripher platziert. Eine Masse-Elektrode ist optional.

Die RNS erfolgt durch Stimulation des Ischiasnervs (*Nervus ischiadicus*) mit einer Frequenz von 4 Hz. Die Pulshöhe beträgt 20 V, die Pulsdauer 0,2 ms. Die Aufzeichnung erfolgt mit einem Oszilloskop. Um eine gute Auswertbarkeit zu ermöglichen, werden erst zwei bis drei Einzelpulse gegeben, bevor mit der RNS begonnen wird. Jede Messung wird mehrmals wiederholt. Die Auswertung der erhaltenen Signale erfolgt je nach Art des erhaltenen Diagramms:

- (1) Sind die Einzelsignale genauso groß wie das erste Signal der repetitiven Nervenstimulation, dann wird aus diesen Werten der Mittelwert ($\overline{A_{1S}}$) gebildet. Nach ca. 10 Stimulationen sind die gemessenen Amplituden konstant. Aus mindestens 5 Amplituden (A_{nS}) wird der Mittelwert $\overline{A_{nS}}$ berechnet.
- (2) Zeigt das erste Signal der RNS ein Artefakt, so werden nur die Einzelpulse bei der Berechnung von $\overline{A_{1S}}$ verwendet.

Der Dekrementwert D errechnet sich dann zu:

$$D[\%] = 100 - \left(\frac{100 \cdot \overline{A_{nS}}}{\overline{A_{1S}}} \right) \quad (10.1)$$

A. Anhang

A.1. Diskutierte Aminosäuresequenzen von natürlichem Gelonin

Nolan		1	GLDTVSFSTKGATYITYVNFLNELRVKPKPEGNSHGIPLLRKCCDDPGKCFVLVALSNDN	
Rosenblum		1	GLDTVSFSTKGATYITYVNFLNELRVKPKPEGNSHGIPLLRKG-DDPGKCFVLVALSNDN	
			*****	*****
Nolan		61	GQLAEIAIDVTSVYVVGQVRNRSYFFKDAPDAAYEGLFKNTIK-----TRLHFHGG	
Rosenblum		60	GQLAEIAIDVTSVYVVGQVRNRSYFFKDAPDAAYEGLFKNTIKNPLLFHGGKTRLHFHGG	
			*****	*****
Nolan		113	YPSLEGEKAYRETTDLGIEPLRIGIKKLDENAIIDNYKPTIASSLLVVIQMVSEAAARFTF	
Rosenblum		120	YPSLEGEKAYRETTDLGIEPLRIGIKKLDENAIIDNYKPTIASSLLVVIQMVSEAAARFTF	

Nolan		173	IENQIRNNFQQRIRPANNTISLENKWGKLSFQIRTSGANGMFSEAVELERANGKKYYVTA	
Rosenblum		180	IENQIRNNFQQRIRPANNTISLENKWGKLSFQIRTSGANGMFSEAVELERANGKKYYVTA	

Nolan		233	VDQVKPKIALLLKFVDKDPK	251 AS -> 28.172,20 Da
Rosenblum		240	VTQVKPKIALLLKFVDKDPE	258 AS -> 28.811,89 Da
			* *****	

Abb. A.1.: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Gelonin nach Nolan et al. (Nolan et al., 1993) und Rosenblum et al. (Rosenblum et al., 1995). Die angegebenen Molekulargewichte errechnen sind aus der Aminosäuresequenz und berücksichtigen keine posttranslationale Modifikationen. *: Identische Aminosäure in beiden Sequenzen, -: Aminosäure nur in einem Protein vorhanden.

A.2. DNA- und Aminosäuresequenz der rekombinanten Proteine

A.2.1. His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁

DNA- und Aminosäuresequenz des rekombinanten Gelonins im Expressionsvektor pET-gel. Die Sequenz enthielt alle 251 AS des natürlichen Gelonins (Swissprot P33186, Nolan *et al.*, 1993). Zusätzlich enthielt das Protein einen N-terminalen HisTag mit einer Thrombin-Schnittstelle zur Abspaltung. Die berechnete Masse beträgt 30.494,72 Da, wobei das Methionin formyliert ist (M*), die Masse bei abgespaltenem HisTag beträgt 28.584,66 Da. Der berechnete pI-Wert beträgt 9,22 bzw. 9,12 bei abgespaltenem HisTag.

```

1  ATGGGCAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC AGCAGCGGCC TGGTGCCGCG CGGCAGCCAT
   M* G S S H H H H H H S S G L V P R G S H
61  ATGGGCCTGG ATACCGTGAG CTTCAGCACC AAAGGCGCCA CCTATATTAC CTATGTGAAC
   M G L D T V S F S T K G A T Y I T Y V N
121 TTCCTGAACG AACTGCGTGT GAAACTGAAA CCGGAAGGCA ACAGCCATGG CATTCCGCTG
   F L N E L R V K L K P E G N S H G I P L
181 CTGCGTAAAA AATGCGATGA TCCGGGCAAA TGCTTCGTGC TGGTGGCGCT GAGCAACGAT
   L R K K C D D P G K C F V L V A L S N D
241 AACGGCCAGC TAGCGGAAAT TGCGATTGAT GTGACCAGCG TGTATGTGGT GGGCTATCAG
   N G Q L A E I A I D V T S V Y V V G Y Q
301 GTGCGTAACC GTAGCTATTT CTTCAAAGAT GCGCCGGATG CGGCGTATGA AGGCCTGTTC
   V R N R S Y F F K D A P D A A Y E G L F
361 AAAAACACCA TAAAACCCG TCTGCATTTT GGCGGCAGCT ATCCGAGTCT AGAAGGCGAA
   K N T I K T R L H F G G S Y P S L E G E
421 AAAGCGTATC GTGAAACCAC CGATCTGGGC ATTGAACCGC TGCATATTGG CATTAAAAAA
   K A Y R E T T D L G I E P L R I G I K K
481 CTGGATGAAA ACGCGATTGA TAACTATAAA CCGACCGAAA TTGCGAGCAG CCTGCTGGTG
   L D E N A I D N Y K P T E I A S S L L V
541 GTGATTCAGA TGGTGAGCGA AGCGGCGCGT TTCACCTTCA TTGAAAACCA GATTTCGTAAC
   V I Q M V S E A A R F T F I E N Q I R N
601 AACTTCCAGC AGCGGATCCG TCCGGCGAAC AACACCATTA GCCTGGAAAA CAAATGGGGC
   N F Q Q R I R P A N N T I S L E N K W G
661 AAACTGAGCT TCCAGATTCG TACCAGCGGC GCGAACGGCA TGTTTCAGCGA AGCGGTGGAA
   K L S F Q I R T S G A N G M F S E A V E
721 CTGGAACGTG CGAACGGCAA AAAATATTAT GTGACCGCGG TGGATCAGGT GAAACCGAAA
   L E R A N G K K Y Y V T A V D Q V K P K
781 ATTGCGCTGC TGAAATTCGT CGACAAAGAT CCGAAATAAT AA
   I A L L K F V D K D P K - -

```

A.2.2. His₆^(T)-Gelonin₁₋₂₄₆-H- α -AChR₄₋₁₈₁

DNA- und Aminosäuresequenz des Fusionsproteins His₆^(T)-Gelonin₁₋₂₄₆-H- α -AChR₄₋₁₈₆ im Expressionsvektor pET-GA. Das Fusionsprotein bestand aus Gelonin mit den Aminosäuren 1 bis 246 (Swiss-Prot P33186) und dem C-terminal fusionierten, extrazellulären α -AChR-Fragment mit den Aminosäuren 4 bis 181 der α -Untereinheit des humanen, nikotinischen Acetylcholinrezeptors (Swiss-Prot P02708). Die Aminosäuren LSNN gehörten zum Vektor. Ein N-terminaler HisTag erlaubte die Aufreinigung mit Nickel-Affinitätschromatographie. Eine Schnittstelle für Thrombin sollte es ermöglichen den HisTag abzuspalten. Die berechnete Masse beträgt unter Berücksichtigung des formylierten Methionins (M*) 50.868,89 Da bei einem pI-Wert von 7,22.

```

1  ATGGGCAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC AGCAGCGGCC TGGTGCCGCG CGGCAGCCAT
   M* G S S H H H H H H S S G L V P R G S H
61  ATGGGCCTGG ATACCGTGAG CTTCAGCACC AAAGGCGCCA CCTATATTAC CTATGTGAAC
   M G L D T V S F S T K G A T Y I T Y V N
121 TTCCTGAACG AACTGCGTGT GAAACTGAAA CCGGAAGGCA ACAGCCATGG CATTCCGCTG
   F L N E L R V K L K P E G N S H G I P L
181 CTGCGTAAAA AATGCGATGA TCCGGGCAAA TGCTTCGTGC TGGTGCGCCT GAGCAACGAT
   L R K K C D D P G K C F V L V A L S N D
241 AACGGCCAGC TAGCGGAAAT TGCGATTGAT GTGACCAGCG TGTATGTGGT GGGCTATCAG
   N G Q L A E I A I D V T S V Y V V G Y Q
301 GTGCGTAACC GTAGCTATTT CTTCAAAGAT GCGCCGGATG CGGCGTATGA AGGCCTGTTC
   V R N R S Y F F K D A P D A A Y E G L F
361 AAAAACACCA TTAAAACCCG TCTGCAT TTC GCGGCAGCT ATCCGAGTCT AGAAGGCGAA
   K N T I K T R L H F G G S Y P S L E G E
421 AAAGCGTATC GTGAAACCAC CGATCTGGGC ATTGAACCGC TGCGTATTGG CATTAAAAAA
   K A Y R E T T D L G I E P L R I G I K K
481 CTGGATGAAA ACGCGATTGA TAACTATAAA CCGACCGAAA TTGCGAGCAG CCTGCTGGTG
   L D E N A I D N Y K P T E I A S S L L V
541 GTGATTCAGA TGGTGAGCGA AGCGGCGCGT TTCACCTTCA TTGAAAACCA GATTCGTAAC
   V I Q M V S E A A R F T F I E N Q I R N
601 AACTTCCAGC AGCGGATCCG TCCGGCGAAC AACACCATTA GCCTGGAAAA CAAATGGGGC
   N F Q Q R I R P A N N T I S L E N K W G
661 AACTGAGCT TCCAGATTCG TACCAGCGGC GCGAACGGCA TGTTTCAGCGA AGCGGTGGAA
   K L S F Q I R T S G A N G M F S E A V E
721 CTGGAACGTG CGAACGGCAA AAAATATTAT GTGACC GCGG TGGATCAGGT GAAACCGAAA
   L E R A N G K K Y Y V T A V D Q V K P K
781 ATTGCGCTGC TGAAATTCGT CGAGACCCGT CTGGTGGCAA AGCTATTTAA AGACTACAGC
   I A L L K F V E T R L V A K L F K D Y S

```

841 AGCGTGGTGC GGCCAGTGGG AGACCACCGC CAGGTCGTGG AGGTCACCGT GGGCCTGCAG
S V V R P V E D H R Q V V E V T V G L Q
901 CTGATACAGC TCATCAATGT GGATGAAGTA AATCAGATCG TGACAACCAA TGTGCGTCTG
L I Q L I N V D E V N Q I V T T N V R L
961 AAACAGCAAT GGGTGGATTA CAACCTAAAA TGAATCCAG ATGACTATGG CGGTGTGAAA
K Q Q W V D Y N L K W N P D D Y G G V K
1021 AAAATTCACA TTCCTTCAGA AAAGATCTGG CGCCAGACC TTGTTCTCTA TAACAATGCA
K I H I P S E K I W R P D L V L Y N N A
1081 GATGGTGACT TTGCTATTGT CAAGTTCACC AAAGTGCTCC TGCAGTACAC TGGCCACATC
D G D F A I V K F T K V L L Q Y T G H I
1141 ACGTGGACAC CTCCAGCCAT CTTTAAAAGC TACTGTGAGA TCATCGTCAC CCACTTTCCC
T W T P P A I F K S Y C E I I V T H F P
1201 TTTGATGAAC AGAACTGCAG CATGAAGCTG GGCACCTGGA CCTACGACGG CTCTGTCTGTG
F D E Q N C S M K L G T W T Y D G S V V
1261 GCCATCAACC CGGAAAGCGA CCAGCCAGAC CTGAGCAACT TCATGGAGAG CGGGGAGTGG
A I N P E S D Q P D L S N F M E S G E W
1321 GTGATCAAGG AGTCCCTGAG CAATAACTAG
V I K E S L S N N -

A.2.3. His₁₀^E-H- α -AChR₄₋₂₀₈

DNA- und Aminosäuresequenz des extrazellulären Fragments der α -Untereinheit des humanen, nikotinischen Acetylcholinrezeptors im Expressionsvektor p α HE706ext. Der Vektor kodierte für die Aminosäuren 4 bis 208 (Swiss-Prot P02708). Das Protein besaß einen N-terminalen HisTag mit einer Schnittstelle für Enterokinase. Die berechnete Masse beträgt 26.817,26 Da bzw. 24.159,55 Da bei abgespaltetem HisTag. Der berechnete pI-Wert liegt bei 5,93 bzw. bei 5,45 ohne HisTag.

```

1  ATGGGCCATC ATCATCATCA TCATCATCAT CATCACAGCA GCGGCCATAT CGACGACGAC
   M* G H  H H H  H H H H  H H S  S G H  I D D D
61  GACAAGCATA TGCTCGAGAC CCGTCTGGTG GCAAAGCTAT TTAAAGACTA CAGCAGCGTG
   D K H  M L E  T R L V  A K L  F K D  Y S S V
121 GTGCGGCCAG TGGAAGACCA CCGCCAGGTC GTGGAGGTCA CCGTGGGCCT GCAGCTGATA
   V R P  V E D  H R Q V  V E V  T V G  L Q L I
181 CAGCTCATCA ATGTGGATGA AGTAAATCAG ATCGTGACAA CCAATGTGCG TCTGAAACAG
   Q L I  N V D  E V N Q  I V T  T N V  R L K Q
241 CAATGGGTGG ATTACAACCT AAAATGGAAT CCAGATGACT ATGGCGGTGT GAAAAAATT
   Q W V  D Y N  L K W N  P D D  Y G G  V K K I
301 CACATTCCTT CAGAAAAGAT CTGGCGCCCA GACCTTGTTT TCTATAACAA TGCAGATGGT
   H I P  S E K  I W R P  D L V  L Y N  N A D G
361 GACTTTGCTA TTGTCAAGTT CACCAAAGTG CTCCTGCAGT ACACTGGCCA CATCACGTGG
   D F A  I V K  F T K V  L L Q  Y T G  H I T W
421 ACACCTCCAG CCATCTTTAA AAGCTACTGT GAGATCATCG TCACCCACTT TCCCTTTGAT
   T P P  A I F  K S Y C  E I I  V T H  F P F D
481 GAACAGAACT GCAGCATGAA GCTGGGCACC TGGACCTACG ACGGCTCTGT CGTGGCCATC
   E Q N  C S M  K L G T  W T Y  D G S  V V A I
541 AACCCGGAAA GCGACCAGCC AGACCTGAGC AACTTCATGG AGAGCGGGGA GTGGGTGATC
   N P E  S D Q  P D L S  N F M  E S G  E W V I
601 AAGGAGTCCC GTGGCTGGAA ACATAGCGTG ACCTATAGCT GCTGCCCGGA TACCCCGTAT
   K E S  R G W  K H S V  T Y S  C C P  D T P Y
661 CTGGATATTA CCTATCATTT CGTGATGCAG TAA
   L D I  T Y H  F V M Q  -

```

A.3. Plasmidkarten

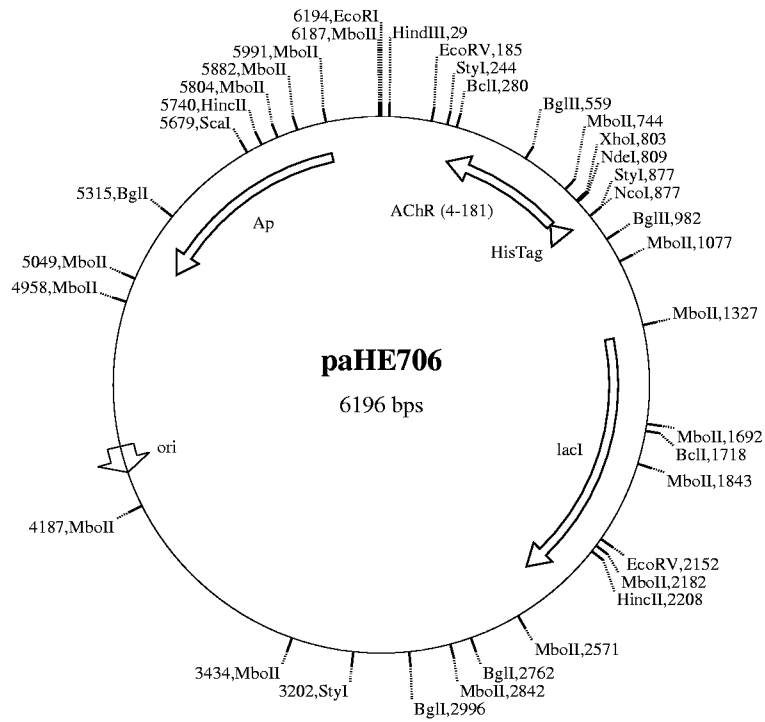


Abb. A.2.: Plasmidkarte *paHE706*

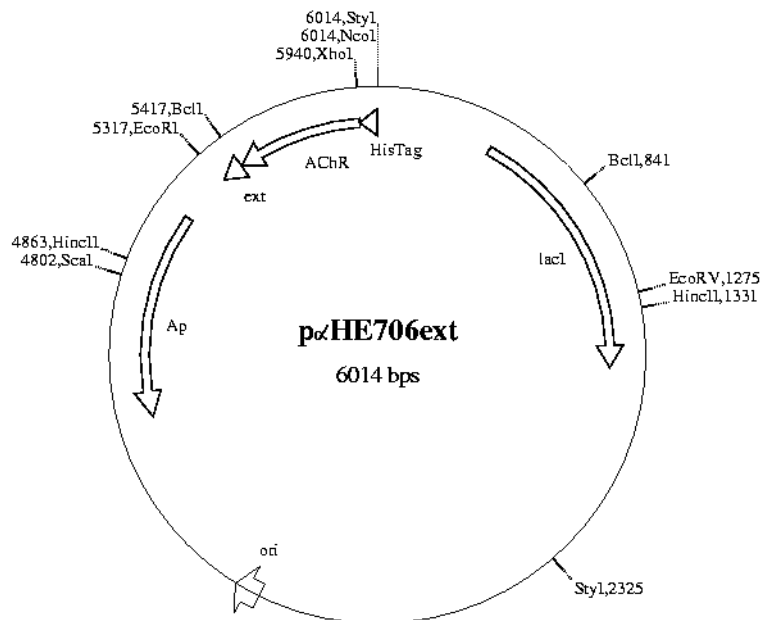


Abb. A.3.: Plasmidkarte *paHE706ext*

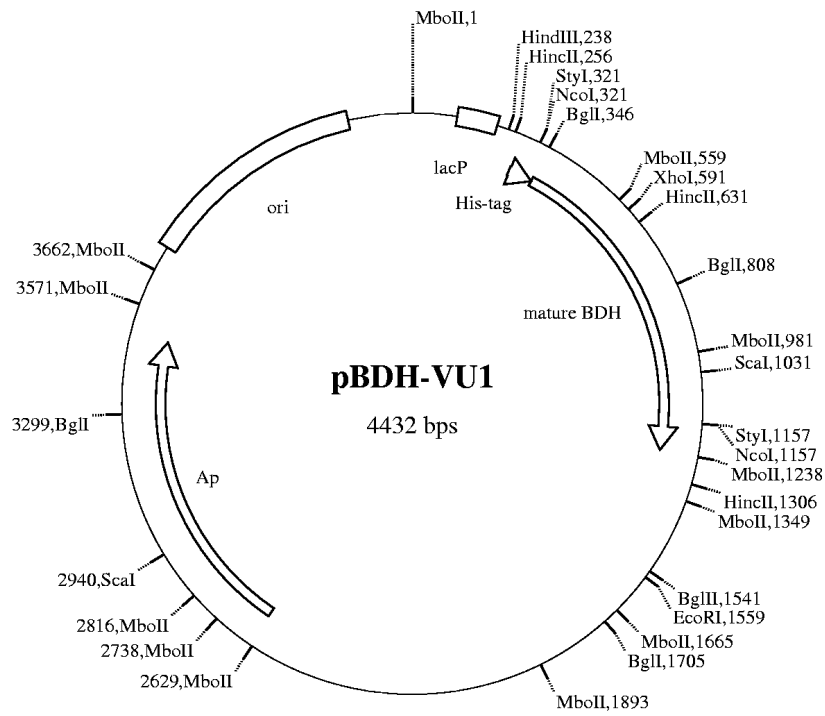


Abb. A.4.: Plasmidkarte pBDH-VU1

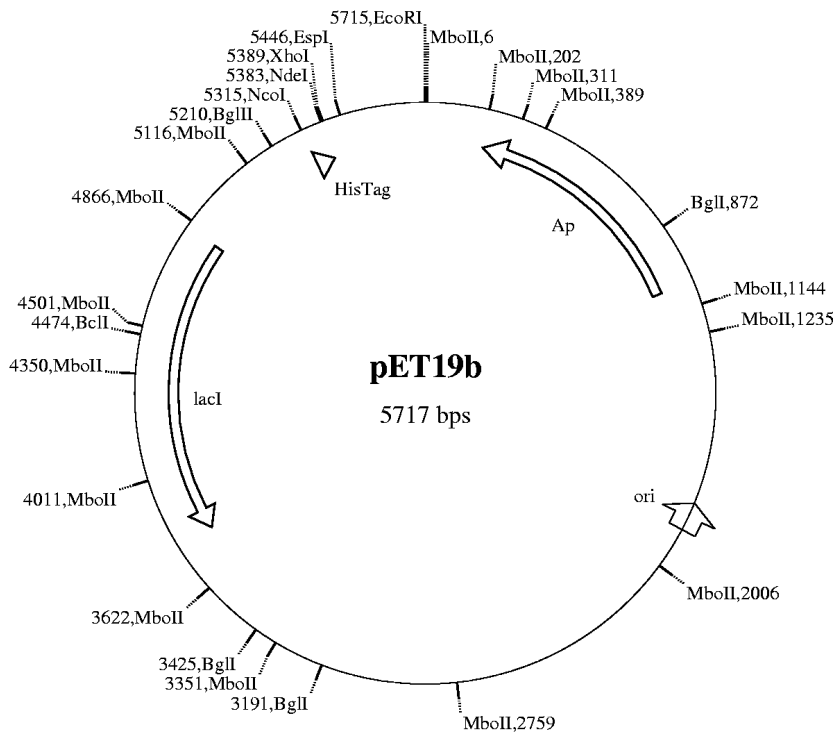


Abb. A.5.: Plasmidkarte pET19b

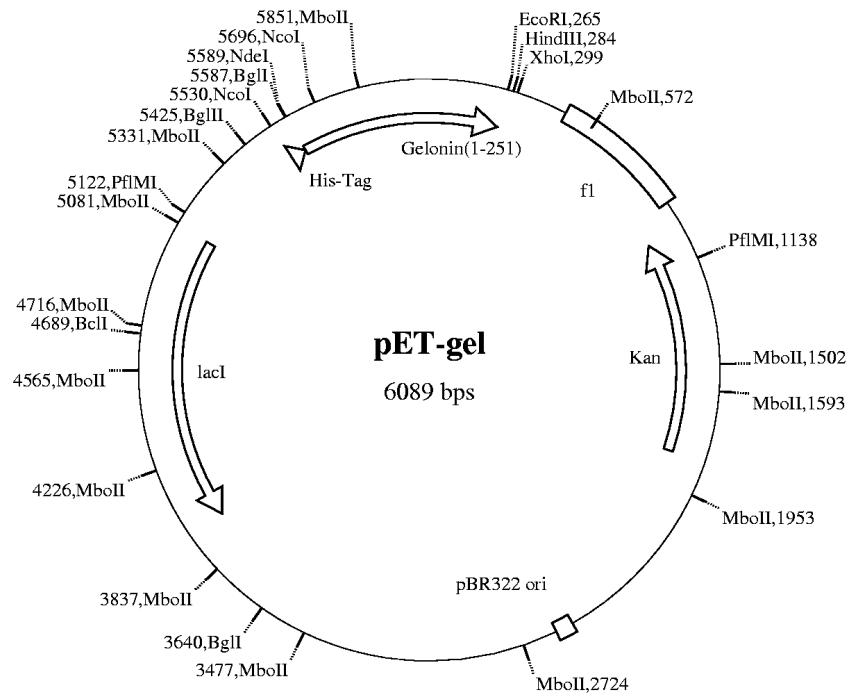


Abb. A.6.: Plasmidkarte pET-gel

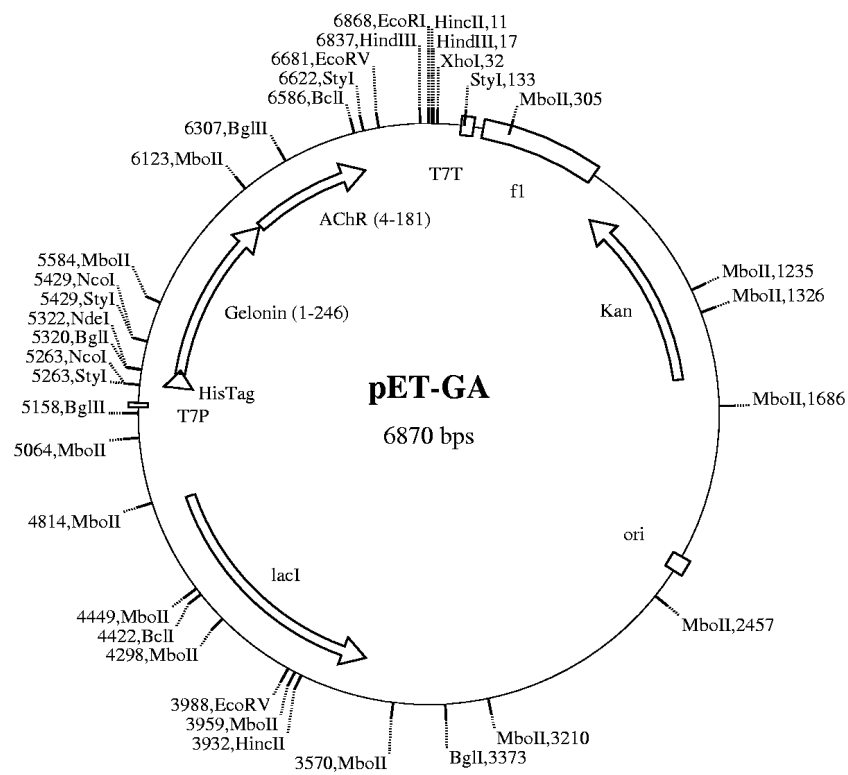


Abb. A.7.: Plasmidkarte pET-GA

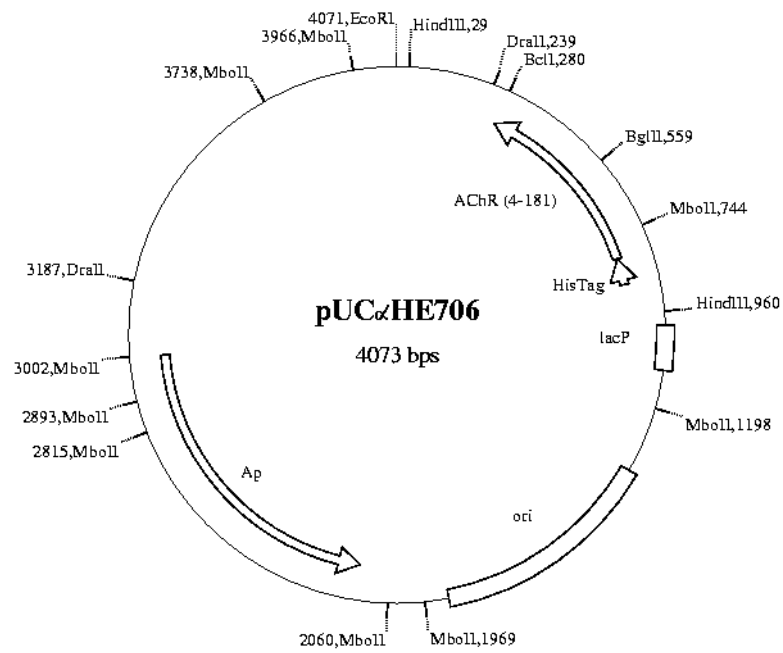


Abb. A.8.: Plasmidkarte pUC α HE706

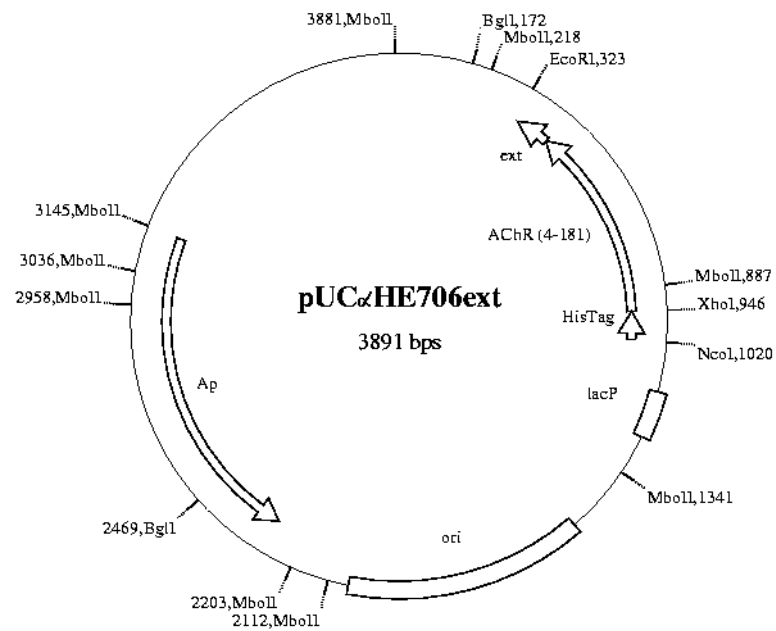


Abb. A.9.: Plasmidkarte pUC α HE706ext

A.4. Mögliche Bestandteile der Glykosylierung von Gelonin

	M_{mono} (Da)	M_{m} (Da)
Zucker		
D-Xylose (Xyl)	150,0529	150,1314
D-Mannose (Man)	180,0634	180,1577
N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc)	221,0900	221,2103
Modifizierungen		
Oxidation	15,9950	15,9994
Desaminierung	0,9840	0,9847
Phosphorylierung	79,9663	79,9799
Pufferbestandteile		
H^+	1,0073	1,0074
Wasser	18,0106	18,0152
Na^+	22,9898	22,9898

Tab. A.1.: Mögliche Bestandteile der Glykosylierung von Gelonin mit monoisotopischen M_{mono} und mittleren molekularen Massen M_{m} .

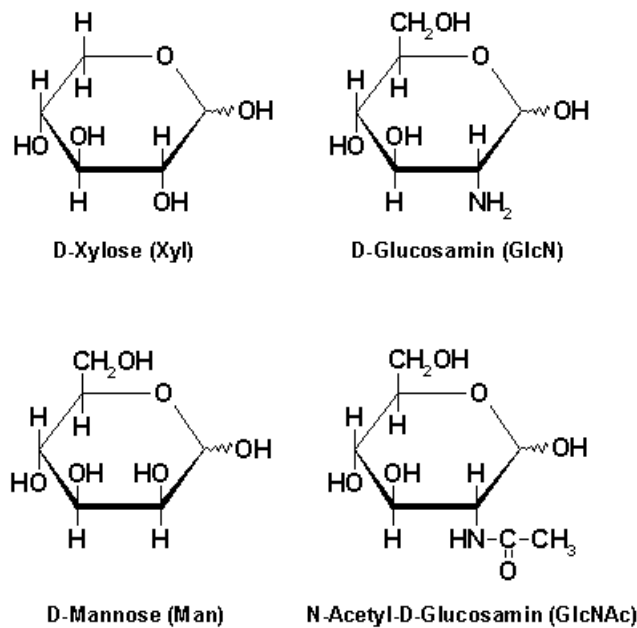


Abb. A.10.: Mögliche Zuckerbestandteile der Oligosaccharid-Strukturen von Pflanzenproteinen.

Literaturverzeichnis

- Aderem A., Ulevitch R. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, **406**, 782–787.
- Akira S., Takeda K., Kaisho T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, **2**, 675–780.
- al Jaufy A., Haddad J., King S., McPhee R., Jackson M. (1994) Cytotoxicity of a shiga toxin A subunit-CD4 fusion protein to human immunodeficiency virus-infected cells. *Infect Immun*, **62**, 956–960.
- Alexeev T., Krivoshein A., Shevalier A., Kudelina I., Telyakova O., Vincent A., Utkin Y., Hucho F., Tsetlin V. (1999) Physicochemical and immunological studies of the N-terminal domain of the *Torpedo* acetylcholine receptor α -subunit expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, **259**, 310–319.
- Alexopoulou L., Holt A., Medzhitov R., Flavell R. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by toll-like receptor 3. *Nature*, **413**, 732–738.
- Apel E., Roberds S., Campbell K., Merlie J. (1995) Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex. *Neuron*, **15**, 115–126.
- Araga S., Xu L., Nakashima K., Villain M., Blalock J.E. (2000) A peptide vaccine that prevents experimental autoimmune myasthenia gravis by specifically blocking T cell help. *FASEB J*, **14**, 185–196.
- Arora N., Leppla S. (1994) Fusions of anthrax toxin lethal factor with shiga toxin and diphtheria toxin enzymatic domains are toxic to mammalian cells. *Infect Immun*, **62**, 4.955–4.961.
- Asher O., Kues W.A., Witzemann V., Tzartos S.J., Fuchs S., Souroujon M.C. (1993) Increased gene expression of acetylcholine receptor and myogenic factors in passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol*, **151**, 6.442–6.450.
- Aullo P., Alcami J., Popoff M., Klatzmann D., Murphy J., Boquet P. (1992) A recombinant diphtheria toxin related human CD4 fusion protein specifically kills HIV infected cells which express gp120 but selects fusion toxin resistant cells which carry HIV. *EMBO J*, **11**, 575–583.

- Bai L., Koopmann J., Fiola C., Fournier P., Schirmmacher V. (2002) Dendritic cells pulsed with viral oncolysates potently stimulate autologous T cells from cancer patients. *Int J Oncol*, **21**, 685–694.
- Banchereau J., Steinman R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392**, 245–252.
- Barbieri L., Battelli M., Stirpe F. (1993) Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta*, **1.154**, 237–282.
- Barbieri L., Bolognesi A., Valbonesi P., Polito L., Olivieri F., Stirpe F. (2000) Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of immunotoxins containing ribosome-inactivating proteins. *J Drug Target*, **8**, 281–288.
- Barbieri L., Valbonesi P., Bonora E., Gorini P., Bolognesi A., Stirpe F. (1997) Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res*, **25**, 518–522.
- Bardor M., Faveeuw C., Fitchette A., Gilbert D., Galas L., Trottein F., Faye L., Lerouge P. (2003) Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core $\alpha(1,3)$ -fucose and core xylose. *Glycobiology*, **13**, 427–434.
- Beeson D., Morris A., Vincent A., Newsom-Davis J. (1990) The human muscle nicotinic acetylcholine receptor α subunit exists as two isoforms: a novel exon. *EMBO J*, **9**, 2.101–2.106.
- Bellone M., Ostlie N., Lei S., Wu X., Conti-Tronconi B. (1991) The I-A^{bm12} mutation, which confers resistance to experimental myasthenia gravis, drastically affects the epitope repertoire of murine CD4+ cells sensitized to nicotinic acetylcholine receptor. *J Immunol*, **147**, 1.484–1.491.
- Bennett W., Huber R. (1984) Structural and functional aspects of domain motions in proteins. *CRC Crit Rev Biochem*, **15**, 291–384.
- Bensadoun A., Weinstein D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem*, **70**, 241–250.
- Berzins S., Godfrey D., Miller J., Boyd R. (1999) A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9.787–9.791.
- Bitar D., Whitacre C. (1988) Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by the oral administration of myelin basic protein. *Cell Immunol*, **112**, 364–370.
- Bouneaud C., Kourilsky P., Bousso P. (2000) Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity*, **13**, 829–840.
- Brejck K., van Dijk W.J., Klaassen R.V., Schuurmans M., van der Oost J., Smit A.B., Sixma T.K.

- (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, **411**, 269–276.
- Breloer M., Dorner B., More S., Roderian T., Fleischer B., von Bonin A. (2001) Heat shock proteins as danger signals: eukaryotic Hsp60 enhances and accelerates antigen-specific IFN- γ production in T cells. *Eur J Immunol*, **31**, 2.051–2.059.
- Brocke S., Brautbar C., Steinman L., Abramsky O., Rothbard J., Neumann D., Fuchs S., Mozes E. (1988) In vitro proliferative responses and antibody titers specific to human acetylcholine receptor synthetic peptides in patients with myasthenia gravis and relation to HLA class II genes. *J Clin Invest*, **82**, 1.894–1.900.
- Brodsky R., Sensenbrenner L., Jones R. (1996) Complete remission in severe aplastic anemia after high-dose cyclophosphamide without bone marrow transplantation. *Blood*, **87**, 491–494.
- Brust S., Filipp G., Hofmann U., Kalies I., Peper K., Rajki K., Sterz R.K., Trommer W.E. (1987) Antigen-gelonin conjugates: preparation and application in myasthenia gravis. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, **368**, 991–999.
- Bundschuh G., Schneeweiss B., Bräuer H. (1992) *Lexikon der Immunologie*. Akademie Verlag; Berlin, 2., erweiterte Auflage.
- Burnet F. (1959) *The clonal selection theory of acquired immunity*. Vanderbilt Univ. Press, Nashville, TN.
- Büttner J. (2002) *Versuche zur Isolierung und Charakterisierung des Ribosomen-inaktivierenden Proteins Gelonin*. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Castellino F., Germain R. (1995) Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity*, **2**, 73–88.
- Chandler L., Sosnowski B., McDonald J., Price J., Aukerman S., Baird A., Pierce G., Houston L. (1998) Targeting tumor cells via EGF receptors: selective toxicity of an HBEGF-toxin fusion protein. *Int J Cancer*, **78**, 106–111.
- Chapman A., Antonio P., Spitali M., West S., Stephens S., King D. (1999) Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nature Biotechnol*, **17**, 780–783.
- Chaudhary V., Mizukami T., Fuerst T., FitzGerald D., Moss B., Pastan I., Berger E. (1988) Selective killing of HIV-infected cells by recombinant human CD4-Pseudomonas exotoxin hybrid protein. *Nature*, **335**, 369–372.
- Chavez R., Hall Z. (1992) Expression of fusion proteins of the nicotinic acetylcholine receptor from

mammalian muscle identifies the membrane-spanning regions in the α and δ subunits. *J Cell Biol*, **116**, 385–393.

Chen W.F., Scollay R., Clark-Lewis I., Shortman K. (1983) The size of functional T-lymphocyte pools within thymic medullary and cortical cell subsets. *Thymus*, **5**, 179–195.

Cheung M., Garcia A., Onuchic J. (2002) Protein folding mediated by solvation: water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 685–690.

Christadoss P. (1989) Immunogenetics of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Crit Rev Immunol*, **9**, 247–278.

Christadoss P., Lindstrom J., Melvold R., Talal N. (1985) Mutation at I-A β chain prevents experimental autoimmune myasthenia gravis. *Immunogenetics*, **21**, 33–38.

Cohen I., Ben-Nun A., Holoshitz J., Maron R., Zerubavel R. (1983) Vaccination against autoimmune disease with lines of autoimmune T lymphocytes. *Immunol Today*, **4**, 227–230.

Colaco M., Bapat M., Misquith S., Jadot M., Wattiaux-De Coninck S., Wattiaux R. (2002) Uptake and intracellular fate of gelonin, a ribosome-inactivating protein, in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 1.180–1.185.

Colangeli R., Heijbel A., Williams A., Manca C., Chan J., Lyashchenko K., Gennaro M. (1988) Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **714**, 223–235.

Compston D., Vincent A., Newsom-Davis J., Batchelor J. (1980) Clinical, pathological, HLA antigen and immunological evidence for disease heterogeneity in myasthenia gravis. *Brain*, **103**, 579–601.

Conrad S., Byeon I., DiGeorge A., Lairmore M., Tsai M., Kaumaya P. (1995) Immunogenicity and conformational properties of an N-linked glycosylated peptide epitope of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-I). *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids*, **1**, 83–92.

Conti-Fine B., Protti M., Bellone M., Howard jr. J. (1997) *Myasthenia gravis: the immunobiology of an autoimmune disease*. Springer Verlag; New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest.

Coutinho A., Kazatchkine M.D., Avrameas S. (1995) Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol*, **7**, 812–818.

Craxton A., Otipoby K.L., Jiang A., Clark E.A. (1999) Signal transduction pathways that regulate the fate of B lymphocytes. *Adv Immunol*, **73**, 79–152.

- Dalakas M.C. (1999) Intravenous immunoglobulin in the treatment of autoimmune neuromuscular diseases: present status and practical therapeutic guidelines. *Muscle Nerve*, **22**, 1.479–1.497.
- Daubenfeld T. (2003) *ESI-FT-ICR-MS of the glycoprotein gelonin*. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- de Groth S., Webster R., Datyner A. (1963) k.a. *Biophys Acta*, **71**, 377–391.
- de Smet T., van Mechelen M., de Becker G., Urbain J., Leo O., Moser M. (1997) Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol*, **27**, 1.229–1.235.
- Deitiker P., Ashizawa T., Atassi M.Z. (2000) Antigen mimicry in autoimmune disease. Can immune responses to microbial antigens that mimic acetylcholine receptor act as initial triggers of myasthenia gravis? *Human Immunology*, **61**, 255–265.
- Dennis M., Giraudat J., Kotzyba-Hibert F., Goeldner M., Hirth C., Chang J.Y., Lazure C., Chretien M., Changeux J.P. (1988) Amino acids of the *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor α -subunit labeled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site. *Biochemistry*, **27**, 2.346–2.357.
- Dobson C. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature*, **426**, 884–890.
- Drachman D., Jones R., Brodsky R. (2003) Treatment of refractory myasthenia: „rebooting“ with high-dose cyclophosphamide. *Ann Neurol*, **53**, 29–34.
- Drisdell R., Green W. (2000) Neuronal α -bungarotoxin receptors are $\alpha 7$ subunit homomers. *J Neurosci*, **20**, 133–139.
- Dunstan D., Grant A., Marshall R., Neuberger A. (1974) A protein, immunologically similar to Tamm-Horsfall glycoprotein, produced by cultured baby hamster kidney cells. *Proc R Soc Lond B*, **186**, 297–316.
- Edge A. (2003) Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulphonic acid: elucidation of molecular structure and function. *Biochem J*, **376**, 339–350.
- Eibl N., Gschwantler M., Ferenci P., Eibl M., Weiss W., Scherthaner G. (2001) Development of insulin-dependent diabetes mellitus in a patient with chronic hepatitis C during therapy with interferon-alpha. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **13**, 295–298.
- Eisele J., Bertrand S., Galzi J., Devillers-Thiery A., Changeux J., Bertrand D. (1993) Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature*, **366**, 479–483.
- Endo Y., Mitsui K., Motizuki M., Tsurugi K. (1987) The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem*, **262**, 5.908–5.912.

- Evoli A., Di Schino C., Marsili F., Punzi C. (2002) Successful treatment of myasthenia gravis with tacrolimus. *Muscle Nerve*, **25**, 111–114.
- Falasca A., Gasperi-Campani A., Abbondanza A., Barbieri L., Stirpe F. (1982) Properties of the ribosome-inactivating proteins gelonin, *Mormordica charantia* inhibitor, and dianthins. *Biochem J*, **207**, 505–509.
- Faye L., Gomord V., Fitchette-Laine A., Chrispeels M. (1993) Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing α 13 fucose or β 12 xylose. *Anal Biochem*, **209**, 104–108.
- Fersht A. (2000) Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 1.525–1.529.
- Fishwild D., Wu H., Carroll S., Bernhard S. (1994) Characterization of the increased cytotoxicity of gelonin anti-T cell immunoconjugates compared with ricin A chain immunoconjugates. *Clin Exp Immunol*, **97**, 10–18.
- Frail D., McLaughlin L., Mudd J., Merlie J. (1988) Identification of the mouse muscle 43,000-dalton acetylcholine receptor-associated protein (RAPsyn) by cDNA cloning. *J Biol Chem*, **263**, 15.602–15.607.
- Froehner S., Luetje C., Scotland P., Patrick J. (1990) The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron*, **5**, 403–410.
- Fujii Y., Lindstrom J. (1988) Regulation of antibody production by helper T cell clones in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol*, **141**, 3.361–3.369.
- Fukuyama S., Kajiwara E., Suzuki N., Miyazaki N., Sadoshima S., Onoyama K. (2000) Systemic lupus erythematosus after α -interferon therapy for chronic hepatitis C: a case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol*, **95**, 310–312.
- Garcia Y.R., Pothitakis J.C., Krolick K.A. (2003) Myocyte production of nitric oxide in response to AChR-reactive antibodies in two inbred rat strains may influence disease outcome in experimental myasthenia gravis. *Clinical Immunology*, **106**, 116–126.
- Gemsa D., Kalden J.R., Resch K. (Herausgeber) (1997) *Immunologie (Grundlagen - Klinik - Praxis)*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 4 Auflage.
- Green W. (1999) Ion channel assembly: creating structures that function. *J Gen Physiol*, **113**, 163–170.
- Guyon T., Levasseur P., Truffault F., Cottin C., Gaud C., Berrih-Aknin S. (1994) Regulation of acetylcholine receptor α subunit variants in human myasthenia gravis - quantification of steady-state

- levels of messenger RNA in muscle biopsy using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest*, **94**, 16–24.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 558–580.
- Hansen S., Radic Z., Talley T., Molles B., Deerinck T., Tsigelny I., Taylor P. (2002) Tryptophan fluorescence reveals conformational changes in the acetylcholine binding protein. *J Biol Chem*, **277**, 41.299–41.302.
- Harlow E. (1987) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Harshyne L.A., Watkins S.C., Gambotto A., Barrat-Boyes S.M. (2001) Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol*, **166**, 3.717–3.723.
- Haskins N. (1982) The application of stable isotopes in biomedical research. *Biomed Mass Spectrom*, **9**, 269–277.
- Hattman S., Brooks J., Masurekar M. (1978) Sequence specificity of the P1 modification methylase (M.Eco P1) and the DNA methylase (M.Eco dam) controlled by the *Escherichia coli* dam gene. *J Mol Biol*, **126**, 367–380.
- Hayashi F., Smith K., Ozinsky A., Hawn T., Yi E., Goodlett D., Eng J., Akira S., Underhill D., Aderem A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, **410**, 1.099–1.103.
- Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. (2000) A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, **408**, 740–745.
- Hertling-Jaweed S., Bandini G., Müller-Fahrnow A., Dommes V., Hucho F. (1988) Rapid preparation of the nicotinic acetylcholine receptor for crystallization in detergent solution. *FEBS Lett*, **241**, 29–32.
- Heukeshoven J., Demick R. (1983) Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen. *Elektrophorese Forum, München*, 92–97.
- Hofmann U. (1988) *Untersuchungen zum Mechanismus der Antigen-spezifischen Immunsuppression mit Hilfe von Antigen-Toxin-Konjugaten*. Doktorarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Hohlfeld R., Toyka K., Miner L., Walgrave S., Conti-Tronconi B. (1988) Amphipathic segment of the nicotinic receptor α subunit contains epitopes recognized by T lymphocytes in myasthenia gravis. *J Clin Invest*, **81**, 657–660.
- Hossann M. (2001) *Versuche zur Herstellung von Acetylcholinrezeptor-Gelonin-Konjugaten*. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.

- Hosur M., Nair B., Satyamurthy P., Misquith S., Surolia A., Kannan K. (1995) X-ray structure of gelonin at 1,8 Å resolution. *J Mol Biol*, **250**, 368–380.
- Huang P., Chen H.C., Kung H.F., Huang R., Huang R., Huang P., Huang H., Lee Huang S. (1992) Anti-HIV plant proteins catalyze topological changes of DNA into inactive forms. *Biofactors*, **4**, 37–41.
- Huetz F., Sciard-Larsson E., Pereira P., Portnoi D., Coutinho A. (1988) T cell dependence of the „natural“ autoreactive B cell activation in the spleen of normal mice. *Eur J Immunol*, **18**, 1.615–1.622.
- Husain M., Roberts J., Thomas B., Wilson A. (1968) The excretion and metabolism of oral ¹⁴C-pyridostigmine in the rat. *Br J Pharmacol*, **34**, 445–450.
- Häcker H., Vabulas R., Takeuchi O., Hoshino K., Akira S., Wagner H. (2002) Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated fractor (TRAF)6. *J Exp Med*, **192**, 595–600.
- Illingworth J. (2004) Persönliche Homepage: <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/>.
- Im S.H., Barchan D., Souroujon M.C., Fuchs S. (2000) Role of tolergen conformation in induction of oral tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol*, **165**, 3.599–3.605.
- Ingulli E., Mondino A., Khoruts A., Jenkins M.K. (1997) In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4⁺ T cells. *J Exp Med*, **185**, 2.133–2.141.
- Ishii K., Suzuki K., Coban C., Takeshita F., Itoh Y., Matoba H., Kohn L., Klinman D. (2001) Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol*, **167**, 2.602–2.607.
- Jackson R., Campbell E.A., Herbert P., Hunt T. (1983) The preparation and properties of gel-filtered rabbit-reticulocyte lysate protein-synthesis systems. *Eur J Biochem*, **131**, 289–301.
- Jaenicke R., Rudolph R. (1986) Refolding and association of oligomeric proteins. *Methods Enzymol*, **131**, 218–250.
- Janeway C. (1989) Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. *Immunol Today*, **10**, 283–286.
- Jehl M. (2002) *Untersuchungen zur Struktur und Funktion der lecithinabhängigen (R)-3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase*. Doktorarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Johnson K., Chrispeels M. (1987) Substrate specificities of N-acetylglucosylaminyl-, fucosyl-, and xylosyltransferases that modify glycoproteins in the Golgi apparatus of bean cotyledons. *Plant Physiol*, **84**, 1.301–1.308.
- Kahn C., McIntosh K., Drachman D. (1990) T-cell vaccination in experimental myasthenia gravis: a double-edged sword. *J Autoimmun*, **3**, 659–669.

- Kasheverov I., Utkin Y., Weise C., Franke P., Hucho F., Tsetlin V. (1998) Reverse-phase chromatography isolation and MALDI mass spectrometry of the acetylcholine receptor subunits. *Protein Expr Purif*, **12**, 226–232.
- Kay I., Mallet A.I. (1993) Use of an on-line liquid chromatography trapping column for the purification of protein samples prior to electrospray mass spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **7**, 744–746.
- Kennedy F.S., Moersch F.P. (1937) Myasthenia gravis: a clinical review of 87 cases observed between 1915 and the early part of 1932. *Can Med Assoc J*, **37**, 217.
- Killen J., Lindstrom J. (1984) Specific killing of lymphocytes that cause experimental autoimmune myasthenia gravis by ricin toxin-acetylcholine receptor conjugates. *J Immunol*, **133**, 2.549–2.554.
- Kim Y., Robertus J. (1992) Analysis of several key active site residues of ricin A chain by mutagenesis and X-ray crystallography. *Protein Eng*, **5**, 775–779.
- Kimura Y., Hase S., Kobayashi Y., Kyogoku Y., Ikenaka T., Funatsu G. (1988) Structures of sugar chains of ricin D. *J Biochem (Tokyo)*, **103**, 944–949.
- Kitamura K., Takahashi T., Yamaguchi T., Noguchi N.A. A., Takashina K., Tsurumi H., Inagake M., Toyokuni T., Hakomori S. (1991) Chemical engineering of the monoclonal antibody A7 by polyethylene glycol for targeting cancer chemotherapy. *Cancer Res*, **51**, 4.310–4.315.
- Klein J. (1991) *Immunologie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH; Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 1. Auflage.
- Kornfeld R., Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, **54**, 631–664.
- Krammer P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **407**, 789–795.
- Kreienkamp H., Maeda R., Sine S., Taylor P. (1995) Intersubunit contacts governing assembly of the mammalian nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*, **14**, 635–644.
- Kreilinger U. (2001) *Versuche zur antigenspezifischen Immunsuppression der Myasthenia gravis mit Immuntoxinen aus Gelonin und rekombinanten AChR- Fragmenten*. Doktorarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Kyhse-Andersen J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, **10**, 203–209.
- Laemmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.

- Lambert J., Blattler W., McIntyre G., Goldmacher V., Scott jr. C. (1988) Immunotoxins containing single-chain ribosome-inactivating proteins. *Cancer Treat Res*, **37**, 175–209.
- Lambolez F., Jooss K., Vasseur F., Sarukhan A. (2002) Tolerance induction to self antigens by peripheral dendritic cells. *Eur J Immunol*, **32**, 2.588–2.597.
- Lanzavecchia A., Lezzi G., Viola A. (1999) From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell*, **96**, 1–4.
- Leads R., Tommerup H., Svendsen I., Mundy J. (1991) Biochemical and molecular characterisation of three barley seed proteins with anti-fungal properties. *J Biol Chem*, **266**, 1.564–1.573.
- Lehmann W. (1996) *Massenspektrometrie in der Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford, 1. Auflage.
- Lehmann W., Schulten H. (1978) Quantitative Massenspektrometrie in Biochemie und Medizin. *Angew Chem*, **90**, 233–250.
- Lennon V., Lindstrom J., Seybold M. (1975) Experimental autoimmune myasthenia: A model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs. *J Exp Med*, **141**, 1.365–1.375.
- Lennon V.A., Lambert E.H. (1981) Monoclonal autoantibodies to acetylcholine receptors: evidence for a dominant idotype and requirement of complement for pathogenicity. *Ann N Y Acad Sci*, **377**, 77–96.
- Lennon V.A., Seybold M.E., Lindstrom J., Cochrane C., Ulevitch R. (1978) Role of complement in the pathogenesis of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Exp Med*, **147**, 973–983.
- Lerouge P., Cabanes-Macheteau M., Ryon C., Fischette-Laine A.C., Gomord V., Faye L. (1998) N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol*, **38**, 31–48.
- Li Z. (2002) *Immunotoxins and neurotrophins: Novel strategies for the efficient expression of recombinant proteins*. Doktorarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Lindstrom J., Lambert E. (1978) Content of acetylcholine receptor and antibodies bound to receptor in myasthenia gravis, experimental autoimmune myasthenia gravis, and in Eaton-Lambert syndrome. *Neurology*, **28**, 130–138.
- Lindstrom J., Peng X., Kuryatov A., Lee E., Anand R., Gerzanich V., Wang F., Wells G., Nelson M. (1998) Molecular and antigenic structure of nicotinic acetylcholine receptors. *Ann N Y Acad Sci*, **841**, 71–86.
- Lindstrom J., Shelton D., Fujii Y. (1988) Myasthenia gravis. *Adv Immunol*, **42**, 233–284.
- Lipscomb M., Masten B. (2002) Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev*, **82**, 97–130. Heruntergeladen.

- Liu L., Rich B.E., Inobe J., Chen W., Weiner H.L. (1997) A potential pathway of Th2 development during primary immune response. IL-10 pretreated dendritic cells can prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Adv Exp Med Biol*, **417**, 375–381.
- Lo D., Burkly L., Flavell R., Palmiter R., Brinster R. (1989) Tolerance in transgenic mice expressing class II major histocompatibility complex on pancreatic acinar cells. *J Exp Med*, **170**, 87–104.
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 76–85.
- Marinus M., Morris N. (1973) Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **114**, 1.143–1.150.
- Matthews I., Sims G., Ledwidge S., Stott D., Beeson D., Willcox N., Vincent A. (2002) Antibodies to acetylcholine receptor in parous women with myasthenia: evidence for immunization by fetal antigen. *Lab Invest*, **82**, 1.407–1.417.
- Matzinger P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, **12**, 991–1.045.
- May M., Hattman S. (1975) Analysis of bacteriophage deoxyribonucleic acid sequences methylated by host- and R-factor-controlled enzymes. *J Bacteriol*, **123**, 768–770.
- McDonald J., Ong M., Shen C., Parandoosh Z., Sosnowski B., Bussell S., Houston L. (1996) Large-scale purification and characterization of recombinant fibroblast growth factor-saporin mitotoxin. *Protein Expr Purif*, **8**, 97–108.
- McIntosh K.R., Drachman D.B. (1999) Induction of apoptosis in activated T cell blasts by suppressive macrophages: a possible immunotherapeutic approach for treatment of autoimmune diseases. *Cell Immunol*, **193**, 24–35.
- McIntosh K.R., Linsley P.S., Bacha P.A., Drachman D.B. (1998) Immunotherapy of experimental autoimmune myasthenia gravis: selective effects of CTLA4Ig and synergistic combination with an IL-2-Diphtheria toxin fusion protein. *J Neuroimmunol*, **87**, 136–146.
- Medzhitov R., Janeway jr. C. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, **296**, 298–300.
- Melms A., Chrestel S., Schalke B., Wekerle H., Mauron A., Ballivet M., Barkas T. (1989) Autoimmune T lymphocytes in myasthenia gravis. Determination of target epitopes using T lines and recombinant products of the mouse nicotinic acetylcholine receptor gene. *J Clin Invest*, **83**, 785–790.
- Melms A., Malcherek G., Gern U., Wietholter H., Muller C., Schoepfer R., Lindstrom J. (1992) T cells from normal and myasthenic individuals recognize the human acetylcholine receptor: heterogeneity of antigenic sites on the α -subunit. *Ann Neurol*, **31**, 311–318.

- Milosavljevic R. (1998) *Versuche zur Expression humanen nicotinischen Acetylcholinrezeptors in Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Misquith S., Surolia A. (1995) In vivo treatment of Heymann's Nephritis using a cytotoxic protein-toxin conjugate. *FEBS Lett*, **373**, 151–154.
- Miyazawa A., Fujiyoshi Y., Unwin N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, **424**, 949–955.
- Miyazawa A., Fukiyoshi Y., Stowell M., Unwin N. (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol*, **288**, 765–786.
- Monzingo A., Robertus J. (1992) X-ray analysis of substrate analogs in the ricin A-chain active site. *J Mol Biol*, **227**, 1.136–1.145.
- Morhahan G., Morel L. (2002) Genetics of autoimmune diseases in humans and in animal models.. *Curr Opin Immunol*, **14**, 803–811.
- Morris P., Shaman J., Attaya M., Amaya M., Goodman S., Bergman C., Monaco J., Mellins E. (1994) An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature*, **368**, 551–554.
- Mosckovitz R., Gershoni J.M. (1988) Three possible disulfides in the acetylcholine receptor α -subunit. *J Biol Chem*, **263**, 1.017–1.022.
- Mouthon L., Nobrega A., Nicolas N., Kaveri S.V., Barreau C., Coutinho A., Kazatchkine M.D. (1995) Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 3.829–3.843.
- Mowat A. (1987) The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunol Today*, **8**, 93–98.
- Nagata S. (1998) Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model. *J Hum Genet*, **43**, 2–8.
- Nagler-Anderson C., Bober L., Robinson M., Siskind G., Thorbecke G. (1986) Suppression of type II collagen-induced arthritis by intragastric administration of soluble type II collagen. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 7.443–7.446.
- Nepom G., Erlich H. (1991) MHC class-II molecules and autoimmunity. *Ann Rev Immunol*, **9**, 493–525.
- Newland C., Beeson D., Vincent A., J. N.D. (1995) Functional and non functional isoforms of the human muscle acetylcholine receptor. *J Physiol*, **489**, 767–778.

- Nicolas E., Goodyer I., Taraschi T. (1997) An additional mechanism of ribosome-inactivating protein cytotoxicity: degradation of extrachromosomal DNA. *Biochem J*, **327**, 413–417.
- Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Tanabe T., Shimizu S., Kikyotani S., Kayano T., Hirose T., Inayama S., Numa S. (1983) Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding α -subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature*, **305**, 818–823.
- Nolan P.A., Garrison D.A., Better M. (1993) Cloning and expression of a gene encoding gelonin, a ribosome-inactivating protein from *Gelonium multiflorum*. *Gene*, **134**, 223–227.
- Nussenblatt R., Caspi R., Mahdi R., Chan C., Roberge F., Lider O., Weiner H. (1990) Inhibition of S-antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance with S-antigen. *J Immunol*, **144**, 1.689–1.695.
- Okumura S., McIntosh K., Drachman D. (1994) Oral administration of acetylcholine receptor: effects on experimental myasthenia gravis. *Ann Neurol*, **36**, 704–713.
- Olsberg C., Mikiten T., Krolick K. (1985) Selective in vitro inhibition of an antibody response to purified acetylcholine receptor by using antigen-ricin A chain immunotoxin. *J Immunol*, **135**, 3.063–3.067.
- Oxley D., Bacic A. (1995) Microheterogeneity of N-glycosylation on a stylar self-incompatibility glycoprotein of *Nicotiana glauca*. *Glycobiology*, **5**, 517–523.
- Pamer E., Cresswell P. (1998) Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*, **16**, 323–358.
- Pascuzzi R.M. (2001) Pearls and pitfalls in the diagnosis and management of neuromuscular junction disorders. *Semin Neurol*, **21**, 425–440.
- Patrick J., Lindstrom J., Culp B., McMillan J. (1973) Studies on purified eel acetylcholine receptor and anti-acetylcholine receptor antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, **70**, 3.334–3.338.
- Pelham H.R., Jackson R.J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, **67**, 247–256.
- Perlo V.P., Arnason B., Poskanzer D., Castleman B., Schwab R.S., Osserman K.E., Papatestis A., Alpert L., Kark A. (1971) The role of thymectomy in the treatment of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*, **183**, 308–315.
- Peters J., Baumgarten H. (1990) *Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung*. Springer Verlag, Berlin, 2 Auflage.
- Peterson G. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, **83**, 346–356.

- Pumplin D., Drachman D. (1983) Myasthenic patients' IgG causes redistribution of acetylcholine receptors: freeze-fracture studies. *J Neurosci*, **3**, 576–584.
- Reddy S., Hsiao K., Abernethy V., Fan H., Longacre A., Lieberthal W., Rauch J., Koh J., Levine J. (2002) Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages induces novel signaling events leading to cytokine-independent survival and inhibition of proliferation: activation of Akt and inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Immunol*, **169**, 702–713.
- Reim J., McIntosh K., Martin S., Drachman D.B. (1992) Specific immunotherapeutic strategy for myasthenia gravis: targeted antigen-presenting cells. *J Neuroimmunol*, **41**, 61–70.
- Ren J., Wang Y., Dong Y., Stuart D. (1994) The N-glycosidase mechanism of ribosome-inactivating proteins implied by crystal structures of α -momorcharin. *Structure*, **2**, 7–14.
- Rieux-Laucat F., Blachere S., Danielan S., De Villartay J., Oleastro M., Solary E., Bader-Meunier B., Arkwright P., Pondare C., Bernaudin F., Chapel H., Nielsen S., Berrah M., Fischer A., Le Deist F. (1999) Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: A possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations. *Blood*, **94**, 2.575–2.582.
- Roder H., Colon W. (1997) Kinetic role of early intermediates in protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 15–28.
- Rosenblum M.G., Kohr W.A., Beattie K.L., Beattie W.G., Marks W., Toman P.D., Cheung L. (1995) Amino acid sequence analysis, gene construction, cloning, and expression of gelonin, a toxin derived from *Gelonium multiflorum*. *J Interferon Cytokine Res*, **15**, 547–555.
- Rousselle H. (1996) *Immuntoxine aus Fragmenten des humanen nikotinischen Acetylcholinrezeptors und dem Pflanzentoxin Gelonin*. Doktorarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Rubin D., Harper C., Auger R. (2004) Trigeminal nerve repetitive stimulation in myasthenia gravis. *Muscle Nerve*, **29**, 591–596.
- Rudolph R., Lilie H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB*, **10**, 49–56.
- Rybak S., Lin J., Newton D., Kung H., Monks A., Chen H., Huang P., LeeHuang S. (1994) In vitro anti-tumor activity of the plant ribosome inactivating proteins MAP 30 and GAP 31. *Int J Oncology*, **5**, 1.171–1.176.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Auflage.
- Samuelsson E., Wadensten H., Hartmanis M., Moks T., Uhlen M. (1991) Facilitated in vitro refolding of human recombinant insulin-like growth factor I using a solubilizing fusion partner. *Biotechnology (N Y)*, **9**, 363–366.

- Sanchez I., Kiefhaber T. (2003) Evidence for sequential barriers and obligatory intermediates in apparent two-state protein folding. *J Mol Biol*, **325**, 367–376.
- Sanes J., Lichtman J. (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci*, **22**, 389–442.
- Schrattenholz A., Pfeiffer S., Pejovic V., Rudolph R., Godovac-Zimmermann J., Maelicke A. (1998) Expression and renaturation of the N-terminal extracellular domain of *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor α -subunit. *J Biol Chem*, **273**, 32.393–32.399.
- Schäfer F. (1995) *Versuche zur antigenspezifischen Immunsuppression mit Antigen-Toxin-Konjugaten*. Doktorarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Sehnert B. (1994) *Isolierung und Reinigung des n-Acetylcholinrezeptors zur Herstellung von Gelonin-n-Acetylcholinrezeptor-Konjugaten*. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Selbo P., Sandvig K., Kirveliene V., Berg K. (2000) Release of gelonin from endosomes and lysosomes to cytosol by photochemical internalization. *Biochim Biophys Acta*, **1.475**, 307–313.
- Seybold M., Lambert E., Lennon V., Lindstrom J. (1976) Experimental autoimmune myasthenia: clinical, neurophysiologic, and pharmacologic aspects. *Ann N Y Acad Sci*, **274**, 275–282.
- Shanmugam A., Copie-Bergman C., Hashim G., Rebibo D., Jais J., Bach J., Bach M., Tournier-Lasserre E. (1994) Healthy monozygous twins do not recognize identical T cell epitopes on the myelin basic protein autoantigen. *Eur J Immunol*, **24**, 2.299–2.303.
- Sharp P., La Regina M. (1998) *The laboratory rat*. CRC Press; Boca Rato, Boston, London, New York, Washington D.C.
- Shi G., Bryant R., Riese R., Verhelst S., Driessen C., Li Z., Bromme D., Ploegh H., Chapman H. (2000) Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J Exp Med*, **191**, 1.177–1.186.
- Smit A.B., Syed N.I., Schaap D., van Minnen J., Klumperman J., Kits K.S., Lodder H., van der Schors R.C., van Elk R., Sorgedrager B., Brejc K., Sixma T.K., Geraerts W.P.M. (2001) A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature*, **411**, 261–268.
- Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M., Fujimoto E., Goeke N., Olson B., Klenk D. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analyt Biochem*, **150**, 76–85.
- Sojar H.T., Bahl O.P. (1987) Chemical deglycosylation of glycoproteins. *Method Enzymol*, **138**, 341–350.
- Stark G., Stein W., Moore S. (1960) Reactions of the Cyanate Present in Aqueous Urea with Amino Acids and Proteins. *J Biol Chem*, **235**, 3.177–3.181.

- Steinman R.M., Kaplan G., Wittmer M.D., Cohn Z.A. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med*, **149**, 1–16.
- Sterz R., Biro G., Rajki K., Filipp G., Peper K. (1985) Experimental autoimmune myasthenia gravis: can pretreatment with ¹²⁵I-labeled receptor prevent functional damage at the neuromuscular junction? *J Immunol*, **134**, 841–846.
- Stirpe F., Olsnes S., Phil A. (1980) Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. *J Biol Chem*, **255**, 6.947–6.953.
- Sturm A. (1991) Heterogeneity of the complex N-linked oligosaccharides at specific glycosylation sites of two secreted carrot glycoproteins. *Eur J Biochem*, **199**, 169–179.
- Sunde M., Blake C. (1997) The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv Protein Chem*, **50**, 123–159.
- Surh C.D., Sprent J. (1994) T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*, **372**, 100–103.
- Surolia N., Misquith S. (1996) Cell surface receptor directed targeting of toxin to human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett*, **396**, 57–61.
- Sönnichsen N., Apostoloff E. (Herausgeber) (1992) *Autoimmunkrankheiten*. Gustav Fischer Verlag; Jena, Stuttgart, 2. Auflage.
- Süßmuth R., Eberspächer J., Haag R., Springer W. (1997) *Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage.
- Takahashi N., Hitotsuya H., Hanzawa H., Arata Y., Kurihara Y. (1990) Structural study of asparagine-linked oligosaccharide moiety of taste-modifying protein, miraculin. *J Biol Chem*, **265**, 7.793–7.798.
- Talal N., Ahmad S. (1987) Immunomodulation by hormones—an area of growing importance. *J Rheumatol*, **14**, 191–193.
- Tanford C., Kawahara K., Lapanje S. (1966) Proteins in 6-M guanidine hydrochloride. Demonstration of random coil behavior. *J Biol Chem*, **241**, 1.921–1.923.
- Tezuka K., Hayashi M., Ishihara H., Akazawa T., Takahashi N. (1992) Studies on synthetic pathway of xylose-containing N-linked oligosaccharides deduced from substrate specificities of the processing enzymes in sycamore cells (*Acer pseudoplatanus* L.). *Eur J Biochem*, **203**, 401–413.
- Thompson P., Barohn R., Krolick K. (1992) Repetitive nerve stimulation vs. twitch tension in rats with EAMG. *Muscle Nerve*, **15**, 94–100.

- Thorlacius S., Mollnes T.E., Garred P., Aarli J.A., Matre R., Tonder O., Halvorsen K. (1988) Plasma exchange in myasthenia gravis: changes in serum complement and immunoglobulins. *Acta Neurol Scand*, **78**, 221–227.
- Trakas N., Tzartos S.J. (2001) Conjugation of acetylcholine receptor-protecting Fab fragments with polyethylene glycol results in a prolonged half-life in the circulation and reduced immunogenicity. *J Neuroimmunol*, **120**, 42–49.
- Trentham D. (1998) Oral tolerization as a treatment of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, **24**, 525–536.
- Tsouloufis T., Mamalaki A., Remoundos M., Tzartos S.J. (2000) Reconstitution of conformationally dependent epitopes on the N-terminal extracellular domain of the human muscle acetylcholine receptor α -subunit expressed in *Escherichia coli*: implications for myasthenia gravis therapeutic approaches. *Inter Immunol*, **12**, 1.255–1.265.
- Tsujihata M., Satoh A., Yoshimura T., Motomura M., Takeo G., Matsuo H., Nakamura T. (2003) Effect of myasthenic immunoglobulin G on motor end-plate morphology. *J Neurol*, **250**, 75–82.
- Tzartos S., Barkas T., Cung M., Mamalaki A., Marraud M., Orlewski P., Papanastasiou D., Sakarellos C., Sakarellos-Daitsiotis M., Tsantili P., Tsikaris V. (1998) Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor. *Immunol Rev*, **163**, 89–120.
- Tzartos S.J., Kokla A., Walgrave S.L., Conti-Tronconi B.M. (1988) Localization of the main immunogenic region of human muscle acetylcholine receptor residues 67-76 of the α subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 2.899–2.903.
- Tzartos S.J., Rand D.E., Einarson B.L., Lindstrom J.M. (1981) Mapping the surface structures of electrophorus acetylcholine receptor using monoclonal antibodies. *J Biol Chem*, **256**, 8.635–8.645.
- Urbatsch I. (1990) *Antigen-spezifische Immunsuppression mit Hilfe von Antigen-Gelonin Konjugaten*. Doktorarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Urbatsch I.L., Sterz R.K., Peper K., Trommer W.E. (1993) Antigen-specific therapy of experimental myasthenia gravis with acetylcholine receptor-gelonin conjugates *in vivo*. *Eur J Immunol*, **23**, 776–779.
- Utkin Y., Tsetlin V., Hucho F. (2000) Structural organization of nicotinic acetylcholine receptors. *Membr Cell Biol*, **13**, 143–164.
- Vieira P.L., de Jong E.C., Wierenga E.A., Kapsenberg M.L., Kalinski P. (2000) Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol*, **164**, 4.507–4.512.

- Vincent A., Jacobson L., Curran L. (1998) α -Bungarotoxin binding to human muscle acetylcholine receptor: measurement of affinity, delineation of AChR subunit residues crucial to binding, and protection of AChR function by synthetic peptides. *Neurochem Int*, **32**, 427–433.
- Vincent A., Whiting P.J., Schlupe M., Heidenreich F., Lang B., Robers A., Willcox N., Newsom-Davis J. (1987) Antibody heterogeneity and specificity in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*, **505**, 106–120.
- Vitetta E., Uhr J. (1985) Immunotoxins. *Annu Rev Immunol*, **3**, 197–212.
- Weiner H., Mackin G., Matsui M., Orav E., Khoury S., Dawson D., Hafler D. (1993) Double-blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis. *Science*, **259**, 1.321–1.324.
- Weiner H., Mayer L. (1996) Oral tolerance: mechanisms and applications. *Ann N Y Acad Sci*, **778**, XIII–XVIII.
- Wells G., Anand R., Wang F., Lindstrom J. (1998) Water-soluble nicotinic acetylcholine receptor formed by $\alpha 7$ subunit extracellular domains. *J Biol Chem*, **273**, 964–973.
- West jr. A.P., Bjorkman P.J., Dougherty D.A., Lester H.A. (1997) Expression and circular dichroism studies of the extracellular domain of the α subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem*, **272**, 25.468–25.473.
- Whitacre C.C. (2001) Sex differences in autoimmune disease. *Nature Immunol*, **2**, 777–780.
- Whitacre C.C., Reingold S.C., O’Looney P.A., the Task Force on Gender M.S., Autoimmunity (1999) A gender gap in autoimmunity. *Science*, **283**, 1.277–1.278.
- Yang B., McIntosh K., Drachman D. (1998) How subtle differences in MHC class II affect the severity of experimental myasthenia gravis. *Clin Immunol Immunopathol*, **86**, 45–58.
- Yao Y., Wang J., Viroonchatapan N., Samson A., Chill J., Rothe E., Anglister J., Wang Z.Z. (2002) Yeast expression and NMR analysis of the extracellular domain of muscle nicotinic acetylcholine receptor α subunit. *J Biol Chem*, **277**, 12.613–12.621.
- Zarling J., Moran P., Haffar O., Sias J., Richman D., Spina C., Myers D., Kuebelbeck V., Ledbetter J., Uckun F. (1990) Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4+ cells by monoclonal antibodies. *Nature*, **347**, 92–95.
- Zeng Y., Bannon G., Thomas V., Rice K., Drake R., Elbein A. (1997) Purification and specificity of $\beta 1,2$ -xylosyltransferase, an enzyme that contributes to the allergenicity of some plant proteins. *J Biol Chem*, **272**, 31.340–31.347.
- Zettlmeissl G., Rudolph R., Jaenicke R. (1979) Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent

aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation. *Biochemistry*, **18**, 5.567–5.571.

Zhang Y., Tzartos S., Wekerle H. (1988) B-T lymphocyte interactions in experimental autoimmune myasthenia gravis: antigen presentation by rat/mouse hybridoma lines secreting monoclonal antibodies against the nicotinic acetylcholine receptor. *Eur J Immunol*, **18**, 211–218.

Zhou H., Glass D.J., Yancopoulos G.D., Sanes J.R. (1999) Distinct domains of MuSK mediate its abilities to induce and to associate with postsynaptic specializations. *J Biol Chem*, **146**, 1.133–1.146.

Zoda T., Krolick K. (1993) Antigen presentation and T cell specificity repertoire in determining responsiveness to an epitope important in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*, **43**, 131–138.

B. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- In chronologischer Reihenfolge danke ich Herrn Ronny Wolf, Frau Melanie Schmidt, Herrn Stefan Hauck, Herrn Jens Schindler, Herrn Andreas Rech, Herrn Fabian Leinisch, Herrn Joachim Ackel, Herrn Matthias Stolte und Frau Michaela Haimann für ihre engagierte und erfolgreiche Mitarbeit im Rahmen des Fortgeschrittenenpraktikums Biochemie.
- Herrn PD Dr. S. Jung (Nervenlinik und Poliklinik, Neurologie, Universitätskliniken des Saarlandes) danke ich für die Demonstration der RNS.
- Herrn Dr. S. Lührke (Fachbereich Biologie, Technische Universität Kaiserslautern) danke ich für seine Hilfe bei den ersten Schritten in der Elektrophysiologie und für seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. E. Friauf (Fachbereich Biologie, Technische Universität Kaiserslautern) danke ich für die Bereitstellung der Geräte.
- Herrn Prof. Dr. G. Niedner-Schatteburg (Fachbereich Chemie, Technische Universität Kaiserslautern) danke ich für die Messung des ESI-FT Massenspektrums von rekombinantem Gelonin.
- Herrn Thorsten Daubenfeld danke ich für die immer fröhliche Zusammenarbeit im Labor, die lange Zeit zum Erhalt der Sprachkultur beigetragen hatte.
- Herrn Jörn Büttner danke ich für die gute Zusammenarbeit während seiner Diplomarbeit und seine freundliche und immer aufgeschlossene Art.
- Herrn Joachim Ackel danke ich auch für die Zusammenarbeit während seiner Diplomarbeit und seine Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche.
- Herrn Dr. Reinhard Philipp danke ich für sein offenes Ohr bei Problemen.

- Herrn Dr. J.G. Wise danke ich für die Unterstützung bei Fragen zur gentechnischen Arbeit.
- Frau Susanne Kunz und Herrn Dr. Hans-Joachim Schmitz danke ich für ihre Hilfe bei den ersten Versuchen zum Umgang mit den Ratten.
- Frau Dr. U. Westermilies danke ich für die bereitwillige Beantwortung der tierärztlichen Fragen.
- Den Mitarbeitern im Arbeitskreis danke ich für die tolle Zusammenarbeit, für das sehr gute Arbeitsklima und die vielen interessanten Gespräche.
- Frau Elke Litmianski danke ich für die Herstellung der polyklonalen Anti-Gelonin Antikörper und ihr offenes Ohr bei fast allen Problemen.
- Frau Carolin Fluck danke ich für ihre freundliche Hilfe und Unterstützung.
- Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung und den großen Rückhalt über die letzten Jahrzehnte und das sie immer an mich geglaubt haben.
- Besonderen Dank gilt Frau Christine Gall für ihre intensive Korrekturarbeit, Unterstützung und für ihre guten Ideen. Ich danke ihr besonders dafür, dass es sie gibt.

...und Ratte K2 danke ich dafür, dass sie mir gezeigt hat, was es heißt Tierversuche durchzuführen.

C. Lebenslauf

Name: Martin Hossann

Anschrift: Gerhart-Hauptmann Straße 24/121
67663 Kaiserslautern

Geburtsdatum: 03. Juni 1975

Geburtsort: 76829 Landau/Pfalz

Eltern: Bernd Hossann
Marlis Hossann (geb. Förster)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1981 - 1983 Grundschule Landau Mitte
1983 - 1985 Pestalozzi-Grundschule, Landau
1985 - 1994 Max-Slevogt Gymnasium, Landau
06/1994 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst: 10/1995 - 12/1995 6./Luftwaffenausbildungsregiment 2, Budel/NL
01/1996 - 07/1996 Luftwaffenmaterialdepot 42, Germersheim

Studium: 10/1994 Aufnahme des Chemiestudiums an der Universität Kaiserslautern
10/1997 Vordiplom Chemie
06/2000 - 02/2001 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. W. E. Trommer
seit 03/2001 Beginn der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. W. E. Trommer
04. Juni 2004 Wissenschaftliche Aussprache

