

Antigenerkennung bei autoaggressiven Lymphozyten

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jessica Bruder

aus Bad Mergentheim

München, Juli 2012



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Klaus Dornmair

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Millionen Menschen weltweit leiden an den verschiedensten Autoimmunerkrankungen. Diese Krankheiten entstehen, wenn das Immunsystem gesundes körpereigenes Gewebe angreift und zerstört. An der Pathogenese sind sowohl Komponenten des angeborenen Immunsystems als auch Bestandteile des adaptiven Immunsystems, wie Lymphozyten und Antikörper, beteiligt. Da die Ursachen und molekularen Mechanismen der Pathogenese dieser Erkrankungen bis heute weitgehend unbekannt sind, wurden in dieser Arbeit autoaggressive Lymphozyten bei den humanen Autoimmunerkrankungen Polymyositis und Multiple Sklerose näher untersucht. Die Polymyositis ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Skelettmuskulatur. Die Muskelfasern werden dabei von zytotoxischen $CD8^+$ $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten infiltriert, attackiert und schließlich zerstört. In einem seltenen Fall der Polymyositis wurden die Muskelzellen hingegen in ähnlicher Weise von $CD8^+$ $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten angegriffen. Die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten waren monoklonal expandiert und ihr Rezeptor, im Folgenden als M88 bezeichnet, wurde als $V\gamma 1.3^+V\delta 2^+$ identifiziert. Frühere Untersuchungen der Antigen-spezifität dieser Zellen zeigten, dass M88 mehrere funktionell und strukturell verschiedene Proteine aus unterschiedlichen Spezies erkennt. Die Bindung erfolgt spezifisch durch die Antigenerkennungsregionen beider Rezeptorketten von M88. In dieser Arbeit wurden verschiedene bakterielle und humane Proteine des Translationsapparates als Antigene von M88 identifiziert. Weitere ausführliche Untersuchungen eines paradigmatischen bakteriellen Antigens, dem Translationsinitiationsfaktor EcIF1, zeigten, dass M88 an Oberflächen-exponierte Konformationsepitope von Proteinen bindet. Interessanterweise erkennt M88 mehrere humane Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Antigene, die in anderen Formen der Myositis von Autoantikörpern angegriffen werden. Diese Beobachtung ergibt eine bemerkenswerte Verbindung zwischen T-Zell- und Antikörper-vermittelten B-Zell-Antworten bei der autoimmunen Myositis.

Bei der Multiplen Sklerose ist das zentrale Nervensystem betroffen. Autoaggressive Lymphozyten greifen die Myelinschicht der Nervenzellen im Gehirn und Rückenmark an und zerstören sie. Im Liquor cerebrospinalis von Patienten lassen sich klonal expandierte und affinitäts-gereifte B-Zellen sowie „oligoklonale Banden“ (OKB) Antikörper nachweisen. Obwohl diese Merkmale auf eine Antigen-induzierte Immunantwort hindeuten, sind die zugrundeliegenden Antigene und die Rolle der OKB bei der Pathogenese bis heute unbekannt. In dieser Arbeit wurde die Antigen-spezifität von fünf IgG OKB-Antikörpern aus drei Patienten untersucht. Durch verschiedene proteinbiochemische Methoden konnten intrazelluläre Kandidatenantigene identifiziert werden. Interessanterweise sind darunter mehrere nukleäre Proteine, die an der Transkriptionsregulation oder der RNA-Prozessierung beteiligt sind. Reaktivitäten gegen intrazelluläre Antigene treten auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise dem systemischen Lupus erythematoses, auf. Diese Ergebnisse könnten auf einen allgemeinen Mechanismus der Entstehung und Funktion von Autoantikörpern bei diesen humanen Autoimmunerkrankungen hindeuten.

Summary

Millions of people worldwide suffer from various autoimmune diseases. These disorders occur if the immune system reacts to and destroys healthy body tissue. Pathogenesis is mediated by components of the innate immune system as well as by constituents of the adaptive immune system, like lymphocytes and antibodies. However, the origin and molecular mechanisms of these diseases remain still largely unknown. Therefore we investigated the role of autoaggressive lymphocytes in the human autoimmune diseases polymyositis and multiple sclerosis.

Polymyositis is a chronically inflammatory disease of the skeletal muscles. Cytotoxic CD8⁺ αβ-T lymphocytes invade, attack and finally destroy muscle fibers. However, in a rare variant of polymyositis, muscle fibers are similarly attacked by CD8⁻ γδ-T lymphocytes. These γδ-T lymphocytes were monoclonally expanded and their receptor, termed M88, was identified as Vγ1.3⁺Vδ2⁺. Previous investigations of the antigen specificity of these cells revealed that M88 recognizes several structurally and functionally different proteins from various species. This recognition is specifically mediated by the antigen recognition sites of both receptor chains of M88. In this work we have identified different bacterial and human proteins of the translation apparatus as antigens of M88. Further detailed investigations of one paradigmatic bacterial antigen, the translation initiation factor EcIF1, have shown that M88 binds to surface-exposed conformational protein epitopes. Interestingly, M88 recognizes several human aminoacyl-tRNA-synthetases. These antigens have been described to be also targeted by autoantibodies in other forms of myositis. This observation reveals a remarkable link between T cell and antibody-mediated B cell responses in autoimmune myositis.

In multiple sclerosis the central nervous system is affected. Autoaggressive lymphocytes attack and destroy the myelin sheath of nerve cells of the brain and spinal cord. In the cerebrospinal fluid of these patients clonally expanded and affinity-matured B cells as well as „oligoclonal band“ (OCB) antibodies can be detected. Although these features indicate an antigen-induced immune response, the underlying antigens and the role of the OCB antibodies in the pathogenesis are still unknown. In this work we describe the antigen specificity of five IgG OCB antibodies from three patients. Through various biochemical methods we have identified intracellular candidate antigens. Interestingly, these include several nuclear proteins involved in transcription regulation and RNA processing. Reactivity against intracellular antigens also occurs in other autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus. These findings suggest a general mechanism for the generation and function of autoantibodies in these human autoimmune diseases.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn PD Dr. rer. nat. Klaus Dornmair vom Max-Planck-Institut für Neurobiologie bedanken. Er ermöglichte mir die Durchführung dieser Doktorarbeit in seiner herausragenden Arbeitsgruppe. Von seiner ständigen Diskussionsbereitschaft, intensiven Betreuung und seinem großem Interesse an meiner Arbeit konnte ich ebenso wie von seinem großen Fachwissen über die Jahre profitieren und lernen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld vom Institut für klinische Neuroimmunologie des Klinikums der Universität München (Großhadern), der sich stets mit großer Begeisterung für meine Arbeit interessierte und immer motivierende Worte fand.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Georg Krohne möchte ich mich für die Begutachtung der Arbeit innerhalb der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg und für die Ausbildung während des Studiums bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Wekerle und allen Mitarbeitern in der Abteilung Neuroimmunologie am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried danke ich für die freundliche Aufnahme und moralische Unterstützung.

Der Abteilung von Herr Prof. Dr. rer. nat. Friedrich Lottspeich am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried möchte ich für die Durchführung der Massenspektrometrie sowie einiger proteinbiochemischer Analysen danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kollegen in der gesamten Arbeitsgruppe für die stets gute und inspirierende Zusammenarbeit. Joachim, Reini, Ingrid, Martina, Katherina, Birgit, Geraldine, Eduardo, Simone und Anna haben mich während der letzten Jahre in Theorie und Praxis stets unterstützt und motiviert. Die Zeit mit euch war unvergesslich und hat sehr viel Spaß gemacht. Bei Geraldine und Katherina möchte ich mich nochmals besonders für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Natürlich möchte ich vor allem meinem Freund Stefan danken, der mich während der ganzen Zeit bedingungslos mit unendlich viel Liebe und Humor in allen Höhen und Tiefen unterstützt, stets an mich geglaubt und mir viel Kraft gegeben hat. Ich freue mich auf alles was uns die Zukunft noch bringen mag.

Zuletzt gilt mein größter Dank meiner Familie, meiner Mama, meinem Papa und meiner Schwester Sandra, die mich während all der Jahre begleitet, unterstützt und immer an mich geglaubt haben. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS IMMUNSYSTEM	1
1.2	DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM	2
1.2.1	T-Lymphozyten	2
1.2.1.1	Zelluläre Immunreaktion	2
1.2.1.2	Der T-Zell-Rezeptor (TZR)	3
1.2.1.3	Entwicklung und Entstehung der Rezeptordiversität	4
1.2.1.4	$\gamma\delta$ -T-Lymphozyten	5
1.2.2	B-Lymphozyten	6
1.2.2.1	Humorale Immunreaktion	6
1.2.2.2	Immunglobuline	6
1.2.2.3	Entwicklung und Entstehung der Rezeptordiversität	8
1.3	AUTOIMMUNERKRANKUNGEN	9
1.3.1	Die Rolle von T- und B-Lymphozyten bei Autoimmunerkrankungen	10
1.3.2	Idiopathische inflammatorische Myopathien	10
1.3.2.1	Polymyositis	11
1.3.2.2	Polymyositis durch einen autoaggressiven $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor	11
1.3.3	Multiple Sklerose	13
1.3.3.1	Liquordiagnostik und oligoklonale Banden	14
1.4	ZIELSETZUNG	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	MATERIAL	17
2.1.1	Allgemeine Geräte	17
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	18
2.1.3	Allgemeine Puffer und Lösungen	19
2.1.4	Bakterienstämme	19
2.1.5	Eukaryotische Zelllinien	19
2.1.6	Vektoren	20
2.1.7	Antibiotika	20
2.1.8	Längen- und Größenstandards	20
2.1.9	Enzyme, Kits, spezielle Reagenzien und Materialien	21
2.1.10	Restriktionsenzyme	22
2.1.11	Primer	22
2.1.11.1	Klonierung einer <i>E. coli</i> cDNA-Bibliothek	22
2.1.11.2	Klonierung von EcIF1wt und EcIF1-Mutanten	22
2.1.11.3	Klonierung des humanen eIF1AY	23
2.1.11.4	Klonierung eines chimären Konstruktes von M88	23
2.1.11.5	Klonierung von rekombinanten Fab-Fragmenten	23
2.1.11.6	Klonierung des humanen SF17A, NSP1 und NSP1 Δ	23
2.1.11.7	Kolonie-PCR- und Sequenzierprimer	24
2.1.12	Proteine und Peptide	24
2.1.13	Antikörper	25
2.1.14	Computerprogramme und Internetseiten	26
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	27
2.2.1	RNA-Isolierung und cDNA-Herstellung aus Zellen	27
2.2.2	DNA-basierte Methoden	28

2.2.2.1	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
2.2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.2.3	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	28
2.2.2.4	Reinigung von DNA-Fragmenten	28
2.2.2.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	29
2.2.2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	29
2.2.2.7	Klonierung	30
2.2.2.8	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	30
2.2.2.9	Ligation von DNA-Molekülen	31
2.2.2.10	Klonierung von EcIF1 wt und EcIF1-Mutanten	31
2.2.2.11	Klonierung einiger humaner Proteine	32
2.2.2.12	Klonierung von M88	33
2.2.2.13	Klonierung eines chimären Konstruktes von M88	33
2.2.2.14	Klonierung von rekombinanten Fab-Fragmenten	33
2.2.2.15	Sequenzierung von DNA	34
2.3	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	34
2.3.1	Anzucht von Bakterien auf Agarplatten und als Flüssigkulturen	34
2.3.2	Konservierung von Bakterienkulturen	34
2.3.3	Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation	35
2.3.4	Transformation von Bakterien	35
2.3.4.1	Transformation durch Elektroporation	35
2.3.4.2	Transformation durch Hitzeschock	35
2.3.5	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	36
2.3.6	Expression eines sc-Fv-M88-TZR in <i>E. coli</i>	36
2.3.7	Antigensuche mit einer <i>E. coli</i> cDNA-Bibliothek	37
2.4	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	37
2.4.1	Maus-T-Zell-Hybridome	37
2.4.1.1	Kultivierung	37
2.4.1.2	Aktivierung von Wildtyp und mutierten M88-Hybridomen	38
2.4.2	COS-7-Zellen	39
2.4.2.1	Kultivierung und Expression eines sc-Fv-M88-TZR	39
2.4.3	TE671-Zellen	40
2.4.4	HEK293E-Zellen	40
2.4.4.1	Kultivierung	40
2.4.4.2	Transfektion und transiente Proteinexpression	41
2.4.5	Bestimmung der Lebendzellzahl	41
2.4.6	Einfrieren und Auftauen von Zellen	41
2.5	PROTEINANALYTISCHE METHODEN	42
2.5.1	Proteinreinigung	42
2.5.1.1	Reinigung löslich rekombinant exprimierter Proteine aus <i>E. coli</i>	42
2.5.1.2	Reinigung nicht löslich rekombinant exprimierter Proteine aus <i>E. coli</i>	43
2.5.1.3	Reinigung eines sc-Fv-M88-TZR	43
2.5.1.4	Reinigung von rekombinant exprimierten Fab-Fragmenten	43
2.5.1.5	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (FPLC)	44
2.5.1.6	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC)	44
2.5.2	Dialyse	44
2.5.3	Konzentrierung durch Ultrafiltration	45
2.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.5.5	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	46
2.5.6	Zweidimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
2.5.7	Proteinfärbung	47
2.5.7.1	Coomassie®-Brillant-Blau-Färbung	47
2.5.7.2	Silberfärbung	47

2.5.8	Elektrotransfer von Proteinen	48
2.5.9	Herstellung von Proteinextrakten.....	48
2.5.9.1	Hirnllysate.....	48
2.5.10	Proteinbestimmung	49
2.5.10.1	Lowry-Test.....	49
2.5.10.2	Photometrische Messung	50
2.5.11	Massenspektrometrie	50
2.5.12	Zirkulardichroismus-Spektroskopie.....	50
2.5.13	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie	51
2.6	IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	51
2.6.1	Durchflusszytometrie	51
2.6.1.1	Herstellung eines EcIF1-Oktamers für die FACS-Färbung	52
2.6.2	Interleukin-2 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (IL-2 ELISA)	53
2.6.3	Immunfluoreszenzfärbungen	53
2.6.4	Lipidexperimente	54
2.6.5	Polyreaktivitäts-ELISA	54
2.6.6	Proteinarrays	55
2.6.7	Westernblot	57
2.6.7.1	2D-Westernblot.....	57
2.6.8	Immunpräzipitation.....	58
3	ERGEBNISSE.....	59
3.1	DER $\gamma\delta$-T-ZELL-REZEPTOR M88 AUS EINEM POLYMYOSITIS-PATIENTEN.....	59
3.1.1	M88-T-Zell-Hybridome	59
3.1.2	Antigensuche mit einer <i>E. coli</i> cDNA-Bibliothek	60
3.1.3	Erkennung bakterieller Proteine durch M88.....	62
3.1.4	Erkennung humaner Proteine durch M88	63
3.1.5	Nähere Charakterisierung des bakteriellen Antigens EcIF1	65
3.1.5.1	Mutagenese, Expression und Charakterisierung des EcIF1	65
3.1.5.2	Aktivierung von M88 durch EcIF1 wt und EcIF1-Mutanten.....	68
3.1.6	Erkennung eines Konformationsepitopes durch M88.....	69
3.1.6.1	Denaturierungsexperimente mit EcIF1 und hH-RS	69
3.1.6.2	Untersuchung auf Erkennung von EcIF1-Peptiden.....	72
3.1.7	Spezifische Erkennung des EcIF1 durch die CDR-Regionen von M88	74
3.1.8	Affinitätsmessungen von M88	75
3.1.8.1	FACS-Färbung mit einem EcIF1-Oktamer	75
3.1.8.2	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie-Messung	76
3.1.8.3	Expressionsversuche von M88.....	76
3.1.9	Expression und Untersuchung des humanen eIF1AY.....	78
3.2	OLIGOKLONALE BANDEN ANTIKÖRPER VON MULTIPLE SKLEROSE PATIENTEN	79
3.2.1	Klonierung, Expression und Charakterisierung rekombinanter Fab-Fragmente.....	79
3.2.2	Suche nach den Antigenen der OKB-Antikörper.....	82
3.2.2.1	Immunfluoreszenzfärbungen und Untersuchung von Lipidantigenen	82
3.2.2.2	Test auf Polyreaktivität der OKB-basierten Fab-Fragmente.....	83
3.2.2.3	Antigensuche mit humanen Proteinarrays	84
3.2.2.4	Antigensuche mit Hirnllysaten.....	96
4	DISKUSSION.....	104
4.1	DER $\gamma\delta$-T-ZELL-REZEPTOR M88 AUS EINEM POLYMYOSITIS-PATIENTEN.....	105
4.1.1	Erkennung von Antigenen durch $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptoren.....	105
4.1.2	M88-T-Zell-vermittelte Polymyositis	105

4.1.3	Erkennung von bakteriellen und humanen Proteinen durch M88	106
4.1.3.1	Bakterielle Antigene von M88	106
4.1.3.2	Humane Antigene von M88	108
4.1.4	Affinität und Spezifität von M88	109
4.1.5	Weitere Antigene von M88	111
4.1.6	Pathogenese durch M88	111
4.1.7	Ausblick	113
4.2	OLIGOKLONALE BANDEN ANTIKÖRPER VON MULTIPLE SKLEROSE PATIENTEN	114
4.2.1	Frühere Strategien der Antigensuche	115
4.2.2	Suche nach den Antigenen der OKB-Antikörper.....	116
4.2.2.1	Test einiger Kandidatenantigene	116
4.2.2.2	Antigensuche mit Proteinarrays.....	117
4.2.2.3	Antigensuche mit 2D-Westernblots.....	119
4.2.2.4	Antigensuche mit Immunpräzipitationen.....	120
4.2.2.5	Vergleich der Ergebnisse aus der Antigensuche.....	120
4.2.3	Affinität und Avidität der OKB-basierten Fab-Fragmente	122
4.2.4	Entstehung der OKB und ihre Rolle in der Immunpathogenese	123
4.2.5	Ausblick	124
4.2.5.1	Kurzfristige Ziele.....	124
4.2.5.2	Längerfristige Ziele	125
5	ANHANG	127
5.1	VEKTORKARTEN	127
5.2	SEQUENZEN	129
5.2.1	$\gamma\delta$ -TZR V γ 1.3 ⁺ V δ 2 ⁺ M88	129
5.2.2	sc-Fv-M88-TZR	129
5.2.3	M88 (HEK293E-Expression).....	130
5.2.4	Chimäres M88-Konstrukt (HEK293E-Expression)	131
5.2.5	EcIF1wt, EcIF1-Mutanten, eIF1AY und mi-MOG.....	131
5.2.6	Weitere Proteinsequenzen der M88-Antigensuche	133
5.2.7	Aminosäuresequenzen der humanen rekombinanten Fab-Fragmente.....	134
5.2.8	Sequenzen der humanen Proteine SF17A, NSP1, NSP1 Δ und eMOG	135
5.2.8.1	SF17A.....	135
5.2.8.2	NSP1.....	136
5.2.8.3	NSP1 Δ – ohne Transmembrandomäne	136
5.2.8.4	eMOG.....	136
5.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	137
5.4	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	139
5.5	TABELLENVERZEICHNIS	140
5.6	LITERATURVERZEICHNIS	141
5.7	VERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION.....	152
5.7.1	Artikel	152
5.7.2	Konferenzbeiträge	152
5.7.3	Poster.....	152
5.7.4	Eingeworbene Drittmittel.....	152
5.8	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	153

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein biologisches Abwehrsystem, das sich über einen langen Zeitraum entwickelt hat, und dessen Hauptaufgabe darin besteht, einen Organismus vor verschiedenen infektiösen Krankheitserregern wie Parasiten, Pilzen, Bakterien und Viren zu schützen. Daneben dient es der Erkennung und Eliminierung von krankhaft veränderten körpereigenen Zellen, wie Krebszellen. Für diesen Zweck setzt es sich aus einem komplexen System aus verschiedensten Organen, Zelltypen und Molekülen zusammen. Für die Unterscheidung von Krankheitserregern, körpereigenen Zellen, entarteten körpereigenen Zellen und harmlosen Stoffen besitzt das Immunsystem eine hohe Diversität und Spezifität. Versagen diese Mechanismen in manchen Fällen, kann es zu Erkrankungen, Allergien oder sogar zur Autoimmunität kommen.

Bei Vertebraten unterteilt man das Immunsystem in zwei Teile, die angeborene und die adaptive Immunität. Die sogenannte „erste Front“ der Abwehr ist die angeborene Immunität. Zu ihr zählen neben einfachen mechanischen und chemischen Mechanismen, wie beispielsweise der natürlichen Barrierefunktion der Haut, auch mehrere zelluläre Komponenten, wie Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Allgemein entzündliche Reaktionen und das Komplementsystem werden ihr ebenfalls zugerechnet. Dieses System erkennt durch nicht variable, keimbahncodierte Rezeptoren allgemein vorkommende Merkmale von Krankheitserregern und kann sehr schnell reagieren. Die adaptive Immunität ist dagegen aufgrund von variablen Rezeptoren der Lymphozyten in der Lage antigenspezifische Immunreaktionen und Gedächtnisbildung auszulösen. Durch ein hochdiverses Repertoire an Rezeptoren ist dieses System somit in der Lage fast jedes beliebige Antigen zu erkennen. Dabei wird nach Antigenpräsentation durch spezifische Zelltypen des Immunsystems ein passender Rezeptor selektioniert und der entsprechende Lymphozyt aktiviert. Diese Zellen teilen sich anschließend und differenzieren zu Effektorzellen, die die Pathogene beseitigen, und antigenspezifischen Gedächtniszellen, die bei einer Reinfektion für eine schnellere und effizientere Immunantwort sorgen (Rogers et al., 2000). Die T-Lymphozyten sind dabei mit ihren membranverankerten Rezeptoren Bestandteil der zellulären Immunantwort, während die B-Lymphozyten hauptsächlich Antikörper produzieren und somit Teil der humoralen Immunantwort sind. Das Zusammenspiel aller Systeme sorgt letztlich in der Regel für die vollständige Eliminierung der Krankheitserreger.

1.2 Das adaptive Immunsystem

1.2.1 T-Lymphozyten

1.2.1.1 Zelluläre Immunreaktion

Die zelluläre Immunantwort spielt sowohl in der Beseitigung intrazellulärer und extrazellulärer Pathogene, als auch bei der Eliminierung entarteter körpereigener Zellen eine wichtige Rolle. Die T-Lymphozyten, kurz T-Zellen, tragen einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR) auf ihrer Zelloberfläche. Man unterscheidet je nach Rezeptortyp die $\alpha\beta$ - von den $\gamma\delta$ -T-Zellen.

Der membrangebundene TZR von $\alpha\beta$ -T-Zellen erkennt kurze prozessierte Peptidfragmente, die von MHC-Proteinen (*major histocompatibility complex* oder *human leucocyte antigen*, HLA) auf körpereigenen Zellen an der Zelloberfläche präsentiert werden (Zinkernagel und Doherty, 1974). Dies wird als MHC-Restriktion der T-Zellen bezeichnet. Es gibt zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen. MHC-Klasse I Moleküle werden auf fast allen Körperzellen exprimiert und präsentieren hauptsächlich endogene intrazelluläre Peptide. Diese können körpereigenen oder bei Infektionen auch viralen oder bakteriellen Ursprungs sein. Dagegen können nur professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ), wie beispielsweise dendritische Zellen (DC), Monozyten, Makrophagen oder B-Lymphozyten, MHC-Klasse II Moleküle exprimieren, und so auch durch Endo- oder Phagozytose aufgenommene extrazelluläre Peptide präsentieren.

Die $\alpha\beta$ -T-Zellen können anhand der Expression weiterer Oberflächenantigene und ihren Aufgaben noch in weitere Subtypen, wie $CD4^+$ Helferzellen, $CD8^+$ zytotoxische Zellen (CTL), regulatorische T-Zellen usw., unterteilt werden. Die $CD4^+$ Helferzellen, die den Korezeptor CD4 tragen, erkennen Antigene, die auf MHC-II-Molekülen von APZ präsentiert werden, und koordinieren die Immunreaktion durch die Ausschüttung regulatorischer Zytokine und die Expression kostimulatorischer Moleküle. Die $CD8^+$ zytotoxischen Zellen dagegen erkennen Antigene, die von MHC-I-Molekülen präsentiert werden, und eliminieren infizierte oder entartete Körperzellen durch zytotoxische Mechanismen, wie die Freisetzung von Perforin und Granzymen (Harty et al., 2000) oder die Expression des Fas-Liganden CD95L (Medana et al., 2000).

Die $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen ihre Antigene dagegen ähnlich wie Antikörper. Das bedeutet sie sind nicht MHC-restringiert und binden ihre Antigene meist direkt, ohne Antigen-präsentierende Zellen. Sie stellen damit eine Art Bindeglied zwischen der klassischen $\alpha\beta$ -T-Zell-Antwort und der Antikörper-vermittelten humoralen Immunantwort dar. Aus diesen Gründen erfüllen sie auch andere Aufgaben innerhalb der Immunabwehr.

1.2.1.2 Der T-Zell-Rezeptor (TZR)

T-Zellen erkennen ihre Antigene durch einen membranverankerten TZR-Komplex. Er besteht aus einem Heterodimer aus α - und β - (Meuer et al., 1983) oder γ - und δ -Kette, wobei über 90 % aller TZR dem $\alpha\beta$ -Subtyp angehören. Die beiden verschiedenen Rezeptortypen sind strukturell grundsätzlich ähnlich aufgebaut, unterscheiden sich aber deutlich in der Antigenerkennung und in ihren Funktionen. Bei beiden bestehen die Rezeptorketten aus einer N-terminalen variablen, antigenspezifischen V-Domäne und einer konstanten C-terminalen Immunglobulin-ähnlichen Domäne, die schließlich in die Membrandomäne übergeht (s. Abb. 1.1). Beide Ketten sind zur Stabilisierung durch extrazelluläre Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die Antigenbindungsstelle wird von den variablen Domänen beider Ketten gebildet und besteht aus den insgesamt sechs CDR-Regionen (*complementarity determining regions*; CDR1, CDR2 und CDR3) (Jores et al., 1990; Katayama et al., 1995). Die $\alpha\beta$ -TZR erkennen ihre Peptidantigene nur, wenn diese an körpereigene MHC-Moleküle gebunden sind (Krogsgaard und Davis, 2005; Rudolph et al., 2006). Die CDR1- und CDR2-Regionen sind vor allem an der Erkennung der MHC-Moleküle beteiligt, während die hypervariablen CDR3-Regionen das gebundene Peptid erkennen und somit im Wesentlichen die Spezifität des Rezeptors festlegen (Garcia und Adams, 2005).

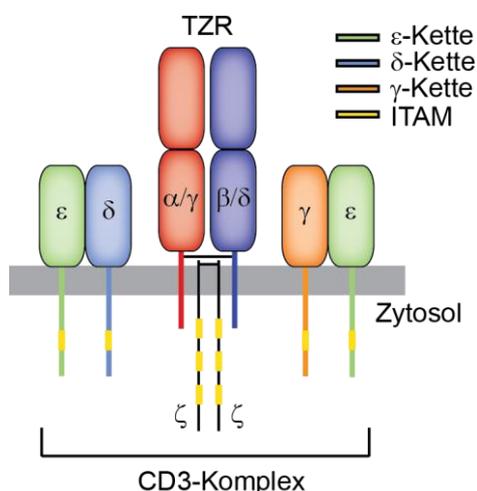


Abb. 1.1: Der T-Zell-Rezeptor-Komplex.

Das rot/blau dargestellte TZR-Heterodimer besteht aus einer α - und β - oder γ - und δ -Kette, die extrazellulär über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die variablen N-Termini sind für die Antigenerkennung verantwortlich, während die konstanten C-Termini in der Membran verankert sind. Im funktionellen Rezeptorkomplex ist das Heterodimer mit sechs weiteren invarianten akzessorischen Ketten, den ϵ , δ , γ und ζ -Ketten, assoziiert, die den CD3-Komplex bilden. Diese Ketten sind durch ihre zytosomatischen ITAM-Domänen nach Antigenkontakt für die Signaltransduktion ins Zellinnere verantwortlich. Der TZR ähnelt einem membranverankerten Fab-Fragment eines Antikörpers (vgl. Abb. 1.3).

Für einen funktionellen TZR und eine Signaltransduktion ins Zellinnere sind noch sechs weitere invariante akzessorische Glykoproteinketten, der CD3-Komplex, nötig. Er besteht aus den Heterodimeren ϵ - δ und ϵ - γ sowie dem Homodimer ζ (Clevers et al., 1988; Irving und Weiss, 1991; Exley et al., 1991; Letourneur und Klausner, 1992). Diese Ketten exprimieren an ihren zytosomatischen Domänen ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), die nach Antigenkontakt von rezeptorständigen Tyrosinkinase phosphoryliert werden, und so das Signal zur Aktivierung der T-Zelle ins Zellinnere weiterleiten (Smith-Garvin

et al., 2009). Die Signalübertragung ist noch nicht bis ins Detail verstanden, aber nach einer Phosphorylierungskaskade wird der Faktor NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) aktiviert (Müller und Rao, 2010), der die Expression mehrerer Gene, unter anderem auch die des Interleukin-2 (IL-2) Locus, steuert. Danach kommt es zur Zellteilung und Differenzierung.

1.2.1.3 Entwicklung und Entstehung der Rezeptordiversität

Die Zellen des adaptiven Immunsystems, T- und B-Zellen, entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Erst später wandern sie in die sekundären lymphatischen Organe, wie Milz und Lymphknoten, um ihre Funktionen auszuüben.

Die T-Zellen reifen aus Lymphoblasten im Knochenmark heran, den größten Teil ihrer Entwicklung durchlaufen sie allerdings im Thymus.

Die Generierung eines hochvariablen Rezeptorrepertoires ist für die Immunabwehr von großer Bedeutung, um auf möglichst viele verschiedenen Pathogene reagieren zu können. Daher hat sich der komplexe genetische Mechanismus der somatischen DNA-Rekombination entwickelt. Damit können theoretisch bis zu 10^{15} verschiedene $\alpha\beta$ -TZR und 10^{20} verschiedene $\gamma\delta$ -TZR generiert werden (Davis und Bjorkman, 1988; Carding und Egan, 2002; Turner et al., 2006). Die zufällige Rekombination der TZR-Gene, auch als kombinatorische Diversität bezeichnet, findet im Thymus statt und wird von dem Enzym VDJ-Rekombinase (*recombination activating genes*, RAG) katalysiert. Die α - und γ -Ketten bestehen aus variablen V-, *joining* J- und konstanten C-Segmenten, während die β - und δ -Ketten noch ein zusätzliches *diversity* D-Segment besitzen (s. Abb. 1.2a) (Wilson et al., 1988; Arden et al., 1995; Lefranc, 2001). Die CDR1- und CDR2-Regionen liegen in den keimbahncodierten Segmenten, während sich die CDR3-Region am Übergang zwischen den Segmenten befindet, und durch das Einfügen oder Entfernen zufälliger P (palindromisch)- und N-Nukleotide, die sogenannte junktionale Diversität, hochvariabel ist (s. Abb. 1.2b). Diese Region ist später hauptsächlich für die Antigenbindung verantwortlich (Davis et al., 1998). Bei den $\gamma\delta$ -T-Zellen vergrößert eine höhere Flexibilität bei der Verknüpfung die Variabilität weiter. So können zum Beispiel mehrere D-Segmente in die δ -Kette eingebaut werden, was die CDR3 δ -Region hochheterogen macht. Die neu kombinierten VJ- bzw. VDJ-Segmente werden erst nach der Transkription durch Spleißprozesse mit einem C-Segment verknüpft. Nach einer produktiven Rezeptorumlagerung mit Oberflächenexpression eines funktionellen TZR kommt es im Thymus zur positiven und negativen Selektion geeigneter T-Zellen. Durch die positive Selektion wird die Bindung an körpereigene MHC-Peptid-Komplexe gewährleistet (Klein et al., 2009), während stark autoreaktive Zellen durch die negative Selektion eliminiert werden (Sprent und Kishimoto, 2002; Starr et al., 2003). Dadurch werden bis zu 95 % der Vorläuferzellen aus dem Repertoire entfernt. Die Entwicklung der T-Zellen verläuft dabei von der Pro-T-Zelle über die Prä-T-Zelle

und unreifen T-Zelle zur reifen naiven T-Zelle, die schließlich in die Peripherie auswandert, um auf ihr Antigen zu treffen.

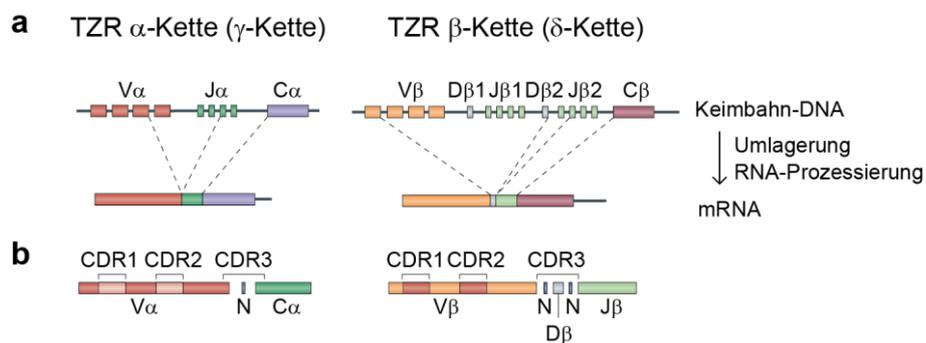


Abb. 1.2: T-Zell-Rezeptor Rearrangement.

(a) Prinzip der somatischen DNA-Rekombination bei der T-Zell-Entwicklung. Im Thymus kommt es während der Entwicklung zur zufälligen Auswahl und Umlagerung von Gensegmenten. Dabei werden für die α - und γ -Kette jeweils ein V- mit einem J-Segment, und für die β - und δ -Kette jeweils zuerst ein D- mit einem J- und anschließend mit einem V-Segment verknüpft. Nach der Transkription werden die Elemente durch Spleißprozesse mit einem C-Segment verbunden. (b) Die CDR1- und CDR2-Regionen liegen in den keimbahncodierten Segmenten, während die hochvariable CDR3-Region direkt am V(D)J-Übergang liegt. (Verändert nach Turner et al., 2006).

1.2.1.4 $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Als Untergruppe exprimieren 5-10 % der T-Zellen einen $\gamma\delta$ -TZR (Brenner et al., 1986) auf ihrer Zelloberfläche und sind $CD4^-$ sowie $CD8^-$. Die Struktur ihrer Rezeptoren ähnelt zwar der von $\alpha\beta$ -T-Zellen (Allison et al., 2001), sie erkennen ihre Antigene aber ähnlich wie Antikörper direkt, und ähneln auch in ihrer Gesamtkonformation eher Antikörpern (Allison und Garboczi, 2002; Chien und Königshofer, 2007). So binden sie meist unprozessierte Antigene, die nicht von klassischen MHC-Molekülen präsentiert werden. Sie haben allerdings eine ähnlich niedrige Affinität wie $\alpha\beta$ -T-Zellen, mit Dissoziationskonstanten von selten unter 10^{-7} M (Crowley et al., 2000; Scotet et al., 2005; Stone et al., 2009). Zum Vergleich liegen die Dissoziationskonstanten von Antikörpern bei 10^{-9} - 10^{-12} M. Dies erschwert den Einsatz biochemischer, affinitätsbasierter Methoden bei der Antigensuche. Daher ist bis jetzt nur wenig über die Antigene und die molekularen Details der Bindung von $\gamma\delta$ -TZR bekannt. Durch ihre speziellen Antigenerkennungseigenschaften und ihre anatomische Verteilung erfüllen sie auch in der Immunabwehr andere Funktionen (Carding und Egan, 2002). Die $\gamma\delta$ -T-Zellen stehen als „*innate like*“ Lymphozyten zwischen angeborener und adaptiver Immunität (Morita et al., 2000; Shen et al., 2002; Holtmeier und Kabelitz, 2005; Born et al., 2006; Beetz et al., 2008). So besitzen viele Subpopulationen einerseits ein eingeschränktes Rezeptorrepertoire und sind gegen allgemein vorkommende Antigene und Erreger gerichtet, andererseits lagern sie ihre Rezeptorgene um und sind zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses fähig.

Mit 1-5 % stellen die $\gamma\delta$ -T-Zellen nur einen sehr kleinen Teil der Lymphozyten im Blut und den lymphatischen Organen dar. Sie kommen dagegen sehr häufig in Epithelien, wie der Haut und den Schleimhäuten der Lunge, des Darms und des Reproduktionstraktes vor. Je nach Gewebe existieren verschiedene Subpopulationen von $\gamma\delta$ -T-Zellen, die vermutlich unterschiedliche Aufgaben haben (Carding und Egan, 2002; Chien und Königshofer, 2007).

Bei der immunologischen Überwachung der Körperoberflächen stellen sie eine „*first line of defense*“ dar und können sehr schnell auf Pathogene reagieren.

$\gamma\delta$ -T-Zellen können zudem ein weites Spektrum an verschiedenen Antigenen und sogar post-translationale Modifikationen wahrnehmen. So können sie beispielsweise Proteine, Lipide, Glykolipide, Phospholiganden und niedermolekulare Stoffe körpereigenen oder mikrobiellen Ursprungs erkennen (Chien und Königshofer, 2007; Champagne, 2011).

Die Effektormechanismen der $\gamma\delta$ -T-Zellen sind sehr vielfältig. Sie reichen vom Abtöten infizierter oder transformierter Zellen durch die Sekretion von Granzymen und Perforin oder durch den Fas-Liganden bis hin zur Sezernierung von Zytokinen zur Immunregulation (Girardi, 2006; Bonneville et al., 2010).

1.2.2 B-Lymphozyten

1.2.2.1 Humorale Immunreaktion

B-Lymphozyten, kurz B-Zellen, sind ebenso wie T-Zellen ein wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Zwei der wichtigsten Aufgaben der B-Zellen sind die Antigenpräsentation an MHC-II-Molekülen gegenüber anderen Immunzellen sowie die Antikörper-Produktion innerhalb der humoralen Immunantwort. Nach Antigenkontakt kommt es zur Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors (BZR) auf der Zelloberfläche von naiven B-Zellen und zur Aktivierung. Durch zusätzliche kostimulatorische Signale von $CD4^+$ T-Helferzellen proliferieren und differenzieren die B-Zellen schließlich. Die Plasmazellen produzieren nach einem weiteren Reifungsprozess im Keimzentrum der lymphatischen Organe große Mengen an spezifischen, hochaffinen Immunglobulinen (Ig, Antikörper), während langlebige Plasmazellen zurück ins Knochenmark wandern und zusammen mit den B-Gedächtniszellen zum immunologischen Gedächtnis beitragen. Die humorale Antikörper-vermittelte Immunantwort richtet sich vor allem gegen extrazelluläre Pathogene und Toxine.

1.2.2.2 Immunglobuline

Man unterscheidet fünf verschiedene Immunglobulin-Klassen: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE, die sich in ihrem Aufbau, ihrer Lokalisation und ihren Effektorfunktionen voneinander unterscheiden. Ein IgG-Immunglobulin, kurz IgG, besteht aus insgesamt vier Polypeptidketten,

zwei schweren Ketten (H-Kette, *heavy*) mit ca. 50 kDa und zwei leichten Ketten (L-Kette, *light*) mit ca. 25 kDa (s. Abb. 1.3a). Die Ketten bestehen aus mehreren ca. 110 Aminosäuren (As) langen Immunglobulindomänen. Die L-Kette besitzt zwei Ig-Domänen, V_L und C_L , und die H-Kette vier, V_H , C_{H1} , C_{H2} , und C_{H3} . Die N-terminalen Domänen bilden jeweils den variablen V-Bereich der Antigenbindungsstelle, während die C-terminalen Domänen den konstanten C-Bereich bilden, der die Effektorfunktionen übernimmt. Die einzelnen Ketten bilden intra- und intermolekulare Disulfidbrücken für die Stabilisierung des Moleküls. Die Region der Disulfidbrücken zwischen den beiden H-Ketten wird als *Hinge*- oder Gelenk-Region bezeichnet. Zudem besitzt jedes IgG-Molekül eine konservierte Glykosylierungsstelle am Asparagin 297.

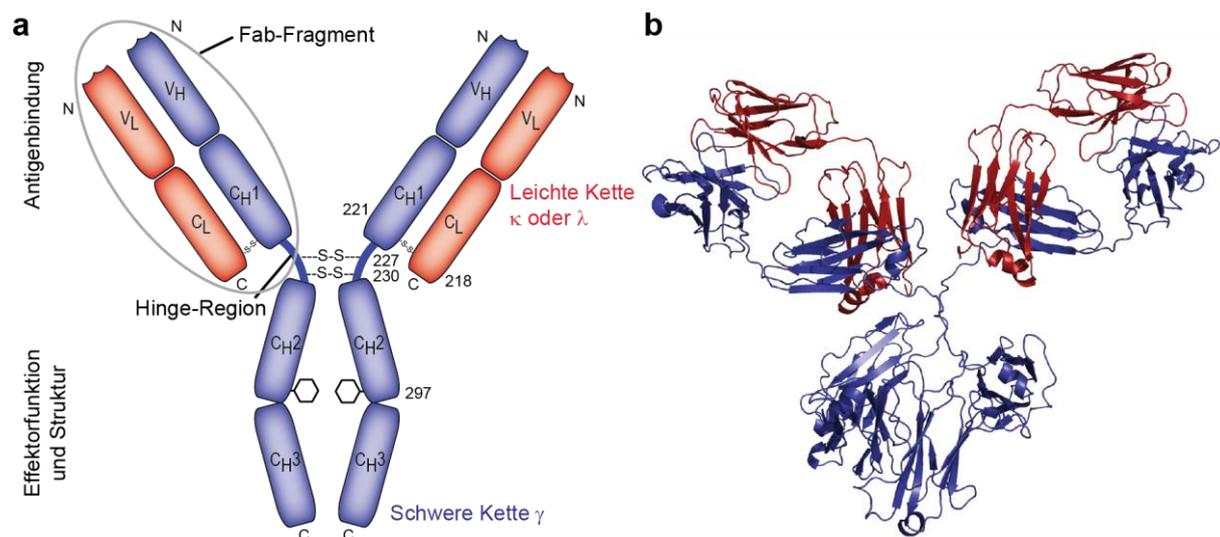


Abb. 1.3: Aufbau eines IgG-Antikörpers.

(a) Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls. Es besteht aus insgesamt vier Polypeptidketten, zwei leichten L-Ketten (rot) und zwei schweren H-Ketten (blau), die über Disulfidbrücken verbunden sind. Die Stellen der Disulfidbrücken innerhalb der Aminosäuresequenz sind angegeben. Jede Kette ist aus Ig-Domänen aufgebaut. Die L-Kette besteht aus V_L und C_L und die H-Kette aus V_H , C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} . V_L und V_H bilden zusammen die Antigenbindungsstelle, während die konstanten Regionen die Effektorfunktionen übernehmen. Die Einheit aus L-Kette und den V_H - und C_{H1} -Domänen der H-Kette wird als Fab-Fragment bezeichnet und ähnelt einem membrangebundenen TZR in Aufbau und Struktur (vgl. Abb. 1.1). (b) Darstellung der Faltung eines IgG-Moleküls. Jede Ig-Domäne bildet ein stabiles β -barrel aus sieben antiparallelen β -Faltblättern. Die exponierten Schleifen bilden in den variablen Domänen jeweils die drei CDR-Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) der Antigenbindungsstelle. (Originalstruktur verändert nach Harris et al., 1998 PDB 1IGY).

Nach Papainspaltung entstehen zwei Fab-Fragmente, jeweils bestehend aus der L-Kette und den V_H - und C_{H1} -Domänen der H-Kette. Die Fab-Fragmente ähneln in ihrem Aufbau und ihrer Struktur einem membrangebundenen TZR (vgl. Abb. 1.1). Sie sind noch zur Antigenbindung fähig, während das restliche Fc-Fragment, das nur aus konstanten Regionen der H-Kette besteht, dazu nicht mehr in der Lage ist.

In Abb. 1.3b ist die Faltung eines IgG-Moleküls dargestellt. Jede einzelne Ig-Domäne besteht aus einem Gerüst aus sieben antiparallelen β -Faltblättern, die ein stabiles β -barrel bilden. Die

flexiblen und exponierten Verbindungsschleifen, die jeweils aus dem Gerüst der V_L - und V_H -Domänen ragen, bilden die Antigenbindungsstelle aus den drei CDR-Regionen CDR1, CDR2 und CDR3. Die komplette Antigenbindungsstelle wird somit aus insgesamt sechs CDR-Schleifen gebildet, wobei auch hier die CDR3-Region die höchste Variabilität aufweist.

1.2.2.3 Entwicklung und Entstehung der Rezeptordiversität

Die Entwicklung der B-Zellen beginnt aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (s. Abb. 1.4). Während der komplexen Entwicklung entstehen B-Zellen mit einem Repertoire von bis zu 10^{11} verschiedenen Antigenspezifitäten. Der Mechanismus ist dabei sehr ähnlich zu dem der T-Zellen (s. Abschnitt 1.2.1.3). Die vererbten Gensegmente im Ig-Lokus werden zuerst durch somatische DNA-Rekombination zufällig neu verknüpft. Es gibt eine H-Kette und zwei verschiedene L-Ketten, kappa κ und lambda λ , wobei immer eine H- mit einer L-Kette paart (s. Abb. 1.3).

Die Pro-B-Zelle beginnt zunächst mit der Umlagerung der H-Kette, die aus V-, D- und J-Segmenten besteht. Im Stadium der Prä-B-Zelle folgen die Umlagerung der L-Kette und eine Verknüpfung der V- und J-Segmente. Wie bei der T-Zell-Entwicklung wird die Variabilität bei der Verknüpfung weiter durch den Ein- oder Abbau von P- und N-Nukleotiden im Bereich der hypervariablen CDR3-Region erhöht. Bei erfolgreicher Genumlagerung ist die Prä-B-Zelle zur Expression eines funktionellen BZR, einer Art membranständigem IgM-Molekül (mIgM), in der Lage und wird als unreife naive B-Zelle bezeichnet. Potentiell autoreaktive B-Zellen werden im Anschluss noch im Knochenmark durch klonale Deletion durch Apoptose oder Anergie aus dem Repertoire entfernt. Durch weitere Umlagerung der L-Ketten-Gene (*receptor editing*) und einer Änderung der Antigenspezifität können die B-Zellen der negativen Selektion unter Umständen noch entgehen. Nach der negativen Selektion exprimieren die reifen B-Zellen mIgM und mIgD auf ihrer Zelloberfläche und wandern über den Blutkreislauf in die Peripherie aus. Nach Antigenkontakt wird die B-Zelle aktiviert und wandert in die Keimzentren von Lymphknoten oder Milz. Dort kommt es zur Zellteilung und zu einem weiteren Mechanismus, der die Diversität des Ig-Repertoires weiter erhöht: der Affinitätsreifung durch somatische Hypermutation (SHM). Dabei werden nach Antigenkontakt durch das Enzym AID (*activation-induced cytidine deaminase*) Punktmutationen in die DNA-Sequenz der B-Zellen eingeführt (Muramatsu et al., 2000; Odegard und Schatz, 2006). Führt die Mutation zu einem BZR höherer Affinität, wird diese B-Zelle positiv selektioniert. Viele andere B-Zellen sterben dagegen im Keimzentrum ab. Nach der positiven Selektion beginnen die hochaffinen B-Zellen zu proliferieren und differenzieren im Verlauf zu Antikörper-produzierenden Plasmablasten sowie B-Gedächtniszellen. Plasmazellen können nach Klassenwechsel (*class switch recombination*, CSR) Antikörper (Ak) verschiedenster Klassen und Funktionen, wie

IgM (Gensegment $c\mu$), IgD ($c\delta$), IgG ($c\gamma 1/2/3/4$), IgA ($c\alpha 1/2$) oder IgE ($c\epsilon$) in großen Mengen produzieren. Langlebige Plasmazellen wandern zurück ins Knochenmark und produzieren dort dauerhaft kleine Mengen an hochaffinen Antikörpern. Sie bilden zusammen mit den B-Gedächtniszellen das humorale immunologische Gedächtnis.

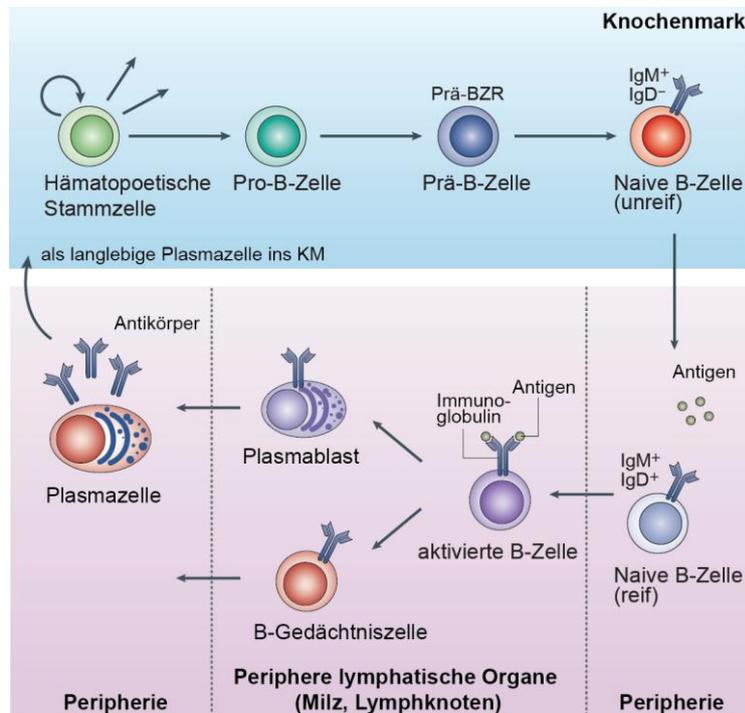


Abb. 1.4: B-Zell-Entwicklung.

Aus einer hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark entwickelt sich über die Stadien der Pro- und Prä-B-Zelle die unreife B-Zelle, die nach durchlaufener somatischer DNA-Rekombination der H- und L-Kette einen funktionellen membranständigen BZR ($mIgM^+$) exprimiert. Diese Zellen wandern nach negativer Selektion auf Autoantigene in die Peripherie und treffen dort eventuell auf ein Antigen. Die Aktivierung führt zur Wanderung in die Keimzentren und dort kommt es durch SHM zur Affinitätsreifung. Positiv auf das Antigen selektierte Zellen proliferieren und differenzieren zu Plasma- und Gedächtniszellen. Langlebige Plasmazellen wandern schließlich zurück ins Knochenmark und bilden mit den B-Gedächtniszellen ein immunologisches Gedächtnis. (Verändert nach Shapiro-Shelef und Calame, 2005; Klein und Dalla-Favera, 2008).

Viele der in der allgemeinen Einleitung verwendeten Inhalte basieren auf Murphy et al., 2008 und Murphy, 2012.

1.3 Autoimmunerkrankungen

Bei Autoimmunerkrankungen kommt es zu einer Reaktion des Immunsystems gegen körpereigenes Gewebe, ohne dass nachweislich eine Infektion mit Pathogenen zugrunde liegt. Die auslösenden Ursachen und Mechanismen des Verlustes der Selbsttoleranz in bestimmten Individuen sind bis heute weitgehend unbekannt, man vermutet allerdings eine ganze Reihe von Faktoren, die eine Entstehung begünstigen. Dazu zählen neben der genetischen Prädisposition auch Umweltfaktoren sowie die mikrobielle Umgebung.

Wie bereits beschrieben, gibt es bei gesunden Individuen mehrere Kontrollmechanismen, die potentiell autoreaktive Zellen aus dem natürlichen Repertoire entfernen. Durch die hohe Variabilität der Rezeptoren des adaptiven Immunsystems kommt es aber immer wieder zu Reaktivitäten gegen körpereigene Strukturen. Potentiell autoreaktive Lymphozyten werden normalerweise durch Mechanismen, wie die negative Selektion oder die periphere Toleranz durch Anergie, eliminiert. Funktionieren diese Mechanismen nicht oder sind sie ineffizient, kann es

zu Autoimmunerkrankungen der verschiedensten Körperstrukturen und Gewebe kommen. Bekannte Beispiele dafür sind Diabetes mellitus Typ I, rheumatoide Arthritis (RA), Psoriasis, systemischer Lupus erythematoses (SLE), Polymyositis (PM) oder Multiple Sklerose (MS).

1.3.1 Die Rolle von T- und B-Lymphozyten bei Autoimmunerkrankungen

Die Autoimmunreaktionen können von T- oder B-Zellen dominiert sein, meist sind aber mehrere Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligt. Beim SLE, einer systemischen Autoimmunerkrankung, die zur Gruppe der Kollagenosen zählt, überwiegen hauptsächlich B-Zellen, die Autoantikörper gegen verschiedene Zellkernbestandteile, wie doppelsträngige DNA, produzieren (Koffler et al., 1967; Mok und Lau, 2003; Rahman und Isenberg, 2008). Bei der Psoriasis, einer autoimmunen, chronischen Entzündung der Haut, kommt es dagegen vor allem durch $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu Schädigungen (Prinz, 2003). Und bei der RA (Firestein, 2003), einer Autoimmunerkrankung der Gelenke, sind, ebenso wie beim Diabetes mellitus Typ I (Grieco et al., 2011), mehrere Bestandteile des angeborenen und adaptiven Immunsystems an der Pathogenese beteiligt. $\gamma\delta$ -T-Zellen wird ebenfalls eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen (Hayday und Geng, 1997), wie beispielsweise der MS (Wucherpfennig et al., 1992; Blink und Miller, 2009), dem SLE (Robak et al., 2001) und dem Diabetes mellitus Typ I (Zhang et al., 2010) zugesprochen. Bei den meisten Autoimmunerkrankungen treten nachweislich klonal expandierte Populationen von Lymphozyten auf. Diese sind vermutlich an der Pathogenese beteiligt, indem sie spezifische körpereigene Autoantigene erkennen und angreifen. Für das Verständnis der Pathogenese und zur Entwicklung von spezifischen Therapien ist es daher von bedeutender medizinischer Relevanz diese zugrundeliegenden Autoantigene zu kennen. Wie bereits beschrieben, erkennen $\gamma\delta$ -T-Zellen ihre Antigene ähnlich wie Antikörper, das heißt meist direkt, ohne Antigen-präsentierende Zellen und ohne MHC-Restriktion. Aufgrund der Ähnlichkeiten bei der Antigenerkennung zwischen $\gamma\delta$ -T-Zellen und Antikörpern wurde sowohl die Antigenspezifität von putativ autoaggressiven $\gamma\delta$ -T-Zellen in der PM als auch von B-Zellen und Antikörpern in der MS näher untersucht.

1.3.2 Idiopathische inflammatorische Myopathien

Idiopathische inflammatorische Myopathien stellen eine seltene und heterogene Gruppe unter den Autoimmunerkrankungen dar, bei der die Skelettmuskulatur von akuten oder chronischen Entzündungen betroffen ist (Hohlfeld und Engel, 1994; Dalakas und Hohlfeld, 2003; Dalakas, 2004). Die Inzidenz liegt bei ca. 1 pro 100.000 Einwohnern. Die Myopathien können weiter in die Dermatomyositis (DM), die Polymyositis (PM) und die „*inclusion body myositis*“ (IBM) unterteilt werden. Bei der PM und IBM finden sich vor allem Infiltrate von $CD8^+$ T-

Zellen, aber auch Makrophagen und B-Zellen, die die Muskelzellen angreifen und zerstören. Bei der DM liegen dagegen hauptsächlich B-Zell-Infiltrate und zusätzliche Hautveränderungen vor. Die IBM unterscheidet sich von der PM durch intrazelluläre Einschlusskörperchen (Hohlfeld und Dornmair, 2007; Dalakas, 2010, 2011a, 2011b, 2012). Im Gegensatz zur IBM sprechen die DM und PM gut auf Immunsuppressiva an.

1.3.2.1 Polymyositis

Als PM wird eine heterogene Gruppe von systemisch entzündlichen Erkrankungen der Skelettmuskulatur bezeichnet. Sie tritt meist ab dem 2. Lebensjahrzehnt und gehäuft bei Frauen mittleren Alters auf. Die 1975 von Bohan und Peter aufgestellten Richtlinien umfassen die proximale Muskelschwäche, Muskelbiopsie mit Entzündungszeichen, Erhöhung der Muskelenzymwerte im Serum und Myopathiemuster im Elektromyogramm. Bei ca. 20 % der Myositis-Patienten lassen sich Autoantikörper gegen zytoplasmatische und nukleäre Bestandteile nachweisen (Dalakas und Hohlfeld, 2003; Dalakas, 2010). Die Ursachen der PM sind bis heute nicht aufgeklärt, es werden aber neben genetischen Komponenten, wie bestimmten HLA-Typen auch Umwelteinflüsse, wie Infektionen, vermutet.

Man nimmt an, dass es sich bei der PM um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung handelt, auch wenn die zugrundeliegenden spezifischen Autoantigene bis heute nicht identifiziert wurden. In Biopsien lassen sich meist fokale, oligoklonal expandierte $CD8^+$ $\alpha\beta$ -T-Zell-Infiltrate nachweisen, die die Muskelzellen direkt kontaktieren und angreifen (Dalakas, 2004). Bei PM-Patienten ist im Gegensatz zu gesunden Individuen die MHC-I Expression auf Muskelzellen, durch Infektionen oder Entzündungsmechanismen, stark hochreguliert. Daher wird vermutet, dass die Lymphozyten ein auf MHC-I-Molekülen präsentiertes Autoantigen erkennen (Hohlfeld und Engel, 1994; Dalakas und Hohlfeld, 2003; Dalakas, 2011a, 2011b). Oligoklonal expandierten T-Zell-Populationen im Muskelgewebe (Bender et al., 1995; Hofbauer et al., 2003) deuten zudem auf eine Selektion und spezifische Aktivierung durch ein lokales Autoantigen und somit auf die pathogene Relevanz dieser T-Zellen hin.

1.3.2.2 Polymyositis durch einen autoaggressiven $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor

1991 entdeckten Hohlfeld et al. bei einem 69-jährigen Mann eine seltene Form der PM, die durch einen putativ autoreaktiven pathogenen $\gamma\delta$ -TZR, im Folgenden als M88 bezeichnet, vermittelt wurde. Die immunhistochemischen Färbungen ergaben dabei ein ähnliches Bild wie bei der $\alpha\beta$ -T-Zell-vermittelten Myositis. Die $CD3^+CD4^-CD8^-$ $\gamma\delta$ -T-Zellen drangen tief in einzelne Muskelfasern ein und zerstörten sie (s. Abb. 1.5). Dieser Fall ist bis heute einzigartig und das zugrundeliegende Autoantigen unbekannt.

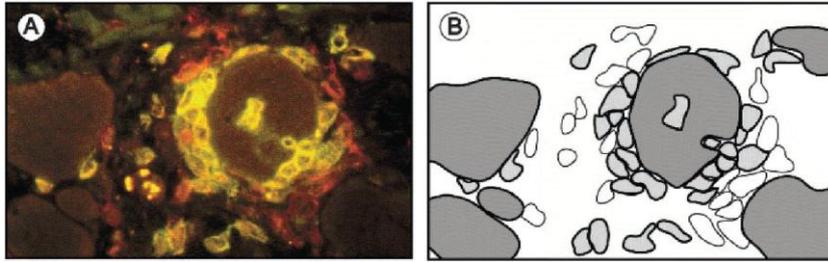


Abb. 1.5: Immunhistochemische Färbung einer Muskelbiopsie des $\gamma\delta$ -PM-Patienten.

(a) Immunfluoreszenzfärbung eines Muskelquerschnitts. CD3-Färbung mit α -CD3-Rhodamin (rot) und V δ 2-Färbung mit α -V δ 2-FITC (grün). Die doppelt positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen erscheinen gelb, während $\alpha\beta$ -T-Zellen rot sind. (b) Schemazeichnung von (a). Die Muskelzellen sind dunkelgrau gezeichnet, die hellgrauen Zellen stellen $\gamma\delta$ -T-Zellen dar. Einzelne $\gamma\delta$ -T-Zellen umgeben eine Muskelfaser und dringen tief in sie ein, während die weiß gezeichneten $\alpha\beta$ -T-Zellen vermutlich nur *Bystander*-Zellen darstellen. (Verändert nach Pluschke et al., 1992; Wiendl et al., 2002).

Im Jahr 1992 wurden die Ketten von M88 als V γ 1.3-J γ 1-C γ 1⁺ und V δ 2-J δ 2-C δ 2⁺ identifiziert (Pluschke et al., 1992). Aufgrund einer monoklonalen Expansion im Vergleich zu anderen Autoimmunerkrankungen, bei denen die T-Zellen oligo- oder polyklonal expandiert sind, war eine Identifizierung der Rezeptorketten ohne aufwendige „*single-cell*“-Techniken (Dornmair et al., 2003; Seitz et al., 2006; Kim et al., 2012) aus dem vorhandenen Biopsiematerial möglich. Es gelang die Sequenz des M88-Rezeptors zu rekonstruieren und diesen auf der Zelloberfläche von murinen 58 $\alpha\beta$ ⁻ T-Hybridomzellen sowie als sezernierten löslichen „*single-chain-Fv*“-Rezeptor in COS-7-Zellen zu exprimieren (Wiendl et al., 2002; Dornmair et al., 2004). Die M88-Hybridomzellen sind nach Aktivierung zur IL-2 Sekretion fähig, daher ergab sich eine Möglichkeit nach den Antigenen von M88 zu suchen. Aufgrund der niedrigen Affinität von TZR für ihre Antigene können biochemische, affinitätsbasierte Methoden nicht angewendet werden. $\gamma\delta$ -TZR erkennen ihre Antigene aber ähnlich wie Antikörper direkt und ohne MHC-Restriktion. Dadurch können die M88-Hybridomzellen *in vitro*, durch an Oberflächen adsorbierte Antigene, stimuliert werden und das abgegebene IL-2 kann anschließend gemessen werden. Schließlich wurde gezeigt, dass M88 durch lösliche zytosolische Proteinfractionen von humanen Muskel- und TE671-Zellextrakten in Abwesenheit von Antigenpräsentierenden Zellen spezifisch aktiviert werden kann. Intakte Zellen stimulierten M88 hingegen nicht. Zudem werden nur Konformationsantigene mit einer Peptidkomponente von M88 erkannt. Mutagenesestudien der CDR-Regionen beider Rezeptorketten von M88 zeigten zusätzlich, dass die Aktivierung CDR3-abhängig ist (Wiendl et al., 2002). Dornmair et al. demonstrierten 2004 durch Chromatographiestudien, dass der Rezeptor wahrscheinlich mehrere strukturell und funktionell nicht verwandte Proteinantigene erkennt, die in verschiedenen Spezies, von humanen Muskelzellen bis hin zu Bakterien, vorkommen können. Dies spricht für eine allgemein aktivierende Konformationsstruktur, die auf mehreren Proteinen vorkommen könnte. Eine genaue Identifizierung der Antigene blieb allerdings erfolglos. Zudem gelang es nicht, M88 im Zytosol einer Zelllinie zu exprimieren oder transgene Mäuse herzustellen.

len, da der Rezeptor wahrscheinlich intrazellulär an essentielle Proteine bindet und dadurch für die Zellen toxisch ist. Einige Versuche aus der Arbeitsgruppe und aus der vorangegangenen Diplomarbeit (Bruder, 2009) deuteten auf humane und bakterielle Proteine des Translationsapparates als mögliche Antigene hin. Darunter waren zum Beispiel mehrere Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (AA-RS) und der bakterielle Translationsinitiationsfaktor EcIF1. Darauf aufbauend wurde die Antigenpezifität des pathogenen $\gamma\delta$ -TZR M88 in der vorliegenden Arbeit weiter analysiert.

1.3.3 Multiple Sklerose

Die MS (Noseworthy et al., 2000) tritt in Deutschland mit einer Inzidenz von 149,1 pro 100.000 Einwohnern auf (Hein und Hopfermüller, 2000) und ist damit eine der häufigsten entzündlichen und degenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS). Frauen sind ungefähr doppelt so häufig betroffen wie Männer. Der Krankheitsverlauf kann zwischen verschiedenen Individuen stark variieren (Lucchinetti et al., 2000) und verändert sich während der Erkrankung meist von der schubförmig-remittierenden MS, bei der sich die Symptome nach den einzelnen Schüben meist wieder zurückbilden, zur sekundär-progredienten MS, mit dauerhaften Beeinträchtigungen (Compston und Coles, 2008; Miller, 2012). Daneben gibt es noch die primär-progrediente MS mit schleichendem Krankheitsverlauf ohne Schübe. Die MS gilt derzeit als nicht heilbar, es stehen aber zahlreiche immunsuppressive Medikamente zur Verfügung, die den Verlauf günstig beeinflussen können.

Die Ursachen der MS sind bis heute nicht bekannt. Es werden neben genetischen Faktoren, wie bestimmten HLA-Genen und einem erhöhten Risiko für Verwandte (Dyment et al., 2004; Barcellos et al., 2006; Fugger et al., 2009; Baranzini et al., 2010), auch Umwelteinflüsse (Ebers, 2008) und sogar Infektionen diskutiert (Cepok et al., 2005; Serafini et al., 2007; Willis et al., 2009). So sind zum Beispiel fast alle MS-Patienten Epstein-Barr-Virus (EBV) seropositiv (Pohl, 2009) und auch weitere Herpesviren (Martin, 1981; Friedman et al., 1999) und das Bakterium *Chlamydia pneumoniae* (Sriram et al., 1999; Derfuss et al., 2001) stehen im Verdacht an der Entstehung beteiligt zu sein. Dabei könnte der Mechanismus der molekularen Mimikry zwischen Pathogenen und körpereigenen Epitopen, die dann erst sekundär als Autoantigene angegriffen werden, eine Rolle spielen (Oldstone, 1987; Sospedra und Martin, 2006). So konnten in der MS bereits einige zwischen viralen Peptiden und Myelinbestandteilen kreuzreaktive T-Zellen identifiziert werden (Wucherpfennig und Strominger, 1995; Tejada-Simon et al., 2003; Holmøy et al., 2004; Markovic-Plese et al., 2005; Lünemann et al., 2008). Wahrscheinlich ist an der Manifestation der MS eine Kombination aus mehreren Faktoren beteiligt (Sospedra und Martin, 2005).

Pathologisch zeichnet sich die MS durch eine Infiltrierung des Gehirns mit Immunzellen, wie Makrophagen, T-Zellen (Booss et al., 1983; Wucherpfennig et al., 1992; Babbe et al., 2000) und B-Zellen (Prineas und Wright, 1978), durch eine geschädigte Blut-Hirn-Schranke (*blood brain barrier*, BBB) aus. Durch die Bildung von Entzündungsherden und Läsionen kommt es zur Schädigung von Neuronen und zur Demyelinisierung und Degenerierung von Axonen (Brück und Stadelmann, 2003). Es wird vermutet, dass vor allem T-Zellen und Makrophagen durch zytotoxische Mechanismen das Gewebe schädigen. Die Immunpathogenese ist allerdings sehr komplex, heterogen und verläuft über mehrere Stadien (Lassmann et al., 2007). Während sich frühere Studien meist auf T-Zellen bezogen, wird mittlerweile auch den B-Zellen eine größere Rolle bei der MS-Pathogenese zugesprochen (Meinl et al., 2006; von Büdingen et al., 2011; Disanto et al., 2012). So sind im Liquor cerebrospinalis (*cerebrospinal fluid*, CSF) von Patienten affinitätsgereifte und klonal expandierte B-Zellen (Qin et al., 1998; Owens et al., 2003; Ritchie et al., 2004) und ein erhöhter Antikörper-Gehalt nachweisbar. Die Antikörper lassen sich als sogenannte oligoklonale Banden (OKB) Antikörper darstellen. Außerdem finden sich im Gehirn in den Läsionen Antikörper-produzierende B-Zellen (Prineas und Wright, 1978; Obermeier et al., 2011). Das derzeit einzige Zell-spezifisch wirksame Medikament, der monoklonale Anti-CD20-Antikörper, führt zudem zur Depletion der B-Zellen und verringert bei Patienten die Schubrate (Hauser et al., 2008). Dies alles spricht für eine Beteiligung der humoralen Immunantwort bei der MS-Pathogenese.

1.3.3.1 Liquordiagnostik und oligoklonale Banden

Für die Diagnose MS müssen mehrere klinische Kriterien erfüllt sein (Polman et al., 2005; Polman et al., 2011). So spielen die Ergebnisse aus Magnetresonanztomographie (MRT), neurophysiologischen Untersuchungen und Liquordiagnostik eine wichtige Rolle. Neben der Darstellung der zeitlichen und räumlichen Dissemination von Läsionen im ZNS, ist der Nachweis von OKB-Antikörpern im Liquor ein wichtiger Schritt zur Diagnose (Kabat et al., 1942; Kabat et al., 1948; Andersson et al., 1994) und Prognose (Awad et al., 2010). Durch isoelektrische Fokussierung (IEF) können einzelne IgG-Banden vor einem Hintergrund an polyklonalen Antikörpern im Liquor von Patienten nachgewiesen werden (s. Abb. 1.6) (Kjellin und Vesterberg, 1974). Bei ca. 95 % aller MS-Patienten tritt solch ein spezifisches Bandenmuster auf (Link und Huang, 2006). Die Antikörper werden intrathekal, das heißt innerhalb des ZNS, von den Liquor-B-Zellen produziert (Obermeier et al., 2008). Sie stellen meist oligoklonale affinitätsgereifte IgG1-Antikörper (Vandvik et al., 1976) limitierter Heterogenität dar (Lowenthal et al., 1960), die wahrscheinlich von einer Antigen-induzierten Immunantwort abstammen.

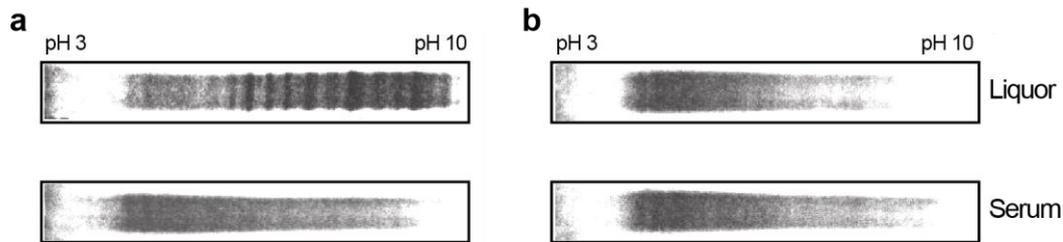


Abb. 1.6: Nachweis oligoklonaler Banden Antikörper bei der MS-Diagnostik.

Vergleich von Liquor und Serum von einem MS-Patienten (a) und einer Person ohne MS (b). Der Nachweis erfolgt über IEF und anschließender Immunfixierung mit Anti-IgG-Serum. Der IgG-Gehalt wird vor der Durchführung auf die gleiche Konzentration eingestellt. Bei (a) sind OKB vor einem polyklonalen Antikörperhintergrund nachweisbar. Da die Banden im Serum fehlen, deutet dies auf eine intrathekale IgG-Produktion hin. Bei (b) lassen sich keine OKB nachweisen. Es kann nur eine gleichmäßige polyklonale IgG-Antikörperpopulation detektiert werden. (Quelle: Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern, München).

Bis heute ist die Frage nicht geklärt, ob die OKB-Antikörper eine spezifische humorale Immunreaktion bei der MS darstellen und somit an der Immunpathogenese beteiligt sein könnten, oder nur als Nebenprodukt einer T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion im ZNS entstehen. Über die Antigene, die diese Antikörper erkennen, ist wenig bekannt, auch weil sie sich bislang aufgrund der vielen irrelevanten polyklonalen Antikörper im Liquor nicht eindeutig den OKB-Antikörpern zuordnen ließen (Fraussen et al., 2009). Die in den vergangenen Jahren beschriebenen Antigene von Liquor-Antikörpern sind sehr vielfältig und reichen von Reaktivitäten gegen Viren (Martin, 1981; Soldan et al., 1997; Reiber et al., 1998; Cepok et al., 2005), Bakterien (Derfuss et al., 2001), DNA (Williamson et al., 2001) und intrazelluläre Proteine (Kolln et al., 2006; Lovato et al., 2008) bis hin zur Erkennung von Lipiden (Ilyas et al., 2003; Kanter et al., 2006; Brennan et al., 2011). Bei den bisher gefundenen Antigenen konnte man sich allerdings nie sicher sein, ob sie tatsächlich einen OKB-Antikörper binden oder einen Antikörper des polyklonalen Hintergrundes im Liquor.

Daher wurde vor kurzem in der Arbeitsgruppe Dornmair (Obermeier, 2011) eine neue proteinbiochemisch-basierte Methode entwickelt, um einzelne OKB-Antikörper vor dem polyklonalen Hintergrund an irrelevanten Antikörpern zu identifizieren. Bei dieser Methode werden die Antikörper aus dem Liquor zunächst durch Protein-G-Affinitätschromatographie isoliert und anschließend über eine hochauflösende 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die zusammengehörigen L- und H-Ketten der aufgetrennten Immunglobuline werden im nächsten Schritt durch Massenspektrometrie identifiziert und mit dem Ig-Transkriptom der Liquor-B-Zellen abgeglichen, um die vollständigen Sequenzen zu erhalten (Obermeier et al., 2008). Die so identifizierten OKB-Antikörper können im Anschluss kloniert und rekombinant exprimiert werden. Mit diesem Verfahren gelang es der Arbeitsgruppe fünf rekombinante OKB-basierte Fab-Fragmente aus drei MS-Patienten und ein Kontroll-Fab bekannter Spezifität herzustellen. Diese können für eine gezielte Antigen suche der OKB-Antikörper, unabhängig vom polyklonalen Antikörperhintergrund im Liquor, eingesetzt werden.

1.4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung von Antigenen autoaggressiver T- und B-Zellen, um bessere Einblicke in die allgemeine Entstehung und Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu gewinnen.

Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit autoaggressive Lymphozyten aus zwei Autoimmunerkrankungen, die T-Zellen bei der Polymyositis (PM) und die B-Zellen bei der Multiplen Sklerose (MS), im Detail untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit sollte der putativ autoreaktive, pathogene $\gamma\delta$ -TZR M88 aus einem PM-Patienten untersucht werden. In den Arbeiten von Wiendl et al., 2002 und Dornmair et al., 2004 wurde bereits gezeigt, dass M88 an diverse intrazelluläre Antigene aus verschiedenen Spezies binden kann. Aufbauend auf Daten aus der Diplomarbeit (Bruder, 2009) sollten die Untersuchungen zur Antigenerkennung von M88 weitergeführt und vertieft werden. Dazu sollte zunächst ein bakterielles Antigen, der Translationsinitiationsfaktor EcIF1 aus *E. coli*, weiter molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert und analysiert werden. Außerdem sollten neben weiteren bakteriellen Antigenen auch mögliche humane Antigene, zum Beispiel Proteine des humanen Translationsapparates, getestet und identifiziert werden. Daher wurden im Folgenden noch verschiedene humane Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sowie der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor eIF1AY näher untersucht.

In einem zweiten Teil sollte die Antigenspezifität der oligoklonalen Banden (OKB) Antikörper von MS-Patienten analysiert werden. Die Antigene, die diese Antikörper erkennen, sind bis heute weitgehend unbekannt und daher ist bislang auch eine mögliche Rolle der humoralen Immunantwort und der OKB-Antikörper bei der Immunpathogenese der MS unklar. Aus diesen Gründen ist es von bedeutender medizinischer Relevanz die Antigene zu identifizieren. Für die Antigensuche standen fünf OKB-Antikörper aus drei MS-Patienten als rekombinante humane Fab-Fragmente zur Verfügung (Obermeier, 2011). Im Verlauf der Arbeit sollten verschiedene Antigenklassen, hauptsächlich Proteine, aber auch Nukleinsäuren und Lipide, mit unterschiedlichen Methoden, wie beispielsweise Immunfluoreszenzfärbungen, ELISAs, Proteinarrays, 2D-Westernblots oder Immunpräzipitationen, untersucht und mögliche Antigene der OKB-Antikörper identifiziert werden.

Die Identifizierung und Charakterisierung von einzelnen PM- und MS-Antigenen könnte Rückschlüsse auf die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ermöglichen und in Zukunft dabei helfen, effizientere und spezifischere Therapien zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Geräte

Gerät

Autoklaven:

Webeco Typ A5

Varioklav® EP-Z500, EV-Z500

Biacore 2000

Bunsenbrenner Fireboy eco

CD-Spektrometer J-715

Einfrierboxen

Eismaschine

Elektroblotkammern *Semi-Dry*

Elektrophoresekammern:

Agarose-Gele

Polyacrylamidgele

Mighty Small SE250/SE260

XCell SureLock™ Mini-Cell

Laufkammer für Midigele

Elektroporationsgerät Gene Pulser® II

ELISA- und Mikrotiterplatten-Auslese-Geräte:

ELISA-Reader MR 4000

Victor2 1420 Multilabel Counter

FACSCalibur

FACS Sorter Facs Vantage SE

FPLC-System:

LCC-501 Plus

UV-Detektor Uvicord SD

Geldokumentation:

Molecular Imager® Gel Doc™ XR System

Quantity One® Basic Software

Perfection 4990 Photo

Heizblöcke:

Thermomixer 5436 Comfort

Thermostat 5320

Thermoshaker TS-100

HPLC-Gerät HP 1100

IEF-Geräte:

Agilent 3100 OFFGEL Fractionator

Hoefler IEF 100

Inkubatoren:

Brutschrank E3115 EL+Therm

BBD 6220

Jouan EB 53

Labormixer Waring

Magnet Dynal

Magnetrührer IKAMAG® RCT

Massenspektrometer:

Maldi Target

Proteomics Analyzer 4700 MALDI-TOF/TOF

Microarray Scanner GenePix 4000B

Mikroskop:

Hersteller

Webco (Selmsdorf)

H+P Labortechnik (Oberschleißheim)

GE Healthcare (München)

Integra Biosciences (Fernwald)

Jasco (Gross-Umstadt)

Nalgene (Roskilde, DK)

Ziegra (Isernhagen)

Instituts-Werkstatt

Instituts-Werkstatt

Hoefler (San Francisco, USA)

Invitrogen (Darmstadt)

Instituts-Werkstatt

Bio-Rad (München)

Dynatech (Rückersdorf)

Perkin Elmer (Waltham, USA)

BD Biosciences (Heidelberg)

BD Biosciences

Amersham Pharmacia Biotech (Nümbrecht)

Bio-Rad

Bio-Rad

Epson (Meerbusch)

Eppendorf (Hamburg)

Eppendorf

Hartenstein (Würzburg)

Agilent Technologies (Böblingen)

Agilent Technologies

Hoefler (San Francisco, USA)

Jouan (Unterhaching)

Heraeus (Hanau)

Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

Waring (Torrington, USA)

Invitrogen

IKA® Werke (Staufen)

Applied Biosystems (Darmstadt)

Axon Instruments, Inc. (Union City, CA)

Wilovert®	Will (Wetzlar)
Biomed	Leitz (Wetzlar)
AxioVert 200M (Fluoreszenzmikroskop)	Carl Zeiss
Mikrowellengerät	Alaska (Berlin)
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	pQLab (Erlangen)
Netzgeräte für Elektrophorese:	
Power Supply EPS 500/400	Amersham Pharmacia (München)
Pharmacia LKB ECPS 3000/150	Amersham Pharmacia
PS 300-B Power Supply	Hoefer (San Francisco, USA)
Consort EV215 Electrophoresis Power Supply	Consort (Turnhout, B)
Neubauer Zählkammer	Carl Roth (Karlsruhe)
PCR-Thermocycler:	
GeneAmp® PCR System 9600	Perkin Elmer (Wellesley, USA)
T personal Thermocycler	Biometra (Göttingen)
pH-Meßgerät pH521	WTW Bruno Kummer (Freiburg)
Photometer GeneQuant II	Amersham Pharmacia Biotech
Pipetten	Eppendorf / Gilson (Middletown, USA)
Pipettiergerät:	
Multipipette plus	Eppendorf
Pipetboy acu	Integra Biosciences
Pipetman® P	Gilson
Plattformschüttler:	
Unimax 2010 (rotierend)	Heidolph Instruments (Schwabach)
Duomax 1030 (wippend)	Heidolph Instruments
Rocky 3D (dreidimensional)	Fröbel Labortechnik GmbH (Linden)
Röntgenfilmentwicklungsmaschine OPTIMAX®	Protec (Oberstenfeld)
Rotationsschüttler Multi Bio RS-24	Biosan (Riga, LV)
Schüttelinkubatoren:	
HT	Infors Ag (Bottmingen, CH)
HT Multitron	Infors Ag
LT-V	Adolf Kühner (Birsfelden, CH)
Sonifier 450	Branson (Genf, CH)
Sterilwerkbank:	
BSB6A	Gelaire Flow Laboratories (Meckenheim)
LaminAir®	Heraeus
UV-Transilluminator 312 nm	Bachofer Laborgeräte (Reutlingen)
UV-visible recording Spectrophotometer UV-160A	Shimadzu (Duisburg)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Waagen:	
Präzisionswaage L2200P	Sartorius AG (Göttingen)
Analysenwaage 2001 MP2	Sartorius AG
Wasseraufbereitung Milli-Q Advantage	Millipore (Schwalbach)
Wasserbadinkubator MA6	Lauda (Lauda-Königshofen)
Zentrifugen:	
5417 C und 5417 R	Eppendorf
Rotana/R	Hettich (Tuttlingen)
Heraeus® Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific
Sorvall RC5C Plus und RC6 Plus	Thermo Fisher Scientific
L8-15 M/E (Ultrazentrifuge)	Beckman (Palo Alto, USA)
Speed Vac Concentrator	Savant

Weitere spezielle Geräte sind in der Methodenbeschreibung angeführt.

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien und Reagenzien wurden in Analysequalität von den Firmen Amersham Pharmacia (München), Becton Dickinson BD Biosciences (Heidelberg), Bio-Rad (München), Biozym (Oldendorf), Carl Roth (Karlsruhe), Dianova (Hamburg), Difco-Laboratories Inc. (Detroit, USA), eBioscience

(Frankfurt), Fermentas (St. Leon-Rot), Fisher Scientific (Schwerte), Fluka (München), GE Healthcare (München), GIBCO® BRL (Darmstadt), Invitrogen (Darmstadt), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Novagen (Darmstadt), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Riedel-de Haen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva Electrophoresis (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München) und Thermo Scientific (Schwerte) bezogen. Weiteres Verbrauchsmaterial, wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Zentrifugenröhrchen und andere Materialien, wurden von den Firmen Becton Dickinson BD Biosciences, Bio-Rad, Biozym, Corning Incorporated (New York, USA), Eppendorf (Hamburg), Millipore (Schwalbach) und Nunc (Langenselbold) bezogen. Falls abweichend sind weitere Bezugsquellen in der Methodenbeschreibung aufgelistet.

2.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung	Verwendung
1x PBS pH 7,4	150 mM NaCl 8,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,9 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	vielfältige Anwendungen in der Proteinbiochemie
PBS-T	1x PBS 0,05 % (w/v) Tween-20	Waschpuffer

Weitere Puffer sind in der Methodenbeschreibung angeführt.

2.1.4 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5α	F- φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i> (<i>confers resistance to phage T1</i>)	Max Efficiency® DH5α™ Competent Cells (Invitrogen)
<i>E. coli</i> DH5α F'IQ	F-φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1/F'</i> <i>proAB+ lacIqZ</i> ΔM15 <i>zzf::Tn5 [KmR]</i>	Max Efficiency® DH5α F'IQ™ Competent Cells (Invitrogen)
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1</i> <i>endA1 araΔ139 Δ(ara, leu) 7697</i> <i>galU galK λ- rpsL(StrR) nupG</i>	One Shot® TOP 10 Chemically Competent Cells (Invitrogen)
<i>E. coli</i> BL21-Star™-DE3	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> <i>rne131</i> (DE3)	Invitrogen
<i>E. coli</i> MG1655	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	ATCC

2.1.5 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
58αβ Hybridome	TZR defiziente Maus-T-Zell-Hybridomlinie, Suspensionszelllinie	K. Dornmair (Letourneur und Malissen, 1989)
58 γδ-TZR M88-Hybridome	Expression des humanen γδ-TZR M88 Vγ1.3 ⁺ Vδ2 ⁺ (Klon A2 oder B5), Geneticin- und Hygromycin-Resistenz	K. Dornmair (Wiendl et al., 2002) (Dornmair et al., 2004)
58 γδ-TZR M88-Mutanten	Wildtyp: M88 Vγ1.3 ⁺ Vδ2 ⁺ , Vγ9 ^{*altVJ} γVδ2 ⁺ , Vγ1.3 ^{*altγCDR3} γVδ2 ⁺ ,	K. Dornmair (Wiendl et al., 2002)

	V γ 1.3 ^{*altγC} V δ 2 ⁺ , V γ 1.3 ⁺ V δ 1 ^{*alt VDJδ} , V γ 1.3 ⁺ V δ 2 ^{*altδCDR3J} , V γ 1.3 ⁺ V δ 2 ^{*altδCDR3} , Geneticin- und Hygromycin-Resistenz	(Dornmair et al., 2004)
COS-7	adhärente Nierenzelllinie afrikanischer Grünmeerkatzen	ATCC (CRL-1651) (Gluzman, 1981)
COS-7 sc-Fv-M88-TZR	Expression des sc-Fv-M88-TZR, Klon 2A5, Hygromycin-Resistenz	K. Dornmair (Dornmair et al., 2004)
TE671	adhärente humane Rhabdomyosarkom- Tumorzelllinie	ATCC
TE671-MOG	TE671 mit dem humanen MOG trans- fiziert, Geneticin-Resistenz	K. Dornmair
HEK293E Large Scale Transient Expression System	humane embryonale Nierenzelllinie, G418-Resistenz	D. Jenne (Yves Durocher NRC Biotechno- logy Research Institute)
EBV-B-Zellen	EBV-transformierte B-Zellen aus dem MS-Patient A, Suspensionszelllinie	K. Dornmair
Jurkat-Zellen	humane T-Lymphozyten-Leukämie- Zelllinie, Suspensionszelllinie	K. Dornmair

2.1.6 Vektoren

Bezeichnung	Resistenzgene	Größe	Beschreibung	Herkunft
pET21c(+)	amp ^R , kan ^R	5,4 kb	Expressionsplasmid	Novagene
pET33b(+)	amp ^R , kan ^R	5,4 kb	Expressionsplasmid	Novagene
pCR@2.1-TOPO@	amp ^R , kan ^R	3,9 kb	TOPO-TA Klonierung	Invitrogen
pQE30	amp ^R	3,4 kb	Expressionsplasmid, N- terminales His ₆ -Peptid	Qiagen
pRSV5-neo	amp ^R , neo ^R	5,1 kb	Expressionsplasmid	K. Dornmair (Long et al., 1991)
pRSV5-hygro	amp ^R , hygro ^R	5,1 kb	Expressionsplasmid	K. Dornmair (Long et al., 1991)
pSecTag2Ahygro	hygro ^R	5,7 kb	Expressionsplasmid	Invitrogen
pTT5	amp ^R	4,4 kb	Expressionsplasmid	Yves Durocher, NRC Biotechnology Research Institute

2.1.7 Antibiotika

Bezeichnung	Stammlösung	Arbeitskonzentration	Bezugsquelle
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	100 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml	50 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Geneticin G418 (Gen)	50-100 mg/ml	1-4 mg/ml	GIBCO®, Invitrogen
Hygromycin B (Hyg)	50 mg/ml	58-M88: 0,3 mg/ml COS-7: 0,5 mg/ml	Invitrogen, Sigma-Aldrich
G-418 Sulfat	50 mg/ml	HEK293E: 25 μ g/ml	PAA Laboratories

2.1.8 Längen- und Größenstandards

DNA-Längenstandard:			
50 bp DNA-Leiter	50-1.000 bp		PeqLab
100 bp Standard	100-1.500 bp		New England Biolabs
1 kb Standard	500-10.000 bp		New England Biolabs

Proteinstandard:		
Wide Range SigmaMarker™	MW 6,5-200 kDa	Sigma-Aldrich
Full Range Rainbow Marker	MW 12-225 kDa	GE Healthcare

2.1.9 Enzyme, Kits, spezielle Reagenzien und Materialien

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
Aprotinin	Sigma-Aldrich	Proteaseinhibitor
DEPC-treated Water	Invitrogen	vielfältige Anwendungen
DNaseI	Sigma-Aldrich	DNA-Verdau
Dynabeads® M-280 Tosylactivated	Invitrogen	Immunpräzipitation
EasyPure® DNA Purification Kit	Biozym	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen
EZ-Link Sulfo-NHS-LC Biotinylation Kit	Thermo Scientific	Biotinylierung von Proteinen
iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase und Reaktionspuffer	Bio-Rad	PCR-Reaktionen
Isopropylthio-β-Galaktosid (IPTG)	Fermentas Merck	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>
Lysozym	Sigma-Aldrich	Protein-Aufreinigung aus <i>E. coli</i>
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen	DNA-Reinigung
Mouse IL-2 ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience	IL-2 ELISA
Ni-NTA-Agarose	Qiagen	Aufreinigung von Proteinen mit His ₆ -Peptid
Novex® 4-20 % Tris-Glycine Mini Gel 8 x 8 cm, 1 mm, 12 Well oder 10 Well	Invitrogen	SDS-PAGE
Nukleinsäuren 10 mM dNTPs	Invitrogen	PCR-Reaktionen
10x PCR Puffer	Roche Diagnostics	PCR-Reaktionen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich	Proteaseinhibitor
ProtoArray® v5.0 Human Protein Microarray und ProtoArray Blocking Buffer Kit	Invitrogen	Proteinarrays
Qiagen® Plasmid Maxi Kit	Qiagen	Plasmid-Isolierung
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	Plasmid-Isolierung
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	Roche Diagnostics	Dephosphorylierung und Ligation von DNA
Reacti-Bind™ DNA Coating Solution	Thermo Scientific	DNA-Adsorption
ReadyStrip IPG Strips pH 3-10 17 cm	Bio-Rad	Isoelektrische Fokussierung
Streptavidin Alexa Fluor® 488 Konjugat	Invitrogen	Bindung an Biotin
SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen	cDNA-Synthese
10x Synthetischer Block	Invitrogen	Blockierung
Taq DNA-Polymerase	Roche	PCR-Reaktionen
10x PCR-Puffer	Diagnostics	
T4 DNA Ligase	Invitrogen	DNA-Ligation
5x T4 DNA Ligase Puffer		
TOPO® TA Cloning® Kit	Invitrogen	Klonierung von PCR-Produkten
TRIzol® Reagent	Invitrogen	RNA-Isolierung

Weitere spezielle Enzyme, Kits, Reagenzien und Materialien sind in der Methodenbeschreibung angeführt.

2.1.10 Restriktionsenzyme

Enzym	Hersteller
Restriktionsenzyme sowie zugehörige Reaktionspuffer: <i>AccI, BamHI, BamHI-HF, BglII, BspEI, BsaWI, BssHIII, EcoRI, FspI, HindIII, KsaI, NheI, NotI, SacI, SacII, SalI, SalI-HF, SmaI, XhoI</i>	New England Biolabs bzw. Fast Digest Fermentas

2.1.11 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert und in einer Konzentration von 100 pmol/μl (100 μM) bezogen. Die M13 Primer stammen von Invitrogen.

Die Verwendung von Wobble-Nukleotiden erfolgte nach der IUPAC-Nomenklatur: R entspricht dabei A oder G, Y entspricht C oder T, K entspricht G oder T, W entspricht A oder T und B entspricht G, T oder C. Aminosäureaustausche sind im Folgenden fett gedruckt und Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

2.1.11.1 Klonierung einer *E. coli* cDNA-Bibliothek

Name	Primersequenz
pET- <i>BglIII</i>	5´-TAGAGGATCGAGATCTCGATCC-3´
pET- <i>SmaI</i> -Mut-rev	5´-AGTCATGCTAGCCCCGGGTATATCTCCTTC-3´
Primer-C- <i>NotI</i>	5´-ATAGTTTAGCGCCGCGGGAGATTTTTTTTTTTTT-3´

2.1.11.2 Klonierung von EcIF1wt und EcIF1-Mutanten

EcIF1wt	IF1wt-for- <i>BamHI</i> : 5´-CCGGATCCATGGCCAAAGAAGACAATATTG-3´ IF1wt-rev- <i>HindIII</i> : 5´-GGGGAAGCTTTCAGCGACTACGGAAGACAA-3´
EcIF1-V31M	keine Primer, weiterverwendete Zufallsmutation
EcIF1-H30A	IF-H30-for- <i>XhoI</i> : 5´-GTAGAGCTCGAGAACGGT GCCG TGGTT-3´ IF-H30-rev- <i>XhoI</i> : 5´-GACCGTTCTCGAGCTCTACGCG-3´
EcIF1-H35A	IF-H35-for- <i>BsaWI</i> : 5´-CACATCTCCGGTAAAATGCGC-3´ IF-H35-rev- <i>BsaWI</i> : 5´-CATTTTACCGGAGAT GGCT GCAGT-3´
EcIF1-Y44F	IF-Y44-for- <i>FspI</i> : 5´-TAAAAATGCGCAAAAAC TTC ATCCG-3´ IF-Y44-rev- <i>FspI</i> : 5´-GTTTTT GCGC ATTTTACCGGA-3´
EcIF1-Y60F	IF-Y60-for- <i>SacI</i> : 5´-TGTTGAGCTC ACCCCGTTC GACCTG-3´ IF-Y60-rev- <i>SacI</i> : 5´-ACGGGGT GAGCTCA ACAGTCA-3´
EcIF1-N28S	IF1-N28S-for- <i>XhoI</i> : 5´-GTAGAGCTCGAG AGC GGTCACGT-3´ IF1-N28S-rev- <i>XhoI</i> : 5´-CGTGACCGTTCTCGAGCTCTAC-3´
EcIF1-K39A	IF-K39A-for- <i>BspEI</i> : 5´-CACATCTCCGG GA CAATGCGCAAAA ACTAC -3´ IF-K39A-rev- <i>BspEI</i> : 5´-CATTTTTTCCGGAGATGTGTGC-3´
EcIF1-K39Q	IF-K39Q-for- <i>BspEI</i> : 5´-CACATCTCCGG CA AATGCGCAAAA ACTAC -3´ IF-K39Q-rev- <i>BspEI</i> : 5´-CATTTTTTCCGGAGATGTGTGC-3´
EcIF1-M40A	IF-M40A-for- <i>BspEI</i> : 5´-CACATCTCCGG AAAA GCG CGCAAAA ACTAC -3´ IF-M40A-rev- <i>BspEI</i> : 5´-CATTTTTTCCGGAGATGTGTGC-3´
EcIF1-M40L	IF-M40L-for- <i>BspEI</i> : 5´-CACATCTCCGG AAAA CTG CGCAAAA ACTAC -3´ IF-M40L-rev- <i>BspEI</i> : 5´-CATTTTTTCCGGAGATGTGTGC-3´

EcIF1-M40P	IF-M40P-for- <i>BspEI</i> : 5' -CACATCTCCGGAAAA CCCC CGAAAAAC-3' IF-M40P-rev- <i>BspEI</i> : 5' -CATT <u>TTTTCCGGAGATGTGTGC</u> -3'
EcIF1-R41A	IF-R41A-for- <i>BspEI</i> : 5' -CACATCTCCGGAAAAATG GCC AAAAACTAC-3' IF-R41A-rev- <i>BspEI</i> : 5' -CATT <u>TTTTCCGGAGATGTGTGC</u> -3'
EcIF1-R41Q	IF-R41Q-for- <i>BspEI</i> : 5' -CACATCTCCGGAAAAATG CA AAAAACTAC-3' IF-R41Q-rev- <i>BspEI</i> : 5' -CATT <u>TTTTCCGGAGATGTGTGC</u> -3'
EcIF1-R41K	IF-R41K-for- <i>BspEI</i> : 5' -CACATCTCCGGAAAAATG AAG AAAAACTAC-3' IF-R41K-rev- <i>BspEI</i> : 5' -CATT <u>TTTTCCGGAGATGTGTGC</u> -3'
EcIF1-M40A/R41A	IF-M40A/R41A-for- <i>BspEI</i> : 5' -CACATCTCCGGAAAA GCGGCC AAAAAC-3' IF-M40A/R41A-rev- <i>BspEI</i> : 5' -CATT <u>TTTTCCGGAGATGTGTGC</u> -3'
EcIF1-K42A	IF-K42A-for- <i>BspEI</i> : 5' -CACATCTCCGGAAAAATGCG GCA AACTAC-3' IF-K42A-rev- <i>BspEI</i> : 5' -CATT <u>TTTTCCGGAGATGTGTGC</u> -3'
EcIF1-K42Q	IF-K42Q-for- <i>BspEI</i> : 5' -CACATCTCCGGAAAAATGCG CA AACTAC-3' IF-K42Q-rev- <i>BspEI</i> : 5' -CATT <u>TTTTCCGGAGATGTGTGC</u> -3'
EcIF1-N43A	IF-N43A-for- <i>BspEI</i> : 5' -CACATCTCCGGAAAAATGCGCAAA GCC TACAT-3' IF-N43A-rev- <i>BspEI</i> : 5' -CATT <u>TTTTCCGGAGATGTGTGC</u> -3'

2.1.11.3 Klonierung des humanen eIF1AY

eIF1AY	eIF1A-for- <i>BamHI</i> : 5' -GGGGATCCCCCAAGAATAAAGGTAAAGGAGG-3' eIF1A-rev- <i>HindIII</i> : 5' -CCCCAAGCTTYTAGATRTCATCAATRTCTTCATCATC-3'
--------	--

2.1.11.4 Klonierung eines chimären Konstruktes von M88

γ -H-chim- <i>SacII</i> -for-1	5' -GCTCCGCGGTGGGTCCT-3'
γ -H-chim- <i>SacII</i> -for-2	5' -GCTCCGCGGTGGGTCCTGTCCAACCTTGAAGGGGAGAACGAAG-3'
γ -H-chim- <i>Sall</i> -rev	5' -CAGAGGTCGACTTGGAGGAGGGTGCCAGGGGGGAAGACCGATGGGCCCTTT TGTTTATCTGTGACAACAAGTG-3'
δ -L-chim- <i>BssHII</i> -for	5' -CGAGGCGCGGATGTGATATTTTGGTGCCTGAACACCAAACA-3'
δ -L-chim- <i>KasI</i> -rev	5' -ACAGATGGCGCCGGCTGACTTCGGGGCTCC-3'

2.1.11.5 Klonierung von rekombinanten Fab-Fragmenten

pTT5-H- <i>Sall</i> -His/BirA-for	5' -ACTTGTCGACCTCTGGGGGCAC-3'
pTT5-H- <i>BamHI</i> -His/BirA-rev	5' -GTGTGTGGATCCTTATTCGTGCCATTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGT CGTTCAGGCCCCCGGAGCTCGCTCGAGATGGTGTGATGGTGTGAG-3'
pTT5-L- <i>KasI</i> -Myc-for	5' -TGATGGCGCCATCTGTCTTCATCT-3'
pTT5-L- <i>BamHI</i> -Myc-rev	5' -CTGTGGATCCTCACAGCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCCTCG GCACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3'

2.1.11.6 Klonierung des humanen SF17A, NSP1 und NSP1A

SF17A- <i>BamHI</i> -for	5' -GACCGGATCCATGGCAGCGGCTACCATCGTG-3'
SF17A- <i>Sall</i> -rev	5' -GAAGGTCGACTCATCGGGAACGACAGACGAG-3'
NSP1-1- <i>BamHI</i> -for	5' -GAGGATCCATGGTGAAGTTGGGGAAACAATT-3'
NSP1-2- <i>HindIII</i> -rev	5' -GTATAAGCTTCTAAGCTGACTTCTCAGCCG-3'
NSP1-4- <i>AccI</i> -for	5' -TTCCTGGTTGTCTACAAGGTG-3'
NSP1-3- <i>AccI</i> -rev	5' -CCTTGTAGACGGAGACCTTAAACCTCTC-3'

2.1.11.7 Kolonie-PCR- und Sequenzierprimer

M13-Forward (-20) für pCR®2.1-TOPO®	5´-GTAAAACGACGGCGTC-3´
M13-Reverse für pCR®2.1-TOPO®	5´-GAGGAAACAGCTATGAC-3´
pQE-for-Seq	5´-CCCGAAAAGTGCCACCTG-3´
pQE-rev-Seq	5´-CCAGTAATGACCTCAGAAC-3´
pTT5-for-Seq	5´-CTTTCTCTCCACAGGTGTC-3´
pTT5-rev-Seq	5´-CCTTCCGAGTGAGAGACAC-3´

2.1.12 Proteine und Peptide

Einzeln gereinigte, bakterielle Proteine des „PURExpress™ *in vitro* Protein Synthesis Kit“ (New England Biolabs) wurden von T. Ueda zur Verfügung gestellt, darunter unter anderem 20 AA-RS und 3 Initiationsfaktoren aus *E. coli* (Shimizu et al., 2001; Shimizu et al., 2005). Es handelt sich hierbei um rekombinant in *E. coli* hergestellte Proteine, die über ein N-terminales His₆-Peptid über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt wurden. Im Gegensatz zum Kit konnten die Proteine hier einzeln analysiert werden. Die Proteine wurden mit sterilem PBS auf 1 µg/µl eingestellt. Aliquots wurden bei 4 °C und -80 °C gelagert oder direkt für weitere Analysen verwendet.

Die rekombinanten humanen Proteine Histidyl-tRNA-Synthetase (hH-RS = Jo-1), Threonyl-tRNA-Synthetase (hT-RS = PL-7), Alaninyl-tRNA-Synthetase (hA-RS = PL-12), „Formimidoyltransferase-Cyclodeaminase 1“ (hLC1) und „Proliferating cell nuclear antigen“ (hPCNA) wurden von der Diarect AG (Freiburg) bezogen. Alle Proteine wurden im Baculovirus-Insektenzell-Expressions-System hergestellt und durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proteine befinden sich in HEPES-NaCl-Puffer mit 20 % Glycerin und wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Protein	Molekulargewicht	Bezugsquelle, Lot
hH-RS (Jo-1)	58,3 kDa	Diarect AG, Lot 29603
hT-RS (PL-7)	83,3 kDa	Diarect AG, Lot 56602
hA-RS (PL-12)	108,0 kDa	Diarect AG, Lot 57603, Lot 57701 (SDS-PAGE)
hLC1	59,7 kDa	Diarect AG, Lot 37602
hPCNA	29,8 kDa	Diarect AG, Lot 54501

Ein synthetisches Peptid von EcIF1, EcIF1(33-46), das die Aminosäuren 33-46 repräsentiert, wurde durch Festphasen-Peptidsynthese („Microchemistry Core Facility“ MPI für Biochemie) hergestellt und mittels *Reversed-Phase*-HPLC gereinigt. Die Sequenz wurde durch Massenspektrometrie bestätigt: EcIF1 (33-46): TAHISGKMRKNYIR. Das Peptid wurde in einer Konzentration von 10 µg/µl in H₂O gelöst.

Für die Antigen suche der rekombinanten Fab-Fragmente aus MS-Patienten wurden drei Proteine von Abnova (Heidelberg) bezogen, die *in vitro* im Weizenkeimexpressionssystem hergestellt wurden. Alle Proteine besitzen ein N-terminales GST-Peptid und sind in 50 mM Tris-HCl, 10 mM reduziertem Glutathion, pH 8 gelöst. Die Proteine wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Protein	Molekulargewicht	Bezugsquelle, Lot
DXYS155E (SF17A)	74,8 kDa	Abnova, 1000714
HOXA1 (HOXA1)	62,5 kDa	Abnova, 1000309
D4S234E (NSP1)	46,1 kDa	Abnova, 0991018, 0990507

Das humane „Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein“ (MOG) wurde von der Arbeitsgruppe Meinl (mi-MOG) zur Verfügung gestellt. Es wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt.

Ein weiteres humanes rekombinantes MOG (eMOG, As 30-144; glykosyliert ca. 20 kDa) mit C-terminalem His₆-Peptid in 20 mM Na-Phosphatpuffer, 500 mM NaCl pH 7,5 wurde von der Arbeitsgruppe Jenne zur Verfügung gestellt. Es wurde in HEK293E-Zellen exprimiert und stellt die extrazelluläre glykosylierte Domäne des Proteins dar.

Weitere verwendete Proteine sind im Folgenden aufgelistet:

Protein	Molekulargewicht	Bezugsquelle, Lot
BSA Albumin bovine Fraction V, Protease and Fatty Acid free	69,3 kDa	Serva Electrophoresis
Whole normal brain lysate		Novus Biologicals, B509129
Membrane protein brain lysate		Novus Biologicals, A809149
Insulin human	5,8 kDa	Sigma-Aldrich

Weitere Proteine sind in der Methodenbeschreibung angeführt.

2.1.13 Antikörper

Spezifität	Klon	Kopplung	Spezies/Isotyp	Konzentration	Bezugsquelle
Maus CD3 ϵ	145-2C11	-	Hamster / IgG1 κ	0,5 mg/ml	eBioscience
Maus CD3 ϵ	145-2C11	FITC	Hamster/ IgG1 κ	0,5 mg/ml	BD Biosciences Pharmingen
Isotypkontrolle	Ha4/8	FITC	Hamster/ IgG2 λ 1	100 Tests	BD Biosciences Pharmingen
hTCR V δ 2	Immu389	FITC	Maus/IgG1	50 Tests	Immunotech Beckman Coulter (Krefeld)
hTCR V δ 2	B6	FITC	Maus/IgG1	50 Tests	Immunotech Beckman Coulter
Isotypkontrolle	X40	FITC	Maus/IgG1	50 μ g/ml	BD Biosciences Pharmingen
TCR PAN $\gamma\delta$	Immu510	PE	Maus/IgG1 κ	50 Tests	Immunotech Beckman Coulter
Isotypkontrolle	X40	PE	Maus/IgG1	50 μ g/ml	BD Biosciences Pharmingen
Jo-1 (hH-RS)	polyklonal	-	humane IgG Fraktion BP2040	unbekannt	Acris (Herford)
hH-RS	HARSA6	-	Maus/IgG1	0,1 mg/ml	GeneWay/ Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Isotypkontrolle	X40	-	Maus/IgG1	50 μ g/ml	BD Biosciences Pharmingen

Material und Methoden

Pentahistidin	-		Maus/IgG1	0,1 mg/ml	Qiagen
6x His	HIS.H8	-	Maus/IgG2b	1 mg/ml	Abcam (Cambridge, UK)
MOG	8-18C5	-	Maus/IgG1	2,4 mg/ml 0,57 mg/ml	AG Meinel, MPI Neurobiologie
Maus IgG	polyklonal	FITC	Ziege/F(ab') ₂	1 mg/ml	DakoCytomation (Hamburg)
Polyhistidin	HIS-1	HRP	Maus/IgG2a	8,2 mg/ml	Sigma-Aldrich
Myc-Peptid	9E10	HRP	Maus/IgG1 κ	0,4 mg/ml	Roche Diagnostics
V5 Epitop		Alexa 647	Maus/IgG2a	0,5 mg/ml	Invitrogen
c-Myc	9E10	Alexa 647	Maus/IgG1	50 µg/ml	AbD Serotec (Düsseldorf)
human kappa light chain	MHK-49	Alexa 647	Maus/IgG1	50 µg/ml	Biolegend, BIOZOL (München)
Maus IgG (H+L)	polyklonal	Alexa 647	Ziege/IgG	2 mg/ml	Invitrogen
human IgG (H+L)	polyklonal	Alexa 647	Ziege/IgG	2 mg/ml	Invitrogen
human kappa light chain	HP6053	-	Maus/IgG1	0,5 mg/ml	Invitrogen
human kappa light chain	HP6053	HRP	Maus/IgG1	0,5 mg/ml	Invitrogen
DNA	404	-	Maus/IgG2b	1 mg/ml	Acris
<i>E. coli</i> LPS	302	-	Maus/IgG2a	1 ml	Acris
Maus IgG (H+L)	polyklonal	HRP	Ziege/IgG	1 mg	Invitrogen

FITC = Fluoresceinisothiocyanat; PE = Phycoerythrin; HRP = *Horseradish peroxidase*

2.1.14 Computerprogramme und Internetseiten

Bei Bedarf wurden folgende Computerprogramme und Internetseiten verwendet:

Programme
„Microsoft® Word 2010“ und „Adobe® Acrobat®“.
„Mendeley“ (www.mendeley.com) für Literaturverwaltung und Zitierungen.
„Microsoft® Excel“ und „R“ (www.r-project.org) für Auswertungen und Statistik.
„Adobe Photoshop CS5“ und „Adobe Illustrator CS5“ für Bildbearbeitungen und Grafiken.
„CellQuest V3.3“ (Becton Dickinson BD Biosciences) und „FlowJo V7.6“ Software (Tree Star, OR, USA) zur Auswertung von Durchflusszytometrie-Daten.
„Chromas Lite Version 2.01“ zur Auswertung von DNA-Sequenzen (Griffith University, AUS).
„ApE-A Plasmid Editor Version 1.1.7“ zur Darstellung von Vektorenkarten (M. Wayne David).
„Swiss-PDB Viewer 4.0.1“ (Guex und Peitsch, 1997), „PyMOL“ (DeLano, W. L., 2010: The PyMOL Molecular Graphics System, version 1.3r1, Schrödinger, LLC, New York) und „Chimera“ (Pettersen et al., 2004) zur dreidimensionalen Darstellung von Proteinstrukturen.
„Spectra Manager CDPro Analysis“ (Jasco) zur Auswertung von CD-Spektren.
„Data Explorer Software“, „Mascot Peptide Mass Fingerprint“, „Mascot MS/MS Ion Search“ (Matrix Science, London) zur Auswertung von Massenspektren.
„BIAevaluation 4.1“ (Biacore Life Sciences, Freiburg) zur Analyse und Auswertung von Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie-Daten.
„MetaMorph® Software“ (Molecular Devices, Downington, USA) zur Aufnahme und „ImageJ V1.43m“ (http://rsb.info.nih.gov/ij/) zur Auswertung von Fluoreszenzmikroskopiebildern.
„GenePix®Pro 6.0“ (Axon Instruments) und „ProtoArray™ Prospektor 5.2.1“ (Invitrogen) zur Analyse und Auswertung von Proteinarray-Daten.

Verwendete Online-Tools und Datenbanken (Internetseiten)<http://www.ncbi.nlm.nih.gov><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi> (Altschul et al., 1990)http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html<http://www.expasy.ch> (Gasteiger et al., 2003; Swiss Institute of Bioinformatics) und Tools.<http://www.uniprot.org> (Consortium, 2009)<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (Berman et al., 2000)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA-Isolierung und cDNA-Herstellung aus Zellen

Für die Gesamt-RNA-Isolierung aus prokaryotischen Zellen wurden $1-2 \times 10^7$ Zellen des *E. coli* Stammes MG1655 verwendet. Zur Gewinnung von RNA aus eukaryotischen Zellen wurden für die Klonierung des humanen eIF1AY $5-10 \times 10^6$ EBV-B-Zellen (K. Dornmair) und für die Klonierung des „Neuron-specific protein family member 1“ (NSP1) 50-100 mg humanes Hirngewebe (-80°C) verwendet. Die RNA-Isolierung erfolgte mit „TRIzol® Reagent“ nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 10 μl DEPC-Wasser gelöst und 10 min bei 55°C inkubiert, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermindern. Die isolierte mRNA wurde im nächsten Schritt in cDNA umgeschrieben.

Zur Herstellung einer cDNA-Expressions-Bibliothek aus *E. coli* wurde die isolierte mRNA zunächst mit DNaseI behandelt, um kontaminierende DNA zu entfernen. Anschließend wurde die mRNA mit dem „ExpressArt® Bacterial mRNA Amplifikation Kit“ (AmpTec) nach Herstellerangaben amplifiziert und in cDNA umgeschrieben (in Kooperation mit K. Dornmair und P. Scheinert). Im letzten Syntheseschritt wurde der Primer C des Kits durch einen Primer ersetzt, der zusätzlich eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle hatte (Primer-C-*NotI*). Das cDNA-Produkt wurde anschließend mit *NotI* verdaut. Aufgrund der Enzyme im Kit war die cDNA am anderen Ende *blunt*. Parallel dazu wurde die *NdeI* Schnittstelle des bakteriellen Expressionsplasmids pET21c(+) durch eine *SmaI*-Schnittstelle ersetzt. Dafür wurde die Sequenz zwischen *BglII* und *NheI* durch eine PCR mit dem Primerpaar pET-*BglII* und pET-*SmaI*-Mut-rev amplifiziert (s. Abschnitt 2.1.11.1). Das ursprüngliche *BglII*-*NheI*-Fragment wurde im Anschluss durch das neue Fragment mit der *SmaI*-Schnittstelle ersetzt. Die *NotI*-geschnittene cDNA wurde dann in den Vektor pET21c(+), der vorher mit *SmaI* und *NotI* verdaut wurde, kloniert.

Für die cDNA-Herstellung aus eukaryotischen Zellen wurde das „SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit“ verwendet. Je Ansatz wurden zu 1 μg RNA 1 μl Oligo(dT)-Primer (20 ng/ μl) oder genspezifischer *reverse* Primer hinzugefügt, mit DEPC-Wasser auf 12 μl aufgefüllt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden jeweils 1 μl 10 mM dNTP-Mix, 2 μl 0,1 M Dithiothreitol (DTT) sowie 4 μl 5x First Strand Buffer hinzugefügt und für 2 min bei 45°C inkubiert. Danach wurde 1 μl „SuperScript™ III RNaseH-Reverse-Transkriptase“ zugefügt und für weitere 60 min bei 45°C inkubiert. Die cDNA wurde dann zur Kontrolle und Amplifikation direkt in eine PCR eingesetzt.

2.2.2 DNA-basierte Methoden

2.2.2.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen für analytische und präparative Zwecke zu gewinnen, wurden für 2 ml Ansätze das „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ und für 250 ml Kulturen das „QIAGEN® Plasmid Maxi Kit“ verwendet. Die Plasmidisolierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 30 bzw. 250 µl EB-Puffer (10 mM Tris, pH 7,5-8,5) eluiert.

2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente im elektrischen Feld in einer Gelmatrix nach ihrer Größe aufgetrennt. Für die Durchführung wurden 0,9-3 % (w/v) Agarose (Biozym) mit 1x TBE-Puffer erhitzt und anschließend in Flachgelapparaturen (35 ml und 250 ml Volumen, institutseigene Werkstatt) gegossen. Zur Visualisierung unter UV-Licht bei $\lambda = 320$ nm wurden dem Gel und dem Laufpuffer 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Laden entsprechend mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt, und es wurden parallel 10 µl eines DNA-Standards (s. Abschnitt 2.1.8) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 35 ml Gele oder 180 V für 250 ml Gele für ca. 45 min durchgeführt.

6x DNA-Probenpuffer:	50 % (v/v) Glycerin 0,02 % (w/v) Bromphenolblau (Serva Electrophoresis) 0,02 % (w/v) Xylencyanol (Bio-Rad) 10 mM Tris-HCl pH 7,5
Ethidiumbromid-Stammlösung (1 mg/ml):	1 % Ethidiumbromidlösung 1:10 in H ₂ O (Carl Roth)
TBE-Puffer:	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8 (Bio-Rad) 0,5 µg/ml Ethidiumbromid

2.2.2.3 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden nach der Gelelektrophorese unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Gelextraktion wurden entweder das „EasyPure® DNA Purification Kit“, das „MinElute Gel Extraction Kit“ oder das „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde am Ende in 10 bzw. 30 µl Elutionspuffer gelöst.

2.2.2.4 Reinigung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente und Plasmide nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau von Enzymen, Nukleotiden und Primern zu trennen oder zur Umpufferung, wurde das „MinElute PCR Purification Kit“ nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde entweder photometrisch oder gelelektrophoretisch bestimmt.

Die photometrische Konzentrationsbestimmung beruht auf der Eigenschaft von DNA, Licht bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda = 260 \text{ nm}$ zu absorbieren. Zur Messung wurden die beiden Geräte „GeneQuant II“ und „NanoDrop 1000“ nach Herstellerangaben verwendet. Zum Nullabgleich diente jeweils eine Pufferprobe ohne DNA.

Die gelelektrophoretische Methode beruht auf der Ethidiumbromid-Färbung von DNA. Dazu wurde neben der Probe parallel ein DNA-Mengenstandard (s. Abschnitt 2.1.8) in einem analytischen Agarose-Gel mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Intensität der jeweiligen Banden konnte anschließend unter dem UV-Transilluminator verglichen und die Mengen abgeschätzt werden.

2.2.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist eine Methode, die die gezielte *in vitro* Amplifikation eines definierten Nukleinsäureabschnittes erlaubt. Der hitzestabilen Taq DNA-Polymerase dienen kurze Oligonukleotide (Primer, s. Abschnitt 2.1.11), die den zu vervielfältigenden Bereich flankieren, als Startmoleküle, um die DNA-Sequenz durch Anlagerung von Nukleotiden zu synthetisieren. In mehreren Zyklen aus Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Elongation kann die DNA so spezifisch exponentiell amplifiziert werden. Die in der Arbeit angewendeten Abwandlungen der PCR sind im Folgenden genauer erläutert.

Standard-PCR-Ansatz 50 μl :

1x PCR-Puffer (10x Roche)
 200 μM dNTP-Mix (10 mM)
 0,5 μM *forward* Primer (100 μM)
 0,5 μM *reverse* Primer (100 μM)
 5 U Taq DNA-Polymerase (5 U/ μl)
 100-200 ng Matrizen-DNA
ad dH_2O 50 μl

PCR-Standardprogramm:

Schritt	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	94 °C	3 min	} 30-40 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Hybridisierung	55-60 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
finale Elongation	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

Kolonie-PCR

Ziel der Kolonie-PCR ist es, zu überprüfen, ob die Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor oder eine Transformation von Bakterien mit einem gewünschten Vektorkonstrukt erfolgreich war. Dafür wurden einzelne Bakterienkolonien von einer LB-Agarplatte isoliert und direkt im PCR-Ansatz aufgenommen. Die verwendeten Primer (s. Abschnitt 2.1.11.7, oder genspezifische Primer) flankierten das DNA-Insert, so dass positive Klone eindeutig anhand einer Bande bestimmter Größe auf einem Agarose-Gel zu identifizieren waren. Die Kolonie-PCR wurde dazu in 20 μl Reaktionsvolumen mit 1 U Taq DNA-Polymerase bei 53 °C Hybridisierungs-Temperatur für 25 Zyklen durchgeführt.

***In vitro* PCR-Mutagenese**

Die PCR-Mutagenese ist eine Methode, um zielgerichtet Punktmutationen in eine Nukleotidsequenz einzuführen. Dies ist häufig für Funktionsanalysen eines Proteins notwendig. Die zur Mutagenese-PCR verwendeten Primer waren größtenteils zur Zielsequenz komplementär, enthielten aber zusätzlich die gewünschten Nukleotidaustausche. Die Primer wurden zudem so gewählt, dass die PCR-Produkte am Ende an beiden Seiten noch Restriktionsschnittstellen aufwiesen, um das spätere Klonieren in einen spezifischen Vektor zu vereinfachen. Siehe auch Abschnitt 2.2.2.10 sowie Abb. 2.1.

2.2.2.7 Klonierung

Bei der Klonierung wird ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Plasmid-Vektor integriert und anschließend in geeigneten Wirtszellen vermehrt. Manche Plasmide sind dabei auf reine DNA-Amplifikation andere auf Sequenzierungs- oder Expressionsversuche optimiert.

TOPO-TA Klonierung

Eine Möglichkeit der Klonierung ist die Verwendung des „TOPO® TA Cloning® Kit“. Mit diesem Kit ist die direkte Insertion eines Taq DNA-Polymerase amplifizierten PCR-Produktes in den Vektor pCR®2.1-TOPO® (s. Abb. 5.1) ohne vorherigen Restriktionsverdau möglich. Die Klonierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Vektor konnte im Anschluss in chemisch kompetente *E. coli* „One Shot® TOP10“ transformiert werden.

2.2.2.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die Sequenzen in doppelsträngiger DNA spezifisch erkennen und die Phosphodiesterbindung in jedem Strang spalten. Dadurch lassen sich definierte DNA-Fragmente leicht herstellen und anschließend wieder mit komplementären 5'- und 3'- Überhängen ligieren. Alle Restriktionsspaltungen wurden in den vom Hersteller empfohlenen Puffern unter den angegebenen Bedingungen mit der entsprechenden Enzymmenge durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug zwischen 25-100 µl. Falls der Reaktionspuffer kompatibel war, und die Schnittstellen weit genug voneinander entfernt lagen, wurden auch Doppelspaltungen mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig durchgeführt. Falls nur der Puffer kompatibel war, die Schnittstellen aber zu eng nebeneinander lagen, wurde das erste Enzym hitzeinaktiviert bevor das zweite Enzym hinzugegeben wurde. Bei Doppelspaltungen mit Enzymen, die in verschiedenen Puffersystemen arbeiteten, wurde das „MiniElute PCR Purification Kit“ zum Pufferaustausch verwendet. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind unter Abschnitt 2.1.10 aufgelistet.

Präparativer Restriktionsverdau 50 µl:	100-200 ng PCR-Produkt bzw. 1-5 µg Vektor-DNA 5 µl 10x Puffer 2-3 µl Restriktionsenzym ev. 0,5 µl BSA (100x) ad dH ₂ O 50 µl
--	---

2.2.2.9 Ligation von DNA-Molekülen

DNA-Fragmente, die nach einem Restriktionsverdau überlappende Enden mit komplementären Sequenzen besitzen, können durch eine Ligation kovalent miteinander verbunden werden. Die Reaktion wird durch das Enzym T4 DNA Ligase ermöglicht, das unter ATP-Verbrauch die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der freien 3'-Hydroxylgruppe des einen und der freien 5'-Phosphatgruppe des anderen DNA-Fragmentes katalysiert. Bei der Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor sollte das molare Verhältnis von linearisiertem Vektor zu DNA-Fragment mindestens 1:3 betragen, um eine Eigenligation des Vektors zu minimieren. Zur Kontrolle der Autoligation des Vektors wurde parallel eine Kontrollligation des geschnittenen Vektors ohne DNA-Fragment durchgeführt. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben über Nacht bei 16 °C.

Ligationsansatz 20 µl:	x µl DNA-Fragment 1
	y µl DNA-Fragment 2 oder Vektor-DNA
	1 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl)
	4 µl 5x T4 Ligase Puffer
	ad dH ₂ O 20 µl

Bei einigen Ansätzen wurde der Vektor nach der Linearisierung und vor der Ligation dephosphoryliert, um die Wahrscheinlichkeit der Eigenligation herabzusetzen. Das Enzym Alkalische Phosphatase spaltet im alkalischen Milieu die 5'-Phosphat-Gruppen von Nukleinsäuren ab und verhindert so ein Religieren des Vektors durch die T4 DNA Ligase. Eine erfolgreiche Ligation kann dann nur zwischen dephosphoryliertem Vektor und dem gewünschten DNA-Fragment, das die Phosphatgruppen noch besitzt, stattfinden. Für diesen Ansatz wurde das „Rapid DNA Dephos & Ligation Kit“ nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.2.10 Klonierung von EcIF1wt und EcIF1-Mutanten

In der vorliegenden Arbeit wurde der Translationsinitiationsfaktor EcIF1 von *E. coli* kloniert und mutagenisiert. Der EcIF1wt und fünf Mutanten (EcIF1-V31M, EcIF1-H30A, EcIF1-H35A, EcIF1-Y44F, EcIF1-Y60F) wurden dazu aus der Diplomarbeit (Bruder, 2009) weiterverwendet. Die Mutagenese-strategie für die weiteren Mutanten entspricht der bereits beschriebenen. Das Prinzip der EcIF1-Mutagenese ist in Abb. 2.1 nochmals verdeutlicht.

Die Sequenzen wurden zunächst über eine PCR mit den Primern unter Abschnitt 2.1.11.2 amplifiziert und anschließend in den pCR®2.1-TOPO® Vektor (s. Abb. 5.1) zwischenkloniert. Nach weiteren Restriktionsspaltungen mit *Bam*HI und *Hind*III wurden die Sequenzen für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* in den Vektor pQE30 (s. Abb. 5.2) umgesetzt. Der Vektor codiert N-terminal für die Sequenz MRGS-His₆-GS. Die pQE30-Plasmide wurden für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* „DH5α F'IQ“ transfiziert.

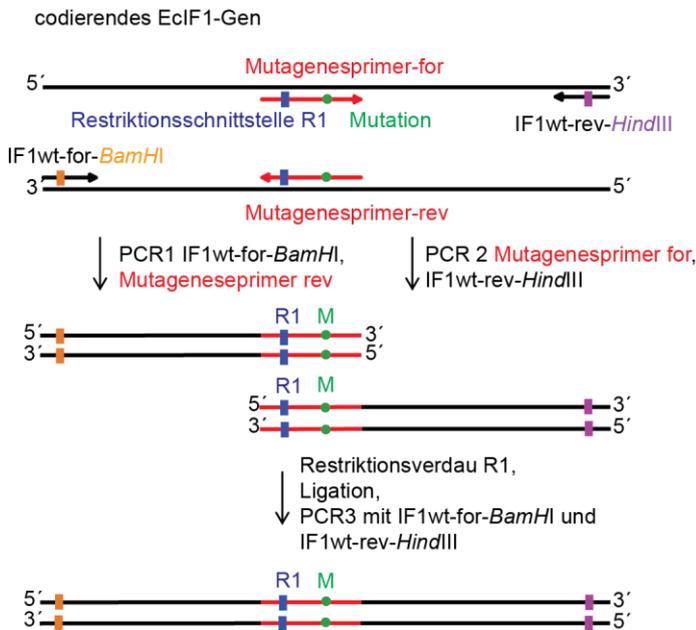


Abb. 2.1: Prinzip der PCR-Mutagenese von EciF1.

Der EciF1wt lag bereits im pQE30-Vektor vor. Die gewünschten Mutationen wurden durch zwei PCRs mit den Primern IF1wt-for-BamHI/ Mutageneseprimer-rev und IF1wt-rev-HindIII/ Mutageneseprimer-for in die Sequenz eingebracht (s. Abschnitt 2.1.11.2). Die Mutageneseprimer tragen sowohl die Mutation für den Aminosäureaustausch als auch stille Mutationen für die Restriktionsschnittstelle R1. Nach Restriktionsverdau mit R1, Ligation und einer weiteren PCR mit den IF1wt-Primern wurde die mutierte Sequenz in den pCR®2.1-TOPO®-Vektor zwischenkloniert. Durch BamHI- und HindIII-Verdau konnte die Sequenz im nächsten Schritt in den Expressionsvektor pQE30 umkloniert werden (verändert nach Bruder, 2009).

2.2.2.11 Klonierung einiger humaner Proteine

Die codierenden Sequenzen der humanen Proteine eIF1AY und des „Neuron-specific protein family member 1“ (NSP1) wurden aus gewonnener cDNA (s. Abschnitt 2.2.1) amplifiziert. Für das eIF1AY wurden dazu die Primer eIF1A-for-BamHI und eIF1A-rev-HindIII verwendet (s. Abschnitt 2.1.11.3). Das Produkt wurde anschließend über BamHI- und HindIII-Verdau in den Vektor pQE30 (s. Abb. 5.2) kloniert. Vom NSP1 wurden zwei Varianten, eine mit und eine ohne die Transmembrandomäne (Δ As 86-102) kloniert (s. Abb. 2.2). Das vollständige Produkt NSP1 wurde durch die Primer NSP1-1-BamHI-for und NSP1-2-HindIII-rev gewonnen, während das verkürzte Produkt NSP1 Δ aus zwei Teilstücken durch Amplifikation mit den Primern NSP1-1-BamHI-for und NSP1-3-AccI-rev bzw. NSP1-4-AccI-for und NSP1-2-HindIII-rev kloniert und anschließend durch AccI-Verdau zusammengefügt wurde (s. Abschnitt 2.1.11.6). Beide Konstrukte wurden im nächsten Schritt durch BamHI- und HindIII-Verdau in den Vektor pQE30 (s. Abb. 5.2) kloniert und in *E. coli* „DH5 α F'IQ“ transfiziert.

Typ II

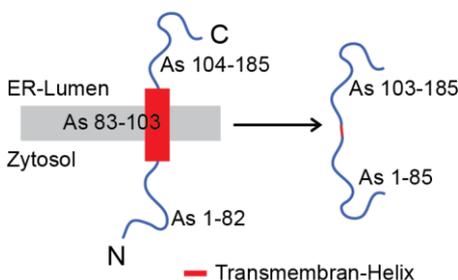


Abb. 2.2: Klonierungsstrategie der Proteine NSP1 und NSP1 Δ .

Das NSP1-Protein gilt als Transmembran-Protein-Typ II mit einer α -Helix als Transmembrandomäne. Während der N-Terminus zytosolisch ist, zeigt der C-Terminus in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Da es noch keine experimentelle Struktur des NSP1-Proteins gibt, basiert dieses Modell auf Strukturvorhersagen. Um ein besser lösliches Produkt zu erhalten, wurde eine Variante NSP1 Δ ohne hydrophobe Transmembrandomäne (TMD, rot) kloniert, indem die As 86-102 entfernt wurden. Dadurch sollte das Protein besser löslich in *E. coli* exprimiert werden.

Die Sequenz des „Splicing factor, arginine/serine-rich 17A“ (SF17A) wurde durch die Primer SF17A-BamHI-for und SF17A-SalI-rev (s. Abschnitt 2.1.11.6) aus der cDNA-Library „IRAT Platte 970 Reihe 50 F8 (IRATp970F0850D; BI910373; BC028151)“ aus der „Microchemistry Core Facility“ des MPI

für Biochemie amplifiziert. Im Anschluss wurde es durch *Bam*HI- und *Sal*I-Verdau in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* „DH5 α F'IQ“ transfiziert.

2.2.2.12 Klonierung von M88

Die TZR-Sequenz (γ - und δ -Kette) von M88 für die erste HEK293E-Expression wurde von der Firma GeneArt® (Regensburg) durch Gensynthese hergestellt und über *Eco*RI- und *Bam*HI-Verdau in den pTT5-Vektor kloniert (s. Abb. 5.3, Abb. 5.4a, b und Abschnitt 5.2.3). Die pTT5-Vektor-Konstrukte konnten für die rekombinante Proteinexpression in HEK293E-Zellen eingesetzt werden.

2.2.2.13 Klonierung eines chimären Konstruktes von M88

Für die Klonierung eines chimären Konstruktes von M88 aus den variablen Teilen der γ - und δ -Kette sowie den konstanten IgG-Bereichen C_{H1} und C_L für die Expression in HEK293E-Zellen wurden die Sequenzen aus Abschnitt 2.2.2.12 (s. Abb. 5.4a, b) als Matrize verwendet. Zunächst wurden die variablen Teile der γ - bzw. δ -Kette durch die Primer γ -H-chim-*Sac*II-for-2/ γ -H-chim-*Sal*I-rev bzw. δ -L-chim-*Bss*III-for/ δ -L-chim-*Kas*I-rev amplifiziert (s. Abschnitt 2.1.11.4). Anschließend wurden diese über *Sac*II/*Sal*I-Verdau in den Kassettenvektor pTT5-H-His/BirA (s. Abb. 5.5c) bzw. durch *Bss*III/*Kas*I-Verdau in den Kassettenvektor pTT5-L-Myc (s. Abb. 5.5d) kloniert (s. Abb. 5.4c, d und Abschnitt 5.2.4). Die pTT5-Vektoren wurden für die rekombinante Proteinexpression eingesetzt.

2.2.2.14 Klonierung von rekombinanten Fab-Fragmenten

Für das zweite Teilprojekt zur Untersuchung der Antigenspezifität von OKB-Antikörpern aus MS-Patienten standen die Sequenzen fünf humaner rekombinanter Fab-Fragmente (rFab-Fragmente) im pTT5-Expressionsvektor (s. Abb. 5.5a, b) zur Verfügung (Obermeier, 2011). Neben der Verwendung der alten rFab-Fragment-Sequenzen mit His₆-Peptid an der H-Kette (rFab-His₆), wurden die rFab-Fragment-Sequenzen zudem in neue Kassettenvektoren, die zusätzlich eine BirA-Erkennungssequenz an der H-Kette und ein Myc-Peptid an der L-Kette besitzen, umkloniert (rFab-His₆/BirA-Myc; s. Abb. 5.5c, d). Dazu wurde mit einer Mutagenese-PCR mit den Primern pTT5-H-*Sal*I-His/BirA-for und pTT5-H-*Bam*HI-His/BirA-rev und anschließendem *Sal*I/*Bam*HI-Verdau die BirA-Erkennungssequenz in den Kassettenvektor pTT5-H, und mit einer Mutagenese-PCR mit den Primern pTT5-L-*Kas*I-Myc-for und pTT5-L-*Bam*HI-Myc-rev und darauf folgendem *Kas*I/*Bam*HI-Verdau die Myc-Sequenz in den Kassettenvektor pTT5-L eingebracht (s. Abschnitt 2.1.11.5). Im Anschluss konnten die codierenden Sequenzen für die rFab-Fragmente wieder über *Sac*II/*Sal*I-Verdau im Falle der H-Kette und über *Bss*III/*Kas*I-Verdau im Falle der L-Kette in die neuen Kassettenvektoren pTT5-H-His/BirA und pTT5-L-Myc (s. Abb. 5.5c, d) kloniert werden. Die BirA-Erkennungssequenz wird spezifisch vom Enzym BirA erkannt, das als Biotin-Ligase Proteine spezifisch biotinylieren kann. Die pTT5-Vektoren wurden für die rekombinante Proteinexpression in HEK293E-Zellen eingesetzt.

rFab-Fragment	Nomenklatur nach Obermeier, 2011
Fab1	Fab-1039-s1
Fab2	Fab-HM-63-s8
Fab3	Fab-HM-63-s9
Fab4	Fab-NS-52
Fab5	Fab-HM-63-s2
α -MOG-Fab	Fab-8-18C5

2.2.2.15 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden vom Sequenzierservice des Max-Planck-Instituts für Biochemie (Martinsried) und des Biozentrums der Ludwig-Maximilians-Universität (München) durchgeführt. Als Primer wurden entweder die unter Abschnitt 2.1.11.7 aufgelisteten oder die genspezifischen Primer verwendet. Die Sequenzen wurden mit dem Programm „Chromas Lite Version 2.01“ ausgewertet.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Anzucht von Bakterien auf Agarplatten und als Flüssigkulturen

Für die Herstellung von Agarplatten wurden dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde der LB-Agar auf ca. 50 °C abgekühlt und 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin zugefügt. Der flüssige LB-Agar wurde in sterile Plastikschalen gegossen, bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und anschließend bei 4 °C gelagert.

Zur Anzucht von Bakterien auf Agarplatten wurden 20-200 µl der Bakteriensuspension auf eine Agarplatte gegeben und mithilfe eines abgeflamten Drigalski-Spatels gleichmäßig ausgestrichen. Die Platten wurden mit dem Deckel nach unten über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und konnten danach bei Bedarf einige Tage im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden.

Für die Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen wurde eine einzelne Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Agarplatte entnommen und in ein steriles Gefäß mit flüssigem LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) überführt. Die angeimpften Kulturen wurden über Nacht auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert.

LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto™ Agar (BD Biosciences) pH 7; autoklaviert gegebenenfalls wurden Antibiotika und 1 % Glukose zugefügt
LB-Medium:	1 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract (BD Biosciences) 1 % (w/v) Bacto™ Tryptone (BD Biosciences) pH 7; autoklaviert gegebenenfalls wurden Antibiotika und 1 % Glukose zugefügt

2.3.2 Konservierung von Bakterienkulturen

Zur Konservierung von Bakterienstämmen dienten Glycerin-Kulturen. Dazu wurde die Bakterienkultur 1:1 mit sterilem 87 % Glycerin in Einfrierröhrchen vermischt und bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation

Für die Transformation durch Elektroporation wurden elektrokompente Bakterien hergestellt. Dazu wurden zunächst 20 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin mit dem *E. coli* Stamm „Max Efficiency® DH5α F'IQTM“ angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Mit je 6 ml der Vorkultur wurden am nächsten Tag zweimal 500 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin angeimpft und bei 37 °C im Schüttler inkubiert, bis eine optische Dichte bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ ($\text{OD}_{600 \text{ nm}}$) von 0,5 und damit die logarithmische Wachstumsphase erreicht war. Nach einem 30-minütigem Inkubationsschritt auf Eis wurden die Kulturen in vorgekühlten Zentrifugengefäßen für 15 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde anschließend dreimal mit je 1.000 ml, 500 ml und 20 ml eiskaltem sterilem 10 % Glycerin gewaschen und dazwischen immer für 15 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Im letzten Schritt wurden die kompetenten Bakterien in 2 ml sterilem 10 % Glycerin resuspendiert und zu je 50 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße auf Trockeneis aliquotiert. Nach Kontrolle der Transformationseffizienz mit 10 µg des Kontrollplasmids pUC10 (Invitrogen) (s. Abschnitt 2.3.4.1) wurden die elektrokompenten Bakterien bei -80 °C gelagert.

2.3.4 Transformation von Bakterien

2.3.4.1 Transformation durch Elektroporation

Die Elektroporation ist eine effiziente Methode, um Bakterien mit Plasmid-DNA zu transformieren. Durch kurzzeitiges Anlegen eines elektrischen Feldes bilden sich Poren in der Bakterienwand, durch die die DNA in die Zellen gelangen kann.

50 µl elektrokompente *E. coli* „DH5α“ oder *E. coli* „DH5α F'IQ“ wurden zunächst für 10 min auf Eis aufgetaut. Es wurden 1-2 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz zu den Bakterien gegeben und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm, Bio-Rad) überführt. Als Positivkontrolle wurde das pUC10-Plasmid und als Negativkontrolle zum Beispiel ein leerer linearisierter Vektor ohne ligiertes DNA-Fragment eingesetzt. Nach der Elektroporation am Gerät „Gene Pulser® II“ bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF wurden die Bakterien sofort in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und für 60 min bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl, 50 µl und 20 µl der Bakterienkultur auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die positiv selektionierten Klone konnten am nächsten Tag weiter verwendet werden.

2.3.4.2 Transformation durch Hitzeschock

Für die Hitzeschock-Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* „One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells“ verwendet. Die Transformation wurde mit 1-5 µl Plasmid oder Ligationsansatz nach Herstellerangaben durchgeführt.

Im Falle der TOPO-TA-Klonierung erfolgte eine Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien über eine Blau-Weiß-Selektion. Der pCR®2.1-TOPO®-Vektor trägt das Gen lacZ, das für das Enzym β-Galaktosidase codiert. Dieses Enzym spaltet X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galacto-

pyranosid) in Galaktose und Indoxyl, das zu einem blauen Indigofarbstoff oxidiert. Bei erfolgreicher Insertion eines PCR-Produktes während der TOPO-TA-Klonierung (s. Abschnitt 2.2.2.7) in den Vektor wird das lacZ-Gen inaktiviert, während eine Religation des Plasmids zu einem funktionsfähigen lacZ-Gen führt. Daher zeigen weiß gefärbte Kolonien eine erfolgreiche Insertion des PCR-Produktes an, während blaue Kolonien Bakterien mit einem leeren pCR®2.1-TOPO®-Vektor anzeigen. Für diese Art der Selektion wurden 40 µl X-Gal Stammlösung vor dem Ausplattieren der Bakterien auf die LB-Amp-Platten aufgetragen. Anschließend wurden die Bakterien ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Positive weiße Klone konnten am nächsten Tag isoliert werden.

X-Gal Stammlösung (40 mg/ml): 400 mg X-Gal in 10 ml Dimethylformamid (DMF), sterilfiltriert

2.3.5 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Das Expressionssystem „QIAexpress“ von Qiagen erlaubt die effiziente Expression und Reinigung von Proteinen im bakteriellen System *E. coli* „DH5α F'IQ“. Der verwendete Vektor pQE30 (s. Abb. 5.2) enthält alle Elemente, die für eine Proteinexpression in Bakterien nötig sind. Die Expression des gewünschten Proteins kann durch Zugabe von Isopropylthio-β-Galaktosid (IPTG) induziert werden. Um die exprimierten Proteine zu isolieren, befindet sich am N-Terminus des Proteins die zwölf Aminosäuren lange Sequenz MRGS-His₆-GS, die für sechs Histidine codiert, und somit eine Reinigung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie ermöglicht.

Für die Proteinexpression von EcIF1wt, EcIF1-Mutanten, eIF1AY, SF17A, NSP1 sowie NSP1Δ wurden einzelne Bakterienklone in LB-Amp-Medium (100 µg/ml Ampicillin, teilweise noch mit 50 µg/ml Kanamycin) bei 37 °C unter Schütteln angezogen, bis die logarithmische Wachstumsphase erreicht war (OD_{600 nm} 0,4-0,8). Der Bakterienkultur wurde dann IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM hinzugefügt. Die Bakterien wurden anschließend für weitere 2-4 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Da die Proteine SF17A, NSP1 und NSP1Δ unter diesen Bedingungen als „inclusion bodies“ exprimiert wurden, wurden sie in einer weiteren Expression bei 27 °C kultiviert und erst bei einer OD_{600 nm} von 1 für nur 45-90 min induziert. Damit sollte die Löslichkeit der Proteine besser erhalten bleiben. Danach wurden die Kulturen für 5 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment, das die Bakterien mit dem rekombinant exprimierten Protein enthält, wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Als Negativkontrolle wurden *E. coli* „DH5α F'IQ“ verwendet, die mit MOG (mi-MOG; Amor et al., 1994) transfiziert waren.

2.3.6 Expression eines sc-Fv-M88-TZR in *E. coli*

Für die Expression eines löslichen „single-chain-Fv“-M88-TZR (sc-Fv-M88-TZR; M88 Vγ1.3⁺Vδ2⁺) im *E. coli* Stamm „BL21-StarTM-DE3“ wurde das Konstrukt aus Dornmair et al., 2004 (in Kooperation mit K. Dornmair) in das bakterielle Expressionsplasmid pET33b(+) umklontiert. Es besteht aus den Aminosäuren 1-94 der Vδ-Region, der vollständigen nDnJδ-Region und der ersten Aminosäure der Cδ-Region, die durch einen 14 Aminosäure langen *Linker* (GS₄GVDGS₃GS) mit den Aminosäuren 1-

94 der V γ , der vollständigen nJ γ sowie den ersten 20 Aminosäuren der C γ -Region verbunden sind (s. Abschnitt 5.2.2). Das Konstrukt hat allerdings keine Signalsequenz mehr. Zusätzlich besitzt der sc-Fv-M88-TZR C-terminal ein Myc- und His₆-Peptid. Um die Expression des sc-Fv-M88-TZR zu unterdrücken, wurden die Bakterien in Gegenwart von 2 mM Glukose und 50 μ g/ml Kanamycin in LB-Medium kultiviert. Nach dem Waschen der Bakterien durch Zentrifugation wurden die Bakterien in Medium ohne Glukose aufgenommen und die Expression des sc-Fv-M88-TZR wurde durch 2 mM IPTG induziert. Wachstumskurven wurden durch Messung der OD der Bakterienkultur bei $\lambda = 600$ nm aufgezeichnet.

2.3.7 Antigen suche mit einer *E. coli* cDNA-Bibliothek

Für die Antigen suche von M88 wurde eine cDNA-Bibliothek-Analyse in Kooperation mit K. Dornmair durchgeführt. Dafür wurde der *E. coli* Stamm „BL21-StarTM-DE3“, der stabil mit dem sc-Fv-M88-TZR im bakteriellen Expressionsplasmid pET33b(+) transfiziert ist (s. Abschnitt 2.3.6 und 5.2.2), mit einer bakteriellen *E. coli* cDNA-Expressions-Bibliothek im Vektor pET21c(+) (s. Abschnitt 2.2.1, Absatz 2) durch Elektroporation supertransfiziert. Anschließend wurden die Bakterien für 30 min bei 37 °C in LB-Medium mit 2 mM Glukose unter Schütteln kultiviert. Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml hinzugefügt und nach weiteren 30 min Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 μ g/ml. Nach 30 min wurden die Bakterien durch Zentrifugation gewaschen, in LB-Medium ohne Glukose aufgenommen und für weitere 30 min kultiviert. Die Expression wurde durch Hinzufügen von 1 mM IPTG induziert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin, 50 μ g/ml Kanamycin und 1 mM IPTG ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Nach 40 h wurden die größten Klone gepickt und in Suspensionskulturen mit Ampicillin und Glukose angezogen. Im nächsten Schritt wurden die Plasmide isoliert und sequenziert. In einem Kontrollexperiment wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin, 50 μ g/ml Kanamycin und 2 mM Glukose angezogen, um die Expression zu unterdrücken. Bei diesen Platten wurden Klone gleicher Größe schon nach 18 h Inkubation bei 37 °C sichtbar.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Maus-T-Zell-Hybridome

2.4.1.1 Kultivierung

Es wurde die immortalisierte 58 α^- 3 β^- Maus-T-Zell-Hybridomlinie verwendet, die keinen endogenen TZR mehr besitzt (Letourneur und Malissen, 1989; Blank et al., 1993). Sie wurde mit den γ - und δ -Ketten des TZR M88 in pRSV5-Vektoren transfiziert (K. Dornmair) und exprimiert diesen auf der Zelloberfläche. Die Kultivierung erfolgte in Suspensionskulturen bei 37 °C und 5 % CO₂ in verschiedenen großen Zellkulturgefäßen (Costar®, Corning). Als Medium wurde RPMI 1640 verwendet, das mit 5-10 % FCS, 100 μ g/ml Penicillin/Streptomycin, 1x nichtessentielle Aminosäuren sowie 1 mM Natriumpyruvat versetzt war (Komplettmedium). Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks wurden die

Antibiotika Geneticin G418 und Hygromycin B in einer Endkonzentration von 1,5 mg/ml bzw. 0,3 mg/ml zugefügt. Wenn eine bestimmte Zelldichte erreicht war, wurde ein Teil der Zellen verworfen und die restlichen Zellen wurden mit frischem Medium weiter kultiviert.

Die TZR-Mutanten von M88 (Wiendl et al., 2002) wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten.

RPMI-Komplettmedium:	500 ml RPMI 1640 + L-Glutamin (GIBCO®, Invitrogen) 5-10 % Fötale Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich) 1 % Penicillin/Streptomycin (GIBCO®, Invitrogen) 1 % Nichtessentielle Aminosäuren (MEM NEAA, GIBCO®, Invitrogen) 1 % Natriumpyruvat (GIBCO®, Invitrogen) gegebenenfalls Antibiotika Geneticin G418 und Hygromycin B
Einfríermedium für 58-Zellen:	10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in FCS (Sigma-Aldrich)

2.4.1.2 Aktivierung von Wildtyp und mutierten M88-Hybridomen

M88-T-Zell-Hybridome können für die Antigensuche eingesetzt werden, da sie nach Aktivierung durch Antigene in der Lage sind, IL-2 in den Zellkulturüberstand zu sezernieren. Das IL-2 kann anschließend in einem IL-2 ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (s. Abschnitt 2.6.2) gemessen werden.

Für alle T-Zell-Aktivierungsexperimente wurden 50 µl der Kandidaten- oder Kontrollproteine für 1-3 h bei 37 °C an eine 96-Well-Flachbodenplatte (Corning® 3596 Costar® 96 Well Cell Culture Cluster, Corning) adsorbiert. Als Positivkontrolle wurden bei allen Experimenten 50 µl eines monoklonalen α-CD3-Antikörpers (1 µg/ml in PBS) adsorbiert, der bei dieser Konzentration zur sicheren Aktivierung der T-Zell-Hybridome führt. Als Negativkontrolle wurden, falls nicht anders angegeben, M88-Hybridome verwendet, die ohne Antigen im Komplettmedium inkubiert wurden.

Proteinproben aus den HPLC-Experimenten wurden direkt im HPLC-Laufpuffer adsorbiert.

Bei den Antikörperblockierungsexperimenten wurden 0,5 µg der AA-RS zunächst für 2 h bei 37 °C in PBS adsorbiert und anschließend mit 200 µl PBS gewaschen. Daraufhin wurden 50 µl der Antikörperlösungen in Komplettmedium zugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das polyklonale humane α-hH-RS (Jo-1) Serum wurde in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 eingesetzt und der monoklonale α-hH-RS-Antikörper sowie die Isotypkontrolle X40 in einer Endkonzentration von 10 µg/ml.

Bei den Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden der EcIF1wt und die Mutanten in Konzentrationen zwischen 0,1-10 µg/Well, oder bei eIF1AY in derselben molaren Konzentration, in 50 µl 50 mM Naphosphat, 300 mM NaCl pH 7,8 oder PBS für 3 h bei 37 °C adsorbiert.

Zur Untersuchung des denaturierten EcIF1 wurden 10 µg/Well des Wildtyps für 3 h bei 37 °C in PBS adsorbiert und nach einem Waschschrít mit PBS wurden 50 µl 6 M Harnstoff, 1 M HCl, 1 M NaOH oder 100 % Ethanol für 30 min bei RT hinzugefügt. Eine weitere Probe wurde für 5 min bei 80 °C in der Platte inkubiert.

In einem weiterführenden Denaturierungsexperiment wurden 0,5 µg/Well der Proteine EcIF1 und hH-RS in PBS für 3 h bei 37 °C adsorbiert, danach mit PBS gewaschen und dann für 24 h bei 37 °C mit 50 µl 6 M Guanidinium-Thiocyanat (Gua⁺SCN⁻), 2 M HCl, 5 M NaOH oder 200 µg/ml Proteinase K

(Roche) inkubiert. Zudem wurden die Proteine in einem Ansatz mit 1 µg/ml Trypsin (Merck) in 25 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 für 2-3 h bei 37 °C in Lösung verdaut und anschließend adsorbiert.

In einem weiteren Experiment wurden 0,5 µg/Well hH-RS für 3 h bei 37 °C in PBS adsorbiert, gewaschen und dann mit 50 µl 6 M Gua⁺SCN⁻, 10 mM DTT in PBS oder 6 M Gua⁺SCN⁻ mit 10 mM DTT für 24 h bei 37 °C behandelt.

Bei der Durchführung der De- und Renaturierungsexperimente für die Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) wurde zunächst die Aktivierung der M88-Hybridome durch die nativ gefalteten Proteine EcIF1 und hH-RS in PBS untersucht. Eine weitere Probe wurde mit 6 M Harnstoff für 2 h bei 37°C und dann über Nacht bei RT denaturiert. Eine dritte Probe wurde durch Dialyse gegen PBS über Nacht bei RT wieder renaturiert. Je 0,5 µg der drei Proteinproben (nativ, denaturiert, renaturiert) wurden anschließend auf Aktivierung der M88-Hybridome getestet. Die De- und Renaturierungen wurden zusätzlich durch CD-Spektroskopie-Messungen überwacht (s. Abschnitt 2.5.12). Dieses Experiment wurde in Kooperation mit B. Obermeier durchgeführt.

Um die Aktivierung durch ein synthetisches Peptid EcIF1(33-46) (s. Abschnitt 2.1.12) zu analysieren, wurde es in Konzentrationen zwischen 5×10^2 - 5×10^5 µg/Well für 3 h bei 37 °C in PBS adsorbiert. Um die Kompetition des EcIF1-Peptids mit EcIF1 zu analysieren, wurden zunächst 0,5 µg/Well EcIF1 für 3 h bei 37 °C in PBS adsorbiert und nach einem Waschschrift mit PBS wurde das EcIF1-Peptid in Konzentrationen zwischen 666 - $3,3 \times 10^4$ µg/ml zusammen mit den M88-Hybridomzellen in Kompletmedium in die Wells gegeben. Dieses Experiment wurde in Kooperation mit K. Siewert durchgeführt. Für ein Kompetitionsexperiment mit EcIF1 und Trypsin-verdaulichem EcIF1 wurden zunächst 0,5 µg/Well EcIF1 für 2 h bei 37 °C in PBS adsorbiert. Parallel dazu wurde EcIF1 in PBS pH 8 für 2 h bei 37 °C mit 1 µg/ml Trypsin (Merck) verdaut. Der Verdau wurde dann für 2 min bei 80 °C gestoppt. Die Wells wurden einmal mit 200 µl PBS gewaschen und es wurden anschließend 50 µl des Verdaus als 1:1 Verdünnung in Kompletmedium mit insgesamt 5 µg Trypsin-verdaulichem EcIF1/Well für 30 min bei 37 °C zum bereits adsorbierten EcIF1 gegeben oder alleine getestet.

Bei allen Experimenten, außer bei der Antikörper-Blockierung und bei der Kompetition mit Trypsin-verdaulichem EcIF1, wurden die Proteinlösungen nach der Adsorption der Proteine an die Mikrotiterplatte entfernt und die Platten ein- bis zweimal mit 200 µl PBS oder Kompletmedium gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 40.000 M88-Hybridomzellen in einem Endvolumen von 150 µl Kompletmedium (mit 1,5 mg/ml Geneticin und 0,3 mg/ml Hygromycin B) hinzugefügt und für 16-18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. 10-50 µl des Zellkulturüberstandes wurden am nächsten Tag abgenommen und die IL-2 Konzentration im ELISA (s. Abschnitt 2.6.2) bestimmt. Als Hintergrund wurden die Signale der Hybridomzellen, die ohne Antigen inkubiert wurden, subtrahiert und die absoluten IL-2 Konzentrationen wurden durch eine Standardkurve berechnet.

2.4.2 COS-7-Zellen

2.4.2.1 Kultivierung und Expression eines sc-Fv-M88-TZR

Die adhärenzte Zelllinie COS-7 stammt aus den Nierenzellen afrikanischer Grünmeerkatzen und ist stabil mit dem SV40 Antigen transformiert (Gluzman, 1981). Die COS-7-Zellen wurden als Monolay-

er-Kulturen in RPMI-Komplettmedium in Zellkulturflaschen- und Schalen unter den gleichen Bedingungen wie die 58-Hybridomzellen kultiviert. Bei einer Konfluenz von 90 % wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS durch Trypsin-EDTA (Invitrogen) für 15 min bei 37 °C von der Oberfläche abgelöst. Anschließend wurde die Reaktion durch Medium gestoppt, die Zellen zentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Ein Teil der Zellen wurde dann in eine neue Kulturflasche überführt und weiter kultiviert.

Für die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie wurde ein lösliches sc-Fv-M88-TZR-Konstrukt in COS-7-Zellen nach Dornmair et al., 2004 exprimiert (s. auch Abschnitt 2.3.6). Dazu wurde der COS-7 Klon 2A5 verwendet, der stabil mit dem Plasmid pSecTag2Ahygro, das für den sc-Fv-M88-TZR codiert, transfiziert ist (s. Abschnitt 5.2.2). Die Zellen wurden im Komplettmedium mit 0,3-0,5 mg/ml Hygromycin B kultiviert und der Überstand, der den löslichen sc-Fv-M88-TZR enthält, wurde geerntet. Der Rezeptor wurde, wie unter Abschnitt 2.5.1.3 beschrieben, gereinigt.

2.4.3 TE671-Zellen

Die adhärenen Rhabdomyosarkom-Zellen TE671 wurden ebenso wie die COS-7-Zellen in Monolayer-Kulturen unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Die TE671-MOG-Zellen sind stabil mit der cDNA eines humanen MOG-Konstruktes im Vektor pRSV5-neo transfiziert (K. Dornmair). Als Grundmedium wurde RPMI-Komplettmedium, das bei den transfizierten TE671-Zellen mit 1,5 mg/ml Geneticin supplementiert wurde, verwendet.

2.4.4 HEK293E-Zellen

2.4.4.1 Kultivierung

HEK293E-Zellen sind modifizierte humane embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*). Diese Zelllinie wurde zur transienten Proteinexpression mit dem pTT5-Vektorsystem eingesetzt (s. Abb. 5.3). Die Zellen wurden als Suspensionskultur in Serum-freiem Medium „GIBCO® FreeStyle™ 293 Expression Medium“ im Inkubationsschüttler („Multitron“) bei 90-110 rpm, 37 °C, 8 % CO₂ und 70 % Luftfeuchtigkeit in belüfteten Erlenmeyerkolben aus Polycarbonat (Corning) kultiviert. Im Medium war zur Verminderung der Schaumbildung zusätzlich 0,1 % „Pluronic® F-68“ enthalten. Das Antibiotikum G-418 in einer Endkonzentration von 25 µg/ml sorgte zusätzlich zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks. Bei der Kultivierung wurde darauf geachtet, dass die Zellzahl stets zwischen 0,1-3 x 10⁶ Zellen/ml lag und die Zellpassage nicht größer als 30 war.

Kultiviermedium	GIBCO® FreeStyle™ 293 Expression Medium (Invitrogen) mit 0,1 % (v/v)
HEK293E-Zellen:	Pluronic® F-68 (Invitrogen) und 25 µg/ml G-418 Sulfat (PAA)
Einfriermedium für	GIBCO® FreeStyle™ 293 Expression Medium mit 10 % (v/v) DMSO;
HEK293E-Zellen:	sterilfiltriert

2.4.4.2 Transfektion und transiente Proteinexpression

Zur transienten Proteinexpression wurden die HEK293E-Zellen mit pTT5-Plasmid-DNA, die für das exprimierende Protein codiert, transfiziert (Durocher et al., 2002). Eine Stunde vor der Transfektion wurden die Zellen dazu auf eine Endkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Menge an zu transfizierender DNA lag bei $1 \mu\text{g}$ DNA pro ml Zellkultur, das heißt ein 500 ml Ansatz wurde mit $500 \mu\text{g}$ DNA transfiziert. Im Falle der rFab-Fragmente und des TZR M88, die ein Heterodimer aus leichter und schwerer Kette darstellen, wurde jeweils die Hälfte der Plasmid-DNA von der leichten Kette und die andere Hälfte von der schweren Kette verwendet. Die rFab-Fragmente wurden daher im 500 ml Ansatz mit je $250 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA von jeder Kette transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde lineares Polyethylenimin (PEI) (Boussif et al., 1995) verwendet, das aufgrund seiner positiven Ladung an die negativ geladene DNA bindet. Der Komplex kann dann von der Zelle durch Endozytose aufgenommen werden (Godbey et al., 1999). Zur Transfektion wurden 1 ml PEI (1 mg/ml) mit 4 ml „OptiPro™SFM“ (Invitrogen) verdünnt, dies entspricht einer Endkonzentration von $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ Zellsuspension für einen 500 ml Ansatz. Die DNA wurde ebenfalls in 5 ml „OptiPro™SFM“ aufgenommen. Anschließend wurde der PEI-Ansatz zum DNA-Ansatz pipettiert und für 30 min bei RT inkubiert. Die Transfektion erfolgte durch tropfenweise Zugabe des Transfektionsansatzes zu den Zellen unter leichtem Schütteln. 24 h nach der Transfektion wurde Trypton (BD Biosciences) in H_2O in einer Endkonzentration von 0,5 % hinzugefügt. Trypton ist ein tryptisches Proteinhydrolysat und kann von den Zellen zu freien Aminosäuren abgebaut werden, die diese dann direkt für die Proteinsynthese einsetzen können (Heidemann et al., 2000; Pham et al., 2003). Nach ungefähr einem Tag beginnen die Zellen mit der Proteinbiosynthese und geben das Protein in den Zellkulturüberstand ab. Nach 120 h wurde der Zellkulturüberstand mit dem sezernierten Protein geerntet. Dazu wurden die Zellen für 5 min bei 4°C und 2.500 rpm abzentrifugiert.

PEI-Stocklösung (1 mg/ml):	500 mg 25 kDa lineares PEI (Polysciences, Inc., Warrington, USA) in H_2O pH 2 gelöst, mit NaOH auf pH 7 eingestellt, dann mit H_2O auf 500 ml aufgefüllt; sterilfiltriert
5 % Trypton-Stammlösung:	50 g Bacto™ TC Lactalbumin Hydrolysate (BD Biosciences) in 1 l H_2O ; sterilfiltriert

2.4.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer nach Herstellerangaben verwendet. Tote Zellen wurden durch die Verwendung von Trypanblau als Todfarbstoff nicht berücksichtigt.

Trypanblau-Lösung 0,1 %:	0,4 % Trypan Blue Solution als 1:4 Verdünnung in PBS pH 7,4 (GIBCO®, Invitrogen); sterilfiltriert
--------------------------	---

2.4.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst bei 1.200 rpm für 6 min bei 10°C zentrifugiert und anschließend im entsprechenden Einfriermedium mit 1×10^6 - 1×10^7 Zellen/ml aufgenommen. Danach

wurden die Zellen in Einfrierröhrchen (Nunc) überführt und langsam in einer Isopropanol-Einfrierbox (Nalgene) auf -80 °C abgekühlt. Nach einigen Tagen konnten die Zellen in flüssigen Stickstoff gebracht und dort dauerhaft eingelagert werden.

Aufgetaut wurden die Zellen durch Handwärme oder im 37 °C Wasserbad. Sie wurden dann in ein Falcon mit 10 ml ihres Kultivierungsmediums ohne Zusätze überführt, um das toxische DMSO zu verdünnen. Nach 6-minütiger Zentrifugation bei 1.200 rpm und 10 °C wurde der Überstand entfernt, die Zellen in ihrem entsprechenden Kompletmedium aufgenommen und wie beschrieben kultiviert.

2.5 Proteinanalytische Methoden

2.5.1 Proteinreinigung

2.5.1.1 Reinigung löslich rekombinant exprimierter Proteine aus *E. coli*

Die Reinigung rekombinanter Fusionsproteine mit His₆-Peptid erfolgte durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie („The QIAexpressionist™“ System von Qiagen nach Herstellerangaben).

Zur Reinigung der in *E. coli* „DH5α F IQ“ rekombinant exprimierten Proteine mit N-terminalem His₆-Peptid (s. Abschnitt 2.3.5) unter nativen Bedingungen wurde das Bakteriensediment (ca. 1-2 g aus einer 500 ml Expression) zunächst auf Eis aufgetaut und in Lysepuffer aufgenommen. Um die viskose DNA zu verdauen, wurden 0,05 mg/ml DNaseI und 10 mM MgCl₂ zugefügt. Als Proteaseinhibitoren wurden 5 µg/ml Aprotinin und 100 µM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) eingesetzt. Anschließend wurden dem Ansatz zum Aufschluss der Bakterienzellwand 1 mg/ml Lysozym hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension für 15 min im Eisbad beschallt („Sonifier 450“; 30 W). Unlösliche Bakterienbestandteile wurden durch 25-minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4 °C entfernt. Der lösliche Überstand mit dem Zielprotein wurde abgenommen und mit 1-1,5 ml/min auf eine vorbereitete 3-5 ml Ni-NTA-Agarose-Säule in Lysepuffer geladen. Für kleinere Aufreinigungen wurde die Ni-NTA-Agarose im *Batch*-Verfahren mit dem Lysat inkubiert. Das im Lysepuffer enthaltene Imidazol sollte die unspezifische Bindung von Proteinen an die Ni-NTA-Agarose reduzieren. Zur Entfernung weiterer unspezifisch gebundener bakterieller Proteine wurde die Ni-NTA-Agarose mit 10, 20, bzw. 50 mM Imidazol im Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Proteine mit 250 mM Imidazol im Elutionspuffer in „*low binding*“ Eppendorf-Reaktionsgefäße eluiert. Die mi-MOG-exprimierende Negativkontrolle wurde identisch behandelt. Da das Protein allerdings bei der Expression in „*inclusion bodies*“ präzipitiert, enthält die Aufreinigung unter nativen Bedingungen als Negativkontrolle nur die mitgereinigten kontaminierenden bakteriellen Proteine (sogenannte „*mock*“-Kontrolle). Die gereinigten Proteine wurden schließlich gegen Hochsalzpuffer (50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, pH 7,8) oder PBS dialysiert und danach bei -80 °C oder 4 °C gelagert. Die Konzentration der Proteine wurde mit Hilfe eines Lowry-Tests oder einer NanoDrop-Messung bestimmt, und die Reinheit der Proben wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließende Coomassie- bzw. Silberfärbung ermittelt. Die Proteinsequenzen wurden durch Massenspektrometrie bestätigt.

Lysepuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8
Waschpuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8
	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 8
Elutionspuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8

2.5.1.2 Reinigung nicht löslich rekombinant exprimierter Proteine aus *E. coli*

Proteine aus „*inclusion bodies*“ wurden unter denaturierenden Bedingungen nach einem Protokoll von Qiagen gereinigt. Dazu wurde das Bakteriensediment auf Eis aufgetaut und in Lysepuffer aufgenommen. Dann wurde das Lysat für 30-60 min bei RT gerührt, bis die Lösung durchscheinend wurde. Nicht lösliche Bestandteile wurden bei 10.000 rpm für 25 min abgetrennt. Der Überstand wurde im Anschluss für 1 h bei RT im *Batch*-Verfahren mit der Ni-NTA-Agarose inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit Waschpuffer pH 6,3 wurden die Proteine mit Elutionspuffer pH 5,9 von der Ni-NTA-Agarose eluiert. Danach wurde mit den Proteinen wie unter Abschnitt 2.5.1.1 weiter verfahren.

Lysepuffer:	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff, pH 8,0
Waschpuffer:	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff, pH 6,3
Elutionspuffer:	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff, pH 5,9

2.5.1.3 Reinigung eines sc-Fv-M88-TZR

Der sc-Fv-M88-TZR mit His₆-Peptid aus COS-7-Zellen (s. Abschnitt 2.4.2.1) wurde über Ni-NTA-Agarose aus dem Zellkulturüberstand gereinigt und über einen Imidazolgradienten von 10-200 mM Imidazol in 50 mM Na-Phosphatpuffer mit 300 mM NaCl pH 8 an der FPLC-Apparatur eluiert. Der lösliche Rezeptor eluierte bei einer Konzentration von 75-100 mM Imidazol. Die Sequenz wurde zusätzlich durch Massenspektrometrie bestätigt. Das Eluat wurde anschließend und über ein Amicon® MWCO 10 kDa aufkonzentriert. Weitere Verunreinigungen wurden durch Gelfiltration mit einer Sepharose-12 Säule (Pharmacia) in 5 mM Na-Acetat, 3 mM Na-Phosphat und 50 mM NaCl pH 7,4 bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,8 ml/min entfernt (modifiziert nach Dornmair et al., 2004).

2.5.1.4 Reinigung von rekombinant exprimierten Fab-Fragmenten

Die rekombinant in HEK293E-Zellen exprimierten, monoklonalen und humanen Fab-Fragmente wurden durch ein C-terminales His₆-Peptid an der H-Kette über Ni-NTA-Agarose gereinigt. Dazu wurde der bereits zentrifugierte Zellkulturüberstand aus Abschnitt 2.4.4.2 weiterverwendet. Weitere Zelltrümmer wurden zunächst durch 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12.500 rpm abgetrennt. Im nächsten Schritt wurde der Zellkulturüberstand auf 1x PBS, 10 mM Imidazol und pH 7,5-8 (mit Tris-HCl pH 8,6) eingestellt. Zusätzlich wurde der Proteaseinhibitor PMSF in einer Endkonzentration von 100 µM zugefügt. Um weitere Partikel und Membranreste zu entfernen, wurde der Überstand über einen 0,22 µm Sterilfilter (Millipore) filtriert. Danach wurde er mit 1,5 ml/min auf eine vorbereitete 1,5 x 10 cm Luer-Lock-Säule mit Durchflussadapter (Sigma-Aldrich) mit 5 ml Ni-NTA-Agarose in 10 mM Imidazol in PBS pH 8 bei 4 °C geladen. Im Anschluss wurde die Säule mit 20 Säulenvolumen

10-20 mM Imidazol in PBS pH 8 gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte an der FPLC-Apparatur mit 200 mM Imidazol in PBS pH 8 (s. Abschnitt 2.5.1.5).

2.5.1.5 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Die rFab-Fragmente wurden an einer FPLC-Apparatur von der Ni-NTA-Agarose-Säule (s. Abschnitt 2.5.1.4) eluiert. Das System besteht aus einer Kontrolleinheit „LCC-501 Plus“, die zwei Pumpen steuert, und einem UV-Detektor („Uvicord SD“), über den sich die Elution der Proteine durch die Absorption der aromatischen Aminosäuren bei $\lambda = 277$ nm verfolgen lässt. Die beiden Pumpen wurden zunächst mit Wasser gespült und anschließend mit PBS pH 7,4 bzw. 200 mM Imidazol in PBS pH 8 beladen. Dann wurde die Ni-NTA-Agarose-Säule angeschlossen und solange weiter mit 10-20 mM Imidazol in PBS gewaschen, bis keine unspezifischen Proteine mehr eluiert wurden. Die Puffermischung kann dabei durch die Kontrolleinheit gesteuert werden. Die Elution erfolgte bei 200 mM Imidazol in PBS pH 8. Der Elutionspeak wurde gesammelt, gegen PBS dialysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proteine wurden bei 4 °C gelagert.

2.5.1.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Zur weiteren Proteinreinigung und Fraktionierung unter nativen Bedingungen wurden einige Proteine einer Gelfiltration unterzogen. Dabei werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, wobei große Proteine in früheren Fraktionen eluieren als kleine Proteine.

Es wurde das HPLC-Gerät „HP 1100“ und eine Silicagel-basierte „TSK-Gel® G2000 SW_{XL} (7,8 mm x 30 cm; Partikelgröße 5,0 μ m)“ Säule von Tosoh Bioscience mit einem Auftrennungsspektrum von 5-150 kDa verwendet. Als Laufpuffer diente 200 mM Na-Phosphatpuffer, 200 mM NaCl, pH 6,8 bei einer Geschwindigkeit von 0,8 ml/min. Es wurden jeweils 27-30 μ g der Proteine auf die Säule aufgetragen und analysiert. Die Elutionsprofile wurden bei $\lambda = 210$ nm aufgezeichnet und anschließend im Programm „R“ normalisiert, da nicht die absolute Signalintensität sondern der Elutionszeitpunkt betrachtet wurde. Zwölf Fraktionen im Zeitraum von ca. 5-21 min (entspricht ca. 150-5 kDa) wurden abwechselnd für einen M88-Hybridom-Aktivierungsversuch (s. Abschnitt 2.4.1.2) direkt in eine 96-Well-Flachbodenplatte und für eine SDS-PAGE sowie für eine massenspektrometrische Analyse in einem „low binding“ Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Aktivierung der M88-Hybridome durch bestimmte Fraktionen wurde anschließend mit dem Elutionsprofil des Proteins verglichen, wobei nicht auf die absolute Signalstärke, sondern vielmehr auf die Überlappung der M88-Aktivierung mit der HPLC-Elutionskurve geachtet wurde.

2.5.2 Dialyse

Mithilfe der Dialyse durch eine semipermeable Membran können Proteine von Salzen und anderen niedermolekularen Komponenten getrennt werden. Die Molekulargewichtsausschlussgröße (MWCO) ist dabei durch den Porendurchmesser der Dialysemembran vorgegeben.

Bei kleinen Volumina der zu dialysierenden Lösungen (bis 200 µl) wurden „D-Tube™ Dialyzer Mini“ Dialysegefäße von Novagen mit einer MWCO von 3 kDa oder 12-14 kDa verwendet, bei größeren Volumina von 1-3 ml dagegen die „D-Tube™ Dialyzer Maxi“ Dialysegefäße mit gleichem Ausschlussvolumen. Bei noch größeren Volumina wurden Dialyseschläuche (Spectra/Por® 6 Dialysis Membrane, Carl Roth) mit einer MWCO von 2 kDa, 3,5 kDa oder 12-14 kDa verwendet. Die Dialysen wurden gegen verschiedene Puffer, meist gegen PBS, über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

2.5.3 Konzentrierung durch Ultrafiltration

Für manche Experimente war es nötig, Proteine in ihrer nativen Form zu konzentrieren. Dafür wurden spezielle Zentrifugationseinheiten der Firma Millipore (Amicon®) nach Herstellerangaben verwendet. Je nach Menge und Proteingröße wurden Amicon-Einheiten von 0,5 ml (Amicon® Ultra-0,5) bis 4 ml (Amicon® Ultra-4) und einer MWCO von 10 kDa, 30 kDa oder 100 kDa gewählt.

2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, indem sie aufgrund ihrer Ladung im elektrischen Feld durch eine poröse Polyacrylamid-Matrix wandern. Es wurden 4-20 %-ige Gradienten-Minigele (Novex® Tris-Glycine Mini Gel, 8 x 8 cm), die ein sehr breites Auftrennungsspektrum besitzen, sowie selbstgegossene 12 %-ige Midigele (ca. 17,5 x 16,5 cm) (s. Abschnitt 2.5.6) verwendet. Zur Entfaltung der Proteine wurden der Probe und dem Laufpuffer das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt. Sollten Proteine unter völlig denaturierenden Bedingungen getrennt werden, so wurden die Proben mit reduzierendem SDS-Auftragspuffer (Laemmli, 1970) mit SDS und β-Mercaptoethanol versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. β-Mercaptoethanol ist ein Reduktionsmittel, das Disulfidbrücken in Proteinen trennt. Daneben konnten die Proteine auch mit einem nicht-reduzierenden SDS-Auftragspuffer versetzt werden, damit die Disulfidbrücken intakt blieben. Alle Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Danach wurden die Proben (5-30 µl) auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte für Minigele bei konstanten 130 V für 90 min und bei Midigelen bei konstanten 55 V über Nacht in einer Elektrophoreseapparatur, die mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt war.

Als Molekulargewichtsstandard wurde der „Wide Range SigmaMarker™“ nach Herstellerangaben verwendet. Pro Gel wurden jeweils 10 µl des in 100 µl dH₂O gelösten Standards aufgetragen. Bei anschließenden Silberfärbungen wurden 100 µl des Größenstandards mit 500 µl 20 % Glycerin verdünnt und je 5 µl auf ein Gel aufgetragen. Sollte das Gel nach der Elektrophorese auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert werden (s. Abschnitt 2.5.8), so wurden je nach Größe des Gels 10-20 µl des „Full Range Rainbow Marker“, bei dem die Proteine schon vorgefärbt sind, verwendet.

3x reduzierender SDS-Auftragspuffer:	0,15 M Tris-HCl pH 6,8
	15 % (w/v) SDS
	45 % (v/v) Glycerin

	6 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
5x nicht-reduzierender SDS-Auftragspuffer:	0,2 M Tris-HCl pH 6,8 7,5 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
1x SDS-Laufpuffer:	0,1 % (w/v) SDS 24 mM Tris 192 mM Glycin

2.5.5 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Als IEF wird die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem isoelektrischen Punkt bezeichnet. Für die IEF des denaturierten Hirnlysats (s. Abschnitt 2.5.9.1) wurden 17 cm lange Polyacrylamid-Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) pH 3-10 eingesetzt. Der IPG-Streifen wurde mit 450 μ l der Proteinprobe in IEF-Rehydrierungspuffer in einer Trägerkammer nach Herstellerangaben über Nacht bei RT rehydriert. Zur Fokussierung wurde das Gerät „Hoefer IEF 100“ verwendet und das folgende Fokussierungsprotokoll angewendet: 1 h bei konstanten 250 V, dann 1 h bei 500 V, danach 4 h als Gradient auf 3.000 V, anschließend für 10 h bei konstanten 3.000 V, darauf für 2 h bei konstanten 6.000 V und am Ende für 8 h bei 500 V. Die Fokussierung lief bei konstanten 100 μ A und RT. Am Ende waren ca. 50 kWh erreicht. Nach der Fokussierung wurde der IEF-Streifen für 20 min im Äquilibrationpuffer A und für 20 min im Äquilibrationpuffer B inkubiert, und anschließend in eine SDS-PAGE eingesetzt. Das SDS im Äquilibrationpuffer ermöglichte dabei die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht.

IEF-Rehydrierungspuffer:	8 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 2 % CHAPS 50 mM DTT 2 % (v/v) SERVALYT TM 3-10 (40 % w/v) (Serva Electrophoresis) Bromphenolblau (0,5 %)
Äquilibrationpuffer A: Dithiothreitol-Lösung	6 M Harnstoff 20 mM DTT 2 % (w/v) SDS 30 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) Trenngelpuffer Bromphenolblau (0,5 %)
Äquilibrationpuffer B: Iodacetamid-Lösung	6 M Harnstoff 25 mM Iodacetamid (IAA) 2 % (w/v) SDS 30 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) Trenngelpuffer Bromphenolblau (0,5 %)

2.5.6 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die 2D-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE) dient der hochauflösenden Trennung von Proteingemischen. Dazu wird die IEF mit einer SDS-PAGE kombiniert. In der ersten Dimension,

der IEF, werden die Proteine, wie bereits beschrieben, nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt und in der zweiten Dimension, der SDS-PAGE, nach ihrem Molekulargewicht. Für die Auftrennung des denaturierten Hirnlysats nach der IEF wurden selbst gegossene 12 % Midigele (ca. 17,5 x 16,5 cm) verwendet. Zum Aufbau wurde der äquilibrierte IPG-Streifen kurz in SDS-Laufpuffer getaucht und auf das Polyacrylamidgel gelegt. 20 µl des „Full Range Rainbow Markers“ wurden auf ein kleines Stückchen Filterpapier pipettiert und neben dem IPG-Streifen auf dem Gel platziert. Anschließend wurden der IPG-Streifen und der Marker luftblasenfrei mit 60 °C heißer 0,5 %-iger Agarose überschichtet und so auf dem SDS-Polyacrylamidgel fixiert. Die Elektrophorese wurde in einer Elektrophoresekammer, die mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt waren, bei konstanten 55 V über Nacht durchgeführt, bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte.

12 % SDS-Polyacrylamidgellösung für 6 Gele:	100 ml H ₂ O 71 ml Trenngelpuffer 114 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Serva Electrophoresis) 2 ml 12,5 %-ige APS-Lösung 250 µl TEMED (Amersham Pharmacia)
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8

2.5.7 Proteinfärbung

2.5.7.1 Coomassie®-Brillant-Blau-Färbung

Zur Fixierung und Anfärbung von Proteinen in der Polyacrylamidgelmatrix wurden kleine „Novex® Tris-Glycine Mini Gele“ für 30 min und große Midigele für 1,5 h bei RT mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. Um unspezifische Hintergrundfärbungen des Gels zu entfernen, wurde das Gel im Anschluss mit Entfärbelösung entfärbt.

Coomassie-Färbelösung für Polyacrylamidgele:	0,1 % (w/v) Coomassie® Brilliant-Blue R-250 (Fluka, Sigma-Aldrich) 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung 1:	50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung 2:	10 % (v/v) Essigsäure

2.5.7.2 Silberfärbung

Für Silberfärbungen von SDS-Polyacrylamidgelen wurde ein Protokoll nach Shevchenko angewendet (Shevchenko et al., 1996). Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese in 50 % Methanol und 5 % Essigsäure für 20 min fixiert. Anschließend wurde es für 10 min in 50 % Methanol und für 10 min in H₂O gewaschen, um die überschüssige Säure der Fixierlösung zu entfernen. Das Gel wurde dann für 1 min in 0,02 % Natriumthiosulfatlösung sensitiviert und daraufhin dreimal für 1 min in H₂O gewaschen. Danach folgte ein 20-minütiger Inkubationsschritt in eiskalter 0,1 % Silbernitratlösung bei 4 °C. Nach erneutem zweimaligem Waschen in H₂O für 1 min wurde das Gel durch intensives Schüt-

teln in 0,04 % Formaldehyd und 2 % Natriumcarbonat entwickelt. Sobald die gewünschte Intensität der Färbung erreicht war, wurde die Entwicklung mit 5 % Essigsäure gestoppt.

2.5.8 Elektrotransfer von Proteinen

Der Vorgang des Elektrotransfers beschreibt die elektrophoretische Übertragung und Fixierung von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Membran.

Bei der Durchführung als Sandwich in einer „Semi-Dry“-Apparatur wurden zunächst drei dünne oder zwei dickere im Anodenpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere (GE Healthcare) auf der plattenförmigen Anode platziert. Darauf wurde eine in Methanol aktivierte, mit Wasser gespülte und in Anodenpuffer äquilibrierte PVDF-Membran (Hybond-P, GE Healthcare) gelegt. Auf die Membran wurde schließlich das SDS-Polyacrylamidgel gelegt, das dann sofort mit drei oder zwei in Kathodenpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren luftblasenfrei bedeckt wurde. Anschließend wurde das elektrische Feld angelegt, das bewirkt, dass die negativ geladenen Proteine aus der Gelmatrix nach unten zur Anode und damit auf die Membran wandern. Der Transfer von kleinen Minigelen erfolgte für 3 h bei 35 mA pro Gel und bei Midigelen für 2,5 h bei 100 mA.

Anodenpuffer:	50 mM Borsäure, 20 % (v/v) Methanol, pH 9
Kathodenpuffer:	50 mM Borsäure, 5 % (v/v) Methanol, pH 9

2.5.9 Herstellung von Proteinextrakten

2.5.9.1 Hirnlysate

Für die Gewebelysate wurde Hirnautopsiematerial von Individuen verwendet, die keine bekannten neurologischen Erkrankungen hatten. Das Gewebe (von AG Meinel, Martinsried zur Verfügung gestellt) wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Es wurde darauf geachtet, dass graue und weiße Substanz zu etwa gleichen Anteilen eingesetzt wurden.

Denaturiertes Hirnlysat

Für die Herstellung eines Hirnlysats unter denaturierenden Bedingungen wurden 6,5 g zerkleinertes humanes Gehirn in einer Mischung aus 10 ml Wasser, 12,5 ml Chloroform und 25 ml Methanol aufgenommen, und in einem Teflon-Homogenisator weiter aufgeschlossen. Danach wurde das homogene Lysat für 2 h auf Eis gerührt. Dieser Schritt diente der Extraktion von Membranlipiden. Die lipophilen Lipide gehen dabei in die Chloroformphase über und konnten so später von den Proteinen abgetrennt werden. Schließlich wurden nochmals 30 ml Wasser und 30 ml Chloroform zugefügt und bis zur Phasentrennung bei RT inkubiert. Um die Phasentrennung zu vervollständigen, wurde das Lysat für 15 min bei 10.000 rpm (Rotor HB6) zentrifugiert. Die Interphase, die die Proteine enthält, wurde abgenommen und bei RT getrocknet. Die Wasserphase, die noch einige gut lösliche Proteine enthält, wurde ebenfalls abgenommen und über Nacht bei RT gerührt, damit Methanol und Chloroform verdampfen konnten. Anschließend wurden die Interphase und die Wasserphase bei -20 °C eingefroren

und dann lyophilisiert. Die trockenen Sedimente wurden gewogen (ca. 530 mg) und in 12,5 ml IEF-Rehydrierungspuffer (s. Abschnitt 2.5.5; ohne SERVALYT™ und Bromphenolblau) aufgenommen. Nach dem Lösen der Sedimente durch Ultraschall und Rühren wurden nicht lösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 17.500 rpm (Rotor SS34) für 10 min bei 20 °C und 40.000 rpm für 1 h bei 16 °C (Ultrazentrifuge, Rotor Ti50) abgetrennt. Der lösliche Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration wurde durch eine SDS-PAGE auf ca. 25 mg/ml geschätzt.

Natives Hirnlysate

Zur Herstellung eines Hirnlysates unter nativen Bedingungen wurden 10-25 g zerkleinertes humanes Gehirn eingesetzt. Zuerst wurden die leicht löslichen intrazellulären Proteine und im nächsten Schritt Membranproteine isoliert. Für die lösliche Fraktion wurde das Gewebe zunächst im 10-fachen Volumen 4 °C kaltem PBS mit Proteaseinhibitoren (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) aufgenommen und in einem Mixer (Waring) homogenisiert. Im nächsten Schritt wurde das Lysat für 15 min auf Eis beschallt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert, damit die Proteine sich lösen konnten. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 17.500 rpm (Rotor SS34) und 4 °C erfolgte die Ultrazentrifugation für 1 h bei 40.000 rpm (Rotor Ti60) und 4 °C. Der Überstand enthält vor allem leicht lösliche intrazelluläre Proteine und konnte sofort in eine Immunpräzipitation eingesetzt werden.

In einer weiteren Variante wurden die Sedimente aus dem ersten Aufschluss erneut im 10-fachen Volumen 2 mM Dodecylmaltoside (DM) in PBS mit Proteaseinhibitoren 4 °C aufgenommen. DM ist ein mildes Detergenz, das Membranproteine unter relativ schonenden Bedingungen in Lösung bringt. Schwer lösliche Membranproteine lassen sich mit diesem Detergenz allerdings nicht isolieren. Nach einer weiteren Beschallung für 15 min auf Eis wurden die Zentrifugationsschritte von oben wiederholt. Der Überstand mit den leicht löslichen Membranproteinen konnte abgenommen und ebenfalls in eine Immunpräzipitation eingesetzt werden (s. Abschnitt 2.6.8).

2.5.10 Proteinbestimmung

2.5.10.1 Lowry-Test

Die Proteinbestimmung wurde nach Peterson, 1977 durchgeführt und stellt eine Variante der Methode von Lowry et al., 1951 dar. Zunächst wurden 100 µl der Lösung A in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend 100 µl der zu bestimmenden Protein-Probenlösungen in verschiedenen Verdünnungsstufen hinzugefügt. Beide Lösungen wurden gut vermischt und nach 10-minütiger Inkubation wurden 50 µl Lösung B zugegeben. Nach weiteren 30 min bei RT wurden je 100 µl in eine Mikrotiterplatte überführt und die OD bei $\lambda = 730 \text{ nm}$ im „ELISA-Reader MR 4000“ gemessen. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden BSA-Standardlösungen mit 10, 20, 40, 60, 80 und 120 µg/ml BSA (Sigma-Aldrich) eingesetzt. Mit den Messwerten wurde eine Eichkurve (OD_{730 nm} zu µg/ml BSA) aufgestellt, mit der die Proteinkonzentrationen in den Probenlösungen berechnet werden konnten.

Lösung A:	0,8 M NaOH, 10 % (w/v) SDS in H ₂ O
CuTartarat Lösung (20 ml):	1 ml 2 % (w/v) CuSO ₄ x 5 H ₂ O 1 ml 4 % (w/v) Na-Tartarat x 2 H ₂ O 8 ml H ₂ O 10 ml 20 % (w/v) Na ₂ CO ₃
Lösung B:	Folin-Ciocalteu-Reagent Arbeitslösung

2.5.10.2 Photometrische Messung

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung bei $\lambda = 280$ nm wurde das Spektrophotometer „NanoDrop 1000“ nach Herstellerangaben verwendet. Zum Nullabgleich diente jeweils eine Pufferprobe ohne Protein. Die Werte wurden anschließend mit dem Molekulargewicht und dem molaren Extinktionskoeffizienten des Proteins (Daten aus dem „ProtParam Tool“ des ExPASy Proteomics Servers) auf die sequenzabhängigen exakten Werte umgerechnet (Gill und von Hippel, 1989).

2.5.11 Massenspektrometrie

Mit der Technik der Massenspektrometrie können Molekülmassen und zum Teil auch Aminosäuresequenzen einzelner Peptide gemessen werden. Die Vorbereitung der Proben für die MALDI-TOF- und MS/MS-Messungen wurde von Reinhard Mentele und die Messungen wurden von Monica Zobawa (MPI für Biochemie, Abteilung Proteinanalytik Prof. Lottspeich, Martinsried) durchgeführt und ausgewertet. Daneben wurden noch Analysen mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer (Orbitrap) oder einem LC-ESI-Massenspektrometer durchgeführt. Die Proben wurden dazu von der „Microchemistry Core Facility“ am MPI für Biochemie vorbereitet und gemessen.

2.5.12 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie (Circular dichroismus-, CD-Spektroskopie) erlaubt die Untersuchung der Konformation von Proteinen. Sie beruht auf der optischen Aktivität asymmetrischer Moleküle in Lösung. Bei der Methode wird zirkular polarisiertes Licht auf eine Proteinprobe eingestrahlt. Dieses wird in Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahelten Lichts durch die optische Aktivität des Proteins abgelenkt. Die optische Aktivität eines Proteins kommt dabei durch die L-Konformation am α -C-Atom der Aminosäuren, sowie des Anteils an α -Helices, β -Faltblättern und ungeordneten Strukturen zustande. Die Messgröße der Verformung des zirkular polarisierten Lichts in Abhängigkeit von der Wellenlänge wird als Elliptizität bezeichnet. CD-Spektren wurden in der „Microchemistry Core Facility“ am MPI für Biochemie am „J-715“ Spektrometer aufgenommen. Die Spektren wurden in einem Bereich zwischen $\lambda = 195$ -250 nm bei 4 °C oder 25 °C und einer Geschwindigkeit von 50 nm/min aufgezeichnet. Für jedes Protein wurden acht Einzelmessungen akkumuliert und anschließend der Durchschnitt verwendet. Als Referenzpuffer wurde PBS oder der Puffer, in dem das Protein gelöst war, verwendet und dessen Spektrum vor der Datenanalyse abgezogen. Die Auswertung wurde mithilfe des Programms „Spectra Manager CDPro Analysis“ durchgeführt und die

experimentellen Kurven mit einem Set aus 56 Standardproteinen („Contin SMP56“) verglichen, um den Anteil der Sekundärstrukturen zu berechnen (Provencher und Glöckner, 1981).

2.5.13 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Mit der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR, Biacore) können Affinitäten zwischen Rezeptor oder Antikörper und Antigen gemessen werden. Der Rezeptor wird dafür an einer Oberfläche immobilisiert und das Antigen vorbeigespült. Die Änderung des Brechungsindex über die Zeit wird anschließend für verschiedene Antigenkonzentrationen gemessen und die Dissoziationskonstante K_D bestimmt. Je kleiner K_D , desto höher ist die Affinität, da das Reaktionsgleichgewicht dann auf der Seite der Komplexbildung liegt.

Für die Biacore-Messungen wurde der sc-Fv-M88-TZR (Expression in COS-7-Zellen, s. Abschnitt 2.4.2.1) gegen den Kopplungspuffer 10 mM Na-Acetat pH 5 dialysiert. Der Ligand EcIF1 wurde gegen 0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA und 0,005 % Surfactant P20 pH 7,4 (HBS-EP, GE Healthcare) dialysiert. Für die Messungen wurde ein „Biacore 2000“ Apparat verwendet. Zwei unabhängige sc-Fv-M88-TZR Präparationen wurden kovalent bei 0,7 μ M und 1,0 μ M an einen „CM5 Sensor Chip“ gebunden. Die Referenzzelle wurde mit Puffer inkubiert. Beide Zellen wurden mit 1 mM Ethanolamin pH 8,5 blockiert. Danach wurden beide Zellen mit verschiedenen EcIF1-Konzentrationen (100 μ M, 30 μ M, 10 μ M, 3 μ M und 1 μ M) bei einer Flussrate von 10 μ l/min bei 25 °C gespült. Alle Konzentrationen wurden dreimal gemessen. Die Daten der Referenzzelle wurden vor der Datenanalyse abgezogen. Anschließend wurde die Dissoziationskonstante K_D mit dem Programm „BiaEvaluation 4.1“ berechnet. Die Messungen erfolgten in der „Microchemistry Core Facility“ am MPI für Biochemie unter Anleitung von Stephan Übel und in Kooperation mit B. Obermeier.

2.6 Immunologische Methoden

2.6.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist eine Methode zur Analyse von Oberflächenantigenen von Zellpopulationen sowie zur Überprüfung von Antikörper-Spezifitäten. Zur Analyse der Oberflächenexpression des M88-Rezeptors auf Maus-T-Zell-Hybridomen wurden ca. 100.000 Zellen der Zellkultur in eine 96-Well-Spitzbodenplatte überführt, bei 1.200 rpm und 10 °C für 6 min zentrifugiert und dann zweimal mit je 200 μ l FACS-Puffer gewaschen. Danach wurden 50 μ l einer 1:50 Verdünnung des primären Antikörpers (α -CD3 oder α -V δ 2) zugefügt und für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen wurde, falls nötig, ein Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:200 hinzugefügt und wie beim primären Antikörper verfahren. Entsprechende Isotypkontrollen wurden ebenfalls mitgeführt. Nach den letzten beiden Waschrufen, wurden die Zellen in 50-100 μ l PBS mit Todfarbstoff (ToPro-3 1:4.000 oder Propidiumjodid 1:500) aufgenommen.

Zur Kontrolle der Funktionalität der selbst exprimierten rFab-Fragmente wurde das α -MOG-Fab durch FACS-Analyse getestet. Dazu wurden MOG-transfizierte TE671-Zellen verwendet, die rekomb-

binantes, nativ gefaltetes MOG auf ihrer Oberfläche exprimieren (s. Abschnitt 2.4.3). Da das α -MOG-Fab im variablen Teil die Sequenz des MOG-spezifischen murinen Antikörpers 8-18C5 (Claflin und Berry, 1988; Linington et al., 1988; Litzemberger et al., 1998) besitzt, kann mit der FACS-Analyse dessen Funktionalität überprüft werden. Der konstante Teil des α -MOG-Fab ist, wie der der anderen rFab-Fragmente, humanen Ursprungs. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte TE671-Zellen. Die TE671-Zellen wurden mit 1,5 μ g α -MOG-Fab bzw. als Isotypkontrolle mit Fab1 in 50 μ l FACS-Puffer für 30 min auf Eis inkubiert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne primären Antikörper mitgeführt, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen. Nach zweimaligem Waschen mit je 200 μ l PBS (1.200 rpm, 6 min, 10 °C) wurden 50 μ l einer 1:150 Verdünnung eines polyklonalen Goat-anti-human-IgG-(H+L)-Alexa-647-Antikörpers in FACS-Puffer zugefügt. Nach weiteren zwei Waschschrritten wurden die Zellen in PBS aufgenommen. In einer weiteren Variante erfolgte nach der Inkubation mit den rFab-Fragmenten zunächst eine Färbung mit einer 1:50 Verdünnung eines murinen α -human-kappa-light-chain-HRP-Antikörpers und anschließend eine Inkubation mit einem Goat-anti-mouse-IgG-(H+L)-Alexa-647-Antikörper (1:150). Als Positivkontrolle wurden die Zellen jeweils mit 0,5 μ g des murinen Antikörpers 8-18C5 inkubiert. Als Isotypkontrolle wurden hier 0,5 μ g des Klons X40 verwendet und als Sekundärantikörper eine 1:150 Verdünnung eines Goat-anti-mouse-IgG-(H+L)-Alexa-647-Antikörpers.

Am „FACSCalibur“ wurden im Anschluss jeweils 10.000 Zellen analysiert („CellQuest V3.3“) und mit dem Programm „FlowJo V7.6“ ausgewertet.

FACS-Puffer:	1x PBS mit 2 % (w/v) BSA
1x PBS (CaCl ₂ , MgCl ₂):	GIBCO®, Invitrogen
ToPro-3 (Invitrogen):	1 mM in DMSO; 1:4.000 Verdünnung in FACS-Puffer
Propidiumjodid (Sigma-Aldrich):	1 mg/ml in PBS; 1:500 Verdünnung in FACS-Puffer

2.6.1.1 Herstellung eines EcIF1-Oktamers für die FACS-Färbung

Für die FACS-Färbung wurde ein EcIF1-Oktamer hergestellt. Dazu wurde ein PentaHisTM-Antikörper und das „EZ-Link Sulfo-NHS-LC Biotinylation Kit“ verwendet. Zunächst wurde der Antikörper gegen den Puffer BupH PBS pH 7,5 dialysiert. Der Antikörper wurde anschließend nach Herstellerangaben für 60 min bei RT mit 4x molarem Überschuss an Biotin biotinyliert. Überschüssiges Biotin wurde danach entfernt. Im nächsten Schritt wurde ein 4x molares Überschuss EcIF1 und ¼ der molaren Menge an „Streptavidin Alexa Fluor® 488 Konjugat“ im Vergleich zum Antikörper hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 30 min bei RT inkubiert, damit sich Oktamere bilden konnten. Das Oktamer (ca. 692 kDa) wurde im Anschluss durch eine Superose-6-Agarose-Säule (Sigma-Aldrich) in PBS bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min abgetrennt und die Elution wurde durch eine SDS-PAGE kontrolliert. Die Größe des Komplexes ließ sich anhand der Elutionsfraktion von der Superose-6-Agarose-Säule und mehreren Eichläufen mit Standardproteinen auf ca. 600-800 kDa bestätigen. Für die FACS-Färbung wurden 10.000 M88-T-Zell-Hybridome mit 10.000 JM22-T-Zell-Hybridomen (Kontroll-T-Zell-Hybridome, die den TZR JM22 exprimieren; K. Siewert) vermischt und mit 1 ml der Oktamerelu-

tionsfraktion für 45 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in FACS-Puffer mit ToPro-3 aufgenommen und 10.000 Zellen gemessen. Als Negativkontrolle dienten ungefärbte Zellen.

2.6.2 Interleukin-2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (IL-2 ELISA)

Zur Quantifizierung des von den aktivierten M88-Hybridomen sezernierten IL-2 wurde das „Mouse IL-2 ELISA Ready-SET-Go!“ Kit verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren, außer dass statt der vorgeschlagenen 100 µl jeweils 50 µl Volumen verwendet wurden. Am Vortag wurden je 50 µl Capture-Antikörper (1:250 in 1x Coating-buffer) auf eine Mikrotiterplatte (96-Well-MaxiSorp-Immunoplatte, Nunc) gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Flachbodenplatte dreimal mit je 300 µl Waschpuffer PBS-T gewaschen und anschließend mit 200 µl 1x Assay-diluent 1 h bei RT blockiert. Nach weiteren drei Waschschrritten wurden 50 µl Zellkulturüberstand bzw. 10 µl Zellkulturüberstand mit 40 µl 1x Assay-diluent zugefügt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde fünfmal gewaschen und 50 µl Detection-Antikörper (1:250 in 1x Assay-diluent) wurden hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschrritten wurden 50 µl Avidin-HRP-Antikörper (1:250 in 1x Assay-diluent) hinzugegeben und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Platte zehnmal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Entwicklung wurden 50 µl einer Tetramethylbenzidine-Substrat-Lösung (TMB) zugefügt. Je nach Intensität wurde die Reaktion nach 3-20 min mit 25 µl Stopplösung (2 N H₂SO₄) gestoppt. Anschließend wurde die Platte bei $\lambda = 450$ zu 550 nm im „ELISA-Reader MR 4000“ oder bei 450 nm im „Victor2 1420 Multilabel Counter“ ausgelesen. Die Absorption ist dabei proportional zur Menge des umgesetzten Substrates und damit zum ursprünglich im Zellkulturüberstand enthaltenen IL-2. Mit Hilfe eines IL-2 Standards, der in Konzentrationen von 5-3.600 pg/ml mitgeführt wurde, konnte die Konzentration des IL-2 in den Proben berechnet werden. Zur Auswertung wurde die OD aller Proben in IL-2 umgerechnet und die Messwerte der Überstände der Zellen, die ohne Antigen inkubiert wurden, abgezogen. Bei Mehrfachbestimmungen wurde der Mittelwert gebildet. Das Detektionslimit liegt bei ca. 2 pg/ml, was 0,1 pg/Well IL-2 entspricht. Die Werte des produzierten IL-2 können dabei im Vergleich zwischen den Experimenten zu verschiedenen Zeitpunkten im lebenden zellabhängigen Versuchsaufbau abhängig vom Zellzyklus und weiteren Faktoren schwanken.

2.6.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden standardisierte Immunfluoreszenztests der Firma Euroimmun (Lübeck) verwendet (in Kooperation mit B. Obermeier). Es wurden die Erreger Masern, Röteln, Varizella Zoster, Epstein-Barr-Virus (EBV), Herpes Simplex Virus Typ 1 und 2 (HSV-1, HSV-2) und *Chlamydia pneumoniae* untersucht, sowie die Fluoreszenztests gegen „Anti-nukleäre Antikörper“ (ANA) und „Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper“ (ANCA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die rFab-Fragmente wurde das Protokoll leicht abgeändert. 0,5 µg rFab-Fragmente wurden zunächst mit 0,75 µg eines Anti-His₆-Antikörpers für 30 min bei RT prä-komplexiert und anschließend für 30 min auf den Testfeldern (25 mm²) der Immunfluoreszenztests inkubiert. Nach einem

fünfminütigen Waschschrift erfolgte die Detektion mit einem Anti-Mouse-IgG-FITC-Antikörper (1:100) für 30 min bei RT. Danach wurde weiter nach Herstellerangaben verfahren. Negativkontrollen nur mit den sekundären Antikörpern wurden entsprechend mitgeführt. Die Bilder wurden am Fluoreszenzmikroskop „AxioVert 200M“ aufgenommen („MetaMorph® Software“) und mit dem Programm „ImageJ V1.43m“ ausgewertet.

2.6.4 Lipidexperimente

Es wurden auch einige Experimente mit Lipiden durchgeführt. Dazu wurden die Lipide (Sulfatides (Brain), Cerebroside (Avanti® Polar Lipids, Inc.), L- α -Phosphatidylcholine, egg yolk (Sigma-Aldrich)) in einer Chloroform-Methanol-Mischung in verschiedenen Konzentrationen gelöst und im Anschluss direkt mit einer Pipettenspitze an eine PVDF-Membran adsorbiert. Die Entwicklung mit den rFab-Fragmenten erfolgte analog zu anderen Immunoblots (Abschnitt 2.6.7). Daneben wurden die Lipide in einer weiteren Variante zunächst Dünnschicht-chromatographisch auf Silica-Gel-60 Platten (ALUGRAM SILG, Carl Roth) mit Chloroform:Methanol:0,2 % KCl (50:40:10 v/v/v) (Ilyas et al., 2003) als Laufpuffer aufgetrennt und anschließend nach dem Protokoll von Taki et al., 2009 mit einem heißen Eisen (Thermoblot) auf eine PVDF-Membran übertragen. Danach erfolgte die Entwicklung ebenfalls wie für andere Immunoblots.

2.6.5 Polyreaktivitäts-ELISA

Um eine Polyreaktivität der rFab-Fragmente zu untersuchen, wurde ein ELISA mit spezifischen Antigenen durchgeführt (Wardemann et al., 2003). Dazu wurden jeweils 50 μ l 10 μ g/ml Kalbsthymus ssDNA und dsDNA (Sigma-Aldrich) über Nacht bei RT mit „Reacti-Bind™ DNA Coating Solution“ nach Herstellerangaben an eine Mikrotiterplatte (Corning® 96 Well Clear Flat Bottom Polystyrene High Bind Microplate 9018, Corning) adsorbiert. 50 μ l der Proteine Insulin, BSA und eMOG (AG Jenne) wurden in einer Konzentration von 5 μ g/ml in 100 mM Na-Carbonatpuffer pH 9,5 über Nacht bei 4 °C an eine 96-Well-MaxiSorp-Immunoplatte (Nunc) gebunden. Das Lipopolysaccharid (LPS) aus *E. coli* (Sigma-Aldrich) wurde in einer Konzentration von 10 μ g/ml in 50 mM Na-Carbonatpuffer, 20 mM MgCl₂ pH 9,8 über Nacht bei 4 °C an die Platte adsorbiert. Ungebundene DNA, Proteine und LPS wurden am nächsten Tag mit dreimal 300 μ l PBS-T entfernt. Anschließend wurden die Platten für 1 h bei 37 °C mit 200 μ l 2 % BSA in PBS-T blockiert. Nach drei Waschschriften mit PBS-T wurden 50 μ l der primären Antikörper-Lösungen hinzugefügt. Die humanen rFab-Fragmente wurden in zwei Verdünnungen von 10 μ g/ml und 1 μ g/ml eingesetzt, während die murinen Positivkontroll-Antikörper 8-18C5 und α -DNA in einer Konzentration von 1 μ g/ml in 1 % BSA in PBS-T eingesetzt wurden. Nach 2 h bei 37 °C wurden die Antikörper entfernt und dreimal mit 300 μ l PBS-T gewaschen. Der Sekundäntikörper α -human-kappa-light-chain-HRP wurde in einer Verdünnung von 1:1.000 und der Goat-anti-mouse-IgG-HRP-Antikörper 1:2.000 in 1 % BSA in PBS-T eingesetzt. Nach 1 h bei 37 °C wurden die Wells siebenmal mit PBS-T gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit 50 μ l TMB-Substrat-Lösung. Je nach Intensität wurde die Reaktion nach einigen Minuten mit 25 μ l Stopplösung

(2 N H₂SO₄) gestoppt. Die Platte wurde bei $\lambda = 450$ nm im Gerät „Victor2 1420 Multilabel Counter“ ausgelesen.

2.6.6 Proteinarrays

Proteinarrays (Zhu et al., 2001; Michaud et al., 2003; Schweitzer et al., 2003; Bangham et al., 2005; Mattoon und Schweitzer, 2009) sind eine relativ neue Methode, um die Antigen-spezifität von Antikörpern zu untersuchen. Daneben gibt es noch zahlreiche weitere Anwendungen.

Um die Spezifität der rFab-Fragmente aus MS-Patienten zu analysieren, wurden die „ProtoArray® v5.0 Human Protein Microarrays“ von Invitrogen (Lot HA20259) verwendet. Diese Arrays enthalten 9.400 native humane Proteine, die in Duplikaten auf einen Objektträger, der mit einer ultradünnen Nitrozellulose beschichtet ist, gespottet sind. Die Proteine haben dabei keine bestimmte Orientierung auf der Oberfläche. Die meisten Proteine aus der „Invitrogen Ultimate ORF™ Collection“ wurden als N-terminale GST-Fusionsproteine im GST-Vektor pDEST20 im Baculovirus-Sf9-Insektzell-System exprimiert und unter nativen Bedingungen gereinigt. Einige Kinasen wurden dagegen mit einem anderen System exprimiert und tragen ein His₆-Peptid. Zudem enthält der Proteinarray viele Kontrollen, um Hintergrundsignale und unspezifische Bindungen zu detektieren. Vor der ersten Anwendung wurde ein „ProtoArray® Control Protein Microarray v5.0“ nach Herstellerangaben durchgeführt, um die Durchführung, Einstellungen und Auswertung zu üben und zu überprüfen. Da es bisher keine Publikationen zur Verwendung von rFab-Fragmenten auf Proteinarrays gab, wurde das Protokoll angepasst, um die Bindung der monovalenten rFab-Fragmente zu verbessern. Es wurden verschiedene Inkubationsbedingungen, Puffer und sekundäre Antikörper ausprobiert. Am besten geeignet erschien folgendes Protokoll. Der Proteinarray (-20 °C) wurde für 15 min bei 4 °C äquilibriert. Anschließend wurde er mit 5 ml Blockierungspuffer (1x Synthetischer Block; 50 mM HEPES, pH 7,5; 200 mM NaCl; 0,08 % Triton X-100; 25 % Glycerin; 20 mM reduziertes Glutathion; 1 mM DTT) für 1 h bei 4 °C unter Schütteln (Flachschüttler „Unimax 2010“, 50-60 rpm) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 5 ml Waschpuffer (1x Synthetischer Block in PBS 0,05 % Tween-20) für 3 min wurden 50 µg rFab-Fragment in 3 ml rFab-Inkubationspuffer (1x Synthetischer Block in PBS 0,01 % Tween-20) dazugegeben und für 90 min bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften mit je 5 ml Waschpuffer für 5 min, wurden 5 ml des Sekundärantikörpers Goat-anti-human-IgG-(H+L)-Alexa-647 in einer Endkonzentration von 1 µg/ml im Waschpuffer hinzugefügt und für weitere 90 min unter Schütteln inkubiert. Am Ende wurde der Proteinarray weitere fünfmal mit 5 ml Waschpuffer für je 5 min gewaschen, anschließend kurz in ein Becherglas mit destilliertem Wasser getaucht, für 2 min bei 188 g in einem 50 ml Falcon-Röhrchen zentrifugiert und im Dunkeln getrocknet. Der Proteinarray wurden bis zum Auslesen in einer lichtdichten Kassette aufbewahrt (s. Abb. 2.3). Alle Puffer wurden vor der Verwendung sterilfiltriert und auf 4 °C gekühlt. Alle Arbeitsschritte außer dem Scannen wurden bei 4 °C durchgeführt. Der Proteinarray war die meiste Zeit lichtdicht abgedeckt, um ein Ausbleichen des Alexafarbstoffes zu verhindern. Mit diesem Protokoll wurden die Proteinarrays für die fünf rFab-Fragmente und das α -MOG-Fab als Isotypkontrolle durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde ein Proteinarray nur mit dem sekundären Antikörper alleine inkubiert.

Nach dem Trocknen wurden die Proteinarrays bei $\lambda = 635 \text{ nm}$ am Mikroarray Scanner „GenePix 4000B“ ausgelesen. Die Einstellungen am Programm „GenePix®Pro 6.0“ waren: Wellenlänge λ : 635 nm; PMT-Gain: 600; Laser Power: 100 %; Pixel-Size: 10 μm , Lines to Average: 1.0, Focus Position: 0 μm . Es wurden Bilder bei verschiedenen PMT-Werten (*Photomultiplier-Tube*, Verstärker) zwischen 550-850 aufgenommen, als „Multi-image TIFF“ gespeichert und die Ergebnisse als „GenePix® Results file“ (GPR) exportiert. Für die Auswertung wurden die Werte bei PMT 700 verwendet.

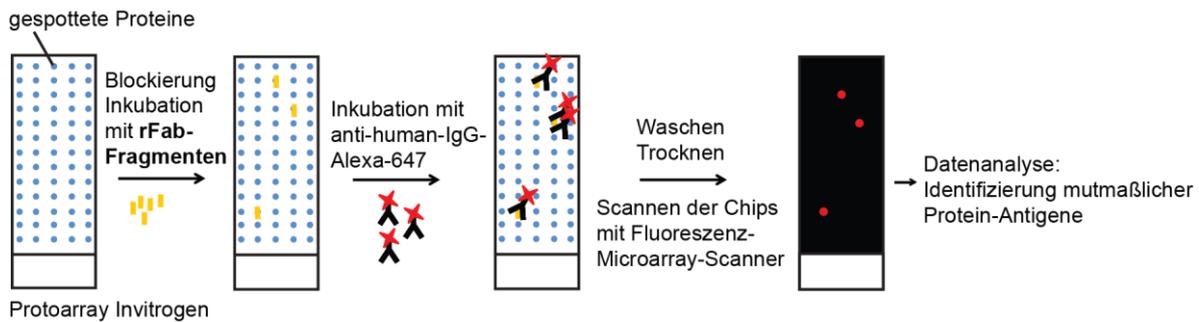


Abb. 2.3: Prinzip der ProtoArray Technologie.

Beim ProtoArray® v5.0 von Invitrogen sind 9.400 native humane Proteine auf eine Membran auf einem Objektträger gespottet. Nach mehreren Blockierungs- und Färbeschritten mit den rFab-Fragmenten und einem geeigneten Sekundärantikörper können einzelne Antigene detektiert werden.

Die Auswertung der Proteinarrays erfolgte mit dem Programm „ProtoArray™ Prospektor 5.2.1“ in der Protein-Protein-Interaktion (*protein-protein-interaction*, PPI) Anwendung. Das Programm berechnet dabei für jeden einzelnen Proteinspot die Signalstärke, das Hintergrundsignal, den Z-Faktor, den Z-Score, den CIP-Value und den CV-Wert. Der Z-Faktor ist eine Größe, die die Qualität des Assays beurteilt, indem sie die Werte mit den internen Arraynegativkontrollen vergleicht. Je näher dieser Wert an 1 liegt, desto besser ist der Assay. Der Z-Score ist eine statistische Größe und ein Z-Score von $> 1,65$ entspricht einem $p < 0,05$. Da zur Auswertung von Proteinarray-Daten, die mit rFab-Fragmenten durchgeführt wurden, noch keine Standards zur Definition eines positiven Signals vorlagen, wurden die Bedingungen für ein spezifisches positives Signal (*Hit*) wie folgt festgelegt: Das Signal sollte jeweils als Doppelbestimmung mindestens fünfmal über dem Mittelwert des Arraysignals (= Durchschnittliches Signal aller Proteine des Proteinarrays) und dreimal über dem entsprechenden Signal bei der Negativkontrolle (Sekundärantikörper alleine) sowie bei der Isotypkontrolle (α -MOG-Fab mit Sekundärantikörper) liegen. Diese Kriterien sollten sowohl für nicht normalisierte als auch für *Mean*- und *Median*-normalisierte Daten gelten, das heißt überlappende spezifische Signale wurden als positiv gewertet. Der Mittelwert des Arraysignals ist dabei definiert als das durchschnittliche Signal aller Proteine des Proteinarrays und wird vom Prospektor als „*Probes*“ *Mean*- bzw. *Median*-Wert ausgegeben. Mit dieser Analyse sollte gewährleistet werden, dass potentielle Bindungspartner der monovalenten rFab-Fragmente, die wahrscheinlich eine niedrigere Bindungsaffinität wie beispielsweise der Sekundärantikörper haben, noch eindeutig identifiziert werden können, die Analyse aber gleichzeitig stringent genug ist, um unspezifische Signale auszuschließen. Zusätzlich wurden die sich daraus ergebenden spezifischen Signale visuell bestätigt.

2.6.7 Westernblot

Beim Westernblot, auch Immunoblot, werden Proteine, die auf eine Trägermembran übertragen wurden (s. Abschnitt 2.5.8), spezifisch durch Antikörper nachgewiesen.

Nach dem Elektrotransfer wurde die PVDF-Membran zunächst für 2 h mit Blockierungspuffer abgessätigt. Danach wurde die Membran einmal mit PBS-T gespült und mit dem primären Antikörper inkubiert. Der Anti-Polyhistidine-HRP-Antikörper wurde ebenso wie der Anti-Myc-HRP-Antikörper bei einer Konzentration von 1:1.000 im Blockierungspuffer für 1 h bei RT inkubiert.

Bei den 2D-Westernblots mit humanen Hirnproteinen wurde die PVDF-Membran zunächst für 2 h bei RT mit 50 ml 1x Synthetischem Block in PBS-T blockiert. Die humanen rFab-Fragmente wurden als primäre Antikörper eingesetzt und auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml in 75 ml rFab-Inkubationspuffer (0,5x Synthetischer Block in PBS 0,01 % Tween-20) verdünnt und über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach drei Waschschritten wurde als Sekundärintikörper ein α -human-kappa-light-chain-HRP-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2.000 in 50 ml Blockierungspuffer für 1 h bei RT hinzugefügt.

Nach der Antikörper-Inkubation folgten jeweils fünf ausgiebige Waschschrritte bei RT.

Für die Tüpfelblots wurden die Proteine zunächst mit einer Pipette an eine Nitrozellulosemembran (Invitrogen) adsorbiert. Anschließend wurde ähnlich wie bei den anderen Immunoblots verfahren. Als primäre Antikörper wurden die rFab-Fragmente in einer Konzentration von 10 µg/5 ml verwendet und als Sekundärintikörper ein α -human-kappa-light-chain-HRP-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500-1:1.000. Die Waschschrritte erfolgten wie für die anderen Blots. Weitere Abwandlungen sind im Ergebnisteil beschrieben.

Zur Detektion wurde das ECL-System (*enhanced chemiluminescence*) verwendet. Dazu wurde die Membran mit 10 ml ECL-A-Lösung, die mit 3,1 µl 30 % H₂O₂ und 100 µl ECL-B versetzt war, für 1 min inkubiert. Bei großen 2D-Westernblots wurde die doppelte Menge Entwicklerlösung angesetzt. Die Membran wurde im letzten Schritt in eine Filmkassette überführt und im Dunkelraum wurde ein Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) entwickelt („Optimax®“).

Blockierungspuffer:	5 % (w/v) Milchpulver <i>blotting grade</i> (Bio-Rad) in PBS 0,05 % Tween-20 2 % BSA (Serva Electrophoresis) in PBS 0,05 % Tween-20 1x Synthetischer Block in PBS 0,05 % Tween-20
rFab-Inkubationspuffer:	0,4 % BSA in PBS 0,01 % Tween-20 0,5x Synthetischer Block in PBS 0,01 % Tween-20
Waschpuffer:	PBS 0,05 % Tween-20 (PBS-T)
ECL-A Lösung:	0,25 % (w/v) Luminol (Sigma-Aldrich) in 1 M Tris pH 8,6
ECL-B Lösung:	0,11 % (w/v) para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO

2.6.7.1 2D-Westernblot

Mit der 2D-Westernblot-Analyse von Zell- und Gewebelysaten sollten denaturierte Proteinantigene der rFab-Fragmente identifiziert werden. Das Prinzip ist in Abb. 2.4 veranschaulicht. Es wurden zunächst zwei 2D-SDS-Polyacrylamidgele parallel durchgeführt. Ein Gel wurde direkt nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt, während das andere elektrotransferiert und im Westernblot (s. Ab-

schnitt 2.6.7) entwickelt wurde. Das Coomassie-gefärbte Gel wurde im Anschluss mit dem entwickelten Röntgenfilm verglichen und überlappende Proteinspots für eine massenspektrometrische Analyse zur Identifizierung des Proteins aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten.

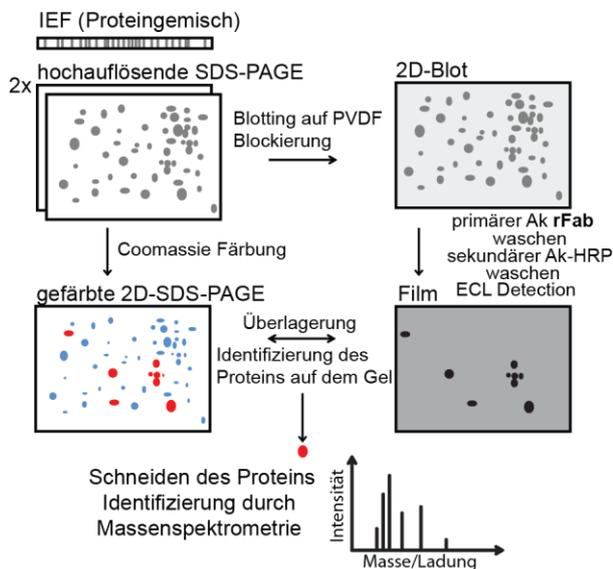


Abb. 2.4: Prinzip des 2D-Westernblots.

Nach der IEF werden die Proteine in der zweiten Dimension durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Ein Gel wird anschließend mit Coomassie gefärbt, während das andere auf eine PVDF-Membran transferiert wird. Es folgt eine Immunodetektion mit den rFab-Fragmenten und einem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper. Im Anschluss wird ein Röntgenfilm entwickelt. Am Ende wird der Film mit dem Coomassie-gefärbten Gel verglichen und überlappende Proteinspots werden aus dem Gel isoliert. Die Identifizierung der Proteine erfolgt durch Massenspektrometrie.

2.6.8 Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationsexperimente wurden „Dynabeads® M-280 Tosylactivated“ verwendet. Die Tosylgruppen auf der Oberfläche erlauben die kovalente Bindung von Proteinen über deren primäre Amino- und Sulfhydrylgruppen. Es wurden jeweils 50 µg rFab-Fragment in PBS nach Herstellerangaben kovalent an 5 mg Dynabeads gebunden. Die Kopplung fand bei pH 7,7-8 über Nacht bei 37 °C statt (ca. 18-20 h). Anschließend wurden die Dynabeads zur Absättigung freier Bindungsstellen zunächst mit 100 mM Ethanolamin in PBS pH 7,5 und dann mit PBS 0,05 % Tween-20 für jeweils 1 h bei 37 °C inkubiert. Die rFab-Fragment-gekoppelten Dynabeads wurden nach mehreren Waschschritten in PBS 0,05 % Azid und 0,05 % Tween-20 bei 4 °C gelagert.

Zur Immunpräzipitation (IP) wurden die rFab-Fragment-gekoppelten Dynabeads bei einigen Durchführungen zunächst bei RT für 1 h mit 1x Synthetischem Block in PBS-T blockiert und dann mit PBS-T oder PBS gewaschen. Danach wurde die entsprechende Menge an rFab-Fragment-gekoppelten Dynabeads in PBS direkt in die selbst hergestellten Lysatlösung gegeben und 2-4 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert, um die Proteindegradation zu minimieren. Falls bereits gereinigte oder gekaufte Proteine präzipitiert wurden, wurden die Proteine in 0,5x Synthetischem Block in PBS 0,01 % Tween-20 zu den rFab-Fragment-gekoppelten Dynabeads gegeben und 2-3 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten mit PBS-T und PBS wurden die Proteine entweder mit 8 M Harnstoff in PBS oder mit 0,1 M Glycin pH 2,8 eluiert. In einigen Fällen wurden die Dynabeads direkt in 2x reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die abgenommenen Überstände wurden im Anschluss direkt auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt oder durch Orbitrap-Massenspektrometrie (IP-Orbitrap) analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Der $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor M88 aus einem Polymyositis-Patienten

Aufbauend auf den beiden Publikationen von Wiendl et al., 2002 und Dornmair et al., 2004 sowie den Ergebnissen der Diplomarbeit (Bruder, 2009) wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Antigen-suche und Charakterisierung des putativ autoreaktiven, pathogenen $\gamma\delta$ -TZR M88 aus einem PM-Patienten fortgeführt und vertieft (s. Abschnitt 1.3.2.2). Einige der Experimente wurden bereits in der Diplomarbeit begonnen und für wichtige Abbildungen auch wenige Daten in die Doktorarbeit übernommen, diese wurden im Folgenden zitiert. Zudem wurden einige vorläufige Experimente aus der Arbeitsgruppe K. Dornmair im Verlauf der Arbeit wiederholt und erweitert.

3.1.1 M88-T-Zell-Hybridome

Für die Untersuchungen der Antigen-spezifität von M88 wurden murine M88-T-Zell-Hybridome verwendet, die auf ihrer Zelloberfläche den humanen TZR M88 $V\gamma 1.3-J\gamma 1-C\gamma 1^+/V\delta 2-J\delta 2-C\delta 2^+$ exprimieren (Wiendl et al., 2002). Die Expression des $\gamma\delta$ -TZR M88 wurde durch FACS-Analyse mit einem Antikörper gegen die $V\delta 2$ -Kette (α - $V\delta 2$) sowie gegen die murine $CD3\epsilon$ -Kette (α - $CD3$) überprüft (s. Abb. 3.1). Damit wurde verifiziert, dass die Hybridome einen funktionellen M88-Rezeptor-Komplex auf der Zelloberfläche exprimieren. Es standen die Klone A2 und B5 zur Verfügung.

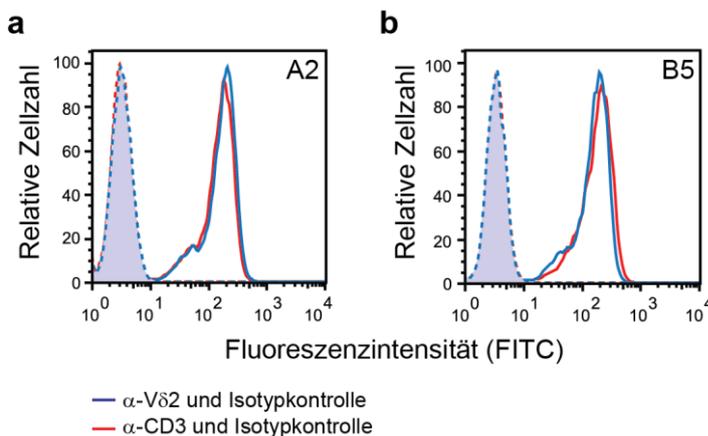


Abb. 3.1: M88-T-Zell-Hybridome.

Für die Untersuchungen standen die M88-Hybridom-Klone A2 und B5 zur Verfügung. Sie wurden auf Oberflächenexpression der $V\delta 2$ -Kette und der murinen $CD3\epsilon$ -Kette überprüft. Die Verschiebung des Signals entlang der x-Achse (blaue und rote durchgezogene Linien) zeigt eine Expression von M88 an. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Isotypkontroll-Antikörper, bei dem es zu keinem Signal kam (gestrichelte Linien). Es ist ein repräsentatives Ergebnis für den Klon A2 (a) bzw. B5 (b) gezeigt.

Die M88-Hybridome konnten für die Antigen-suche von M88 eingesetzt werden (s. Abschnitt 1.3.2.2). Dafür wurden Kandidatenproteine auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit

den M88-Hybridomen inkubiert (s. Abschnitt 2.4.1.2). Die Aktivierung der M88-Hybridome durch Antigene führt nach einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade zur IL-2 Sekretion. Das IL-2 konnte anschließend in einem ELISA gemessen und so die Aktivierung der M88-Hybridome quantifiziert werden (s. Abschnitt 2.6.2).

3.1.2 Antigen suche mit einer *E. coli* cDNA-Bibliothek

Frühere Experimente der Arbeitsgruppe zeigten, dass es nicht möglich ist, ein lösliches „*single-chain-Fv*“-Konstrukt des M88-Rezeptors (sc-Fv-M88-TZR; s. Abb. 3.2a) im Zytosol von prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen zu exprimieren, da die Zellen nach der Induktion des Rezeptors ihr Wachstum einstellen. Daher wurde vermutet, dass der sc-Fv-M88-TZR im Zytosol an Proteine bindet, die für das Zellwachstum essentiell sind, und somit deren natürliche Funktionen behindert. Der TZR M88 wäre somit in einem gewissen Rahmen „toxisch“ für das Wachstum der Zellen. Als erster Schritt der Antigen suche wurde daher ein Experiment gewählt, bei dem die durch den M88-Rezeptor verursachte Wachstumshemmung in *E. coli* durch die Supertransfektion mit einer *E. coli* cDNA-Expressions-Bibliothek aufgehoben werden sollte (Wiederholung vorläufiger Ergebnisse der Arbeitsgruppe in Kooperation mit K. Dornmair). Die Theorie hinter diesem Experiment ist, dass nach der Transfektion in einem bestimmten Bakterienklon durch die cDNA-Bibliothek ein Antigen von M88 überexprimiert wird. Dieses bindet intrazellulär an den sc-Fv-M88-TZR und neutralisiert so den wachstumshemmenden Effekt (s. Abb. 3.2c). Diese Bakterien können somit weiterwachsen und größere Kolonien bilden. Die größten Kolonien können anschließend isoliert und sequenziert werden, um die codierenden Antigene von M88 zu identifizieren. Bakterien, die irrelevante Transkripte der cDNA-Bibliothek aufgenommen haben, können dagegen nur sehr kleine oder gar keine Kolonien bilden. Zur Durchführung wurde das sc-Fv-M88-TZR-Konstrukt aus Dornmair et al., 2004 im Zytosol von *E. coli* „BL21-StarTM-DE3“ exprimiert. Es besteht jeweils aus den Vn(D)nJ-Regionen der γ - und δ -Ketten, die durch einen 14 Aminosäuren langen *Linker* verbunden sind (s. Abschnitt 2.3.6, Abb. 3.2a). Bei Induktion des M88-Rezeptors stellten die Bakterien ihr Wachstum ein (s. Abb. 3.2b). Wurde dagegen eine *E. coli* cDNA-Bibliothek supertransfiziert und die Expression des sc-Fv-M88-TZR sowie der cDNA-Bibliothek induziert, so wuchsen nach dem Ausplattieren einzelne Klone zu großen Kolonien heran, während die meisten Kolonien sehr klein blieben (s. Abb. 3.2d). Bei der Negativkontrolle, bei der die Expression des sc-Fv-M88-TZR durch Glukose unterdrückt wurde, hatten alle Kolonien dieselbe Größe (s. Abb. 3.2e). Die größten Kolonien wurden im Anschluss isoliert und die Plasmide der cDNA-Bibliothek sequenziert. Neben einigen Mischsequenzen fand sich in den Klonen 2 und 3 die ORF-Sequenz (*open reading frame*) der *E. coli* Lysyl-tRNA-Synthetase (Eck-RS). In Bruder, 2009 wurde bereits die rekombinant hergestellte Eck-RS (Shimizu et

al., 2001) auf Aktivierung der M88-Hybridome hin untersucht und konnte als Antigen bestätigt werden (s. Abb. 3.2f). Dazu wurden die EcK-RS und ein monoklonaler α -CD3-Antikörper als Positivkontrolle an eine Mikrotiterplatte adsorbiert und anschließend M88-transfizierte Hybridomzellen hinzugefügt. Nach 16 Stunden wurde das in den Zellkulturüberstand sezernierte IL-2 im ELISA gemessen. Sowohl die EcK-RS, als auch der α -CD3-Antikörper stimulierten die M88-Hybridome, während das Medium alleine zu keiner Aktivierung führte. Somit deuten zwei unabhängige Experimente auf eine Aktivierung von M88 durch die EcK-RS hin.

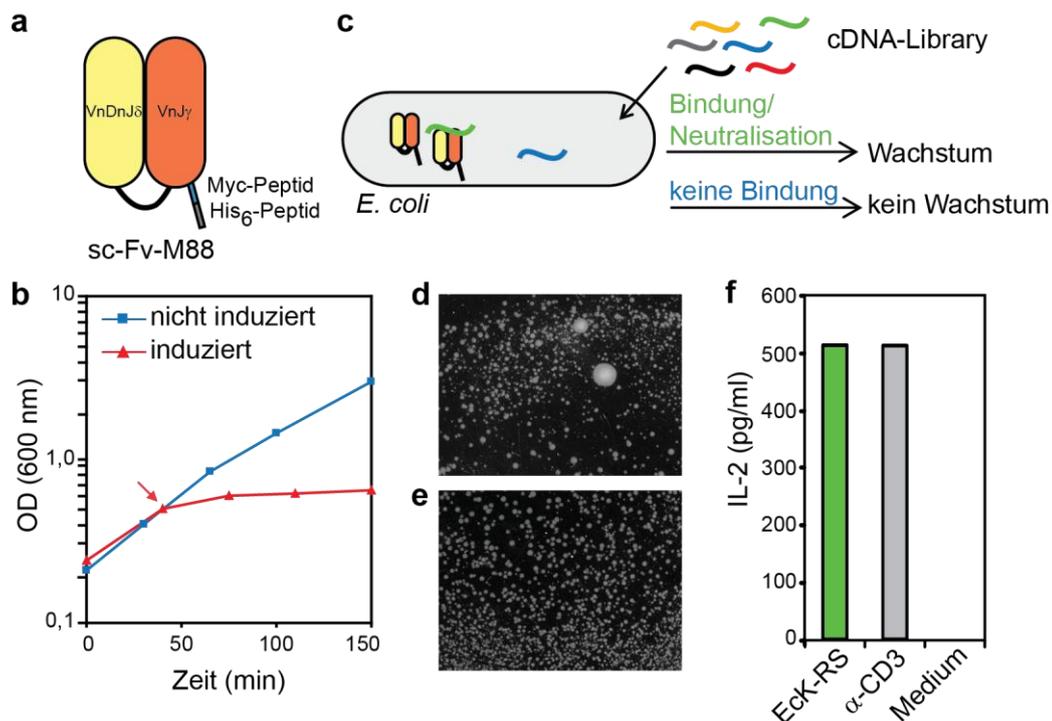


Abb. 3.2: Antigensuche mit einer *E. coli* cDNA-Bibliothek.

(a) Schematische Darstellung des löslichen sc-Fv-M88-TZR, der im Zytosol von *E. coli* exprimiert wurde. Er besteht aus den VnDnJ δ - und VnJ γ -Regionen sowie eines Teils der C γ -Region, die über einen Aminosäure-Linker verbunden sind. (b) Wachstumskurve von *E. coli* „BL21-StarTM-DE3“, die mit dem sc-Fv-M88-Rezeptor transfiziert wurden. Die blaue Kurve stellt das Bakterienwachstum ohne Induktion des sc-Fv-M88-TZR dar, während bei der roten Kurve die Expression mit IPTG induziert wurde. Der Zeitpunkt der Induktion (40 min) ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet, danach stellten die Bakterien ihr Wachstum ein. (c) Schematischer Versuchsablauf: Nachdem die Bakterien mit M88 transfiziert wurden, wird eine *E. coli* cDNA-Bibliothek supertransfiziert. Wird ein Antigen (grün) exprimiert, so bindet es an den M88-Rezeptor und neutralisiert ihn, während andere Transkripte (blau, etc.) nicht binden können und zu einem Wachstumsstopp führen. (d) Bakterien, die mit dem sc-Fv-M88-TZR sowie einer *E. coli* cDNA-Bibliothek transfiziert wurden. Hatten die Bakterien ein Antigen aufgenommen, so hat es im Zytosol an den sc-Fv-M88-Rezeptor gebunden und den wachstumshemmenden Effekt neutralisiert. Diese Bakterien konnten große Kolonien bilden, während Bakterien, die andere Transkripte der cDNA-Bibliothek aufgenommen hatten nur sehr kleine Kolonien bildeten. Die größten Kolonien wurden anschließend isoliert und sequenziert. In zwei Klonen fand sich das ORF der EcK-RS. (e) Kontrollexperiment, bei dem die Expression des sc-Fv-M88-TZR durch 2 mM Glukose unterdrückt wurde. Alle Kolonien hatten dieselbe Größe. Um die Bildung eines konfluenten Bakterienrasens zu verhindern, wurden die Bakterien kürzer als unter (d) kultiviert. (f) Aktivierung der M88-Hybridome durch 1 μ g/Well rekombinante EcK-RS (Bruder, 2009) gemessen im IL-2 ELISA. Als Positivkontrolle diente ein monoklonaler α -CD3-Antikörper (1 μ g/ml) und als Negativkontrolle Medium. Es ist ein repräsentatives Experiment gezeigt.

3.1.3 Erkennung bakterieller Proteine durch M88

Seit Wiendl et al., 2002 und Dornmair et al., 2004 wird vermutet, dass M88 ein Epitop bzw. Strukturmotiv erkennt, das auf mehreren funktionell und strukturell nicht verwandten Proteinen vorkommt. Diese Annahme wird vor allem durch die Experimente gestützt, in denen gezeigt wurde, dass die Antigene sowohl in mehreren Spezies vorkommen, als auch verschiedene Molekulargewichte aufweisen können.

In Bruder, 2009 wurde bereits die Aktivierung der M88-Hybridome durch einzeln gereinigte rekombinante Proteine des Translationsapparates aus *E. coli* (Shimizu et al., 2001) analysiert und einige der Präparationen konnten M88 tatsächlich stimulieren. Die meisten der untersuchten Proteine waren laut SDS-Polyacrylamidgel und Silberfärbung bereits hoch gereinigt, manche Präparationen zeigten jedoch weitere kontaminierende Proteine. Um auszuschließen, dass Kontaminationen in den Präparationen M88 aktivieren, wurden Gelfiltrationsexperimente mit den rekombinanten Proteinen des Translationsapparates durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden im Anschluss auf Aktivierung des TZR M88 hin untersucht. Dabei konnten die bakterielle EcK-RS (58 kDa), die Asparaginyl-tRNA-Synthetase (EcN-RS, 53 kDa) und der Translationsinitiationsfaktor EcIF1 (9 kDa) als Antigene bestätigt werden. Die Gelfiltrationsläufe der EcN-RS und des EcIF1 stammen aus Bruder, 2009 und wurden aus Gründen der Vollständigkeit und des Verständnisses übernommen. Eine Aktivierung von M88 (s. Abb. 3.3b) konnte nur in den Fraktionen beobachtet werden, die auch laut Gelfiltrationselutionsprofil (s. Abb. 3.3a) die entsprechenden Proteine enthielten. Als Negativkontrolle diente die Aspartyl-tRNA-Synthetase (EcD-RS, 66 kDa), die die M88-Hybridome nicht zur IL-2 Sekretion stimulierte. Die Proteine zeigten zum Teil unterschiedliche Laufeigenschaften bei der Gelfiltrationsschromatographie, was unter anderem von der Konformation, Oligomerbildung oder Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial abhängt. Daher eluierten manche Proteine in Fraktionen, die eigentlich nicht dem Molekulargewicht des Standards entsprechen würden. Die Elution der Proteine wurde daher zusätzlich mit einer SDS-PAGE (4-20 %) unter reduzierenden Bedingungen und Silberfärbung überprüft (s. Abb. 3.3c). Von den Proben „vorher“ wurden je 3 µg Protein aufgetragen, nach der Gelfiltration wurden jeweils 20 µl einer der Hauptelutionsfraktionen aufgetragen. Die Adsorptionsspektren der vier einzelnen Proteine bei der Gelfiltration wurden zum Zwecke der besseren Übersichtlichkeit normalisiert und zusammengefasst in Abb. 3.3a dargestellt. Es ist daher zu beachten, dass hier nicht die absolute Signalintensität der Elutionskurven bzw. der IL-2 M88-Aktivierungssignale der verschiedenen Proteine untereinander zu vergleichen sind, sondern vielmehr, dass die M88-Aktivierung mit dem Elutionsprofil des entsprechenden Proteins übereinstimmt. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass M88 durch mehrere strukturell und funktionell verschiedene Proteine des Translationsapparates aus *E. coli* aktiviert werden kann.

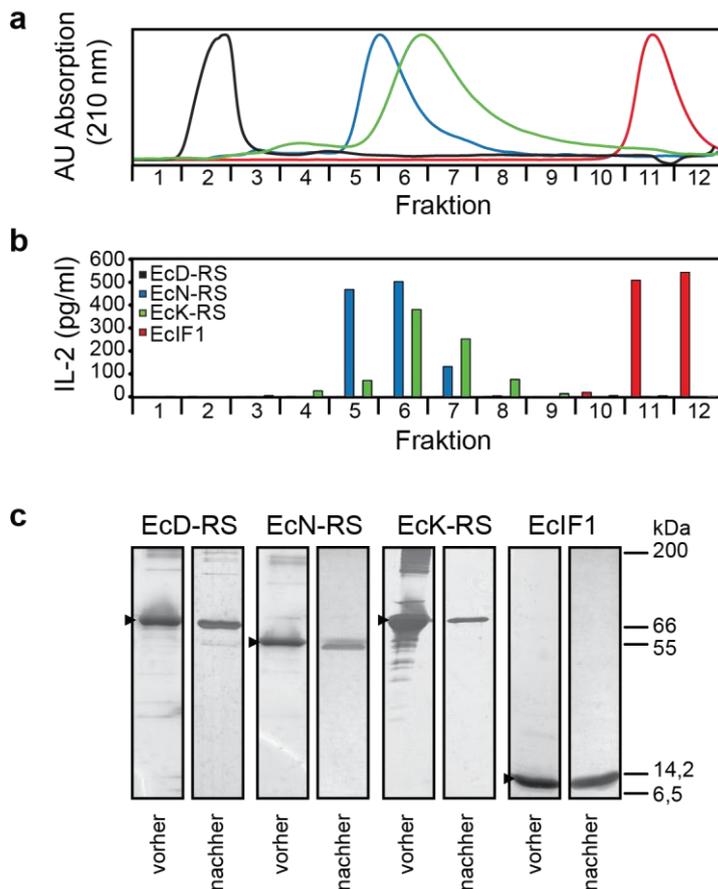


Abb. 3.3: Erkennung mehrerer bakterieller Proteine durch M88.

(a) Gelfiltrationsexperimente mit mehreren rekombinant im Zytosol von *E. coli* exprimierten Proteinen aus Shimizu et al., 2001: EcD-RS (schwarz), EcN-RS (blau (Bruder, 2009)), EcK-RS (grün) und EcIF1 (rot (Bruder, 2009)). Alle Proteine wurden identisch hergestellt und gereinigt. Die Elutionskurven wurden bei 210 nm aufgezeichnet und anschließend normalisiert. EcD-RS eluierte früher als erwartet, wahrscheinlich formten sich während des Laufs Oligomere. (b) Es wurden zwölf Fraktionen zwischen 150-5 kDa gesammelt, an Mikrotiterplatten adsorbiert und auf Aktivierung der M88-Hybridome getestet. Im Anschluss wurde das produzierte IL-2 im Überstand gemessen. Die Aktivierung der Hybridome durch bestimmte Elutionsfraktionen stimmte mit den Elutionspeaks der EcK-RS, EcN-RS und des EcIF1 überein, während die EcD-RS M88 nicht aktivierte. (c) Die Reinheit der rekombinanten Proteine wurde vor (3 µg Protein) und nach der Gelfiltration (20 µl einer Elutionsfraktion) mit einer SDS-PAGE (4-20 %) unter reduzierenden Bedingungen und Silberfärbung überprüft. Die Pfeile zeigen die Position der relevanten Proteine an. Es ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis gezeigt.

3.1.4 Erkennung humaner Proteine durch M88

Es wurde bereits beschrieben, dass der pathogene Rezeptor M88 wahrscheinlich auch Proteine aus humanen Zellen, insbesondere Muskelzellen, erkennt (Wiendl et al., 2002; vorläufige Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe K. Dornmair). Da außerdem bekannt ist, dass ca. 20 % aller Myositis-Patienten Autoantikörper gegen AA-RS und weitere intrazelluläre Proteine besitzen (Dalakas und Hohlfeld, 2003), wurde im Folgenden die Aktivierung des TZR M88 durch humane rekombinante AA-RS untersucht. Zunächst wurde mit den rekombinanten Proteinen Histidyl-tRNA-Synthetase (hH-RS, Jo-1, 58,3 kDa), Alanyl-tRNA-Synthetase (hA-RS, PL-12, 108,0 kDa) und Threonyl-tRNA-Synthetase (hT-RS, PL-7, 83,3 kDa) ein Gelfiltrationsexperiment wie in Abschnitt 3.1.3 durchgeführt (s. Abb. 3.4). Diese humanen Proteine wurden im Baculovirus-Insektenzell-System exprimiert und gereinigt. Eine Aktivierung von M88 wurde, ähnlich wie in Abschnitt 3.1.3 für bakterielle Proteine beschrieben, nur in den Fraktionen beobachtet, die die hH-RS und hA-RS enthielten. Die hT-RS wurde ebenfalls gelfiltriert, vermutlich denaturierte sie allerdings auf der Gelfiltrationssäule. Sie konnte daher nicht in den Elutionsfraktionen detektiert werden. Des Weiteren ist die Aktivierung von M88 nicht auf humane AA-RS beschränkt. Es wurde zusätzlich ein Hepatitisantigen, die „Formimidoyltransferase-Cyclodeaminase 1“ (hLC1, 59,7 kDa) (Mao et al., 2004) untersucht. Dieses Protein

stimulierte die M88-Hybridome ebenfalls. Ein Kontrollprotein „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (hPCNA, 29,8 kDa), das auf die gleiche Weise hergestellt und gereinigt wurde, aktivierte die Hybridome hingegen nicht (s. Abb. 3.4). Dies deutet auf eine spezifische Aktivierung von M88 durch die hH-RS, hA-RS und hLC1 hin. Bei diesem Experiment wurde die Elution bei der Gelfiltration ebenfalls parallel durch eine SDS-PAGE (4-20 %) unter reduzierenden Bedingungen und Silberfärbung überprüft (s. Abb. 3.4c). Besonders in den Proben vor der Gelfiltration sind zahlreiche kontaminierende Proteine zu erkennen, von denen die meisten durch Gelfiltration erfolgreich abgetrennt werden konnten. Allerdings wurden bei der hA-RS, der hLC1 und dem hPCNA keine scharfen Elutionspeaks erzielt. Die Proteine eluierten daher in mehreren Fraktionen. Der erste Peak von hPCNA (s. Abb. 3.4a, schwarze Kurve, Fraktion 3) stellt wahrscheinlich ein Oligomer dar, da das silbergefärbte SDS-Polyacrylamidgel der Fraktion 3 keine weiteren kontaminierenden Proteine aufzeigte (Daten nicht gezeigt).

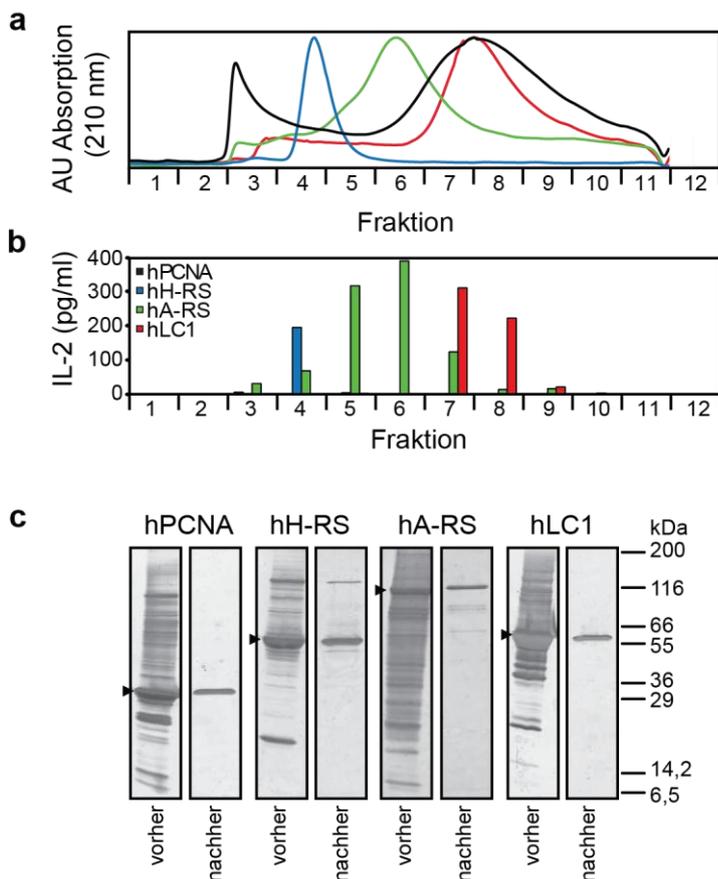


Abb. 3.4: Erkennung mehrerer humaner Proteine durch M88.

(a) Gelfiltrationsexperimente mit mehreren rekombinanten humanen Proteinen: hPCNA (schwarz), hH-RS (blau), hA-RS (grün) und hLC1 (rot). Alle Proteine wurden identisch im Baculovirus-Insektzell-System hergestellt. Die Elutionsprofile wurden bei 210 nm aufgezeichnet und normalisiert. hH-RS lief etwas schneller als erwartet, was auf Oligomerbildung hindeutet. hA-RS und hLC1 liefen hingegen etwas langsamer als erwartet, wahrscheinlich aufgrund von Wechselwirkungen mit der Gelmatrix. (b) Wie in Abb. 3.3 wurden zwölf Fraktionen gesammelt und auf Aktivierung der M88-Hybridome getestet. Die Aktivierung der Hybridome durch bestimmte Elutionsfraktionen im IL-2 ELISA stimmte mit den Elutionspeaks der hH-RS, hA-RS und hLC1 überein, während hPCNA M88 nicht aktivierte. (c) Die Reinheit der Proteine wurde vor (3,5 µg Protein) und nach der Gelfiltration (20 µl einer Elutionsfraktion) mit einer SDS-PAGE (4-20 %) unter reduzierenden Bedingungen und Silberfärbung analysiert. Die Position der relevanten Proteine ist durch Pfeile angezeigt. Besonders vor der Gelfiltration sind zahlreiche kontaminierende Proteine zu erkennen. Es ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis gezeigt.

Zur Analyse der spezifischen Erkennung der hH-RS durch M88 wurde zusätzlich ein Antikörper-Blockierungsexperiment durchgeführt. Dazu wurden die drei AA-RS, hH-RS, hT-RS und hA-RS (s. Abb. 3.5a), in einer Konzentration von 0,5 µg/Well an eine Mikrotiterplatte adsorbiert. Danach wurde die Aktivierung der M88-Hybridome in Ab- und Anwesenheit von

blockierenden Antikörpern untersucht (s. Abb. 3.5b). Ein polyklonales humanes Serum sowie ein monoklonaler Antikörper (mAk) gegen die hH-RS blockierten die Erkennung der hH-RS durch M88 vollständig. Das polyklonale humane Serum hatte allerdings in hohen Konzentrationen ebenfalls einen Effekt auf die Erkennung der hT-RS und der hA-RS, was auf eine Kreuzreaktivität des polyklonalen humanen Antikörperserums gegen verschiedene AA-RS hinweist. Der monoklonale Antikörper blockierte dagegen ausschließlich die Erkennung der hH-RS. Diese Daten zeigen, dass die hH-RS spezifisch von M88 erkannt wird und die Erkennung durch Antikörper vollständig blockiert werden kann.

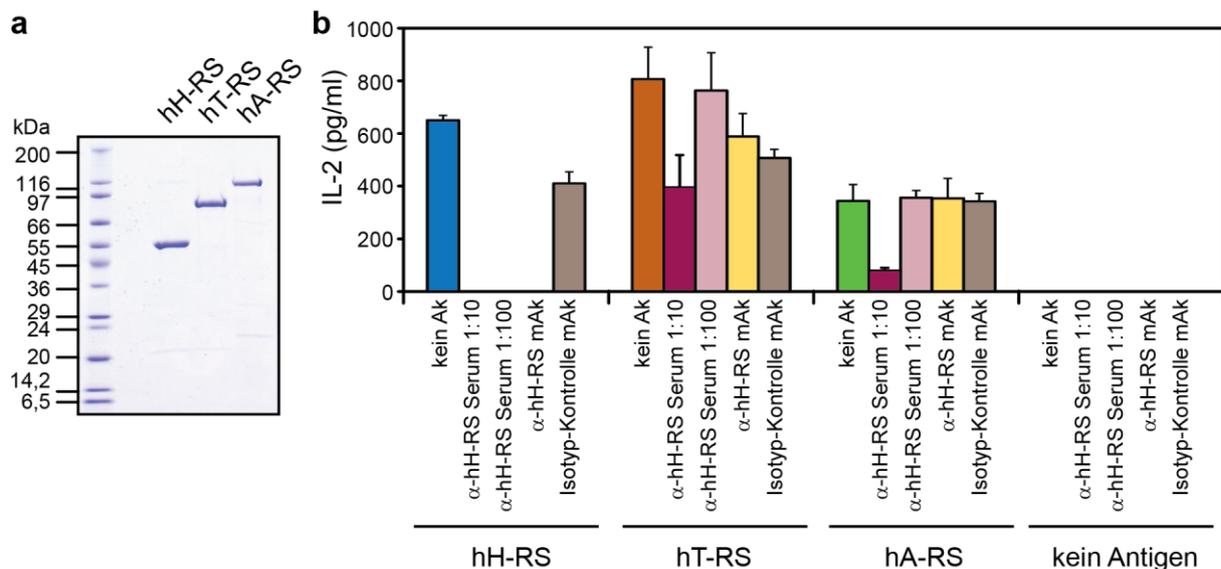


Abb. 3.5: Spezifische Erkennung humaner Aminoacyl-tRNA-Synthetasen durch M88.

(a) Beispiel eines Coomassie-gefärbten 4-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengels der rekombinanten humanen AA-RS (je 3 μ g Protein) unter reduzierenden Bedingungen. (b) Antikörper-Blockierungsexperiment der AA-RS. 0,5 μ g/Well der Proteine hH-RS (blau), hT-RS (orange) und hA-RS (grün) wurden an Mikrotiterplatten adsorbiert und die Aktivierung der M88-Hybridome in Ab- und Anwesenheit von blockierenden Antikörpern untersucht. Anschließend wurde das in den Überstand sezernierte IL-2 im ELISA gemessen. Die Erkennung der hH-RS konnte durch zwei spezifische Antikörper blockiert werden. Zum einen wurde ein polyklonales humanes Serum gegen die hH-RS in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 (pink und rosa) verwendet und zum anderen ein monoklonaler Antikörper (mAk) gegen die hH-RS (gelb). Beide Antikörper blockierten die Erkennung der hH-RS durch M88 vollständig, während die Isotypkontrolle, der monoklonale Antikörper X40 (grau), die Aktivierung kaum veränderte. Die Erkennung der hT-RS und der hA-RS wurde durch hohe Konzentrationen des polyklonalen humanen α -hH-RS Serums ebenfalls vermindert, was auf eine Kreuzreaktivität des Serums schließen lässt. Die Antikörper alleine induzierten keine IL-2-Produktion (s. Negativkontrolle rechts). Es ist der Mittelwert aus einer 4-fach Bestimmung gezeigt und die Fehlerbalken zeigen \pm SD an. Die Daten stellen ein repräsentatives Experiment von vier unabhängigen Wiederholungen dar.

3.1.5 Nähere Charakterisierung des bakteriellen Antigens EcIF1

3.1.5.1 Mutagenese, Expression und Charakterisierung des EcIF1

Um die Antigenerkennung des TZR M88 näher zu charakterisieren, wurde ein kleines lösliches *E. coli* Protein, der Translationsinitiationsfaktor EcIF1 (Pon et al., 1979; 8,3 kDa, UniProt-Identität (UniProt-ID) P69222), als Modellantigen verwendet. Es wurde unter ande-

rem ausgewählt, weil die vollständige Struktur, im Gegensatz zu den humanen AA-RS, bereits bekannt ist (Sette et al., 1997). Das EcIF1 ist 72 As lang und ist ein essentielles Protein, das an der Proteinbiosynthese im Zytosol beteiligt ist. Posttranslationale Modifikationen von EcIF1 sind bis jetzt nicht beschrieben worden. EcIF1 besitzt als strukturelle Besonderheit eine Oligonukleotid/Oligosaccharid-Bindungs-Falte (OB-Fold, Murzin, 1993), die aus fünf antiparallelen verdrehten β -Faltblättern und einer kurzen, flexiblen und exponierten 3_{10} α -Helix besteht (s. Abb. 3.6a) und an der Bindung von Nukleinsäuren beteiligt ist. Diese Domäne kommt auch bei anderen Proteinen, zum Beispiel bei einigen AA-RS, vor.

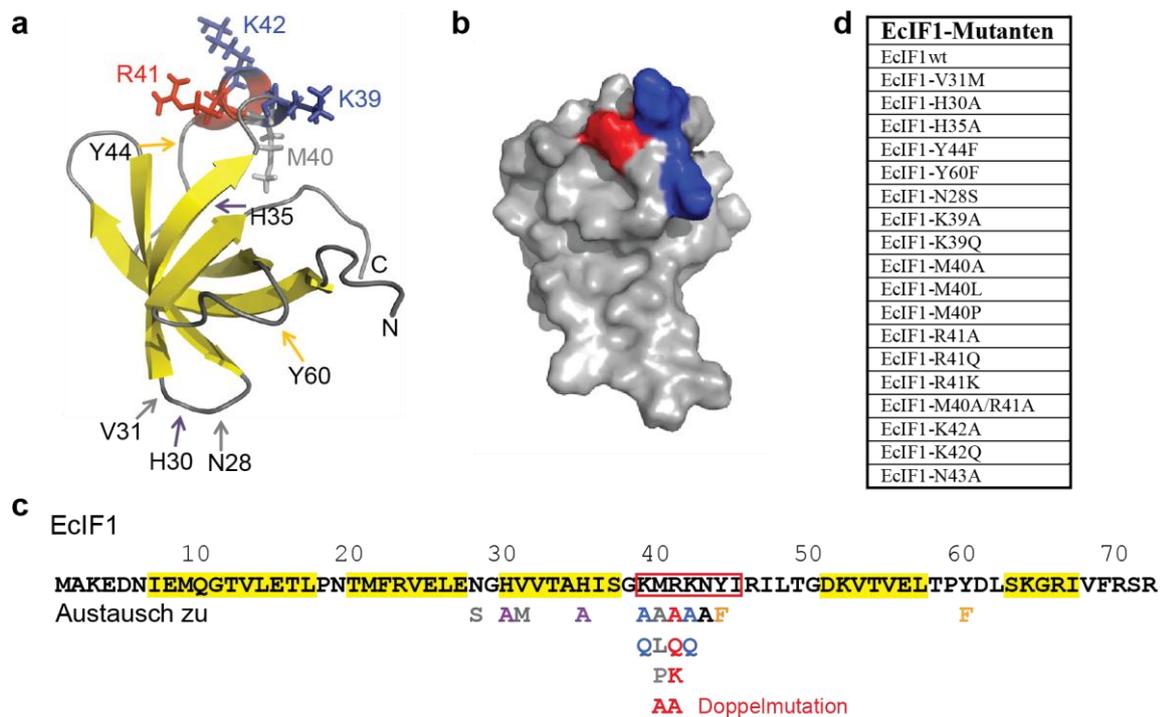


Abb. 3.6: Struktur und Mutagenese von EcIF1.

(a) 3D-Strukturmodell des EcIF1 basierend auf NMR-Spektroskopie-Daten (Sette et al., 1997), Struktur 1AH9, 11 (Darstellung mit dem Programm „PyMOL“). Das Molekül besteht aus einer starren, aus fünf β -Faltblättern bestehenden Struktur (gelb) und einer kurzen 3_{10} α -Helix (rot). Die Aminosäuren, an denen besonders viele Mutationen vorgenommen wurden, liegen in der kurzen α -Helix und sind als Stäbchenmodell dargestellt: K39 (blau), M40 (grau), R41 (rot), K42 (blau). Die übrigen Mutationen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Unter (b) ist ein Oberflächenmodell im gleichen Farbcode abgebildet. (c) Aminosäuresequenz 1-72 des EcIF1 (UniProt-ID P69222), der Farbcode ist derselbe wie unter (a). Ausgetauschte Aminosäuren sind unterhalb der Sequenz und in Tabelle (d) aufgelistet. Es handelt sich bis auf die Mutante EcIF1-M40A/R41A, bei der zwei Aminosäuren gleichzeitig gegen Alanin ausgetauscht wurden, um Einzelmutationen zu der jeweils genannten Aminosäure.

Aus Bruder, 2009 standen der EcIF1wt sowie die Mutanten V31M, H30A, H35A, Y44F und Y60F zur Verfügung. Aus älteren Arbeiten (Wiendl et al., 2002; Dornmair et al., 2004) ging bereits hervor, dass wahrscheinlich ein auf mehreren nicht verwandten Proteinen vorkommendes, exponiertes Konformationsepitop bei der Aktivierung von M88 eine Rolle spielt. Daher erschienen einige weitere Mutationen um die exponierte 3_{10} α -Helix des EcIF1 als besonders geeignet (s. Abb. 3.6c). Der EcIF1wt und die Mutanten wurden in *E. coli* mit N-

terminalem MRGS-His₆-GS-Peptid exprimiert und gereinigt. Die Proteine haben eine Länge von 84 As und ein errechnetes Molekulargewicht von 9,6 kDa. Es ist bereits bekannt, dass der EcIF1wt unter diesen Bedingungen nativ und funktionell hergestellt werden kann (Shimizu et al., 2001). Insgesamt wurden 19 verschiedene EcIF1-Proteine kloniert, exprimiert und einzeln gereinigt (s. Abb. 3.6d). Sowohl der EcIF1wt als auch die Mutanten konnten bis auf die EcIF1-N43A-Mutante in großer Ausbeute und Reinheit hergestellt werden (s. Abb. 3.7a für den EcIF1wt). Die Aminosäuresequenzen der rekombinanten Proteine wurden zusätzlich durch Massenspektrometrie bestätigt (Daten nicht gezeigt). Alle Proteine, bis auf die EcIF1-N43A-Mutante, die sich nicht in ausreichenden Mengen exprimieren ließ, wurden anschließend auf Aktivierung der M88-Hybridome hin untersucht.

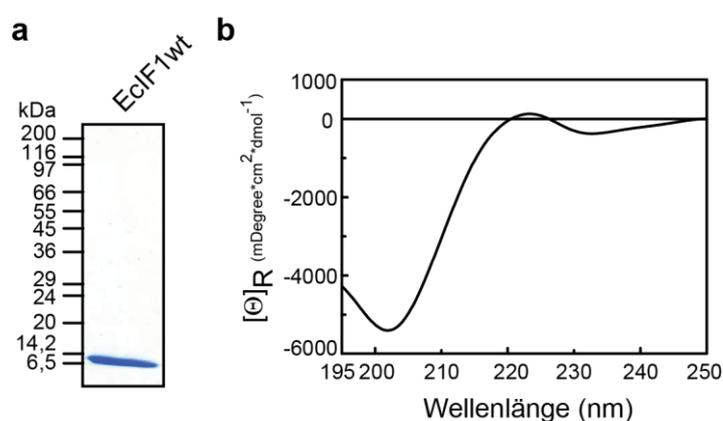


Abb. 3.7: Expression und Charakterisierung des EcIF1.

(a) Repräsentatives Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (4-20 %) des gereinigten EcIF1wt (3 µg) unter reduzierenden Bedingungen. Das Protein wurde in guter Ausbeute und Reinheit gewonnen. Die Mutanten wurden entsprechend hergestellt (hier nicht gezeigt). (b) CD-Spektroskopie des EcIF1wt in PBS. Die molare Elliptizität $[\Theta]_R$ ist zwischen 195-250 nm gezeigt. Es ist ein repräsentatives Experiment von vier unabhängigen Messungen gezeigt.

Tab. 3.1: Anteile der Sekundärstrukturen des EcIF1 in Prozent.

Die CD-Daten des EcIF1wt wurden mit dem Programm „Spektra Manager CDPro Analysis Contin SMP56“ ausgewertet und die Anteile der Sekundärstrukturen in Prozent berechnet. Im nächsten Schritt wurden die bekannten Literaturwerte auf die nun insgesamt 84 As des rekombinanten EcIF1 umgerechnet und mit den praktisch ermittelten Werten verglichen. Es konnte eine gute Übereinstimmung beobachtet werden.

	α -Helices	β -Stränge	Schleifen	ungefaltete Strukturen
Contin SMP56	5,3	40,8	22,4	31,5
Sette et al., 1997	8,3	46,4	17,9	27,4

Zudem konnte mit CD-Spektroskopie-Messungen gezeigt werden, dass der gereinigte EcIF1wt eine native Konformation annimmt (s. Abb. 3.7b und Tab. 3.1). Bei der CD-Spektroskopie wird der Anteil an α -Helices, β -Faltblättern, Schleifen und ungefalteten Strukturen durch Einstrahlung von zirkular polarisiertem Licht gemessen. Danach werden die gemessenen Daten mit 56 Referenzproteinen (Contin SMP56) bekannter Struktur verglichen und der Anteil der verschiedenen Sekundärstrukturen berechnet. Die im Experiment ermittelten Daten wurden im Anschluss mit den NMR-Daten aus der Literatur (Sette et al., 1997; s. Tab. 3.1 unten) abgeglichen und es wurde eine gute Übereinstimmung beobachtet. 39 der Aminosäuren bilden ein starres β -barrel und 7 Aminosäuren sind an einer flexiblen α -Helix beteiligt. Die Werte aus der Literatur bezogen sich auf ein EcIF1 mit insgesamt 71 Aminosäuren.

ren, daher wurden die Werte auf die nun 84 Aminosäuren des hier verwendeten rekombinanten EcIF1 umgerechnet. Aufgrund des um MRGS-His₆-GS verlängerten N-Terminus hat das hier gezeigte EcIF1 wahrscheinlich einen größeren Anteil an ungeordneten Strukturen als für das ursprüngliche EcIF1 zu erwarten wäre.

3.1.5.2 Aktivierung von M88 durch EcIF1wt und EcIF1-Mutanten

Um die Aktivierung von M88 durch EcIF1wt und die diversen Mutanten zu analysieren, wurden die Proteine zunächst in *E. coli* exprimiert, isoliert und auf Reinheit überprüft (s. Abb. 3.8).

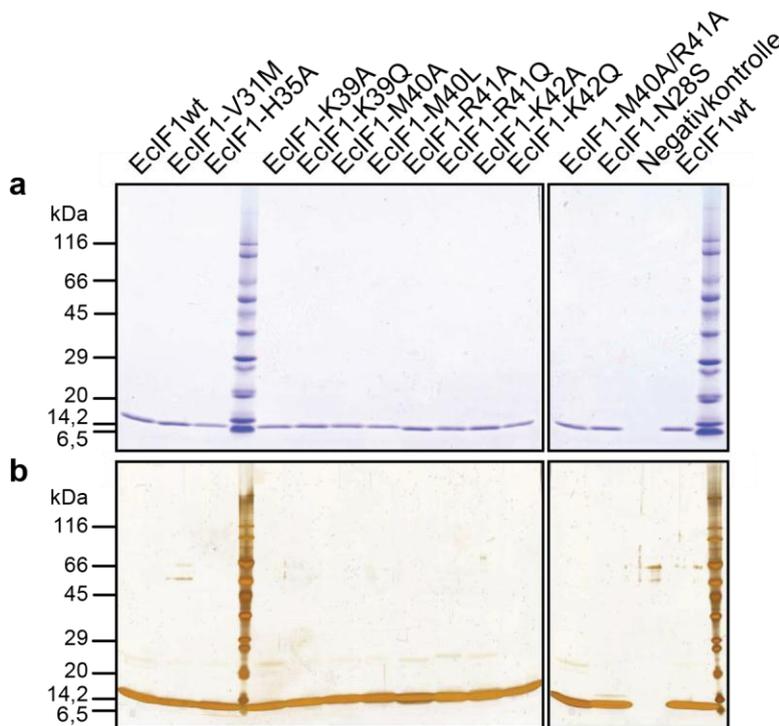


Abb. 3.8: Expression und Reinheit der EcIF1-Proteine.

Rekombinant exprimierte EcIF1wt- und Mutanten-Proteine, die für die Aktivierung der M88-Hybridome in Abb. 3.9. eingesetzt wurden. Die Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen in 4-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen aufgetrennt. **(a)** Coomassie-Färbung zur Abschätzung der Mengen. Es sind je 0,65 µg von allen Proteinen aufgetragen. Im nächsten Schritt wurden die Proteine in gleichen Mengen in einen M88-Aktivierungsversuch eingesetzt. **(b)** Überprüfung der Reinheit der EcIF1-Proteine (je 2,6 µg) mittels Silberfärbung. Alle Proteine konnten in großer und vergleichbarer Reinheit gewonnen werden.

In einem ersten Experiment wurden zunächst der EcIF1wt und zwölf der Mutanten (s. Abb. 3.8) auf die gleiche Konzentration eingestellt und in einer 1:3 Verdünnungsreihe von 10-0,12 µg/Well an Mikrotiterplatten adsorbiert. Anschließend wurde die Aktivierung der M88-Hybridome durch Messung des sezernierten IL-2 in den Zellkulturüberstand im ELISA analysiert (s. Abb. 3.9). Von den untersuchten Mutanten hatten nur einige der Mutationen in der kurzen 3₁₀ α-Helix einen Effekt auf die Aktivierung der M88-Hybridome (s. Abb. 3.9). Die anderen Austauschungen zeigten im Vergleich zum EcIF1-Wildtyp nur kleine Abweichungen. Die Aminosäuren der Helix K39, M40, R41 und K42 wurden jeweils einzeln gegen Alanin sowie gegen strukturell verwandte Aminosäuren wie K zu Q, M zu L und R zu Q ausgetauscht. Besonders die Mutationen des R41 (R41A, R41Q und M40A/R41A) zeigten eine signifikant geringere Aktivierung der M88-Hybridome. Als Kontrolle dienten Bakterien, die MOG ex-

primierten, das bei der Expression sogenannte unlösliche „*inclusion bodies*“ bildet. Eine identisch behandelte Probe aus diesen Bakterien enthält dieselben kontaminierenden bakteriellen Proteine und diente daher als Negativkontrolle für die Aktivierung der M88-Hybridome (sogenannte „*mock*“-Kontrolle). Diese Probe aktivierte die Hybridomzellen nicht. Damit konnten Kontaminationen durch andere bakterielle Proteine als Aktivierungsquelle ausgeschlossen werden. Zudem ist aus weiteren Experimenten bekannt, dass andere bakterielle Kontrollproteine, wie beispielsweise einige weitere AA-RS (Bruder, 2009), ein 22,6 kDa-Protein (Dephospho-CoA-Kinase aus *E. coli*; K. Dornmair) sowie das Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) aus *Staphylococcus aureus* den M88-Rezeptor ebenfalls nicht aktivieren (Daten nicht gezeigt). In weiteren Experimenten wurden auch die übrigen Mutanten H30A, Y44F, Y60F, M40P und R41K zusammen mit den bereits beschriebenen Proteinen exprimiert und gereinigt. Die Reinheit der Präparationen wurde wieder durch SDS-PAGE und Silberfärbung überprüft. Anschließend wurden der EcIF1wt und die Mutanten auf die gleichen Konzentrationen eingestellt und die Aktivierung der M88-Hybridome untersucht. Sie zeigten aber, bis auf die Mutante R41K, im Vergleich zum EcIF1wt nur vernachlässigbare Abweichungen (Daten nicht gezeigt), ansonsten war der gleiche Trend wie in Abb. 3.9 zu erkennen.

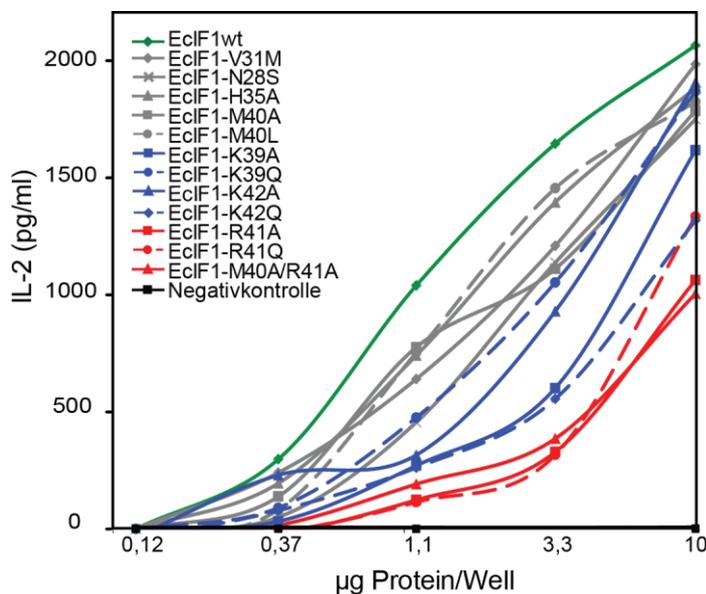


Abb. 3.9: Aktivierung von M88-Hybridomen durch EcIF1wt und mutierte EcIF1-Proteine.

Die Proteine wurden in den angegebenen Konzentrationen an Mikrotiterplatten adsorbiert. Im Anschluss wurden M88-Hybridome zugefügt und die Aktivierung durch Messung des sezernierten IL-2 bestimmt. Der EcIF1wt ist in grün dargestellt. Der Farbcode für die einzelnen Aminosäureaustausche ist in der Legende angegeben. Die Aktivierung war mit $p < 0,05$ für die Mutanten R41A, R41Q, M40A/R41A, K39A und K42Q im Gegensatz zum EcIF1wt für die Proteinkonzentrationen 1,1, 3,3 und 10 $\mu\text{g}/\text{Well}$ statistisch signifikant erniedrigt („*students two tailed unpaired*“ T-test „*Exel*“), wobei die drei R41-Mutanten den deutlichsten Effekt zeigten (s. rote Kurven). Die Negativkontrolle zeigte kein Signal. Die Daten stellen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 4-facher Bestimmung dar.

3.1.6 Erkennung eines Konformationsepitopes durch M88

3.1.6.1 Denaturierungsexperimente mit EcIF1 und hH-RS

Es wird vermutet, dass der TZR M88 nur Konformationsepitope erkennt, die auf einer Proteinoberfläche exponiert sind (Wiendl et al., 2002; Dornmair et al., 2004). Konformations-

epitope bezeichnen dabei Epitope, die erst durch die räumliche Faltung des Antigens gebildet werden. Um die Erkennung von Konformationsepitopen durch M88 zu untersuchen, wurden mit dem bakteriellen EcIF1 und der humanen hH-RS mehrere Denaturierungsexperimente durchgeführt, bei denen die native Konformation (Sekundär- und Tertiärstrukturen) mit verschiedenen Reagenzien aufgelöst werden sollte. Zunächst wurde in einigen Versuchen das bakterielle EcIF1 verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieses kleine Protein sehr stabil ist, oder sich nach Denaturierung sehr schnell in die native Konformation zurückfalten kann. Nach nur kurzer Inkubation mit denaturierenden Agenzien für 30 min bei RT zeigte sich keine Verringerung der Aktivierbarkeit von M88 durch Säuren, Basen oder andere chaotrope Chemikalien (s. Abb. 3.10a). Daher wurden in einem zweiten Experiment längere Inkubationszeiten für eine vollständige Denaturierung gewählt und es wurde weniger EcIF1 eingesetzt (s. Abb. 3.10b). Durch eine 24-stündige Inkubation mit dem chaotropen Guanidinium-Thiocyanat (Gua^+SCN^-), Säure, Base oder dem Verdau mit Proteinase K bzw. Trypsin bei 37 °C wurde gewährleistet, dass die Sekundärstruktur und damit auch das Konformationsepitop des EcIF1 nicht mehr ausgebildet sind. Nach dieser Behandlung wurde M88 nicht mehr durch EcIF1 aktiviert (s. Abb. 3.10b). Dies unterstützt die bereits früher gewonnenen Erkenntnisse über ein konformationelles Proteinepitop auch für das bakterielle Protein EcIF1.

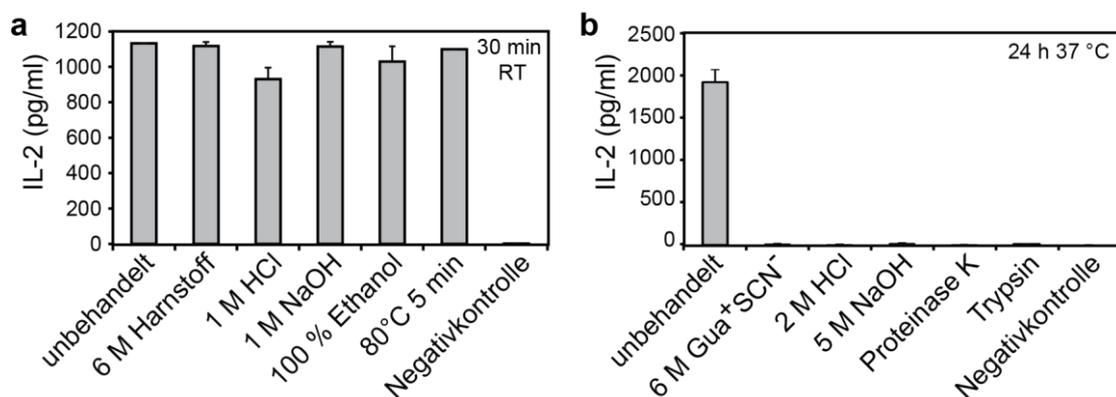


Abb. 3.10: Denaturierung des bakteriellen EcIF1.

(a) Für die ersten Denaturierungsexperimente wurden 10 µg EcIF1/Well an eine Mikrotiterplatte adsorbiert und für 30 min bei RT mit den angegebenen Agenzien behandelt. Zusätzlich wurde eine Probe für 5 min bei 80 °C inkubiert. Da EcIF1 sehr stabil ist oder schnell renaturiert, konnte im Vergleich zum unbehandelten nativen EcIF1 (links) kein Effekt auf die Aktivierung der M88-Hybridome im IL-2 ELISA beobachtet werden. (b) Wird die Denaturierung bzw. der Protease-Verdau von 0,5 µg EcIF1/Well dagegen für 24 h bei 37 °C durchgeführt, so wird die Erkennung durch M88 vollständig unterbunden. Die Daten stellen die Mittelwerte einer 2-fach (a) bzw. 4-fach-Bestimmung (b) dar und die Fehlerbalken zeigen +/- SD an.

Für weitere Denaturierungsexperimente wurde die hH-RS verwendet (s. Abb. 3.11). Die Aktivierung der M88-Hybridome durch die hH-RS konnte hier ebenfalls durch Säure- und Basinkubation sowie durch Proteaseverdau vollständig verhindert werden. Eine Abschwächung der Antigenerkennung durch Gua^+SCN^- gelang hingegen nicht (s. Abb. 3.11a). Dies wurde in einem weiteren Experiment noch näher untersucht (s. Abb. 3.11b), da vermutet wurde, dass

noch bestehende Disulfidbrücken innerhalb der hH-RS eine schnelle Rückfaltung ermöglichen. Durch Zugabe von DTT wurde die Aktivierung der M88-Hybridome zwar deutlich vermindert, aber nicht ganz unterdrückt. Zusammenfassend konnte aber auch hier eine Zerstörung des Konformationsepitopes und damit eine Verhinderung der Aktivierung von M88 durch die hH-RS erreicht werden.

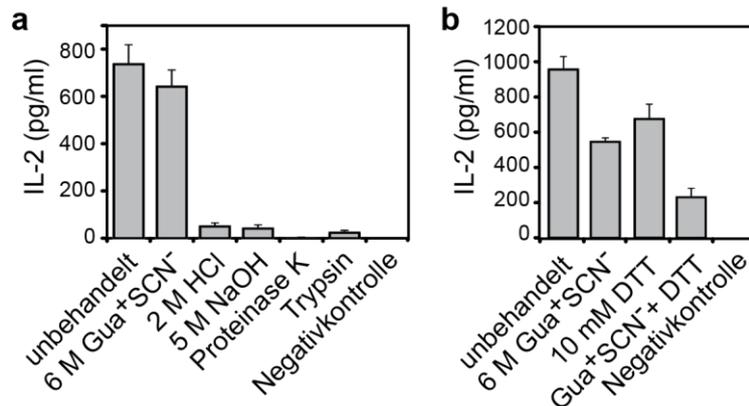


Abb. 3.11: Denaturierung der humanen hH-RS.

(a) Es wurden 0,5 µg der humanen hH-RS an eine Mikrotiterplatte adsorbiert und mit den angegebenen Agenzien für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe der M88-Hybridome wurde das sezernierte IL-2 im ELISA gemessen. Die Antigenerkennung der hH-RS durch M88 konnte bis auf die Inkubation mit Gua⁺SCN⁻ vollständig aufgehoben werden. (b) Weitere Experimente mit Gua⁺SCN⁻ und DTT. Durch Zugabe beider Agenzien kann die Aktivierung von M88 vermindert, aber nicht vollständig verhindert werden. Es ist der Mittelwert einer 4-fach Messung angegeben und die Fehlerbalken zeigen +/- SD an.

Des Weiteren wurde mit den beiden Proteinen EcIF1 und hH-RS noch ein De- und Renaturierungsexperiment in Kooperation mit B. Obermeier durchgeführt (s. Abb. 3.12). Dazu wurde zunächst die Aktivierung der M88-Hybridome durch die nativen Proteine in PBS, wie bereits beschrieben, untersucht, indem 0,5 µg Protein/Well an eine Mikrotiterplatte adsorbiert und anschließend M88-Hybridome hinzugefügt wurden. Ein weiteres Aliquot der Proteine wurde dagegen zunächst mit 6 M Harnstoff denaturiert, bevor ebenfalls jeweils 0,5 µg der Proteine untersucht wurden. Die restliche Probe wurde im Anschluss zur Renaturierung wieder gegen PBS dialysiert. Die Stimulation der M88-Hybridome durch 0,5 µg der renaturierten Probe wurde danach ebenso analysiert. Gleichzeitig wurde der Vorgang der De- bzw. Renaturierung durch CD-Spektroskopie überprüft (s. Abb. 3.12; rechte Seite). Abb. 3.12a zeigt das Ergebnis für EcIF1. Wie bereits für Abb. 3.10 beschrieben, ist dieses kleine Protein sehr stabil und nur schwer zu denaturieren. Diese Ergebnisse konnten mit dem Experiment bestätigt werden. Sowohl bei der Aktivierung der M88-Hybridome, als auch bei der CD-Spektroskopie zeigte sich die Stabilität des EcIF1 gegenüber denaturierenden Agenzien. Die hH-RS dagegen aktivierte die M88-Hybridome nach der Behandlung mit 6 M Harnstoff nicht mehr (s. Abb. 3.12b). Die Denaturierung des Proteins ließ sich zusätzlich durch CD-Spektroskopie bestätigen (s. Abb. 3.12b; rote Kurve). Selbst nach Dialyse gegen PBS wurde die ursprüngliche Konformation der hH-RS nicht wieder vollständig zurückgewonnen (s. Abb. 3.12b; blaue Kurve). Dies spiegelte sich ebenfalls in einer schwächeren Stimulation der M88-Hybridome wider.

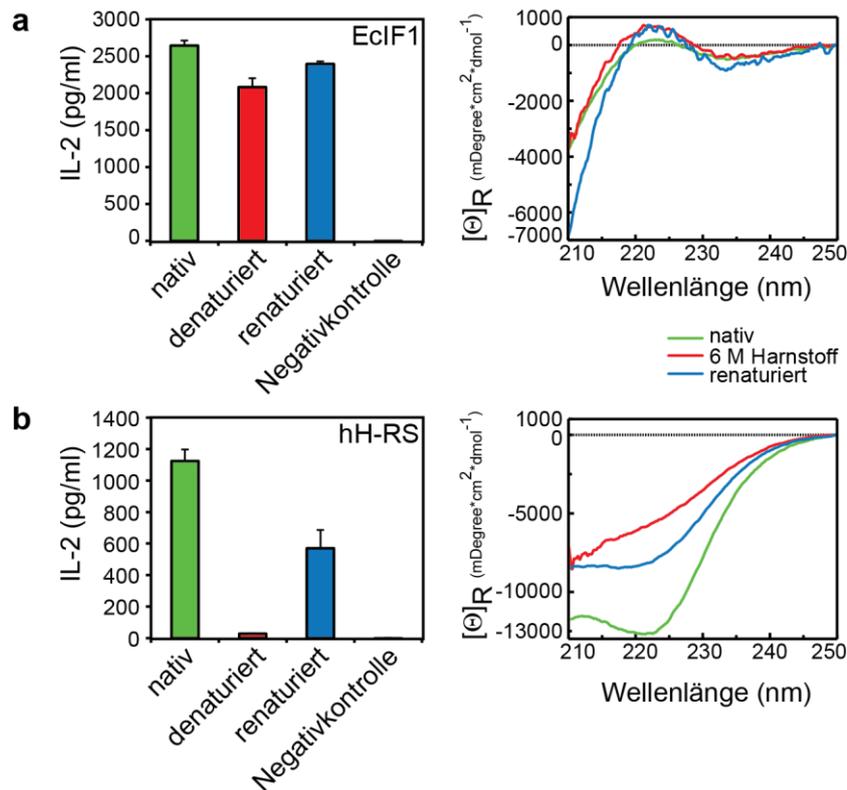


Abb. 3.12: De- und Renaturierung von EcIF1 und hH-RS.

Links sind die M88-Aktivierungsversuche (IL-2 ELISA) und rechts sind die zugehörigen CD-Spektroskopie-Messungen abgebildet. **(a)** De- und Renaturierung des EcIF1. Zunächst wurde die Aktivierung der M88-Hybridome durch natives EcIF1 in PBS, mit 6 M Harnstoff denaturiertes EcIF1 und durch Dialyse gegen PBS wieder renaturiertes EcIF1 im IL-2 ELISA untersucht. Die De- und Renaturierung wurden zusätzlich durch CD-Spektroskopie überprüft. Die molare Elliptizität $[\Theta]_R$ ist im Bereich zwischen 210 und 250 nm gezeigt. Die grüne Kurve zeigt das unbehandelte Protein, die rote Kurve das mit 6 M Harnstoff behandelte und die blaue Kurve das wieder gegen PBS dialysierte Protein. Wie bereits in Abb. 3.10 beschrieben, ist EcIF1 sehr stabil und lässt sich nur schwer denaturieren. Dies ließ sich sowohl durch die Aktivierung der M88-Hybridome im IL-2 ELISA als auch durch die CD-Spektroskopie bestätigen. **(b)** De- und Renaturierung der hH-RS. Die hH-RS ließ sich durch 6 M Harnstoff denaturieren. Dies konnte sowohl bei der Stimulation von M88 im IL-2 ELISA, als auch mit der CD-Spektroskopie gezeigt werden (rot). Selbst nach Dialyse gegen PBS nahm das Protein nicht wieder seine ursprüngliche Konformation ein und aktivierte die M88-Hybridome nur noch schwächer (blau). Für die Aktivierung der M88-Hybridome wurden jeweils $0,5 \mu\text{g}$ Protein/Well adsorbiert. Es ist der Mittelwert aus einer 3-fach Bestimmung dargestellt und die Fehlerbalken zeigen \pm SD an.

3.1.6.2 Untersuchung auf Erkennung von EcIF1-Peptiden

Um die Erkennung eines nicht linearen Konformationsepitopes durch M88 zu bestätigen, wurde zusätzlich untersucht, ob die M88-Hybridome durch ein synthetisches EcIF1-Peptid, das die Aminosäuren 33-46 des Proteins repräsentiert (EcIF1 (33-46)), stimuliert werden können (in Kooperation mit K. Siewert). Das Peptid wurde mittels Festphasen-Peptidsynthese hergestellt und durch HPLC gereinigt. Es wurde in verschiedenen Konzentrationen von $5 \times 10^2 - 5 \times 10^5 \mu\text{g/Well}$ an eine Mikrotiterplatte adsorbiert (s. Abb. 3.13a) und die Aktivierung von M88 wurde in einem IL-2 ELISA gemessen. Es konnte keine direkte Erkennung des Peptids durch den M88-Rezeptor beobachtet werden. Als Positivkontrolle wurde nativ gefaltetes EcIF1 verwendet, das wie erwartet M88 aktivierte. Zudem konnte das synthetische Peptid

nicht mit dem nativ gefalteten EcIF1 um Bindungsstellen am M88-Rezeptor konkurrieren (s. Abb. 3.13b), das heißt die Erkennung des EcIF1 wurde durch das zugefügte Peptid nicht beeinflusst. In einem weiteren Experiment wurde Trypsin-verdautes EcIF1 getestet. Durch den Verdau mit Trypsin nach den basischen Aminosäuren R und K sind theoretisch 12 verschiedene Peptide in der Lösung enthalten (s. Tab. 3.2). Es ist besonders zu beachten, dass durch den Verdau die kurze 3_{10} α -Helix vollständig zerstört wird. Damit ergänzt dieses Experiment die Untersuchungen zur Erkennung des EcIF1-Peptids (33-46), das vor allem die α -Helix repräsentiert. Es konnte auch hier keine Aktivierung von M88 durch die tryptische Peptidmischung beobachtet werden. Zudem wurde die Erkennung des nativen EcIF1 durch Zugabe von tryptischen EcIF1-Peptiden nicht verändert (s. Abb. 3.13c).

Tab. 3.2: Tryptische Peptide des EcIF1.

Trypsin-Verdau des rekombinanten EcIF1, der anschließend auf Aktivierung der M88-Hybridome sowie auf Konkurrenz um Bindungsstellen mit nativem EcIF1 hin untersucht wurde. Das Peptid MRGS-His₆-GS des Expressionsplasmids pQE30 ist in grau und die Sequenz des EcIF1 in schwarz dargestellt. Der Bereich 33-46, der durch das synthetische Peptid abgedeckt wurde, ist unterstrichen. Durch den Verdau des EcIF1 mit Trypsin entstehen theoretisch 12 verschiedene tryptische Peptide. Die Schnittstellen (Leerzeichen) nach den rot markierten basischen Aminosäuren R und K sind eingezeichnet.

EcIF1	MRGSHHHHHHGSM ^{grau} AKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISGKMRK ^{rot} NYIR RILTGDKVTVELTPYDLSKGRIVFRSR
Erwartete tryptische Peptide des EcIF1	MR GSHHHHHHHGSM ^{grau} AK EDNIEMQGTVLETLPNTMFR VELENGHVVTAHISGK MR K NYIR ILTGDK VTVELTPYDLSK GR IVFR SR

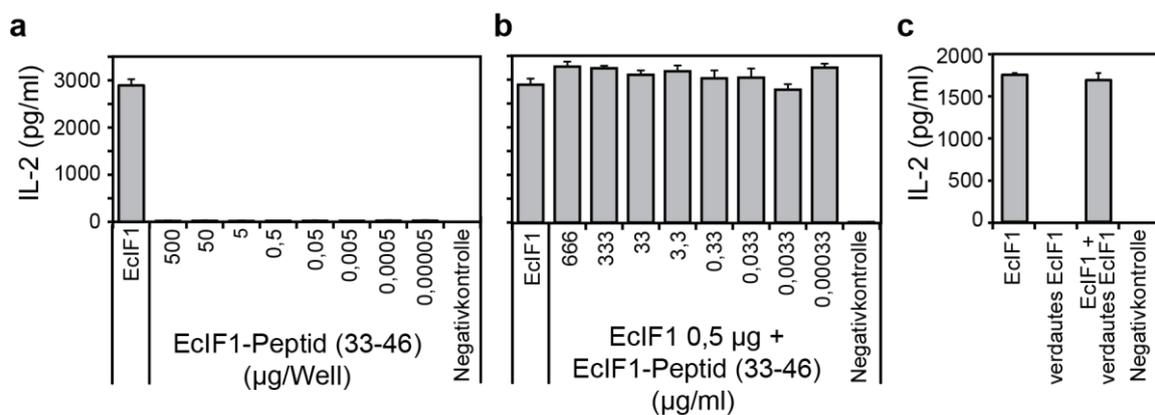


Abb. 3.13: Erkennung von EcIF1-Peptiden durch M88.

(a) Das synthetische Peptid EcIF1 (33-46), das die Aminosäuren des EcIF1 33-46 repräsentiert, wurde in Konzentrationen von 5×10^2 - 5×10^{-5} $\mu\text{g}/\text{Well}$ an eine Mikrotiterplatte adsorbiert und die Aktivierung von M88 wurde im IL-2 ELISA gemessen. Im Gegensatz zur Positivkontrolle, $0,5 \mu\text{g}$ natives EcIF1/Well (links), aktivierte das synthetische Peptid M88 nicht. (b) Konkurrenzexperiment mit dem EcIF1-Peptid. Zunächst wurden $0,5 \mu\text{g}$ EcIF1 an eine Mikrotiterplatte adsorbiert. Danach wurden die Platten gewaschen und $6,66 \times 10^2$ - $3,3 \times 10^{-4}$ μg Peptid/ml zusammen mit den M88-Hybridomen hinzugefügt. Es konnte keine Konkurrenz des EcIF1-Peptids (33-46) mit dem EcIF1 beobachtet werden. Die Erkennung des nativen EcIF1 wurde durch das Peptid nicht beeinflusst. Die y-Achsenbeschriftung ist dieselbe wie bei (a) (c) Konkurrenzexperiment mit tryptischen EcIF1-Peptiden. Durch den Verdau mit Trypsin sind theoretisch 12 verschiedene tryptische EcIF1-Peptide in der Lösung enthalten (s. Tab. 3.2). Der Trypsin-Verdau wurde anschließend alleine untersucht sowie wie unter (b) zu bereits $0,5 \mu\text{g}/\text{Well}$ adsorbiertem nativem EcIF1 gegeben. Die tryptischen Peptide alleine aktivierten die M88-Hybridome nicht und konnten auch nicht mit dem nativen EcIF1 konkurrieren oder dessen Erkennung durch den M88-Rezeptor beeinflussen. Es ist der Mittelwert aus einer 3-fach (a, b) oder einer 4-fach Bestimmung (c) abgebildet. Die Fehlerbalken zeigen \pm SD an.

3.1.7 Spezifische Erkennung des EcIF1 durch die CDR-Regionen von M88

Für die Experimente zur spezifischen Erkennung des EcIF1 durch die CDR-Regionen des M88-Rezeptors, wurden neben dem M88-Wildtyp sechs M88-Mutanten (Wiendl et al., 2002) verwendet. Die M88-Rezeptoren dieser Zellen besitzen definierte Aminosäureaustausche in den Vn(D)nJ- oder C-Regionen beider Rezeptorketten und sind bereits gut charakterisiert. Sie exprimieren einen funktionellen TZR und sind nach Stimulation durch α -CD3- und pan- $\gamma\delta$ -Antikörper zur IL-2-Produktion fähig. Das Experiment stammt aus Bruder, 2009 und wurde aus Gründen der Vollständigkeit und des Verständnisses hier übernommen (s. Abb. 3.14).

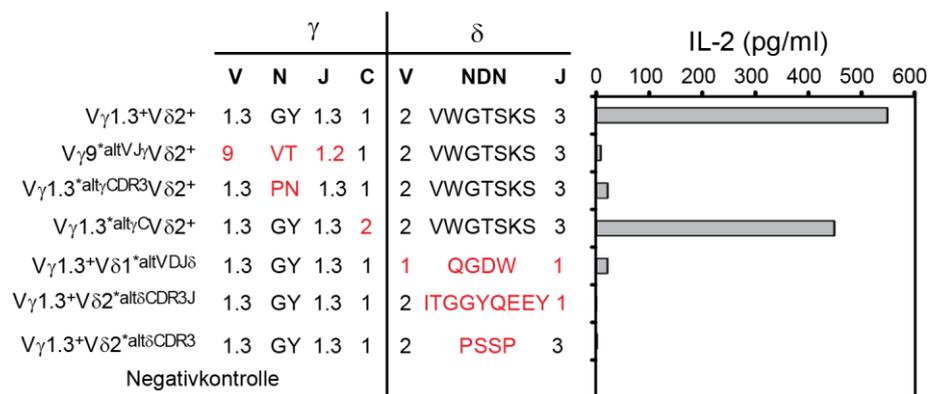


Abb. 3.14: Spezifische Erkennung des EcIF1 durch M88.

Vergleich der Erkennung des EcIF1 durch Wildtyp und mutierte M88-Rezeptormoleküle, die definierte Aminosäureaustausche in den Vn(D)nJ- oder C-Regionen beider TZR-Ketten haben (Wiendl et al., 2002). Die CDR3-Regionen setzen sich aus zufälligen Nukleotiden (N), *diversity* (D)- und *joining* (J)-Elementen zusammen. Die Nomenklatur wurde nach Arden et al., 1995 gewählt. Links oben ist der M88-Wildtyp (V γ 1.3⁺V δ 2⁺) abgebildet. Danach folgen die einzelnen mutierten γ - oder δ -Ketten: zwei Mutanten hatten veränderte V(D)J Regionen (V γ 9*altV_J γ V δ 2⁺, V γ 1.3⁺V δ 1*altVDJ δ), drei Mutanten hatten Austausch in der γ -N-Region (V γ 1.3*alt γ CDR3 γ V δ 2⁺), der δ -NDN-Region (V γ 1.3⁺V δ 2*alt δ CDR3_J), oder der δ NDNJ-Region (V γ 1.3⁺V δ 2*alt δ CDR3_J) und eine Mutante hatte die Wildtyp Vn(D)nJ-Regionen, aber eine veränderte konstante C-Region der γ -Kette (V γ 1.3*alt γ C γ V δ 2⁺). Links sind die Aminosäureaustausche in den γ - und δ -Ketten in Rot gekennzeichnet. Auf der rechten Seite ist die Aktivierung der entsprechenden M88-Transfektanten durch das EcIF1 gezeigt. 10 μ g/Well EcIF1 wurden dazu für 3 h bei 37 °C an die Mikrotiterplatten adsorbiert und über Nacht mit den entsprechenden Hybridomzellen inkubiert. Anschließend wurde das in den Zellkulturüberstand sezernierte IL-2 in ELISA gemessen. Nur der M88-Wildtyp und die Mutante mit der veränderten γ C-Region wurden durch das EcIF1 aktiviert, während die anderen Mutanten mit Aminosäureaustauschen in den V- oder CDR3-Regionen nicht aktiviert wurden (Bruder, 2009). Dies deutet auf eine spezifische Erkennung des EcIF1 durch die CDR-Regionen von M88 hin.

Alle Aminosäureaustausche in den variablen V- und CDR3-Regionen verhinderten die Erkennung des EcIF1 durch M88 vollständig. Nur die Mutante, bei der die konstante C-Region der γ -Kette ausgetauscht wurde, zeigte noch eine Aktivierung und IL-2-Produktion durch EcIF1. Als Negativkontrolle diente der Zellkulturüberstand von nicht aktivierten M88-Wildtyp-Hybridomen (s. Abb. 3.14). Diese Untersuchungen weisen eine spezifische Erkennung des EcIF1 durch die CDR-Schleifen beider Ketten des M88-Rezeptors nach. Allerdings bleibt offen, welche der insgesamt sechs CDR-Schleifen zu welchen Anteilen an der Antigenbin-

dung beteiligt sind. Experimente aus Wiendl et al., 2002 zeigten bereits, dass auch Antigene aus einem Lysat der humanen Rhabdomyosarkom-Zelllinie TE671 spezifisch durch die CDR-Regionen von M88 erkannt werden. K. Siewert führte ein ähnliches Experiment mit der humanen hH-RS durch und auch dort konnte eine spezifische Bindung durch die CDR-Regionen von M88 nachgewiesen werden (Siewert, 2011). Diese Art der Erkennung ist ähnlich zu einem Prenyl-Pyrophosphat-spezifischen $\gamma\delta$ -TZR (Wang et al., 2010), aber anders als bei einigen $\gamma\delta$ -TZR, die nicht-klassische MHC-Moleküle nur über ihre CDR3 δ -Schleife binden (Adams et al., 2008).

3.1.8 Affinitätsmessungen von M88

3.1.8.1 FACS-Färbung mit einem EcIF1-Oktamer

Die Affinität des M88-Rezeptors zu dem Antigen EcIF1 wurde zunächst durch eine FACS-Färbung mit einem EcIF1-Oktamer untersucht (s. Abschnitt 2.6.1.1). Für die Herstellung des Oktamers wurde EcIF1 mittels eines biotinylierten PentaHisTM-Antikörpers über Streptavidin oligomerisiert. Dabei binden jeweils acht EcIF1-Moleküle an vier biotinylierte Antikörper, die dann durch ein Streptavidin zu einem Oktamer verbunden sind. Das Oktamer (ca. 692 kDa) wurde durch Gelfiltrationschromatographie isoliert und die Elution wurde mit einer SDS-PAGE kontrolliert (s. Abb. 3.15a). Auf dem SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen ist aufgrund der geringen Konzentration des Oktamers nur die H-Kette des Antikörpers bei ca. 50 kDa zu sehen. Die erwartete Größe des Komplexes ließ sich aber anhand der Elutionsfraktion bei der Gelfiltration und mehreren Eichläufen mit Standardproteinen auf ca. 600-800 kDa bestätigen.

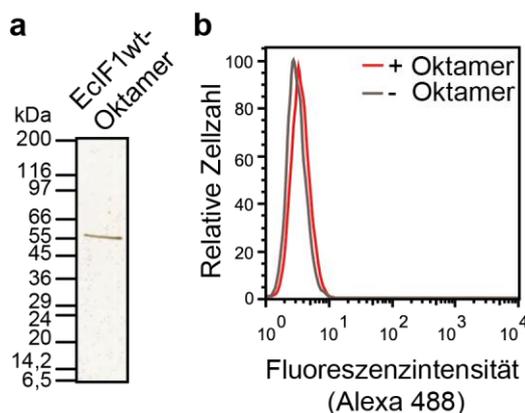


Abb. 3.15: FACS-Färbung von M88-Hybridomen mit EcIF1-Oktameren.

(a) EcIF1-Oktamer (13 μ l der Elutionsfraktion), das unter reduzierenden Bedingungen auf einem 4-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt wurde. Das Gel wurde mit Silber gefärbt. Aufgrund der geringen Konzentration ist nur die H-Kette des PentaHisTM-Antikörpers bei 50 kDa zu sehen. Die Elutionsfraktion hatte allerdings ein Molekulargewicht von 600-800 kDa, was auf ein intaktes Oktamer schließen lässt. (b) FACS-Färbung von 1:1 mit Kontroll-T-Zell-Hybridomen (TZR JM22) gemischten M88-Hybridomen. Es wurden 10.000 Zellen gemessen. Es konnte keine Bindung des EcIF1-Oktamers an die M88-Hybridome beobachtet werden. Als Negativkontrolle dienten ungefärbte Zellen.

Für die FACS-Färbung wurden M88-T-Zell-Hybridome 1:1 mit Kontroll-T-Zell-Hybridomen vermischt und mit dem EcIF1-Oktamer inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10.000 Zellen analysiert. Als Negativkontrolle dienten ungefärbte Zellen. Es konnte jedoch keine signifikan-

te Bindung des EcIF1-Oktamers an die M88-Hybridome beobachtet werden (s. Abb. 3.15b). Dies deutet auf eine geringe Affinität des TZR M88 zu EcIF1 hin.

3.1.8.2 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie-Messung

Zur Messung der Affinität des TZR M88 zu dem bakteriellen Antigen EcIF1 wurde eine Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (Biacore-Messung) durchgeführt (s. Abschnitt 2.5.13; in Kooperation mit B. Obermeier). Ein löslicher sc-Fv-M88-TZR wurde dazu als Sekretionsprotein in COS-7-Zellen exprimiert, gereinigt (s. Abschnitt 2.4.2.1 und 2.5.1.3) und kovalent an einen „CM5 Biacore Sensor Chip“ gebunden. Anschließend wurden die Messzellen mit fünf verschiedenen Konzentrationen EcIF1 gepulst und die Affinität bestimmt (s. Abb. 3.16). Zwar konnte eine konzentrationsabhängige direkte Bindung des EcIF1 an den sc-Fv-M88-TZR nachgewiesen werden, eine Sättigung konnte allerdings nicht erreicht werden. Es wurde eine sehr schwache Affinität des M88-Rezeptors zu EcIF1 gemessen und die Dissoziationskonstante wurde auf eine Größenordnung von $K_D = 10 \pm 6,7$ mM berechnet. Das bedeutet, dass die Bindungs- und Dissoziationsreaktionen zwischen EcIF1 und M88 sehr schnell ablaufen. Dies bestätigt die Daten der FACS-Oktamerfärbung (s. Abschnitt 3.1.8.1) zur geringen Affinität von M88 zu EcIF1.

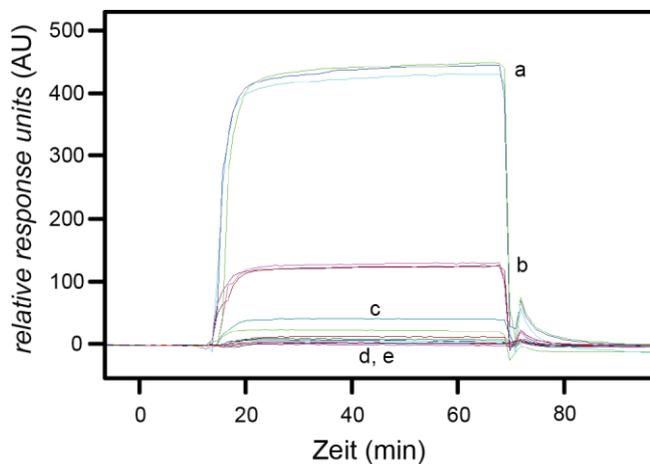


Abb. 3.16: Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie von M88 mit EcIF1.

Für die Messung wurde ein gereinigter sc-Fv-M88-TZR kovalent an die Oberfläche eines „CM5 Sensor Chip“ gebunden. Die Zelle sowie eine Referenzzelle wurden mit Puffer gespült und mit verschiedenen Konzentrationen EcIF1 (a) 100 µM, (b) 30 µM, (c) 10 µM, (d) 3 µM und (e) 1 µM gepulst. Es wurde die Änderung des Brechungsindex (AU) über die Zeit erfasst. Alle Konzentrationen wurden 3-fach gemessen. Die Bindung des EcIF1 an M88 ist konzentrationsabhängig, eine Sättigung konnte allerdings nicht erreicht werden, da sowohl die Bindungs- als auch die Dissoziationsreaktion sehr schnell abließen. Die Dissoziationskonstante wurde auf $K_D = 10 \pm 6,7$ mM bestimmt. Die Daten stehen repräsentativ für zwei unabhängige Wiederholungen.

3.1.8.3 Expressionsversuche von M88

Um bessere Messergebnisse bei der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie zu erhalten, sollten im Folgenden zwei verschiedene Konstrukte von M88 in HEK293E-Zellen exprimiert werden, damit größere Mengen eines löslichen M88-Rezeptors zur Verfügung stehen würden. Das erste Konstrukt besteht dabei aus der γ -Kette As 1-246 und der δ -Kette As 1-243. Vor den Sequenzen befinden sich jeweils die Antikörper IgG-*Leader* VH4-04 (bei der γ -Kette)

bzw. VκI-O12 (bei der δ -Kette), die die Synthese der beiden Ketten in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulum (ER) der HEK293E-Zellen ermöglichen. Zudem hat die γ -Kette am C-Terminus noch die Sequenz für die TEV-Protease (ENLYFQG) und ein His₆-Peptid (s. Abb. 5.4a, b). Ein weiteres Konstrukt besteht aus den variablen Teilen der γ -Kette (As 1-117) bzw. der δ -Kette (As 1-125) und den konstanten IgG-Regionen C_H1 (bei der γ -Kette) bzw. C_L (bei der δ -Kette) und bildet somit eine Chimäre aus TZR M88 und Antikörper. Das zweite Konstrukt besitzt C-terminal ein His₆-Peptid sowie eine BirA-Erkennungssequenz an der γ -Kette und ein Myc-Peptid an der δ -Kette (s. Abb. 5.4c, d). Mithilfe der BirA-Erkennungssequenz ist später eine spezifische Biotinylierung des Proteins und damit eine gerichtete Adsorption des Rezeptors an Streptavidin-besetzte Oberflächen, wie beispielsweise die eines Biacore-Sensors, möglich. In beiden Fällen sollten bei der Expression in HEK293E-Zellen die beiden einzelnen Ketten des Rezeptors im Lumen des ER über eine Disulfidbrücke des C-terminalen Cysteins zum funktionellen M88-Heterodimer zusammengefügt und sezerniert werden. Als Positivkontrolle wurde jeweils das humane rekombinante Fab-Fragment eines Antikörpers „Fab1“ (s. Abschnitt 2.2.2.14) im selben Expressionsvektor verwendet. Fab1 besitzt zudem dieselben konstanten Antikörper IgG-Regionen wie das zweite chimäre M88-Konstrukt. Wie in Abb. 3.17 zu erkennen ist, gelang die Expression von M88 in HEK293E-Zellen nicht. Selbst das zweite Konstrukt, das eine Chimäre aus M88 und konstanten Antikörper IgG-Regionen darstellt, konnte nicht exprimiert werden. Somit schlugen weitere Experimente, M88 löslich in größeren Mengen rekombinant herzustellen, fehl. Zudem stellen diese Ergebnisse ein weiteres Indiz dafür dar, dass der Rezeptor intrazellulär wahrscheinlich an für das Zellwachstum essentielle Proteine bindet und somit für die Zellen schädlich ist.

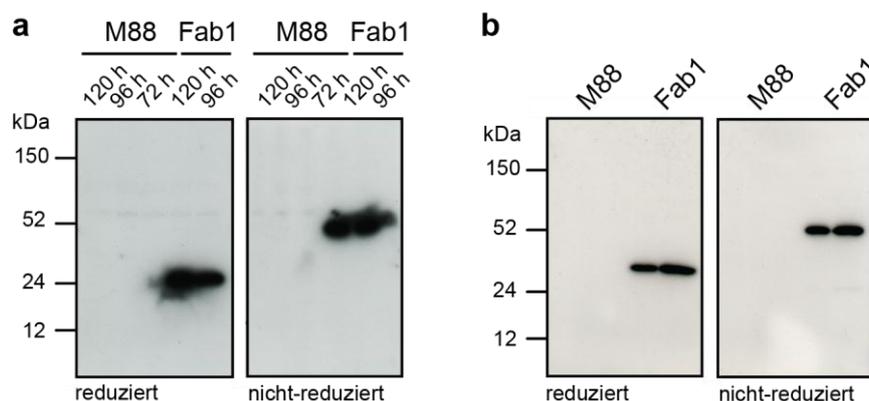


Abb. 3.17: Expressionsversuche von M88 in HEK293E-Zellen.

(a) Expression des ersten M88-Konstruktes in HEK293E-Zellen. Es wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die Expression von M88 wurde im Westernblot mit einem Antikörper gegen das His₆-Peptid überprüft. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine Expression von M88 in den HEK293E-Überstand beobachtet werden, während die Positivkontrolle Fab1 eine Expression zeigte. (b) Expression des zweiten chimären M88-Konstruktes. 5 und 10 μ l des Überstandes wurden nach 120 h in einem Westernblot gegen das Myc-Peptid auf Expression von M88 hin untersucht. Der M88-Rezeptor wurde allerdings auch hier nicht exprimiert. Die Kontrolle Fab1 wurde hingegen exprimiert. Die Expositionszeit des Films betrug jeweils 1 s.

3.1.9 Expression und Untersuchung des humanen eIF1AY

Schließlich wurde noch das humane homologe Protein zum bakteriellen EcIF1 kloniert und exprimiert: der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor eIF1AY (UniProt-ID O14602). Es zeigt eine 21 %-ige Sequenzübereinstimmung mit EcIF1 (Kyrpides und Woese, 1998) und beide Proteine sind in ihrer Struktur ähnlich (Battiste et al., 2000), das humane eIF1AY hat allerdings zusätzlich noch lange und flexible N- und C-Termini. Zudem ist es mit 144 As und 16,5 kDa doppelt so groß wie das bakterielle EcIF1. Für die Untersuchungen wurde das humane Protein genauso wie das bakterielle Protein exprimiert und gereinigt (s. Abb. 3.18a). Es besitzt ein N-terminales His₆-Peptid und hat mit insgesamt 155 As ein Molekulargewicht von 17,7 kDa. Die Y-chromosomale Variante eIF1AY besitzt im Gegensatz zum X-chromosomalen Allel an der Position 50 einen Aminosäureaustausch von Methionin zu Leucin. Diese Stelle ist allerdings zwischen den Spezies nicht konserviert (Kyrpides und Woese, 1998). Die Aminosäuresequenz des rekombinant exprimierten Proteins wurde durch Massenspektrometrie bestätigt (Daten nicht gezeigt). Zudem wurde die Sekundärstruktur durch CD-Spektroskopie überprüft (s. Abb. 3.18b und Tab. 3.3). Im Anschluss wurde die Stimulation der M88-Hybridome durch eIF1AY im Vergleich zum bakteriellen EcIF1 gemessen (s. Abb. 3.18c). Es konnte allerdings keine Aktivierung von M88 durch das humane eIF1AY festgestellt werden. Es wurde dieselbe MOG-exprimierende Negativkontrolle wie unter Abschnitt 3.1.5.2 verwendet.

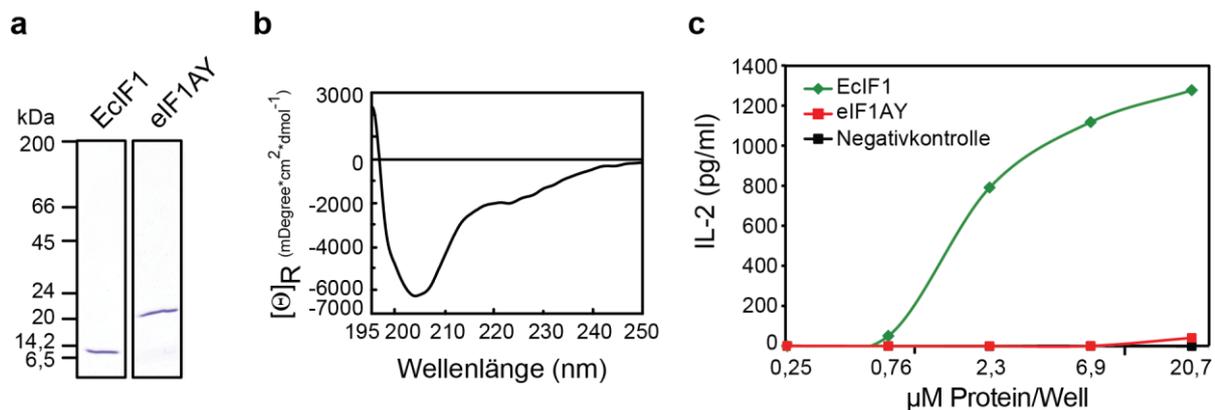


Abb. 3.18: Expression und Untersuchung des humanen eIF1AY.

(a) Unter reduzierenden Bedingungen durchgeführtes SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (4-20 %) von rekombinant exprimiertem EcIF1 und eIF1AY nach Coomassie-Färbung. Von den Proteinen wurde jeweils die gleiche molare Menge aufgetragen: 1,3 µg EcIF1 und 2,4 µg eIF1AY. Beide Proteine konnten in vergleichbarer Reinheit und Menge für die Aktivierung der M88-Hybridome unter (c) eingesetzt werden. (b) CD-Spektroskopie des humanen eIF1AY. Die molare Elliptizität $[\Theta]_R$ ist zwischen 195-250 nm gezeigt. Die gemessenen Daten stimmen gut mit der Literatur überein (s. Tab. 3.3). (c) Aktivierung der M88-Hybridome durch rekombinantes EcIF1 und eIF1AY gemessen im IL-2 ELISA. Es wurde jeweils die gleiche molare Konzentration von EcIF1 und eIF1AY von 0,25-20,7 µM/Well aufgetragen. Es konnte keine Aktivierung der Hybridome durch eIF1AY beobachtet werden. Als Negativkontrolle wurde eine sogenannte „mock“-Kontrolle verwendet. Es ist der Mittelwert aus einer Doppelbestimmung gezeigt. Das Experiment stellt ein Repräsentativ von drei unabhängigen Wiederholungen dar.

Tab. 3.3: Anteile der Sekundärstrukturen des humanen eIF1AY in Prozent.

Die CD-Daten des humanen eIF1AY wurden mit dem Programm „Spektra Manager CDPro Analysis Contin SMP56“ ausgewertet und die Anteile der Sekundärstrukturen in Prozent berechnet. Danach wurden die Daten mit den Literaturangaben verglichen und auf die insgesamt nun 155 Aminosäuren des rekombinanten eIF1AY umgerechnet. Es konnte eine gute Übereinstimmung beobachtet werden.

	α -Helices	β -Stränge	Schleifen	ungefaltete Strukturen
Contin SMP56	14,6	33,5	20,8	31,1
Battiste et al., 2000	12,3	24,5	15,5	47,7

Das Protein wurde daraufhin noch mit verschiedenen Puffern, wie PBS oder Hochsalzpuffer (50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, pH 7,8), und dem Zusatz von reduzierenden Agenzien, wie DTT oder β -Mercaptoethanol, gereinigt und getestet, allerdings führte auch keine dieser Präparationen zur Aktivierung der M88-Hybridome (Daten nicht gezeigt).

3.2 Oligoklonale Banden Antikörper von Multiple Sklerose Patienten

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Antigenspezifität von fünf OKB-Antikörper aus drei MS-Patienten näher charakterisiert (s. Abschnitt 1.3.3.1). Da die medizinisch relevanten Zielstrukturen dieser Antikörper bis heute weitgehend unbekannt sind, stand vor allem die Antigensuche im Vordergrund.

3.2.1 Klonierung, Expression und Charakterisierung rekombinanter Fab-Fragmente

Aus einer früheren Arbeit (Obermeier, 2011) standen bereits fünf OKB-Antikörper aus drei MS-Patienten als monoklonale humane rFab-Fragmente sowie das α -MOG-Fab, das als Kontrolle bekannter Spezifität an MOG bindet, zur Verfügung. Diese rFab-Fragmente besitzen ein His₆-Peptid an der H-Kette (rFab-His₆). Die Sequenzen lagen im pTT5-Vektor vor (s. Abb. 5.5a, b) und konnten direkt für die Proteinexpression in HEK293E-Zellen eingesetzt werden. Die rFab-Fragmente wurden in großer Reinheit und einer Ausbeute von ca. 1 mg pro 500 ml Expression (5×10^8 Zellen) gewonnen (s. Abb. 3.19a). Neben den rFab-His₆-Fragmenten wurden für die Antigensuche noch neue rFab-Fragmente (rFab-His₆/BirA-Myc) mit einer zusätzlichen BirA-Erkennungssequenz am C-Terminus der H-Kette sowie einem Myc-Peptid am C-Terminus der L-Kette kloniert (s. Abb. 5.5c, d) und ebenfalls in HEK293E-Zellen exprimiert. Diese rFab-His₆/BirA-Myc-Fragmente wurden für die Antigensuche auf Proteinarrays eingesetzt. Für alle anderen Experimente wurden die rFab-His₆-Fragmente verwendet, da diese in größerer Ausbeute exprimiert werden konnten. Die rFab-His₆-Fragmente wurden bereits in Obermeier, 2011 ausführlich charakterisiert. Dies wurde nun auch für die rFab-

His₆/BirA-Myc-Fragmente durchgeführt. Zunächst wurde die Expression der neuen Konstrukte in HEK293E-Zellen mit denen der alten verglichen (s. Abb. 3.19a zu b). Die Proteinexpressionsmenge war im direkten Vergleich mit ca. 0,25 mg je 500 ml Expression deutlich geringer, die Proteine konnten aber trotzdem in vergleichbarer Reinheit mit nur geringen Kontaminationen gewonnen werden. Mit einer SDS-PAGE wurde das erwartete Molekulargewicht der Heterodimere bzw. der einzelnen Ketten bestätigt (s. Abb. 3.19b). Die Proteinsequenzen wurden durch Massenspektrometrie verifiziert (Daten nicht gezeigt).

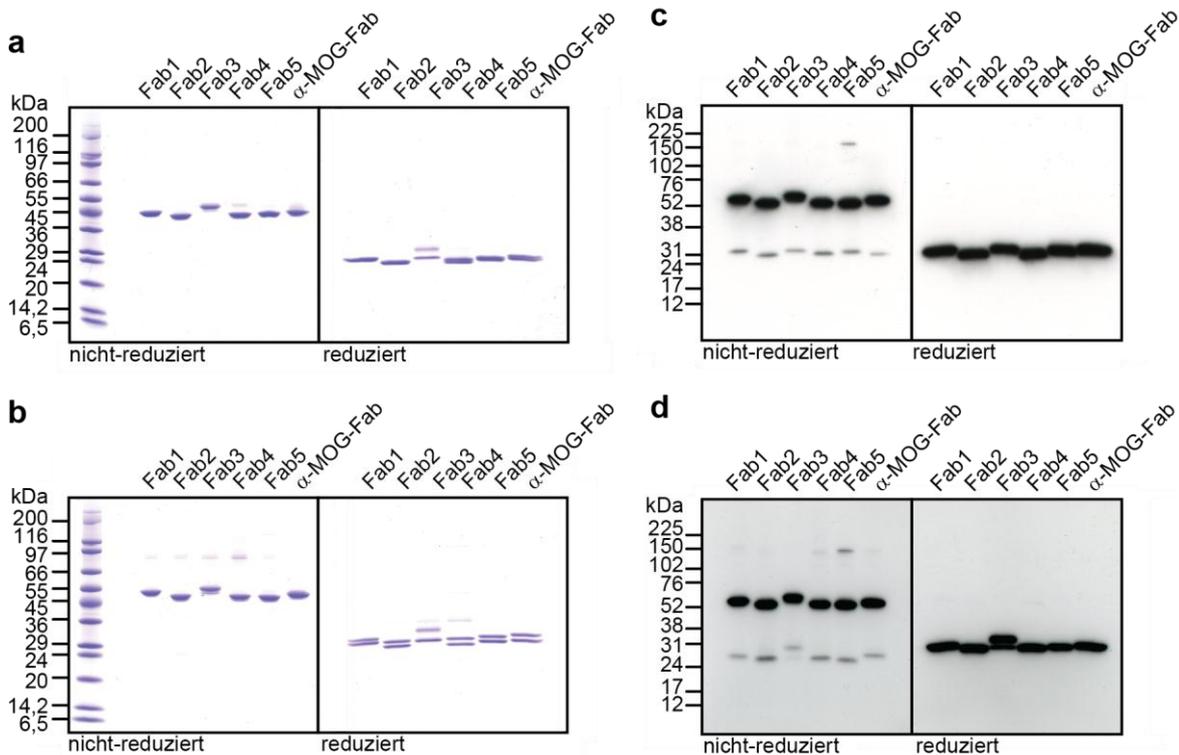


Abb. 3.19: Expression der rekombinanten Fab-Fragmente.

(a, b) Je 1 µg rekombinant in HEK293E-Zellen exprimierte rFab-Fragmente wurden unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen in einem 4-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengel nach ihrem Molekulargewicht getrennt. (a) rFab-Fragmente mit His₆-Peptid an der H-Kette (rFab-His₆). Die nicht-reduzierten rFab-Fragmente haben als Heterodimer ein Molekulargewicht zwischen 48 und 51 kDa. Rechts ist das Gel mit den reduzierten Proben und den dissoziierten H- und L-Ketten, die ein Molekulargewicht zwischen 23 und 27 kDa haben, zu sehen. Da das Molekulargewicht der einzelnen Ketten sehr ähnlich ist, laufen beide Ketten meist in einer Bande. (b) Expression der neuen rFab-His₆/BirA-Myc-Fragmente. Die Ketten sind aufgrund des zusätzlichen Myc-Peptids an der L-Kette und der BirA-Erkennungssequenz an der H-Kette mit einem Molekulargewicht des Heterodimers von 52-55 kDa etwas schwerer als die rFab-His₆-Fragmente. Rechts ist das SDS-Polyacrylamidgel mit den reduzierten Proben abgebildet. Es sind die beiden einzelnen Ketten zu erkennen, die sich in ihrem Molekulargewicht nun deutlicher unterscheiden und als getrennte Banden laufen. (c, d) Westernblot-Analyse der rFab-His₆/BirA-Myc-Fragmente. Für die Westernblot-Analyse wurden je 250 ng der rFab-His₆/BirA-Myc-Fragmente unter nicht-reduzierenden (links) und reduzierenden (rechts) Bedingungen in einem 4-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Unter (c) erfolgte die Detektion des His₆-Peptids am C-Terminus der H-Kette und unter (d) die Detektion des Myc-Peptids am C-Terminus der L-Kette durch spezifische HRP-gekoppelte Antikörper und anschließende Entwicklung durch Chemilumineszenz. Die Expositionszeit des Films betrug jeweils 1 s. Die Anwesenheit beider Ketten und die Bildung eines funktionellen Heterodimers konnten bestätigt werden. Es wurden zusätzlich freie L- und H-Ketten zu gleichen Anteilen nachgewiesen.

Die Bestätigung der Heterodimerbildung aus H- und L-Kette erfolgte durch SDS-PAGE und Westernblot-Analyse (s. Abb. 3.19c, d). Dazu wurden die rFab-Fragmente zunächst unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Mit der Detektion des His₆-Peptids der H-Kette (s. Abb. 3.19c) und des Myc-Peptids der L-Kette (s. Abb. 3.19d) durch spezifische Antikörper konnten im Anschluss beide Ketten sowohl einzeln als auch im Heterodimer nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht im Westernblot stimmte ebenfalls mit dem SDS-Polyacrylamidgel (s. Abb. 3.19b) überein.

Die Ausbildung einer nativen Faltung der rekombinant exprimierten Fab-His₆/BirA-Myc-Fragmente wurde durch CD-Spektroskopie überprüft (s. Abb. 3.20). Eine intakte Sekundärstruktur ist für die Ausbildung einer funktionellen Antigenbindungsstelle essentiell. Die gemessenen Anteile an Sekundärstrukturen (s. Tab. 3.4) stimmen gut mit der Literatur überein (Obermeier, 2011; Tetin et al., 2003). Den Hauptanteil machen mit ca. 50 % die β -Faltblätter der stabilisierenden IgG-Domänen aus, gefolgt von ca. 20 % Schleifenstrukturen, zu denen unter anderem auch die sechs CDR-Schleifen beider Ketten beitragen, die zusammen die Antigenbindungsstelle formen.

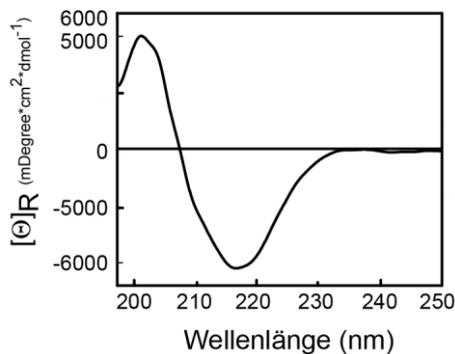


Abb. 3.20: CD-Spektroskopie des α -MOG-Fab-His₆/BirA-Myc.

Die molare Elliptizität $[\Theta]_R$ ist zwischen 195-250 nm gezeigt. Die gemessenen Daten stimmen gut mit der Literatur überein (s. Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Anteile der Sekundärstrukturen des α -MOG-Fab-His₆/BirA-Myc in Prozent.

Die CD-Daten des α -MOG-Fab wurden mit dem Programm „Spektra Manager CDPro Analysis Contin SMP56“ ausgewertet und die Anteile der Sekundärstrukturen in Prozent berechnet. Danach wurden die Daten mit den Literaturangaben verglichen. Es konnte eine gute Übereinstimmung beobachtet werden, der höhere Anteil an ungeordneten Strukturen lässt sich durch die längeren C-Termini durch die BirA- bzw. Myc-Peptide erklären.

	α -Helices	β -Stränge	Schleifen	ungefaltete Strukturen
Contin SMP56	1,3	47,3	21,2	29,8
Obermeier, 2011	1,7	49,7	20,1	28,4

Die Funktionalität, das heißt die Fähigkeit der neuen rFab-His₆/BirA-Myc-Fragmente Antigene zu binden, wurde für das α -MOG-Fab mit einer FACS-Analyse bestätigt (s. Abb. 3.22a). Die variablen Bereiche des α -MOG-Fab entsprechen der Sequenz des murinen monoklonalen Antikörpers 8-18C5, der MOG als Antigen erkennt. Mit der FACS-Analyse wurde die Bindung von nativem MOG auf der Zelloberfläche von transfizierten TE671-Zellen durch das α -

MOG-Fab nachgewiesen. Ein solcher Funktionstest konnte für die anderen rFab-Fragmente nicht durchgeführt werden, da deren Spezifität noch nicht bekannt ist.

3.2.2 Suche nach den Antigenen der OKB-Antikörper

Die rekombinant hergestellten und charakterisierten monoklonalen humanen Fab-Fragmente, die jeweils einzelne OKB-Antikörper von MS-Patienten repräsentieren, wurden im Folgenden für die Antigensuche eingesetzt. Es wurden unterschiedliche Methoden angewandt, um verschiedene Antigenklassen, wie Proteine, Lipide oder Nukleinsäuren zu untersuchen und mögliche Kandidatenantigene zu identifizieren.

3.2.2.1 Immunfluoreszenzfärbungen und Untersuchung von Lipidantigenen

Um die Reaktivität der rFab-Fragmente gegenüber viralen und bakteriellen Erregern zu untersuchen, wurden in Kooperation mit B. Obermeier mehrere standardisierte Immunfluoreszenztests durchgeführt. Es wurden unter anderem die Viren Masern, Röteln, Varizella Zoster, Epstein-Barr, Herpes Simplex Typ 1 und Typ 2 sowie das Bakterium *Chlamydia pneumoniae* untersucht. Daneben wurden zusätzlich die Autoantikörpertests gegen „Anti-nukleäre Antikörper“ (ANA = Antikörper gegen Zellkernbestandteile) sowie „Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper“ (ANCA) durchgeführt, die auch in der medizinischen Diagnostik beim Verdacht auf Autoimmunerkrankungen zum Einsatz kommen. Bei den Immunfluoreszenz-Untersuchungen konnte allerdings keine Reaktivität der rFab-Fragmente gegen die getesteten Bestandteile beobachtet werden. Die detaillierte Durchführung und die negativen Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen sind bereits in Obermeier, 2011 dargestellt, und werden daher im Rahmen dieser Arbeit nicht nochmals gezeigt. Weitere immunhistochemische Färbungen von humanen Hirngefrierschnitten zeigten ebenfalls keine spezifische Bindung der rFab-Fragmente (Obermeier, 2011). Es wurden weder bestimmte Hirnbereiche, spezifische Zelltypen, wie Neuronen oder Oligodendrozyten, noch zellulären Strukturen, wie beispielsweise Zellmembranen, zytosolische Bestandteile oder Zellkerne, gefärbt.

Die Reaktivität gegenüber Lipiden wurde bereits von Obermeier, 2011 in einem Glykolipidarray (Rinaldi et al., 2009) analysiert. In dieser Arbeit wurden ebenfalls verschiedene Experimente mit Lipiden durchgeführt, unter anderem Lipid-Tüpfelexperimente und Far-Eastern-Blots (Taki et al., 2009) mit diversen Lipiden (z. B. Eilipide, Phosphatidylcholin, Sulfatide). Beim Far-Eastern-Blot werden die Lipide zuerst Dünnschicht-chromatographisch getrennt und danach durch Wärmezufuhr auf eine Membran übertragen. Die Entwicklung erfolgt im Anschluss wie für andere Immuno- und Tüpfelblots. Mit diesen Experimenten konnten keine Lipidreaktivitäten der rFab-Fragmente nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da alle

durchgeführten Lipidexperimente negativ waren, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher auf die Durchführung und Ergebnisse eingegangen.

3.2.2.2 Test auf Polyreaktivität der OKB-basierten Fab-Fragmente

Antikörper können auch polyreaktiv sein, das heißt ein Antikörper kann an mehrere verschiedene antigene Strukturen, wie beispielsweise Proteine, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren oder Lipide binden (Notkins, 2004). Dies kommt zum Beispiel bei natürlichen Antikörpern, aber auch bei Autoantikörpern einiger Autoimmunerkrankungen, wie dem SLE (Zhang et al., 2009a), vor. Um eine mögliche Polyreaktivität der rFab-Fragmente aus MS-Patienten zu untersuchen, wurde ein Polyreaktivitäts-ELISA nach einem Protokoll von Wardemann et al., 2003 durchgeführt. Dafür wurden ssDNA, dsDNA sowie LPS und Insulin zunächst an eine Mikrotiterplatte adsorbiert. Im Anschluss wurde mit den zu untersuchenden Antikörpern ein ELISA durchgeführt (s. Abschnitt 2.6.5). Die rFab-Fragmente zeigten im durchgeführten Experiment keine Polyreaktivität (s. Abb. 3.21). Es wurden zwei Verdünnungen der rFab-Fragmente analysiert, von denen keine ein Signal im ELISA zeigte. Als Kontrolle für die Adsorption der DNA an die Mikrotiterplatte wurde ein α -DNA-Antikörper verwendet und als Kontrolle für die Adsorption der Proteine das α -MOG-Fab in Kombination mit dem Antigen MOG. Beide Kontrollen, der Antikörper und das α -MOG-Fab, zeigten ein Signal im ELISA.

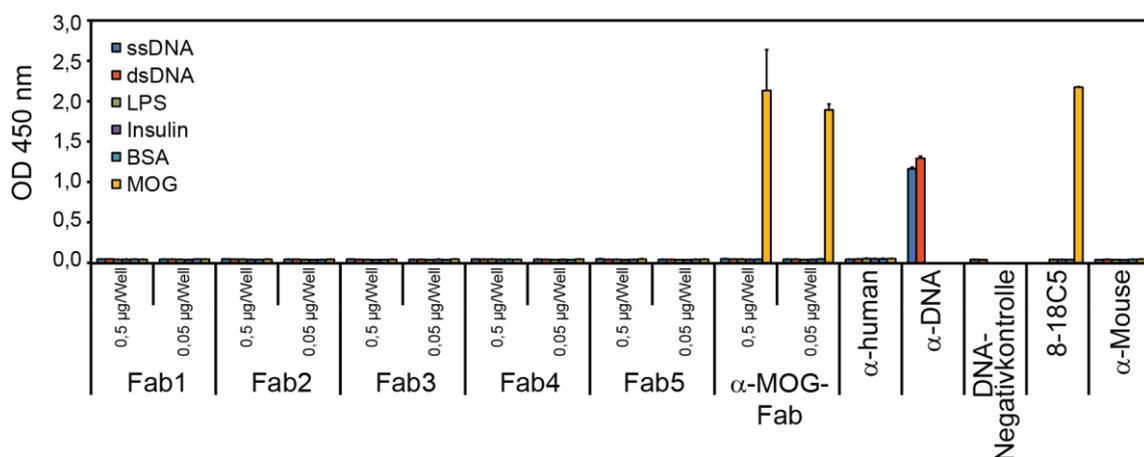


Abb. 3.21: Polyreaktivitäts-ELISA der rekombinanten Fab-Fragmente.

Im Polyreaktivitäts-ELISA wurden ssDNA, dsDNA, LPS sowie Insulin an eine Mikrotiterplatte adsorbiert. Als Kontrollen wurden BSA (Negativkontrolle) und rekombinantes MOG-Protein (Positivkontrolle) mitgeführt. Anschließend wurde ein ELISA durchgeführt. Es wurden je zwei Konzentrationen mit 0,5 µg rFab/Well und 0,05 µg rFab/Well getestet. Die rFab-Fragmente zeigten keine Polyreaktivität. Die Positivkontrolle α -MOG-Fab erkannte das adsorbierte Antigen MOG (eMOG) in beiden Konzentrationen vergleichbar mit dem intakten murinen Antikörper 8-18C5. Gleichzeitig wurde für die Kontrolle der DNA-Adsorption an die Mikrotiterplatte ein α -DNA-Antikörper mitgeführt. Hier wurde ebenfalls ein Signal detektiert. Als Negativkontrollen wurden der sekundäre α -human-kappa-light-chain-HRP-Antikörper (α -human) sowie der α -Mouse-IgG-HRP-Antikörper (α -Mouse) alleine verwendet. In der DNA-Negativkontrolle wurde keine DNA an die Wells adsorbiert, ansonsten wurden die Wells genauso wie die der Probe mit DNA behandelt. Es ist der Mittelwert aus einer 2-fach Bestimmung eines repräsentativen Experimentes dargestellt und die Fehlerbalken zeigen +/- SD an.

3.2.2.3 Antigensuche mit humanen Proteinarrays

Die rekombinant hergestellten fünf Fab-Fragmente, die einzelne OKB-Antikörper von MS-Patienten repräsentieren, wurden im Folgenden für die relativ neue Methode der Antigensuche mit Proteinarrays (ProtoArray v5.0 von Invitrogen, s. Abschnitt 2.6.6) eingesetzt. Damit sollten nativ gefaltete Bindungspartner der rFab-Fragmente identifiziert werden. Der Proteinarray enthält 9.400 humane Proteine, die in ihrer nativen Konformation im Mikroarraymaßstab an eine Nitrozellulosemembran adsorbiert sind. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass viele verschiedene Proteine parallel in kurzer Zeit unter standardisierten Bedingungen analysiert werden können.

Da es bislang keine Publikationen oder Protokolle zur Verwendung von rFab-Fragmenten auf Proteinarrays gab, wurde zunächst ein Protokoll etabliert und optimiert. Zudem wurde die Auswertung der Daten für die rFab-Fragmente angepasst (s. Abschnitt 2.6.6). Für die Protokolloptimierung wurde das α -MOG-Fab, dessen Antigen das MOG-Protein bereits bekannt ist, verwendet. Da das MOG-Protein ebenfalls auf dem Proteinarray enthalten ist, diente das α -MOG-Fab/MOG-System im Folgenden als Positivkontrolle. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde abgewandelt, da es entweder für intakte Antikörper oder für Proteine mit dem V5-Epitop (14 As langes Peptid aus der RNA-Polymerase Alpha Subunit des Simian Virus 5) in Kombination mit einem Anti-V5-Antikörper optimiert wurde. Die rFab-Fragmente besitzen allerdings ein His₆- und Myc-Peptid und sind monovalent, das heißt die Bindungsaffinität ist geringer als die von intakten Antikörpern. Da einige Proteine des Proteinarrays ebenfalls ein His₆-Peptid besitzen, konnte ein Anti-His₆-Antikörper nicht verwendet werden. Zunächst wurde daher ein Mouse-anti-c-Myc-Alexa-647-Antikörper (AbD Serotec) verwendet, doch es konnte kein Signal des α -MOG-Fab am Antigen MOG detektiert werden. Später wurde gezeigt, dass das C-terminale Myc-Peptid im intakt gefalteten rFab-Fragment offenbar nicht mehr für einen sekundären Antikörper zugänglich ist. Daraufhin wurde ein Anti-human-Ig-light-chain-kappa-Alexa-647-Antikörper (Biolegend), der gegen die L-Kette der rFab-Fragmente gerichtet ist, getestet. Schließlich wurde noch die Kombination aus Mouse-anti-human-kappa-light-chain-Antikörper (Invitrogen) und Goat-anti-mouse-IgG-(H+L)-Alexa-647-Antikörper (Invitrogen) verwendet. Bei diesen Antikörpern wurde ebenfalls kein Signal des α -MOG-Fab detektiert (Daten nicht gezeigt). Daher wurde schließlich auf einen polyklonalen Goat-anti-human-IgG-(H+L)-Alexa-647-Antikörper von Invitrogen zurückgegriffen, der für die Proteinarrays geeignet ist. Hier konnte ein Signal nachgewiesen werden (s. Abb. 3.23). Um die geringere Bindungsaffinität der monovalenten rFab-Fragmente auszugleichen, wurde die Konzentration der rFab-Fragmente auf 50 μ g in 3 ml rFab-Inkubationspuffer mit nur 0,01 % Tween-20 pro Proteinarray erhöht. Es wurde auch die Empfehlung des Herstellers, die Inkubation unter einem Deckglas mit nur 120 μ l Volumen durchzuführen, getestet, aller-

dings war die Inkubation unter Schütteln in Lösung reproduzierbarer, auch wenn dabei im Verhältnis mehr rFab-Fragment eingesetzt werden musste. Zudem wurde nach der Inkubation mit den rFab-Fragmenten nur dreimal statt der empfohlenen fünfmal gewaschen. Ab dem Schritt der Zugabe des sekundären Antikörpers wurde das Protokoll nach Herstellerangaben befolgt (s. Abschnitt 2.6.6 und Abb. 2.3). Die Funktionalität der verwendeten Antikörper-Kombination und der Durchführung wurden für das α -MOG-Fab zusätzlich durch eine FACS-Analyse und einen Tüpfelblot bestätigt (s. Abb. 3.22).

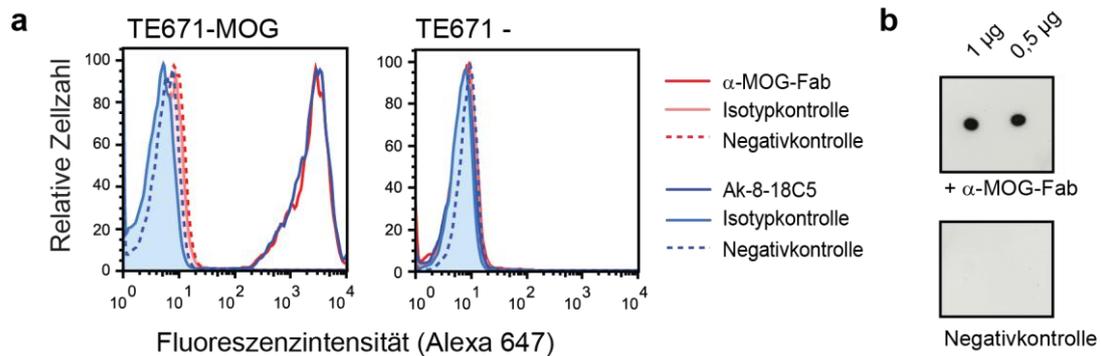


Abb. 3.22: Funktionstest des α -MOG-Fab-His₆/BirA-Myc für den Proteinarray.

(a) Zur Analyse der Antigenerkennung des α -MOG-Fab wurden MOG-exprimierende TE671-Zellen verwendet. Diese wurden zum einen mit 1,5 μ g α -MOG-Fab, Fab1 (Isotypkontrolle) oder keinem primären Antikörper (Negativkontrolle) inkubiert (rote Kurven, s. Legende). Als Sekundärantikörper diente ein Goat-anti-human-IgG-(H+L)-Alexa-647-Antikörper, der auch für die Proteinarrays verwendet wurde. Als Positivkontrolle wurde der murine Antikörper 8-18C5 sowie eine entsprechende Isotyp- (X40) und Negativkontrolle verwendet (blaue Kurven, s. Legende). Als Sekundärantikörper wurde hier ein Goat-anti-mouse-IgG-(H+L)-Alexa-647-Antikörper eingesetzt. Des Weiteren wurden alle Antikörper auch mit nicht transfizierten TE671-Zellen, die kein rekombinantes MOG exprimieren, inkubiert (rechts). Die Bindung der Antikörper wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie überprüft. Es konnte eine Erkennung des nativen MOG-Proteins auf TE671-Zellen durch das α -MOG-Fab nachgewiesen werden, die sogar mit der des intakten Antikörpers 8-18C5 vergleichbar war. Die Negativkontrollen zeigten keine Signale. (b) Um zu überprüfen, ob die Antigenerkennung unter den Versuchsbedingungen beim Proteinarray gewährleistet ist, wurden 1 bzw. 0,5 μ g mi-MOG-Protein an eine Nitrozellulosemembran adsorbiert und die Detektion wurde unter ähnlichen Bedingungen wie beim Proteinarray durchgeführt. Es wurden 10 μ g α -MOG-Fab in 5 ml rFab-Inkubationspuffer eingesetzt und als Sekundärantikörper wurde ein α -human-kappa-light-chain-HRP-Antikörper (1:1.000) verwendet. Die Detektion erfolgte im Anschluss durch Chemilumineszenz. Es wurde ein deutliches Signal des α -MOG-Fab am gespotteten MOG-Protein nachgewiesen. Die Negativkontrolle wurde nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert und zeigte kein Signal.

Die Kombination aus α -MOG-Fab und sekundärem Goat-anti-human-IgG-(H+L)-Alexa-647-Antikörper erkannte natives MOG auf transfizierten TE671-Zellen bei der FACS-Analyse vergleichbar wie der intakte Antikörper 8-18C5 (s. Abb. 3.22a). Beim Tüpfelblot wurde rekombinantes mi-MOG-Protein an eine Nitrozellulosemembran adsorbiert und die Detektion mit dem α -MOG-Fab anschließend unter ähnlichen Bedingungen wie beim Proteinarray, das heißt mit den gleichen Puffern und Inkubationsbedingungen, durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurde allerdings ein α -human-kappa-light-chain-HRP-Antikörper verwendet, der sich über Chemilumineszenz detektieren lässt. Mit diesem Experiment konnte ebenfalls ein Signal des α -MOG-Fab am MOG-Protein nachgewiesen werden (s. Abb. 3.22b).

Unter den festgelegten Bedingungen wurde zunächst das α -MOG-Fab auf dem Proteinarray verwendet. In diesem Experiment konnte ein Signal des α -MOG-Fab am MOG-Protein des Proteinarrays detektiert werden. Der Proteinarray des α -MOG-Fab ist in Abb. 3.23 dargestellt. Ein Proteinarray besteht aus 48 verschiedenen Blöcken, von denen jeder in Duplikaten gespottete Proteine enthält. Zudem besitzt jeder Block interne Kontrollen, wie beispielsweise Alexa-Fluor-Antikörper als Positivkontrollen, die durch ihre rote Fluoreszenz die Orientierung des Proteinarrays vorgeben. Als weitere Kontrollen sind Human-IgG-Antikörper- und Anti-human-IgG-Antikörper-Gradienten gespottet, um humanes IgG entweder durch den primären oder den sekundären Antikörper detektieren zu können. Daneben gibt es noch interne Arraynegativkontrollen, wie zum Beispiel BSA, Puffer- oder GST-Kontrollen.

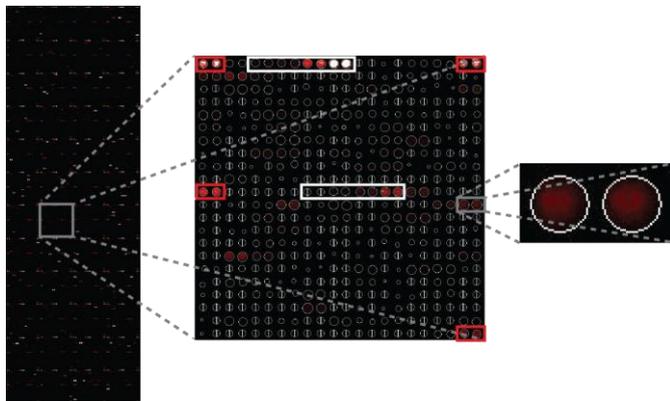


Abb. 3.23: Proteinarray des α -MOG-Fab.

Links ist der ganze Proteinarray mit den 9.400 Proteinen abgebildet. Die Proteine sind in 48 Blöcken angeordnet, wobei jeder Block seine eigenen Kontrollen besitzt, wie beispielsweise Alexa-Fluor-Antikörper (rote Rechtecke) und Human-IgG- bzw. Anti-human-IgG-Gradienten (weiße Rechtecke). Jedes Protein hat auf dem Proteinarray eine definierte Position. So liegt das MOG-Protein (graues Rechteck) zum Beispiel in Block 26, Reihe 12, Position 21 und 22. Der Proteinarray wurde mit dem α -MOG-Fab und dem sekundären Goat-anti-human-IgG-(H+L)-Alexa-647-Antikörper inkubiert und zeigt ein deutliches Signal am MOG-Protein. Die anderen Signale sind entweder Kontrollsignale, unspezifische Signale oder sie stammen vom sekundären Antikörper. Aufnahme bei PMT850.

Die Auswertung der Proteinarrays erfolgte durch das Programm „ProtoArrayTM Prospektor 5.2.1“ in der PPI-Anwendung (für Details s. Abschnitt 2.6.6). Als Negativkontrolle wurde der Proteinarray verwendet, der mit dem Sekundärantikörper alleine inkubiert wurde, und als Isotypkontrolle wurde das Fab1 bzw. bei den anderen rFab-Fragmenten das α -MOG-Fab verwendet. Damit sollten Signale des Sekundärantikörpers oder unspezifische Bindungen der rFab-Fragmente an den Proteinarray ausgeschlossen werden. Für ein spezifisches Signal eines Array-Proteins musste das Signal des rFab-Fragmentes mindestens fünfmal über dem Mittelwert des Arraysignals und dreimal über dem entsprechenden Signal bei der Negativ- und Isotypkontrolle liegen. Für alle rFab-Fragmente und Kontrollen wurden die Werte bei PMT700 ausgewertet. Dies wurde so gewählt, dass der Mittelwert der internen Arraynegativkontrollen ein Signal von um die 200-350 (AU Intensität) aufwies (s. auch Tab. 3.6 mittlere Spalte). Ein Beispiel für die Signalverteilung aller Proteine auf dem Proteinarray ist in Abb. 3.24 für das α -MOG-Fab dargestellt.

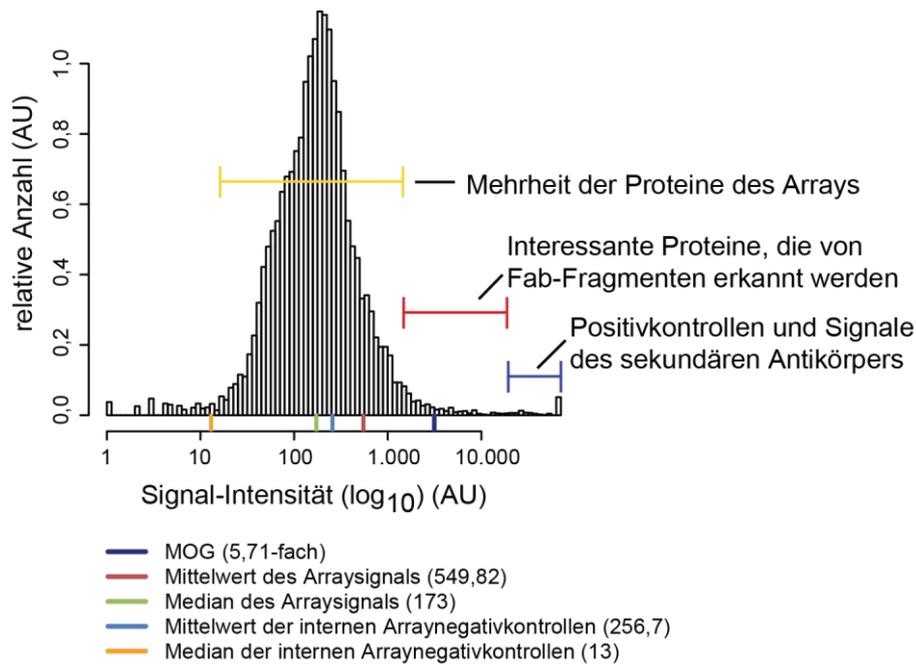


Abb. 3.24: Proteinarray-Signalverteilung der Positivkontrolle α -MOG-Fab.

Dargestellt ist die Signalverteilung des α -MOG-Fab auf dem Proteinarray bei PMT700 (Programm R). Die Signale sind normalverteilt. Die Analyse musste wegen der geringeren Bindungsaffinität der monovalenten rFab-Fragmente angepasst werden. Rechts im blauen Bereich liegen die stärksten Signale. Sie sind teilweise in der Sättigung und stammen von den internen Arraykontrollen oder vom Sekundärantikörper. Sie wurden durch die Analyse ausgeschlossen. Im roten Bereich liegen die interessanten Proteine, wie beispielsweise das MOG-Protein (dunkelblauer Strich unten). Das Signal liegt 5,71-fach über dem Mittelwert (549,82; roter Strich unten). Im gelben Bereich liegen die meisten anderen Proteine des Proteinarrays. Zudem sind noch der Mittelwert und Median der internen Arraynegativkontrollen angegeben (hellblau und orange), die allerdings nicht mit der Negativkontrolle (Sekundärantikörper alleine) und der Isotypkontrolle (rFab-Fragment) zu verwechseln sind.

Tab. 3.5 zeigt die Ergebnisse des Proteinarrays für das α -MOG-Fab. Das Signal von MOG lag im Durchschnitt bei 3.138 (AU Intensität) und war damit im Vergleich zum Mittelwert aller Proteine des Proteinarrays (549,82) 5,71-fach erhöht. Vergleicht man die Signale allerdings mit den MOG-Protein-Signalen auf der Sekundärantikörper- und der Isotypkontrolle Fab1, so war das Signal des MOG-Proteins im Durchschnitt 17-fach erhöht (s. Tab. 3.5, letzte Spalte). Bei der Auswertung wurden noch zwei weitere unbekannte Proteine identifiziert, ihre Anreicherung war mit 3,5-fach und 5-fach gegenüber den Kontrollen allerdings deutlich geringer als die des MOG-Proteins. Eine gewisse Kreuzreaktivität oder Polyspezifität lässt sich bei vielen Antikörpern, sogar bei monoklonalen und affinitätsgereiften Antikörpern, beobachten und kann in einem gewissen Rahmen erwartet werden. Da das α -MOG-Fab mit den festgelegten Durchführungs- und Auswertungskriterien auf dem Proteinarray nur 3 von 9.400 Proteinen erkannte, und MOG dasjenige mit der weitaus stärksten Anreicherung (17-fach) gegenüber den Kontrollen war, ist davon auszugehen, dass mit dieser Durchführung signifikante Proteinsignale detektiert werden können. Das heißt die Methode ist wahrscheinlich sensitiv genug, um die monovalente Bindungsaffinität der rFab-Fragmente auszugleichen, und

gleichzeitig robust genug, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers und der rFab-Fragmente zuverlässig zu erkennen und auszuschließen.

Tab. 3.5: Ergebnisse des Proteinarrays für das α -MOG-Fab.

Es sind die Original-Werte bei PMT700 als AU der Intensität aufgelistet. Für jeden Proteinspot sind in Duplikaten das Messsignal, der Hintergrund und das verwendete Signal mit abgezogenem Hintergrund angegeben. In der grau unterlegten Spalte sind die Signale der Negativkontrolle des Sekundärantikörpers und in der blau unterlegten Spalte die der Isotypkontrolle Fab1 gezeigt. In den folgenden Spalten sind zudem noch statistische Größen wie der Z-Faktor und der Z-Score abgebildet (für Details s. Abschnitt 2.6.6). Des Weiteren ist der Wert des Signals im Vergleich zu den beiden Kontrollen (Sekundärantikörper und Isotypkontrolle) angegeben (rot unterlegte Spalte). Das Signal des α -MOG-Fab für das Protein MOG lag 17-fach über dem Signal der Kontrollen (rot).

Protein Doppelbestimmung	Messung	Hintergrund	Signal	Signal Negativkontrolle	Signal Isotypkontrolle	Z-Faktor	Z-Score	Vergleich Signal zu Kontrollen
MOG	3.180	66	3.114	169	109	0,25	0,69	17,16
	3.226	64	3.162	175	273	0,25	0,70	17,42
PDZ and LIM domain protein 2	3.954	67	3.887	739	639	0,20	0,90	5,03
	3.715	69	3.646	736	978	0,20	0,83	4,72
AMME chromosomal region gene 1-like (AMMECR1L)	3.939	209	3.730	995	1.059	0,27	0,85	3,69
	3.452	170	3.282	938	1.054	0,27	0,73	3,24

Im Anschluss wurden alle fünf rFab-Fragmente unter den gleichen Bedingungen wie die Negativkontrolle des Sekundärantikörpers und die Isotypkontrolle α -MOG-Fab auf den Proteinarrays getestet. In Tab. 3.6 ist das Ergebnis als tabellarische Übersicht dargestellt. Mit dieser Durchführung und Auswertung wurden für Fab1 keine, für Fab2 sechs, für Fab3 drei, für Fab4 18 und für Fab5 vier spezifische Signale detektiert. In Tab. 3.6 sind außerdem die Originalwerte der Proteinarray-Kontrollen bei PMT700 angegeben. Der Mittelwert des Arraysignals (Tab. 3.6 rechts) war für alle Proteine relativ gleich, bei Fab2 war er höher, was auf mehr unspezifische Bindungen schließen lässt.

Tab. 3.6: Ergebnisse der Proteinarrays für die sechs rFab-Fragmente.

Anzahl der spezifischen Proteinsignale für die sechs verschiedenen rFab-Fragmente auf den Proteinarrays nach der Auswertung (PMT700; AU Intensität). Für Fab1 konnten keine spezifischen Signale detektiert werden, für Fab2 sechs, für Fab3 drei, für Fab4 18, für Fab5 vier und für das α -MOG-Fab, wie bereits beschrieben, drei. Zusätzlich sind die Proteinarray-Kontrollensignale für die sechs rFab-Fragmente angegeben. Der Mittelwert der internen Arraynegativkontrollen sollte zwischen 200-350 (AU Intensität) liegen und für ein spezifisches Signal mussten die Signale der rFab-Fragmente mindestens fünfmal über dem Mittelwert des Arraysignals aller Proteine (AU Intensität) liegen.

Fab	spezifische Signale	Mittelwert der internen Arraynegativkontrollen	Mittelwert des Arraysignals
Fab1	0	300,4	576,5
Fab2	6	283,3	825,3
Fab3	3	225,6	611,7
Fab4	18	336,7	646,7
Fab5	4	292,6	534,0
α -MOG-Fab	3	256,7	549,8
Negativkontrolle	0	291,7	625,2

In Tab. 3.7 sind die detaillierten Ergebnisse der Proteinarrays für die sechs rFab-Fragmente dargestellt. Je höher das Signal im Vergleich zu den Kontrollen war, als desto spezifischer wurde der Treffer eingestuft. Zusätzlich konnten noch der Z-Faktor und der Z-Score betrachtet werden (s. Abschnitt 2.6.6).

Tab. 3.7: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der Proteinarrays.

Vollständige Ergebnistabelle für die sechs rFab-Fragmente. Es ist die Doppelbestimmung der Proteine angegeben. In der ersten Spalte sind die originalen Signalwerte bei PMT700 gelistet (= Signal - Hintergrund; AU Intensität). In der grau unterlegten Spalte sind die Werte der Negativkontrolle (Sekundärantikörper) und in der blau unterlegten Spalte die Werte der Isotypkontrolle α -MOG-Fab abgebildet. Beim α -MOG-Fab wurde als Isotypkontrolle Fab1 verwendet. In der rot unterlegten Spalte ist die Anreicherung gegenüber den beiden Kontrollen gezeigt. Je höher dieser Wert war, als desto spezifischer wurde das Signal eingestuft.

Fab	Protein Doppelbestimmung	Signal	Signal Negativkontrolle	Signal Isotypkontrolle	Z-Faktor	Z-Score	Vergleich Signal zu Kontrollen
Fab1	-	-	-	-			
	Chromosome 16 open reading frame 48 (C16orf48)	14.032	1.888	1.795	0,70	2,90	7,24
		14.737	2.144	1.928	0,70	3,05	7,60
	cDNA clone IMAGE:4903661, complete cds	13.984	2.104	1.982	0,61	2,89	7,36
		12.872	1.718	1.791	0,61	2,65	6,78
	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	12.644	1.336	1.552	-0,20	2,60	7,85
		8.036	1.569	1.982	-0,20	1,58	4,99
Fab2	Growth factor receptor-bound protein 7	5.784	936	1.236	0,29	1,09	5,30
		6.482	876	1.316	0,29	1,24	5,94
	Mitochondrial GTPase 1 homolog (S. cerevisiae) (MTG1)	27.870	6.545	4.936	0,78	5,94	4,87
		29.952	6.240	5.150	0,78	6,40	5,24
	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC389415 (LOC389415)	16.206	4.252	3.736	0,75	3,38	4,60
		15.320	3.200	2.905	0,75	3,18	4,35
	Homeobox A1 (HOXA1), transcript variant 1	9.102	883	1.796	0,78	2,07	7,13
		9.456	812	1.618	0,78	2,16	7,40
Fab3	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1 (NEK1)	9.990	2.797	2.082	0,82	2,29	4,07
		10.290	2.248	2.696	0,82	2,36	4,19
	FLJ36874 protein (FLJ36874)	4.503	1.441	1.065	0,55	0,95	3,71
		4.281	1.259	1.094	0,55	0,89	3,52
	Homeobox A1 (HOXA1), transcript variant 1	20.461	883	1.796	0,02	4,71	16,02
		13.686	812	1.618	0,02	3,10	10,72
	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2 (MARK2), transcript variant 3	5.317	536	412	-0,16	1,11	10,60
		7.077	612	446	-0,16	1,53	14,11
	p21(CDKN1A)-activated kinase 6 (PAK6)	4.295	233	360	0,09	0,87	12,32
		4.183	271	531	0,09	0,84	11,99
Fab4	Cell cycle associated protein 1 (CAPRIN1), transcript variant 1	21.094	1.348	1.708	-0,33	4,86	13,38
		12.428	1.783	1.469	-0,33	2,80	7,88
	DNA segment on chromosome 4 (unique) 234 expressed sequence (D4S234E), transcript variant 1	5.324	481	567	-0,17	1,11	7,47
		7.581	687	1.117	-0,17	1,65	10,63
	Mesenchyme homeobox 1 (MEOX1), transcript variant 1	21.090	2.101	2.874	0,71	4,86	8,94
		22.335	1.810	2.652	0,71	5,16	9,47
	Chromosome 1 open reading frame 77 (C1orf77)	14.056	2.035	2.131	0,72	3,19	6,41
		14.883	2.096	2.507	0,72	3,39	6,79

Ergebnisse

cDNA clone IMAGE:4903661, complete cds	14.158	2.104	1.982	0,02	3,21	7,46
	10.414	1.718	1.791	0,02	2,32	5,48
T-complex 10 (mouse)-like (TCP10L)	28.430	3.928	4.628	0,88	6,61	6,33
	29.077	4.314	5.106	0,88	6,76	6,47
Uncharacterized protein C17orf85	4.295	758	692	0,27	0,87	5,72
	4.327	799	754	0,27	0,88	5,76
Splicing factor 1	36.510	8.482	6.312	0,87	8,53	5,63
	35.771	5.255	5.909	0,87	8,35	5,51
LATS, large tumor suppressor, homolog 1 (Drosophila) (LATS1)	5.063	835	1.005	0,01	1,05	5,41
	4.440	952	948	0,01	0,90	4,75
BR serine/threonine kinase 1	5.004	1.014	788	0,11	1,04	5,21
	4.653	1.020	1.023	0,11	0,95	4,84
PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC283663 (LOC283663), mRNA	6.197	1.628	1.060	0,13	1,32	4,41
	7.151	1.768	1.160	0,13	1,55	5,09
Chromosome 16 open reading frame 48 (C16orf48)	8.677	1.888	1.795	0,51	1,91	4,48
	9.110	2.144	1.928	0,51	2,01	4,70
NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1 (NEK1)	10.561	2.797	2.082	0,79	2,36	4,30
	10.577	2.248	2.696	0,79	2,36	4,31
Adrenodoxin-like protein, mitochondrial	4.094	1.248	986	-0,09	0,82	3,71
	4.832	1.349	830	-0,09	1,00	4,38
cDNA clone IMAGE:5271031	3.320	1.031	816	-0,26	0,64	3,76
	3.243	932	751	-0,26	0,62	3,67
Splicing factor, arginine/serine-rich 17A (SFRS17A)	29.928	288	373	0,86	7,48	79,54
	29.112	350	494	0,86	7,27	77,37
DNA segment on chromosome 4 (unique) 234 expressed sequence (D4S234E), transcript variant 1	4.537	481	567	0,22	1,02	6,36
	5.181	687	1.117	0,22	1,18	7,27
Homeobox A1 (HOXA1), transcript variant 1	7.646	883	1.796	0,60	1,81	5,99
	7.215	812	1.618	0,60	1,70	5,65
Mesenchyme homeobox 1 (MEOX1), transcript variant 1	9.862	2.101	2.874	0,58	2,37	4,18
	10.423	1.810	2.652	0,58	2,52	4,42
Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)	3.162	175	273	0,25	0,70	17,42
	3.114	169	109	0,25	0,69	17,16
α-MOG-Fab	3.887	739	639	0,20	0,90	5,03
	3.646	736	978	0,20	0,83	4,72
AMME chromosomal region gene 1-like (AMMECR1L)	3.730	995	1.059	0,27	0,85	3,69
	3.282	938	1.054	0,27	0,73	3,24

Im Folgenden wurden die Ergebnisse nach besonders starker Anreicherung gegenüber den Kontrollen überprüft. Zusätzlich wurden Informationen über Vorkommen, Expression, Lokalisation und Funktion der Proteine aus der UniProt-Datenbank in die Analyse mit einbezogen. Besonders interessant sind Proteine, die sowohl im zentralen Nervensystem als auch auf der Zelloberfläche exprimiert werden, da diese leicht für die OKB-Antikörper bei der MS zugänglich wären. Um eine bessere Übersicht zu bekommen und eine leichtere Auswahl der Proteine treffen zu können, wurden die spezifischen Signale in Tab. 3.8 zunächst nach den Proteinen geordnet. Zudem sind die Lokalisation und die Funktion der Proteine, soweit bekannt, aufge-

listet. In Abb. 3.25 sind zudem die Schnittmengen der spezifischen Proteinsignale der einzelnen rFab-Fragmente in Form eines Venn-Diagramms dargestellt.

Tab. 3.8: Positive Proteine der Proteinarrays.

Tabellarische Übersicht über die positiven Proteine der Proteinarrays. In der zweiten Spalte ist die im Proteinarray angegebene UniProt-ID aufgeführt. Die Daten über Proteinnamen, Lokalisation und Funktion wurden aus der UniProt-Datenbank entnommen. In der letzten Spalte ist angegeben, welches rFab-Fragment das entsprechende Protein auf dem Proteinarray erkannt hat. NA steht für „not available“ und bedeutet, dass noch keine Informationen zur Verfügung standen.

Proteinarray Beschreibung	UniProt-ID	Name	Lokalisation	Funktion	Fab
Chromosome 16 open reading frame 48 (C16orf48)	Q9H0I2	Uncharacterized protein C16orf48	Mikrotubuli Zytoskelett	Proteinbindung	Fab2 Fab4
cDNA clone IMAGE:4903661, complete cds	Q96CB2	NA	NA	NA	Fab2 Fab4
MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	Q96L34	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	Zentrosom Neuronenfortsatz	Kinase Proteinbindung	Fab2
Growth factor receptor-bound protein 7	Q14451	Growth factor receptor-bound protein 7	Zytoplasma Zellprojektion	Signaltransduktion Regulation	Fab2
Mitochondrial GTPase 1 homolog (S. cerevisiae) (MTG1)	Q9BT17	Mitochondrial GTPase 1	Mitochondrium	GTPase	Fab2
PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC389415 (LOC389415)	NA	NA	NA	NA	Fab2
Homeobox A1 (HOXA1), transcript variant 1	P49639	Homeobox protein Hox-A1	Nukleus	Transkription Transkriptionsregulation	Fab3 Fab4 Fab5
NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1 (NEK1)	Q96PY6	Serine/threonine-protein kinase Nek1	Zytoplasma Zytoskelett Nukleus	Kinase Zellzyklus Zellteilung	Fab3 Fab4
FLJ36874 protein (FLJ36874)	Q8N9M6	Protein PAT1 homolog 1	Zytoplasma	RNA-Bindung Protein-Bindung	Fab3
MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2 (MARK2), transcript variant 3	A9CP04	Ser/Thr protein kinase PAR-1Balpha splicing variant	NA	Kinase	Fab4
p21(CDKN1A)-activated kinase 6 (PAK6)	Q9NQU5	Serine/threonine-protein kinase PAK 6	Zytoplasma Nukleus	Kinase	Fab4
Cell cycle associated protein 1 (CAPRIN1), transcript variant 1	Q14444	Caprin-1	Zytoplasma Zellprojektion	Differenzierung RNA-Bindung Regulation Inhibitor der Proteinsynthese	Fab4
DNA segment on chromosome 4 (unique) 234 expressed sequence (D4S234E), transcript variant 1	P42857	Neuron-specific protein family member 1	Golgi-Membran	Dopamin Rezeptor Bindung	Fab4 Fab5
Mesenchyme homeobox 1 (MEOX1), transcript variant 1	P50221	Homeobox protein MOX-1	Nukleus	DNA-Bindung	Fab4 Fab5
Chromosome 1 open reading frame 77 (C1orf77)	Q9Y3Y2	Chromatin target of PRMT1 protein	Nukleus	Transkription Regulation	Fab4
T-complex 10 (mouse)-like (TCP10L)	Q8TDR4	T-complex protein 10A homolog 2	Nukleus	Interaktion mit ZIPK/DAPK3	Fab4
Uncharacterized protein C17orf85	Q53F19	Uncharacterized protein C17orf85	NA	Nukleotidbindung	Fab4
Splicing factor 1	Q15637	Splicing factor 1	Nukleus Spleißosom	Spleißen Transkription Regulation	Fab4
LATS, large tumor suppressor, homolog 1 (Drosophila) (LATS1)	O95835	Serine/threonine-protein kinase LATS1	Zytoplasma Zytoskelett	Kinase Zellzykluskontrolle	Fab4
BR serine/threonine kinase 1	Q8TDC3	BR serine/threonine kinase 1	Zytoplasma Nukleus Zytoskelett	Kinase Zellzyklus	Fab4
PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC283663 (LOC283663), mRNA	NA	NA	NA	NA	Fab4
Adrenodoxin-like protein, mitochondrial	Q6P4F2	Adrenodoxin-like protein, mitochondrial	Mitochondrium	Elektronentransportkette	Fab4

Ergebnisse

cDNA clone IMAGE:5271031	NA	NA	NA	NA	Fab4
Splicing factor, arginine/serine-rich 17A (SFRS17A)	Q02040	A-kinase anchor protein 17A	Nukleus Spleißosom	RNA-Prozessierung Spleißen Regulation Bindung der PKA	Fab5
Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)	Q16653	Myelin-oligodendrocyte glycoprotein	Zellmembran	Zelladhäsion	α -MOG-Fab
PDZ and LIM domain protein 2	Q96JY6	PDZ and LIM domain protein 2	Zytoplasma Zytoskelett Nukleus	Zelladhäsion	α -MOG-Fab
AMME chromosomal region gene 1-like (AMMECR1L)	NA	NA	NA	NA	α -MOG-Fab

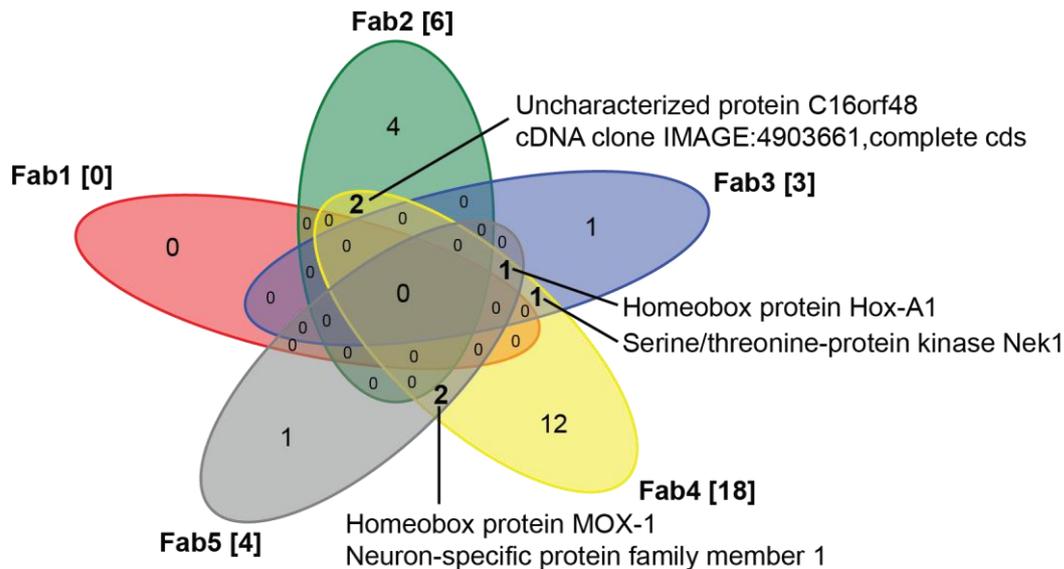


Abb. 3.25: Überlappung der Ergebnisse der Proteinarrays.

Die Abbildung zeigt die Schnittmengen der spezifischen Proteinsignale der fünf einzelnen rFab-Fragmente (Venn-Diagramm). Die gesamte Überlappung ist Null. Einige rFab-Fragmente haben dieselben Antigene, diese sind gekennzeichnet und aufgelistet. Hinter dem jeweiligen rFab-Fragment steht in eckiger Klammer die gesamte Anzahl der spezifischen Signale für dieses rFab-Fragment.

Analyse einzelner Kandidaten des Proteinarrays

Für eine weitere detailliertere Analyse und Verifizierung der Daten wurden im nächsten Schritt einzelne Proteine des Proteinarrays, die bei einem rFab-Fragment ein spezifisches Signal zeigten, ausgewählt. Laut Herstellerangaben (Invitrogen) können Kinasen falsch positive Signale geben, da sie in einer anderen Niederlassung wie die anderen Proteine produziert wurden. Daher wurden die Ergebnisse der Kinasen besonders kritisch betrachtet und zunächst zurückgestellt. Der „Splicing factor, arginine/serine-rich 17A“ (SF17A) zeigte bei Fab5 eine 78-fache Anreicherung gegenüber den beiden Kontrollen (s. Tab. 3.7). Zudem waren die Kontrollwerte sehr niedrig und der Z-Faktor und der Z-Score sehr gut. Daher erschien dieser Kandidat sehr vielversprechend. Daneben wurden noch die Proteine „Homeobox A1 (HOXA1), transcript variant 1“ (HOXA1) und das „DNA segment on chromosome 4 (unique) 234 expressed sequence (D4S234E), transcript variant 1“ oder auch „Neuron-specific protein family member 1“ (NSP1) ausgewählt. HOXA1 wurde von Fab3, Fab4 und Fab5 erkannt. NSP1 wurde von Fab4 sowie Fab5 erkannt und wird außerdem im Nervensystem exprimiert. Bei

diesen beiden Proteinen war eine 6- bis 14-fache Anreicherung gegenüber den Kontrollen (s. Tab. 3.7) allerdings nicht so signifikant wie für den SF17A bei Fab5. In Abb. 3.26 sind die originalen GenePix-Ausschnitte für die ausgewählten Proteine dargestellt.

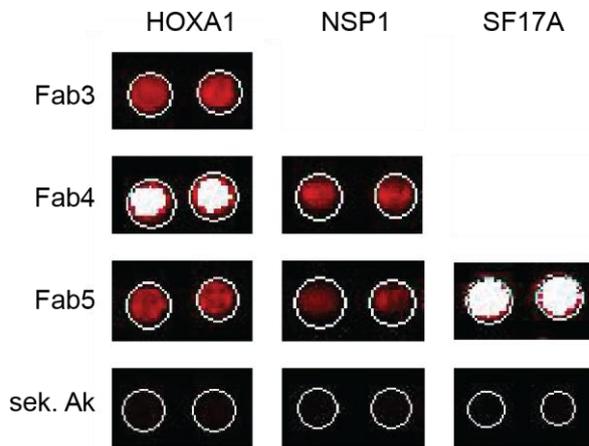


Abb. 3.26: Visuelle Bestätigung ausgewählter positiver Proteine der Proteinarrays.

Dargestellt sind die originalen GenePix-Ausschnitte des HOXA1, NSP1 und SF17A für Fab3, Fab4 oder Fab5 sowie für die Negativkontrolle (sekundärer Antikörper (sek. Ak)). Aufnahme bei PMT850.

Untersuchung von Kandidatenantigenen des Proteinarrays

Analyse gekaufter Proteine aus einer *in vitro* Weizenkeimexpression

Die drei ausgewählten Proteine des Proteinarrays, SF17A, NSP1 und HOXA1, wurden für eine detailliertere Analyse in kleinen Mengen von einer zweiten Firma (Abnova) bezogen. Die Proteine wurden *in vitro* im Weizenkeimexpressionssystem hergestellt und tragen wie die Proteine des Proteinarrays N-terminal ein GST-Peptid. Die Proteine des Proteinarrays stammen hingegen aus einer Baculovirus-Insektenzell-Expression. Da nur kleine Mengen der rekombinanten Proteine zur Verfügung standen, wurden sie zunächst in einem Tüpfelblot mit den rFab-Fragmenten unter ähnlichen Bedingungen wie im Proteinarray getestet. Die Proteine wurden dafür manuell an eine Nitrozellulosemembran adsorbiert und die Entwicklung erfolgte analog zu einem Immunoblot. Bei diesem Experiment wurden die Proteine durch die entsprechenden rFab-Fragmente nicht detektiert (s. Abb. 3.27). Es ist allerdings nicht bekannt, ob die gekauften Proteine der *in vitro* Weizenkeimexpression nativ gefaltet oder denaturiert sind, oder ob sie vielleicht während der manuellen Adsorption an die Membran denaturieren. Da die Proteine des Proteinarrays laut Firmenangaben eine native Konformation haben, konnte daher mit diesem Experiment nicht geklärt werden, ob die rFab-Fragmente vielleicht an die nativ gefalteten Proteine binden würden. Eine Analyse der Faltung durch CD-Spektroskopie war aufgrund der geringen Menge der zur Verfügung stehenden Proteine und des Reinheitsgrades der Präparationen (s. auch Abb. 3.28b) nicht möglich.

Des Weiteren wurden mit diesen Proteinen noch IP-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die Proteine SF17A (74,8 kDa), HOXA1 (62,5 kDa), NSP1 (46,1 kDa) sowie eMOG (ca. 20 kDa) vermischt und anschließend mit den rFab-Fragmenten, die kovalent an Dynabeads

gebunden waren, inkubiert. Es konnte allerdings auch hier keine spezifische Bindung der gekauften Proteine an die rFab-Fragmente nachgewiesen werden (s. Abb. 3.28). Trotz intensiver Blockierung und ausgiebigen Waschschritten zeigten die Proteine, besonders das NSP1-Protein, eine starke unspezifische Bindung an die rFab-Fragmente bzw. an die Dynabeads. Das MOG-Protein konnte als Positivkontrolle unter den gewählten Bedingungen spezifisch vom α -MOG-Fab präzipitiert werden. Allerdings ist anzumerken, dass das α -MOG-Fab das Antigen MOG sowohl in der nativen als auch in einer denaturierten Konformation binden kann (s. Abb. 3.28). Mit diesen Experimenten bleibt daher die Frage nach der Konformation der gekauften *in vitro* im Weizenkeimexpressionssystem hergestellten Proteine ebenfalls offen.

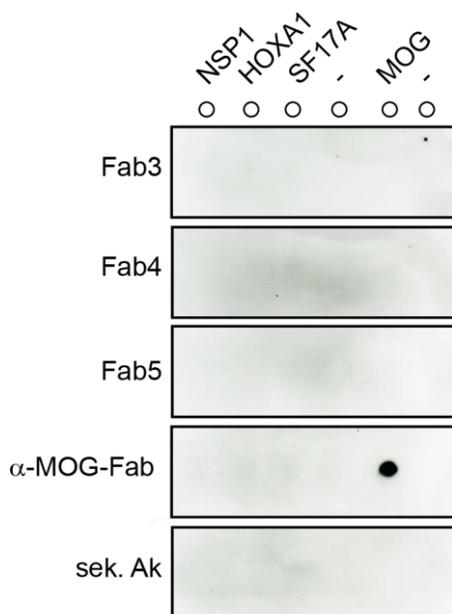


Abb. 3.27: Tüpfelblot mit Proteinen aus einer *in vitro* Weizenkeimexpression.

Tüpfelblot mit jeweils 50 ng der drei ausgewählten Array-Proteine. Die gekauften Proteine der *in vitro* Weizenkeimexpression wurden an eine Nitrozellulosemembran adsorbiert. Zuerst wurde das NSP1-Protein, dann das HOXA1-Protein und schließlich der SF17A gespottet. Danach folgt eine Leerkontrolle mit dem Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM reduziertes Glutathion, pH 8). Rechts sind noch die Positivkontrolle eMOG und dessen Puffer 20 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl, pH 7,5 gespottet. Die Membranen wurden anschließend mit 50 μg rFab-Fragment unter den gleichen Bedingungen wie beim Proteinarray inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein α -human-kappa-light-chain-HRP-Antikörper (1:500) verwendet. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz. Es konnte keine Erkennung der Proteine durch die rFab-Fragmente nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle α -MOG-Fab erkannte hingegen das Antigen MOG. Allerdings bindet das α -MOG-Fab sowohl natives als auch denaturiertes MOG-Protein. Der Sekundärantikörper alleine zeigte kein Signal. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Wiederholungen dargestellt.

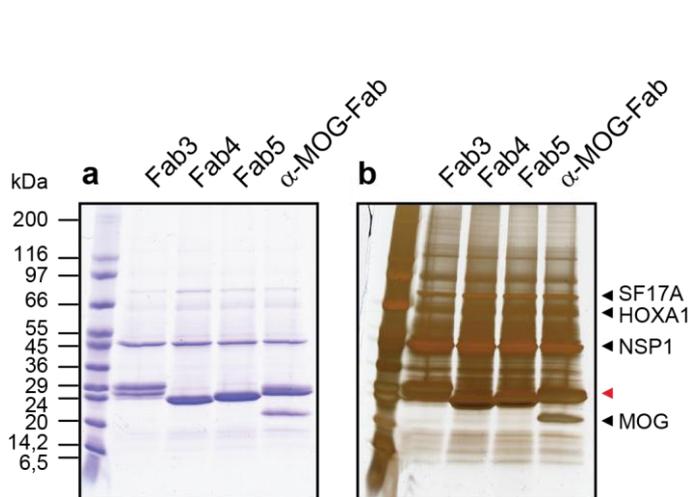


Abb. 3.28: Immunpräzipitation mit Proteinen aus einer *in vitro* Weizenkeimexpression.

Mit den Proteinen SF17A (74,8 kDa), HOXA1 (62,5 kDa), NSP1 (46,1 kDa) sowie eMOG (ca. 20 kDa) wurde eine IP mit den rFab-Fragmenten durchgeführt. Die Elutionsfraktion wurde anschließend auf einem 4-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Sowohl bei der Coomassie-Färbung (a) als auch bei intensiver Silberfärbung (b) konnte keine spezifische Bindung der Array-Proteine an die rFab-Fragmente detektiert werden. Die Positivkontrolle α -MOG-Fab dagegen präzipitierte das Antigen MOG (rechte Spur, Höhe 20 kDa) spezifisch. Die Banden bei 25 kDa stellen die beiden freien Ketten der rFab-Fragmente (roter Pfeil) dar, die durch den reduzierenden SDS-Puffer von den Dynabeads eluiert wurden.

Expression von Proteinen des Proteinarrays in *E. coli*

Die Proteine des Proteinarrays stammen aus einer Baculovirus-Insektenzell-Expression und sind teilweise glykosyliert. Die Proteine der *in vitro* Weizenkeimexpression wurden dagegen bislang nicht von den rFab-Fragmenten gebunden. Daher wurde im Folgenden *E. coli* als ein drittes unabhängiges Expressions-System ausgewählt, um weitere Experimente mit den Array-Proteinen durchführen zu können. Die beiden humanen Proteine SF17A (52,9 kDa) und NSP1 (22,3 kDa) wurden dazu kloniert (s. Abschnitt 2.2.2.11). Von NSP1 wurde zusätzlich eine Variante ohne Transmembrandomäne, NSP1 Δ , (20,5 kDa) kloniert, um die Expressionsrate und Löslichkeit dieses Membranproteins zu erhöhen (s. Abb. 2.2). Die Proteine wurden im Anschluss rekombinant in *E. coli* exprimiert. Mit den so hergestellten Proteinen sollten die Ergebnisse des Proteinarrays mit einer weiteren unabhängigen Proteinpräparation bestätigt werden.

Erste Expressionsversuche zeigten, dass die Proteine mit der richtigen Sequenz in *E. coli* exprimiert werden. Dies wurde durch SDS-PAGE und Massenspektrometrie bestätigt. Weitere Expressions- und Reinigungsversuche ergaben allerdings, dass die drei Proteine sich wahrscheinlich nicht löslich im Zytosol von *E. coli* exprimieren lassen, sondern als unlösliche „inclusion bodies“ ausfallen und sich daher vermutlich auch nicht unter nativen Bedingungen aus *E. coli* reinigen lassen (Daten nicht gezeigt). Proteine in „inclusion bodies“ bilden große unlösliche Aggregate aus denaturiertem Protein, die sich nur sehr schwer bzw. nicht wieder in die native Konformation zurückfalten lassen. Ein humanes Kontrollprotein eIF1AY (17,7 kDa) ließ sich dagegen unter den gewählten Bedingungen löslich exprimieren und unter nativen Bedingungen reinigen.

Daher wurde in einem Ansatz versucht, die Proteine unter denaturierenden Bedingungen aus „inclusion bodies“ aufzureinigen und durch Dialyse rückzufalten. In einem weiteren Ansatz wurden die Proteine bei 27 °C in *E. coli* exprimiert und die Induktionszeit verkürzt. Dadurch sollte die Expressionsrate verringert und die Löslichkeit der Proteine in *E. coli* verbessert werden. Die Proteine dieser Expression wurden danach unter nativen Bedingungen isoliert. Die Ausbeuten waren dabei allerdings sehr gering. Tüpfelblot- und IP-Experimente mit den rückgefalteten Proteinen oder den unter nativen Bedingungen gereinigten Proteinen zeigten bislang jedoch keine spezifische Bindung an die rFab-Fragmente (Daten nicht gezeigt). Vermutlich konnten die Proteine daher nicht rückgefaltet werden und es handelt sich wahrscheinlich selbst bei den Präparationen, die unter nativen Bedingungen aus *E. coli* gereinigt wurden, um denaturierte Proteine, die aus „inclusion bodies“ stammen und in geringen Mengen bei der Reinigung gelöst wurden.

3.2.2.4 Antigensuche mit Hirnlysaten

Als Ausgangsmaterial für die Identifizierung von Hirn-spezifischen Antigenen wurde humanes Hirnautopsiematerial von Individuen verwendet, die keine bekannte neurologische Erkrankung hatten. Zur Antigensuche wurden verschiedene Detektionstechniken eingesetzt, je nachdem, ob denaturierte oder native Proteinantigene identifiziert werden sollten. Denaturierte Proteinantigene haben durch bestimmte Pufferreagenzien oder Arbeitsschritte bei der Aufarbeitung keine übergeordneten Faltungsstrukturen mehr. Im Gegensatz dazu besitzen native Proteine noch eine intakte Konformation.

Denaturierte Hirnantigene

Mögliche denaturierte Hirnantigene der rFab-Fragmente wurden mit einer 2D-Westernblot-Analyse untersucht. Da Hirnmaterial nur schwer zugänglich und von großem wissenschaftlichem Wert ist, wurde die Protokolletablierung- und Optimierung der 2D-Westernblots zunächst mit EBV-B-Zell- und Jurkat-T-Zell-Proteinlysate durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Der Aufschluss unter denaturierenden Bedingungen erfolgte dabei sehr ähnlich zum später eingesetzten Hirnlysate. Von besonderer Bedeutung war die Abtrennung der Lipide durch Chloroform-Methanol-Extraktion (s. Abschnitt 2.5.9.1), was zu einer verbesserten Auftrennung der Proteine während der IEF führte. Während der Protokolloptimierung wurde durch Änderungen der Auftrags- und Laufbedingungen die Proteinauftrennung während der ersten und zweiten Dimension weiter verbessert. Beim Westernblot war das Hintergrundsignal während der Entwicklung aufgrund des Gesamt-Protein-Ausgangslysates zunächst sehr hoch. Der Test verschiedener Blockierbedingungen zeigte schließlich, dass ein „10x Synthetischer Block“ (Invitrogen) das beste Signal-Hintergrund-Verhältnis erzielte.

Für die Detektion der humanen rFab-Fragmente bei der Westernblot-Analyse wurde ein α -human-kappa-light-chain-HRP-Antikörper verwendet. Zur Kontrolle, ob das α -MOG-Fab in Kombination mit diesem Sekundärantikörper noch MOG binden kann, oder ob es zu sterischen Problemen kommt, wurde ein Experiment durchgeführt. Es wurde zum einen natives MOG auf der Zelloberfläche von transfizierten TE671-Zellen und zum anderen denaturiertes MOG, das an eine Membran adsorbiert war, verwendet. Abb. 3.29a und b zeigen, dass das α -MOG-Fab in Kombination mit dem Sekundärantikörper noch an MOG binden kann. Der Sekundärantikörper α -human-kappa-light-chain-HRP konnte daher für die Detektion der rFab-Fragmente im Immunoblot verwendet werden. Nach den Protokolloptimierungen wurde unter denaturierenden Bedingungen ein humanes Hirnlysate aus grauer und weißer Hirnsubstanz zu etwa gleichen Anteilen hergestellt (s. Abschnitt 2.5.9.1, Absatz 1). Die Qualität des Aufschlusses wurde zunächst mit einer 1D-SDS-PAGE überprüft (s. Abb. 3.29c).

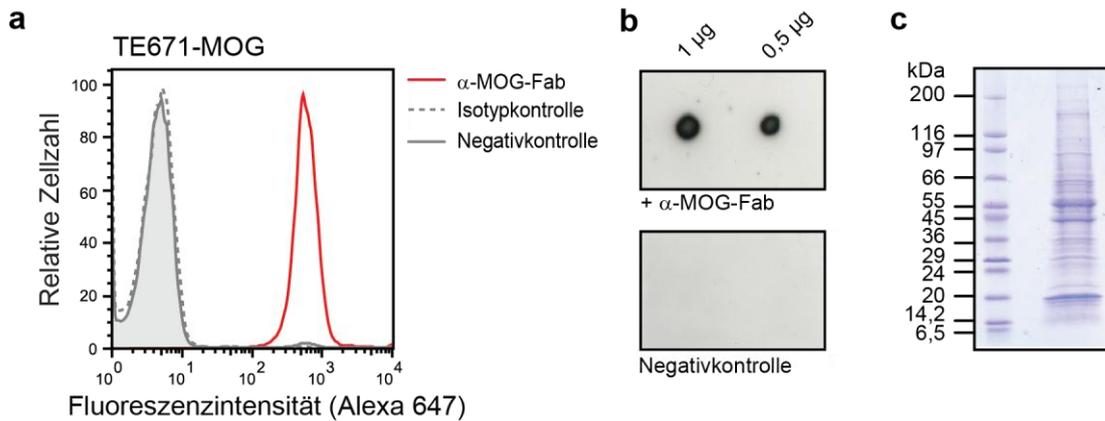


Abb. 3.29: Antigensuche mit Hirnlysat.

Um zu überprüfen, ob das α -MOG-Fab in Kombination mit einem sekundären α -human-kappa-light-chain-HRP-Antikörper an das Antigen MOG binden kann, wurden eine FACS-Analyse (a) und ein Tüpfelblot (b) durchgeführt. (a) Für die FACS-Analyse wurden MOG-transfizierte TE671-Zellen mit 1,5 μ g α -MOG-Fab inkubiert. Als Isotypkontrolle wurde Fab1 verwendet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem α -human-kappa-light-chain-HRP-Antikörper (1:50) und einem Goat-anti-mouse-IgG-(H+L)-Alexa-647-Antikörper (1:150). Die Negativkontrolle wurde ohne rFab-Fragment inkubiert. Bei der Analyse konnte eine Bindung des α -MOG-Fab an das MOG-Protein auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Der Antikörper 8-18C5 wurde als Positivkontrolle mitgeführt und zeigte ein vergleichbares Ergebnis (Daten nicht gezeigt). (b) Im Tüpfelblot konnte ebenfalls eine Erkennung des rekombinanten MOG (1 bzw. 0,5 μ g mi-MOG) durch das α -MOG-Fab (10 μ g/Blot) beobachtet werden. Die Negativkontrolle wurde nur mit dem Sekundärantikörper α -human-kappa-light-chain-HRP (1:1.000) inkubiert. (c) SDS-Polyacrylamidgel (4-20 %) von humanem Hirnlysat (1 μ l) unter reduzierenden Bedingungen. Das Lysat wurde für die 2D-Westernblot-Analyse verwendet.

In Abb. 3.30 ist ein Coomassie-gefärbtes 2D-SDS-Polyacrylamidgel des unter denaturierenden Bedingungen hergestellten Hirnlysat dargestellt. Der Auftrennungsbereich lag zwischen pH 3 und pH 10 sowie zwischen 200 kDa und 10 kDa. Mit dem verwendeten IEF-Fokussierungsprotokoll sowie der Auftrennung in der zweiten Dimension auf einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel konnte optisch eine gute Trennung der Proteine erreicht werden.

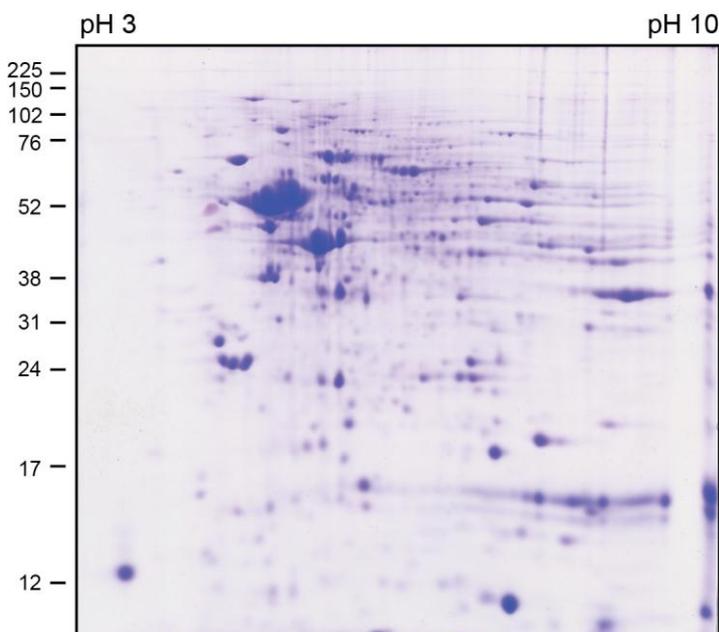


Abb. 3.30: 2D-SDS-Polyacrylamidgel von humanem Hirnlysat.

Dargestellt ist die Proteinauftrennung von humanem Hirnlysat mit einer 2D-SDS-PAGE (12 % Polyacrylamidgel) unter reduzierenden Bedingungen. Es wurde 1 mg Protein eingesetzt. Trotz der großen Proteinmenge wurde eine gute Auftrennung der einzelnen Proteine und Isoformen erzielt. Die Auftrennung im stark basischen Bereich bei pH 10 ist kritisch, wie auf der rechten Seite des Gels zu erkennen ist. Es ist ein Coomassie-gefärbtes 2D-Gel (Fab3) als Beispiel gezeigt.

Für die Antigensuche mit 2D-Westernblots wurden zunächst für jedes der rFab-Fragmente zwei 2D-SDS-Polyacrylamidgele mit je 1 mg Hirnprotein als Ausgangsmaterial parallel durchgeführt (s. Abb. 3.31). Ein Gel wurde nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt, während das zweite Gel auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert und im Westernblot entwickelt wurde. Das gefärbte Gel wurde später mit dem entwickelten Röntgenfilm verglichen (s. Abb. 2.4). Der Vergleich des entwickelten Westernblots mit dem zugehörigen Gel wurde für jedes rFab-Fragment separat durchgeführt (s. Abb. 3.31). Da mit Gesamt-Hirnlysate gearbeitet wurde, sind die unspezifischen Hintergrundsignale hoch. Daher wurden alle Signale sorgfältig geprüft. Die Spots auf dem Röntgenfilm wurden dazu mit den Kontrollen α -MOG-Fab (Isotypkontrolle) und dem Sekundärantikörper α -human-kappa-light-chain-HRP (Negativkontrolle) verglichen. Spots, die eindeutig auf den Sekundärantikörper zurückzuführen waren, oder auf unspezifische Bindung der rFab-Fragmente hindeuteten, wurden im Folgenden ausgeschlossen. Weitere unspezifische Hintergrundsignale unterscheiden sich optisch von Proteinspots und wurden durch eine Entwicklungsreihe von 10 s, 30 s, 1 min, 2 min und 4 min identifiziert und ebenfalls ausgeschlossen. Bei Fab3 und Fab4 waren die Hintergrundsignale allerdings sehr hoch, so dass in einigen Fällen nicht sicher zwischen Proteinspots und Hintergrundsignalen unterschieden werden konnte (s. Abb. 3.31).

Bei allen rFab-Fragmenten waren die stärksten Signale auf unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zurückzuführen. Es konnten daher nur wenige schwache Bindungen der rFab-Fragmente an denaturierte Hirnproteine im 2D-Westernblot identifiziert werden. Die identifizierten Proteinspots wurden anschließend aus dem Coomassie-gefärbten Gel isoliert und die enthaltenen Antigene durch Orbitrap-Massenspektrometrie identifiziert (s. Abschnitt 2.6.7.1 und Abb. 2.4). Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 3.31 und Tab. 3.9 dargestellt. Bei der Auswertung wurden nur Proteine berücksichtigt, die mit mindestens zwei „*unique*“ Peptiden, das heißt mit zwei für dieses Protein einzigartigen Peptiden, nachgewiesen wurden. Allerdings wurden in jedem isolierten Proteinspot diverse Proteine (bis zu 61 Proteine je Spot) identifiziert (s. Tab. 3.9, Anzahl der Proteine). Daher wurden die Proteine im Anschluss noch nach „Intensität/Anzahl der *unique* Peptide“ sortiert und die ein bis drei Proteine mit den höchsten vergleichbaren Intensitäten im jeweiligen Spot in die Tab. 3.9 aufgenommen. Bekannte unspezifische Proteinsignale, die auch bei anderen rFab-Fragmenten oder den Kontrollen gefunden wurden, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Da viele verschiedene Proteine in jedem Spot identifiziert wurden, kann letztlich nicht entschieden werden, welches der Proteine tatsächlich von einem rFab-Fragment im Westernblot an der detektierten Stelle erkannt wurde, da für ein Signal im Immunoblot theoretisch schon einzelne Moleküle ausreichen würden.

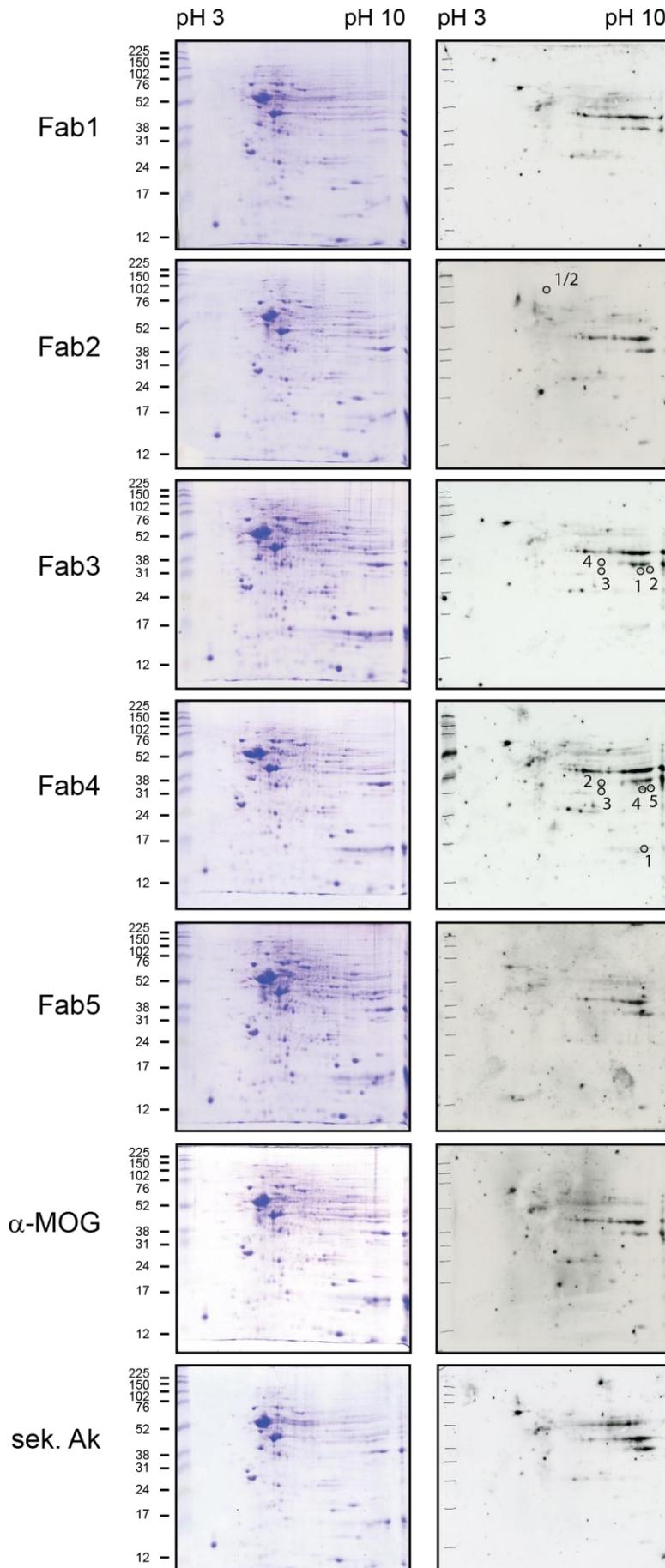


Abb. 3.31: 2D-Westernblot-Analyse mit humanem Hirnlysate.

Wie bereits beschrieben, wurden für jedes rFab-Fragment separat zwei 2D-SDS-Polyacrylamidgele (12 %) unter reduzierenden Bedingungen parallel durchgeführt. Ein Gel wurde im Anschluss mit Coomassie gefärbt (Gele links), während das andere auf eine PVDF-Membran elektrotransferriert und im Immunoblot mit den rFab-Fragmenten und dem sekundären α -human-kappa-light-chain-HRP-Antikörper (sek. Ak) entwickelt wurde (Westernblots rechts). Im nächsten Schritt wurden die Westernblots der rFab-Fragmente mit denen des α -MOG-Fab (Isotypkontrolle) und des Sekundärantikörpers (sek. Ak) (s. unten) verglichen, um unspezifische Signale auszuschließen. Proteinspots, die sich eindeutig positiven Signalen auf den Westernblots zuordnen ließen (s. eingezeichnete Spot-Nummern), wurden schließlich aus den Coomassiegefärbten 2D-Gelen isoliert. Die Proteine wurden später durch Massenspektrometrie identifiziert. Die Hintergrundsignale unterscheiden sich zwischen den Blots für die einzelnen rFab-Fragmente. Für die Westernblots ist jeweils die Expositionszeit von 1 min abgebildet, außer bei Fab3 und Fab4, dort war der Hintergrund sehr hoch, daher ist zum besseren Vergleich die Expositionszeit von 30 s gezeigt.

Tab. 3.9: Ergebnisse der 2D-Westernblot-Analyse von denaturiertem humanem Hirnlysate.

Denaturierte Kandidatenantigene wurden durch 2D-Westernblot-Analyse von humanem Hirnlysate identifiziert. Proteinspots, die positiven Signalen im 2D-Westernblot zugeordnet werden konnten, wurden aus einem Coomassie-gefärbten 2D-SDS-Polyacrylamidgel isoliert und durch Orbitrap-Massenspektrometrie identifiziert. In der ersten Spalte steht das jeweilige rFab-Fragment, dann folgen die Spot-Nr. (s. Abb. 3.31) und die Anzahl der Proteine, die jeweils in diesem Spot identifiziert wurden. Dahinter sind Informationen zu den Proteinen gelistet (UniProt-Datenbank), die mit den stärksten vergleichbaren Intensitäten im jeweiligen Spot identifiziert wurden.

Fab	Spot Nr.	Anzahl Proteine im Spot	Protein	UniProt-ID	Masse [kDa]	Lokalisation	Funktion																																																																																		
Fab2	1	40	Puromycin-sensitive aminopeptidase	P55786	103	Zytoplasma Nukleus	Amino-peptidase																																																																																		
	2	61						Fab3	1	27	L-lactate dehydrogenase A chain	P00338-1	37	Zytoplasma	Glykolyse	2	11	Hyaluronan and proteoglycan link protein 2	Q9GZV7	38	extrazellulärer Raum	Extrazelluläre Matrix	3	28	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	P45880-3	32	Mitochondrien	Ionenkanal	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	31	Mitochondrien Plasmamembran	Ionenkanal	4	26	Fructosamine-3-kinase	Q9H479	35	Zytoplasma	Kinase	Fab4	1	7	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	P59998	20	Zytoplasma Zytoskelett	Actin-Bindung	2	27	Fructosamine-3-kinase	Q9H479	35	Zytoplasma	Kinase	3	23	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	P45880-3	32	Mitochondrien	Ionenkanal	Carbonyl reductase [NADPH] 1	P16152		Zytoplasma	Reduktase	4	18	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	31	Mitochondrien Plasmamembran	Ionenkanal	5	33	L-lactate dehydrogenase A chain	P00338-1	37	Zytoplasma	Glykolyse	Hyaluronan and proteoglycan link protein 2	Q9GZV7	38	extrazellulärer Raum	Extrazelluläre Matrix		
Fab3	1	27	L-lactate dehydrogenase A chain	P00338-1	37	Zytoplasma	Glykolyse																																																																																		
			2	11	Hyaluronan and proteoglycan link protein 2	Q9GZV7	38		extrazellulärer Raum	Extrazelluläre Matrix																																																																															
	3	28	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	P45880-3	32	Mitochondrien	Ionenkanal																																																																																		
			Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	31	Mitochondrien Plasmamembran	Ionenkanal																																																																																		
	4	26	Fructosamine-3-kinase	Q9H479	35	Zytoplasma	Kinase																																																																																		
	Fab4	1	7	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	P59998	20	Zytoplasma Zytoskelett		Actin-Bindung																																																																																
		2	27	Fructosamine-3-kinase	Q9H479	35	Zytoplasma		Kinase																																																																																
		3	23	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	P45880-3	32	Mitochondrien		Ionenkanal																																																																																
				Carbonyl reductase [NADPH] 1	P16152		Zytoplasma		Reduktase																																																																																
		4	18	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	31	Mitochondrien Plasmamembran	Ionenkanal																																																																																	
5	33	L-lactate dehydrogenase A chain	P00338-1	37	Zytoplasma	Glykolyse																																																																																			
		Hyaluronan and proteoglycan link protein 2	Q9GZV7	38	extrazellulärer Raum	Extrazelluläre Matrix																																																																																			
			Hyaluronan and proteoglycan link protein 2	Q9GZV7	38	extrazellulärer Raum	Extrazelluläre Matrix																																																																																		

Native Hirnantigene

Hirnproteine mit nativer Konformation als mögliche Antigene wurden mit IP-Experimenten untersucht. Dabei wurde zunächst ein humanes Hirnlysate unter nativen Bedingungen (s. Abschnitt 2.5.9.1, Absatz 2) hergestellt. In einem ersten Experiment wurden zwei Fraktionen analysiert, eine mit den leicht löslichen intrazellulären Proteinen in PBS und eine mit teilweise extrahierten Membranproteinen in PBS mit 2 mM Dodecylmaltoside (DM). DM gilt im

Vergleich zu SDS, Triton-X-100 oder NP40 als milde Detergenz, da es eine relativ große hydratisierte Kopfgruppe und einen kurzen hydrophoben Schwanz besitzt. Dadurch dringt es nicht so tief in die Proteinstruktur ein und das Protein wird nicht denaturiert. Beide Proteinfraktionen wurden im Anschluss in eine IP eingesetzt. Dazu wurden Dynabeads verwendet, an die kovalent die rFab-Fragmente gebunden waren (s. Abschnitt 2.6.8). Nach mehreren Waschschritten wurden die präzipitierten Proteine in einem ersten Elutionsschritt mit 8 M Harnstoff und in einem zweiten Schritt direkt mit reduzierendem SDS-Probenpuffer eluiert. Alle Fraktionen wurden schließlich in einem SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und sowohl Coomassie- als auch Silber-gefärbt (s. Abb. 3.32a, b).

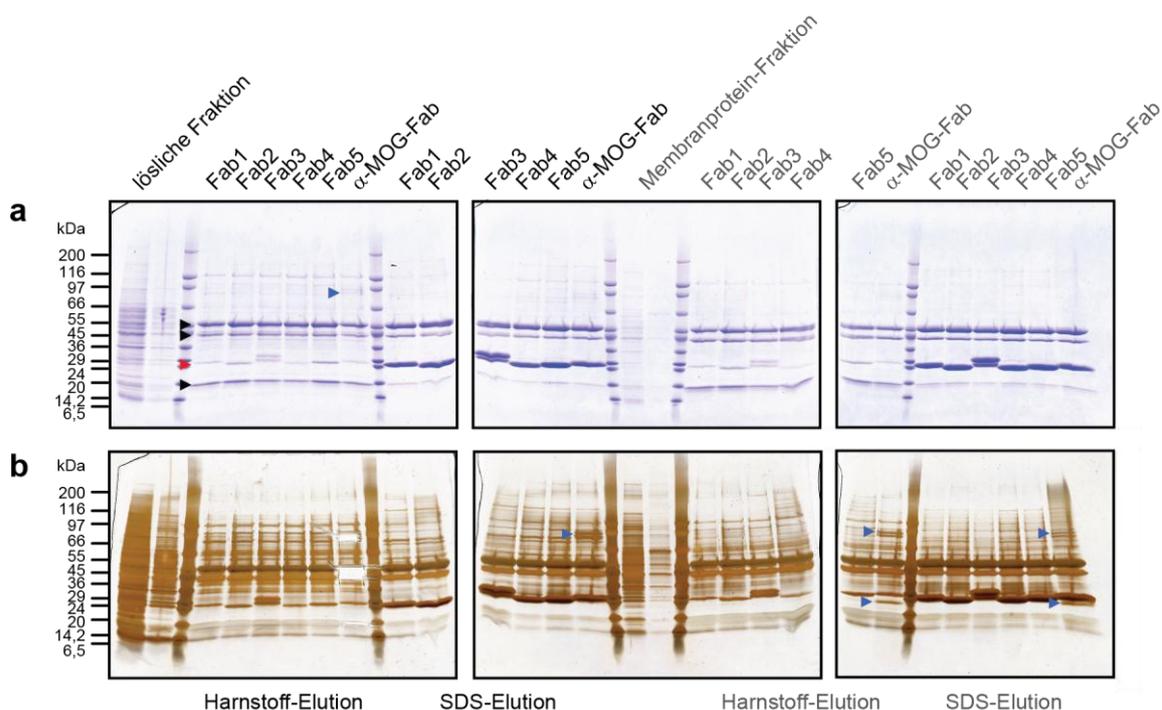


Abb. 3.32: Immunpräzipitation mit Hirnlysat.

Es wurde eine IP mit rFab-Fragment-gekoppelten Dynabeads und einem Hirnlysat, das unter nativen Bedingungen hergestellt wurde, durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Proteinfraktionen analysiert: lösliche Proteine (schwarz) sowie leicht lösliche Membranproteine (grau). Die präzipitierten Proteine wurden zuerst mit 8 M Harnstoff und danach mit SDS von den Dynabeads eluiert. Die Proben wurden nach der Elution unter reduzierenden Bedingungen in 4-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen aufgetrennt. Vor den Elutionsschritten sind jeweils 10 und 2 μ l der entsprechenden Gesamt-Proteinfraktionen aufgetragen. Anschließend folgen die Elutionsfraktionen. Unter (a) wurden die Gele zunächst mit Coomassie gefärbt. Es konnten allerdings für die rFab-Fragmente keine spezifischen Banden detektiert werden. Die drei stärksten Banden (s. schwarze Pfeile) konnten durch Massenspektrometrie als Tubulin (50 kDa), Actin (42 kDa) und MBP (19 kDa) identifiziert werden. Zudem sind die freien Ketten der rFab-Fragmente bei 25 kDa zu sehen (s. roter Pfeil). Daher wurden die Gele unter (b) mit Silber nachgefärbt. Außer beim α -MOG-Fab konnten jedoch keine spezifischen Banden identifiziert werden (s. blaue Pfeile). Die obere Bande beim α -MOG-Fab wurde durch Massenspektrometrie als Gephyrin (83 kDa) und die untere Bande als PLP (30 kDa)/MOG (28 kDa) identifiziert.

Es konnten allerdings auf dem SDS-Polyacrylamidgel für Fab1-5 keine spezifischen Banden identifiziert werden, das Muster war für alle rFab-Fragmente optisch identisch. Die drei stärksten unspezifischen Banden wurden durch Massenspektrometrie als Tubulin (50 kDa),

Actin (42 kDa) und „Myelin-basisches Protein“ (MBP) (19 kDa) identifiziert und sind auf unspezifische Bindungen an die Dynabeads zurückzuführen. Für das α -MOG-Fab konnten hingegen zwei spezifische Banden identifiziert werden: in der oberen Bande befand sich laut Massenspektrometrie Gephyrin (83 kDa) und in der unteren Bande die Membranproteine „Myelin proteolipid protein 1“ (PLP1) (30 kDa) zusammen mit MOG (28 kDa). PLP1 findet sich im Gegensatz zu MOG in großen Mengen im Gehirn, daher könnten kleine Mengen MOG PLP1 als Komplex ko-immunpräzipitiert haben. Diese Positivkontrolle zeigt, dass die IP funktioniert hat. Die Auflösung der SDS-PAGE ist aber wahrscheinlich nicht hoch genug bzw. die Färbungen sind nicht sensitiv genug, um Bindungspartner der rFab-Fragmente optisch noch aufzeigen zu können. Auch mit gekauftem Hirnlysate (Gesamthirn sowie Membranfraktion) konnten mit dieser Methode der IP gefolgt von einer SDS-PAGE keine besseren Ergebnisse erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Um sensitivere Daten aus IP-Experimenten mit Hirnlysate, das unter nativen Bedingungen hergestellt wurde, zu gewinnen, wurde noch eine weitere Methode angewendet. Dazu wurde zunächst wieder ein Hirnlysate unter nativen Bedingungen hergestellt, bei dem die leicht löslichen Proteinen in PBS isoliert wurden (s. Abschnitt 2.5.9.1). Die IP wurde im Wesentlichen wie oben beschrieben durchgeführt, allerdings wurden die Dynabeads vor der IP länger blockiert und vor der Elution öfter gewaschen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Die Proteine wurden dann mit 0,1 M Glycin pH 2,8 eluiert und ohne vorherige SDS-PAGE in eine Orbitrap-basierte massenspektrometrische Analyse eingesetzt. Mit dieser sensitiven Methode kann die Identität (ID) von nahezu allen in einer Probenlösung enthaltenen Proteinen bestimmt werden, selbst wenn sie nur in geringen Spuren vorhanden sind.

Bei der Auswertung wurden die Signale des α -MOG-Fab als Isotypkontrolle von den Ergebnissen der anderen rFab-Fragmente subtrahiert. Beim α -MOG-Fab wurde Fab1 als Kontrolle abgezogen. Zudem wurden wieder nur Proteine berücksichtigt, die mit mindestens zwei *unique* Peptiden eindeutig identifiziert wurden. Außerdem wurde der Wert der „Intensität/Anzahl der *unique* Peptide“ berechnet. Je höher dieser Wert war, desto spezifischer wurde das Signal eingestuft. Tab. 3.10 zeigt die überlappenden Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. In der letzten Spalte ist zudem angegeben, ob Peptide dieses Proteins bei weiteren rFab-Fragmenten gefunden wurden (selbst als Einzelbestimmung und mit nur einem *unique* Peptid), wobei Peptide bei maximal drei anderen rFab-Fragmenten und nicht bei der Kontrolle gefunden werden durften. Ansonsten wurden die Proteine als unspezifische Signale ausgeschlossen. Mit der Kombination aus IP und Orbitrap-Massenspektrometrie (IP-Orbitrap-Analyse) gelang es weitere intrazelluläre Kandidatenantigene der rFab-Fragmente Fab2, Fab4 und Fab5 zu identifizieren. Interessanterweise sind auch diese Proteine an der RNA-

Prozessierung oder der Transkriptionsregulation im Zellkern oder Zytoplasma beteiligt. Das Protein „Methylosome protein 50“ wurde sogar bei drei rFab-Fragmenten identifiziert. Für Fab1 und Fab3 konnten hingegen mit dieser Methode keine Proteinantigene nachgewiesen werden. Die Methode ist äußerst sensitiv, so wurde in der Kontrolle α -MOG-Fab sogar das seltene Hirnmembranprotein MOG aus dem Lysat präzipitiert und identifiziert. Neben dem bekannten Antigen MOG wurden beim α -MOG-Fab zudem vier weitere Proteine nachgewiesen. Diese Proteine wurden wahrscheinlich mit dem MOG-Protein ko-immunpräzipitiert und wurden daher ebenfalls identifiziert.

Tab. 3.10: Ergebnisse der IP-Orbitrap-Analyse von nativen humanen Hirnlysaten.

Ergebnisse aus den IP-Experimenten der rFab-Fragmente mit Hirnlysaten, die unter nativen Bedingungen hergestellt wurden. Die eluierten Proteine wurden im Anschluss durch Orbitrap-Massenspektrometrie identifiziert. Es sind die überschneidenden Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Proteine wurden mit mindestens zwei *unique* Peptiden identifiziert. Zudem ist der Durchschnitt (\emptyset) der „Intensität/*unique* Peptide“ aus den zwei Experimenten und die „*Unique Sequence coverage*“ für beide Experimente dargestellt. Danach folgen Informationen über die Proteine (UniProt-Datenbank). Zudem ist angegeben, ob Peptide dieses Proteins bei weiteren rFab-Fragmenten gefunden wurden.

Fab	UniProt-ID	\emptyset Intensität/ <i>unique</i> Peptide $\times 10^6$	<i>Unique Sequence Coverage</i> [%]	Protein	Lokalisation	Funktion	Peptide bei weiteren Fab
Fab2	O43809	7,2	23,3 51,5	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	Nukleus	RNA- Prozessierung	Fab5
	Q9BQA1	0,44	9,1 5,6	Methylosome protein 50	Zytoplasma, Nukleus	Spleißosom- Aufbau	Fab4 Fab5
Fab4	Q9BQA1	0,3	16,1 5,6	Methylosome protein 50	Zytoplasma, Nukleus	Spleißosom- Aufbau	Fab2 Fab5
Fab5	O00422	0,42	32,0 52,9	Histone deacety- lase complex subunit SAP18	Zytoplasma, Nukleus	Transkription Transkriptions- regulation	Fab2
	Q9BQA1	0,19	9,1 7,3	Methylosome protein 50	Zytoplasma, Nukleus	Spleißosom- Aufbau	Fab2 Fab4
α - MOG- Fab	A6NNJ9	11,35	13,4 17,8	Myelin- oligodendrocyte glycoprotein (MOG)	Zellmembran	Zelladhäsion	-
	Q9NQX3- 2	9,42	68,9 78,2	Gephyrin	Zytoplasma	Membran- Zytoskelett Interaktion	Fab2
	O94856-1	0,17	10,2 10,5	Neurofascin	Zellmembran	Zelladhäsion	-
	Q92752-1	0,16	2,7 2,7	Tenascin-R	Extazelluläre Matrix	Zelladhäsion	-
	Q92823-5	0,1	4,1 4,1	Neuronal cell adhesion molecule	Zellmembran	Zelladhäsion	-

4 Diskussion

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Identifizierung und Charakterisierung von Antigenen autoaggressiver T- und B-Zellen, um Einblicke in die Entstehung und Pathogenese von humanen Autoimmunerkrankungen zu gewinnen. Dazu wurden autoaggressive Lymphozyten bei zwei dieser Erkrankungen, die $\gamma\delta$ -T-Zellen bei der Polymyositis (PM) und die B-Zellen bei der Multiplen Sklerose (MS), näher untersucht. Besonders bemerkenswert ist dabei, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen und Antikörper ihre Antigene direkt ohne Antigen-präsentierende Zellen erkennen und somit im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -T-Zellen nicht MHC-restringiert sind.

Zunächst wurde die Antigen-spezifität des autoreaktiven $\gamma\delta$ -TZR M88, der aus einer Muskelbiopsie eines PM-Patienten isoliert wurde, untersucht. Für die M88-T-Zell-vermittelte PM konnten mit mehreren verschiedenen Methoden bakterielle und humane Antigene identifiziert werden. Die meisten davon sind als intrazelluläre essentielle Proteine an der Translation beteiligt. Interessanterweise bindet M88 an verschiedene humane Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Antigene, die auch von Autoantikörpern in anderen Formen der Myositis erkannt werden. Im Folgenden wurde das bakterielle Antigen EcIF1, ein Translationsinitiationsfaktor der Proteinbiosynthese im Zytosol, durch Mutagenese- und Affinitätsstudien weiter untersucht und charakterisiert. Außerdem wurde gezeigt, dass M88 nur an Konformationsepitope bindet, die unabhängig von posttranslationalen Modifikationen sind und auf einer Proteinoberfläche lokalisiert sein müssen. Bereits in Bruder, 2009 wurde nachgewiesen, dass die Erkennung des EcIF1 spezifisch durch die CDR3-Regionen beider Rezeptorketten von M88 erfolgt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Antigen-spezifität der oligoklonalen Banden (OKB) Antikörper von MS-Patienten analysiert. Für die Untersuchungen standen fünf rekombinante humane Fab-Fragmente zur Verfügung, die direkt von einzelnen OKB-Antikörpern aus drei MS-Patienten abstammen. Dadurch war es möglich, unabhängig vom polyklonalen Hintergrund an Antikörpern im Liquor cerebrospinalis, spezifisch nach Antigenen der OKB-Antikörper zu suchen. Im Verlauf der Arbeit wurden verschiedene Antigenklassen, hauptsächlich native und denaturierte Proteine, aber auch Nukleinsäuren und Lipide, mit unterschiedlichen Methoden, wie Immunfluoreszenzfärbungen, ELISAs, Proteinarrays, 2D-Westernblots oder Immunpräzipitationen, analysiert. Mit humanen Proteinarrays und Immunpräzipitationsexperimenten konnten schließlich einige native intrazelluläre Proteine als Kandidatenantigene der OKB-Antikörper identifiziert werden. Unter den identifizierten Kandidaten sind interessanterweise mehrere nukleäre Proteine, die an der Transkriptionsregulation oder der RNA-Prozessierung beteiligt sind.

4.1 Der $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor M88 aus einem Polymyositis-Patienten

4.1.1 Erkennung von Antigenen durch $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptoren

Bislang ist nur wenig über $\gamma\delta$ -TZR, ihre Antigene sowie ihre Bindungseigenschaften bekannt. Zudem ist die mögliche Rolle, die sie bei der Entstehung und Pathogenese von Autoimmunerkrankungen einnehmen, weitgehend unklar. $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen ihre Antigene einerseits ähnlich wie Antikörper, das heißt direkt und ohne MHC-Restriktion, andererseits haben sie eine vergleichbar niedrige Affinität wie $\alpha\beta$ -T-Zellen (Crowley et al., 2000; Shin et al., 2005; Scotet et al., 2005; Adams et al., 2005; Chien und Königshofer, 2007; Xu et al., 2011). Das bedeutet, dass die Dissoziationskonstanten von $\alpha\beta$ - sowie von $\gamma\delta$ -TZR selten unter 10^{-7} M (Stone et al., 2009) liegen, während die meisten Antikörper viel kleinere Dissoziationskonstanten haben. Da die meisten Untersuchungsmethoden auf hochaffinen Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Antigen basieren, erschwert dies im Allgemeinen die Untersuchung der Antigenbindungseigenschaften von TZR. Daher sind molekulare Details der Erkennung bisher meist unbekannt. Zudem können $\gamma\delta$ -T-Zellen eine große Bandbreite an Antigenen, Modifikationen oder auch niedermolekularen Liganden binden (Chien und Königshofer, 2007; Beetz et al., 2008; Hayday, 2009; Bonneville et al., 2010). Bis heute sind nur wenige $\gamma\delta$ -TZR-Strukturen gelöst (Li et al., 1998; Allison et al., 2001; Adams et al., 2005; Xu et al., 2011). Selbst bei den häufigsten humanen $V\gamma 9V\delta 2$ -Zellen, welche Prenyl-Pyrophosphate erkennen, ist nicht bekannt, wie diese Moleküle präsentiert werden (Sarikonda et al., 2008). Über die Antigenerkennungseigenschaften und Strukturen von $\alpha\beta$ -TZR ist hingegen schon sehr viel mehr bekannt (Rudolph et al., 2006; Wucherpfennig et al., 2007; Ishizuka et al., 2008; Garcia et al., 2009). Durch die Untersuchungen des putativ autoreaktiven pathogenen $\gamma\delta$ -TZR M88 aus einem PM-Patienten konnten weitere spannende Einblicke in die Biologie der $\gamma\delta$ -TZR gewonnen werden.

4.1.2 M88-T-Zell-vermittelte Polymyositis

Die Rolle von T-Zellen bei der Pathogenese der PM ist bis heute nicht aufgeklärt (Dalakas und Hohlfeld, 2003; Dalakas, 2004, 2010, 2011a, 2011b). Durch immunhistochemische Färbungen und molekularbiologische Analysen werden fokale T-Zell-Infiltrate und ein oligoklonal expandiertes T-Zell-Repertoire nachgewiesen, welche auf eine spezifische Autoimmunreaktion der T-Zellen gegen das Muskelgewebe hindeuten. Ein direkter Beweis dafür fehlt ohne Kenntnis des zugrundeliegenden Autoantigens allerdings. Hohlfeld et al. beschrieben 1991 erstmals einen PM-Patienten, bei dem $\gamma\delta$ -T-Zellen (TZR-Klon M88) im entzündeten Muskelgewebe nachweisbar waren. Wiendl et al., 2002 zeigten, dass M88 *in vitro* ein konformationelles, intrazelluläres und muskel-assoziiertes Proteinantigen erkennt. 2004 konnten

Dornmair et al. zudem nachweisen, dass die Antigene in verschiedenen Spezies, von humanen Muskelzellen bis hin zu Bakterien, vorkommen. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Antigenspezifität von M88, aufbauend auf Bruder, 2009, näher untersucht.

4.1.3 Erkennung von bakteriellen und humanen Proteinen durch M88

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bakterielle und humane Proteinantigene des pathogenen $\gamma\delta$ -TZR M88 identifiziert und zum Teil auch näher charakterisiert werden. Die meisten dieser Antigene sind interessanterweise als essentielle Proteine an der Proteinbiosynthese im Zytosol beteiligt.

4.1.3.1 Bakterielle Antigene von M88

Erste Hinweise auf die Identität potentieller bakterieller Antigene von M88 wurden durch die Antigen suche mit einer *E. coli* cDNA-Bibliothek erhalten, bei der ein lösliches „*single-chain-Fv*“-Konstrukt von M88 in *E. coli* eingesetzt wurde. Dabei wurden Proteine des Translationsapparates als mögliche Antigene identifiziert. Zudem wurden bereits auch einzelne rekombinante Proteine des Translationsapparates von *E. coli*, darunter AA-RS und Initiationsfaktoren (Shimizu et al., 2001) analysiert (Bruder, 2009). Einige der Proteine, unter anderem die bakteriellen AA-RS für Lysin (EcK-RS) und Asparagin (EcN-RS) sowie der Translationsinitiationsfaktor EcIF1, aktivierten M88 *in vitro*. Kontaminationen als Quelle des Signals konnten durch zusätzliche Gelfiltrationsexperimente ausgeschlossen werden. Ein Kontrollprotein, die AA-RS für Aspartat (EcD-RS), aktivierte M88 nicht.

Neben mehreren anderen bakteriellen Proteinen stimulierte, wie bereits erwähnt, das Protein EcIF1 M88. Dieses wurde für eine weitere Charakterisierung durch Mutagenese- und Affinitätsstudien ausgewählt. EcIF1 ist mit 72 Aminosäuren sehr klein und gut löslich. Die Sekundärstruktur ist bereits bekannt (Sette et al., 1997) und es sind bisher keine posttranslationalen Modifikationen beschrieben. Daher erschien es als besonders geeignet, um gerichtete Mutationen einzuführen und anschließend die Aktivierung von M88 durch den EcIF1-Wildtyp und die Mutanten zu untersuchen. Insgesamt wurden neben dem Wildtyp 18 verschiedene EcIF1-Mutanten kloniert, exprimiert, gereinigt und auf Stimulation der M88-Hybridome hin untersucht. Unter den analysierten Mutanten zeigte besonders der Austausch des Arginin 41 in einer kurzen exponierten 3_{10} α -Helix eine signifikant schwächere Aktivierung von M88. Einige andere Austausche in dieser Region führten ebenfalls zu einer schwächeren Stimulation des Rezeptors. Die Aktivierung von M88 durch EcIF1 konnte allerdings mit keiner der Mutationen vollständig verhindert werden, was eine Erkennung weiterer Oberflächenbereiche von EcIF1 durch M88 vermuten lässt. Der M88-Rezeptor erkennt wahrscheinlich ein nicht linea-

res Konformationsepitop auf der Proteinoberfläche. Konformationsepitope sind Epitope, die erst durch die räumliche Faltung eines Proteins entstehen. So können auch diskontinuierliche Aminosäureabschnitte eines Proteins, die erst durch die Faltung in eine räumliche Nähe gebracht werden, zusammen ein Epitop bilden. Daher kann das vollständige Epitop von M88 auf EcIF1 wahrscheinlich nicht einfach durch weitere Mutagenesestudien definiert werden. Zur Aktivierung könnten mehrere Proteinoberflächenbereiche beitragen und es müssten alle verschiedenen, auch nicht linearen, Mutationskombinationen analysiert werden. Dieser Ansatz würde zudem dadurch erschwert werden, dass sich vor allem beim gleichzeitigen Austausch mehrerer Aminosäuren die Sekundärstruktur des Proteins unvorhersehbar ändern kann. Dies würde eine Interpretation der Daten zusätzlich beeinträchtigen. Zudem können selbst einzelne Aminosäureaustausche einen nicht vorhersehbaren Einfluss auf die Sekundärstruktur und damit auch auf die Adsorptionseigenschaften der Proteine an Oberflächen, wie beispielsweise an die Mikrotiterplatten für die Aktivierungsversuche der M88-Hybridome, haben. Daher können Mutagenesestudien in der Regel nur Hinweise geben, es können aber keine endgültigen Schlüsse über das vollständige molekulare Epitop oder die detaillierte Antigenbindung gezogen werden. Solche Ergebnisse könnten nur durch Ko-Kristallisationsexperimente von M88 mit EcIF1 gewonnen werden. Die dafür notwendige Expression eines löslichen M88-Rezeptors in größeren Mengen in HEK293E-Zellen wurde zwar in mehreren Experimenten versucht, war allerdings aufgrund der wahrscheinlich intrazellulär für das Zellwachstum toxischen Eigenschaften dieses Rezeptors nicht möglich.

Für die Erkennung weiterer Oberflächenbereiche auf EcIF1 oder gar repetitiver Antigene würde zusätzlich die Tatsache sprechen, dass ein TZR im Durchschnitt eine Antigenerkennungsregion von 900-1.500 Å² besitzt (Allison et al., 2001; Davis-Harrison et al., 2007), wohingegen das EcIF1 mit schätzungsweise 100-200 Å² eher klein ist.

Mit den EcIF1-Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass die Aktivierung von M88 wahrscheinlich unabhängig von posttranslationalen Modifikationen ist, da solche bis jetzt für EcIF1 nicht beschrieben wurden.

Die Erkennung eines strikt konformationellen, nicht linearen Epitopes auf EcIF1 durch M88 wurde durch mehrere Denaturierungs- und Renaturierungsexperimente bestätigt. EcIF1 ist ein sehr stabiles Protein. Durch starke Denaturierungsreagenzien- oder Bedingungen konnte die Erkennung durch M88 allerdings vollständig verhindert werden. Zudem konnten ein synthetisches Peptid oder Trypsin-verdaute Peptide des EcIF1 M88 nicht aktivieren, oder mit nativem EcIF1 um die Bindung an den M88-Rezeptor konkurrieren. Dies bedeutet, dass nur EcIF1 mit einer nativen Konformation in der Lage ist, den Rezeptor zu aktivieren.

Zudem wurde die Bindung von M88 an EcIF1 bereits in Bruder, 2009 mit M88-Mutanten charakterisiert. Dazu wurden M88-transfizierte Hybridomzellen verwendet, die definierte Aminosäureaustausche in der γ - oder δ -Kette des Rezeptors hatten. Anschließend wurde die

Erkennung des EcIF1 durch die M88-Mutanten untersucht. Durch diese Experimente wurde gezeigt, dass an der Bindung von EcIF1 durch M88 die CDR3-Regionen beider TZR-Ketten beteiligt sind. Mutationen in den CDR-Regionen verhindern die Aktivierung der entsprechenden M88-Hybridome durch EcIF1 vollständig, während Austausch in den konstanten Regionen keinen Einfluss haben. Die Aktivierung erfolgt also spezifisch CDR3-abhängig und ist nicht auf einen Superantigeneffekt zurückzuführen.

4.1.3.2 Humane Antigene von M88

Im Folgenden sollten auch humane Antigene und damit potentielle Autoantigene im Patienten identifiziert werden. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Myositis-Patienten häufig Autoantikörper gegen AA-RS (Plotz, 2003; Levine et al., 2003) sowie einige weitere intrazelluläre Proteine bilden (Dalakas und Hohlfeld, 2003; Dalakas, 2010). Zudem wurden AA-RS aus *E. coli* bereits als Antigene von M88 identifiziert, daher wurden im Folgenden auch mehrere humane AA-RS auf Aktivierung des TZR M88 hin untersucht. Außerdem erkennen $\gamma\delta$ -TZR ihre Antigene, wie bereits erwähnt, ähnlich wie Antikörper, das heißt direkt und ohne MHC-Restriktion. Tatsächlich stimulierten die humanen AA-RS für Histidin (hH-RS), Alanin (hA-RS) und Threonin (hT-RS) M88. Dies ist besonders interessant, da Autoantikörper gegen die hH-RS (Jo-1 Antigen) auch den Hauptanteil der Anti-Synthetase-Antikörper in anderen Myositis-Patienten stellen. Die spezifische Erkennung konnte für die hH-RS und hA-RS zusätzlich durch Gelfiltrationsexperimente bestätigt werden. Dabei blieb die Aktivierung von M88 durch die AA-RS nach Reinigung durch Gelfiltration in den entsprechenden Fraktionen erhalten. Kontaminationen in den Proben als Signalursache konnten durch ein Kontrollprotein hPCNA, welches auf dieselbe Weise exprimiert und gereinigt wurde, ausgeschlossen werden. Dieses Protein stimulierte den Rezeptor, wie erwartet, nicht. Zudem konnte die Stimulation von M88 durch die hH-RS durch ein polyklonales humanes Serum und einen monoklonalen Antikörper gegen diese Synthetase spezifisch blockiert werden. Für die hH-RS konnte mit Denaturierungsexperimenten ebenfalls ein konformationelles Proteinepitop nachgewiesen werden. Nur das Protein mit einer nativen Konformation aktivierte den M88-Rezeptor. Da die humanen AA-RS meist große Proteine sind, wurde von aufwendigen Mutageneseexperimenten zur näheren Epitopcharakterisierung abgesehen. Außer von der EcK-RS aus *E. coli* (Onesti et al., 2000) sind bislang auch die detaillierten vollständigen Konformationsstrukturen dieser Proteine nicht bekannt.

Als weiteres humanes Kandidatenprotein wurde das zu EcIF1 homologe Protein, der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor eIF1AY, kloniert und exprimiert. Es konnte allerdings im vorliegenden experimentellen System M88 nicht aktivieren. Ein möglicher Grund ist, dass das humane rekombinante Protein eine andere Sekundärstruktur im Vergleich zum bakteriellen

rekombinanten EcIF1 aufweist, zumal es auch fast doppelt so groß ist. Es wurde bereits des Öfteren gezeigt, dass M88 nur Konformationsepitope erkennt. Des Weiteren sind CD-Spektroskopie-Daten von Proteinen mit hohen *Random*-Anteilen, wie sie beim eIF1AY vorkommen, oft nicht genau. Daher kann über die tatsächliche Sekundärstruktur des rekombinanten Proteins keine eindeutige Aussage getroffen werden. Von ausführlichen und aufwendigen Rückfaltungsexperimenten mit dem rekombinanten eIF1AY-Protein wurde abgesehen, da die Sekundärstruktur auch durch den Adsorptionsvorgang an die Mikrotiterplatte selbst unvorhersehbar beeinflusst werden könnte. Zudem wäre es auch möglich, dass die langen und flexiblen N- und C-Termini des eIF1AY das Epitop bei der Adsorption an die Mikrotiterplatten verdecken. Dadurch könnte das Epitop für den M88-Rezeptor während des Hybridom-Aktivierungsversuches nicht mehr zugänglich sein.

In dieser Arbeit wurden einige strukturell und funktionell verschiedene bakterielle und humane Antigene von M88 identifiziert. Da sich jedes Protein, je nach Sequenz und Struktur, bei der Adsorption an feste Oberflächen anders verhält, können bei allen Experimenten Proteinadsorptionsartefakte an die Plastikoberfläche bei den Aktivierungsversuchen der M88-Hybridome nicht ausgeschlossen werden. Dabei kann es bei verschiedenen Proteinen zu unvorhersehbaren Effekten, wie zum Beispiel zu Veränderungen in der Sekundärstruktur, kommen. Allerdings stand für die Untersuchungen der Antigen-spezifität und für die Aktivierungsexperimente von M88 kein anderes experimentelles System zur Verfügung. Da die Affinitäten von TZR für ihre Antigene allgemein sehr niedrig sind (Stone et al., 2009), konnten keine biochemischen, affinitätsbasierten Methoden, wie IP-Experimente oder Ähnliches, angewendet werden. Solche Methoden kommen beispielsweise häufig bei Antikörpern zum Einsatz. Zudem unterliegen $\gamma\delta$ -TZR nicht der MHC-Restriktion, daher konnten auch keine neuen zellbasierten Methoden der Antigen-suche, wie sie kürzlich für $\alpha\beta$ -TZR entwickelt wurden, verwendet werden (Siewert et al., 2012).

4.1.4 Affinität und Spezifität von M88

Die Erkennung von mehreren strukturell und funktionell verschiedenen Proteinantigenen durch einen Rezeptor wirft natürlich die Frage nach der Affinität und Spezifität des TZR M88 auf. Mit Affinitätsmessungen wurde daher die Bindung von EcIF1 an M88 näher charakterisiert. Bei der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (Biacore-Messung) wurde eine schwache Affinität von M88 zu EcIF1 in einer Größenordnung von $K_D = 10 \pm 6,7$ mM gemessen, eine Sättigung konnte allerdings nicht erreicht werden. Dies deutet auf eine sehr schnelle Assoziations- und Dissoziationsreaktion zwischen EcIF1 und M88 hin. In einer FACS-Analyse, bei der M88-Hybridome mit oligomerisierten EcIF1-Molekülen gefärbt wer-

den sollten, konnte hingegen keine Bindung nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Daten der Biacore-Experimente zur geringen Affinität von M88 zu EcIF1. Die Biacore-Daten zeigen, dass die Messung einer direkten chemischen Bindung von niederaffinen TZR an ihre Liganden zwar möglich, aber auch begrenzt ist, da eine Sättigung oft nicht erreicht werden kann. Es ist bereits bekannt, dass TZR sehr geringe Affinitäten zu ihren Antigenen haben (Rudolph et al., 2006). Daher werden oft zellbasierte *Bioassays* bevorzugt, da diese viel sensitiver sind. Im Gegensatz zur biochemischen Messung, wo die direkte Interaktion eines Rezeptors mit einem Liganden gemessen wird, kommt es im biologischen System zur Oligomerisierung und starken Quervernetzung von Ligand und TZR auf der Zelloberfläche und in der Zelle durch Signaltransduktionskaskaden zur Signalamplifikation. Im vorliegenden Fall der Aktivierung der M88-Hybridome und der anschließenden Messung des sezernierten IL-2, wird das Antigen in hohen Konzentrationen immobilisiert auf einer Mikrotiterplatte präsentiert. Dies führt auf der Zelloberfläche zunächst zur Quervernetzung des M88-Rezeptors und in der Zelle zu einer Signaltransduktionskaskade und Signalamplifikation. Zudem werden die Zellen zum Beispiel beim Aktivierungsversuch allein durch die Schwerkraft auf die Antigen-besetzte Oberfläche gedrückt und es kommt zu keinen Scherkräften wie bei der Biacore-Messung, bei der das Antigen am Rezeptor vorbeifließt. Am Ende wird das sezernierte IL-2 im Zellkulturüberstand durch einen ELISA gemessen. Diese Methode basiert ebenfalls auf einer Amplifikation des Signals durch Antikörper und Enzymreaktionen. Daher sind *Bioassays* sehr sensitiv und selbst eine geringe Affinität zu einem Antigen kann *in vitro* zu einer Aktivierung der T-Zellen führen.

Es kann daher letztlich keine Aussage mehr getroffen werden, wodurch und wie im Patienten die Autoimmunerkrankung PM ausgelöst wurde, und welche Antigene im Patienten *in vivo* tatsächlich den TZR M88 aktivierten. Es wäre zudem denkbar, dass im Patienten vielleicht schon eine schwache Affinität zu einem Antigen, in Verbindung mit anderen allgemeinen Entzündungssignalen oder einer Infektion, zur Aktivierung des pathogenen M88-Rezeptors ausgereicht haben. Als Folge kam es dann zur autoimmunen Myositis. Dies passt zur Vermutung, dass autoaggressive T-Zellen eher niederaffin zu Autoantigenen sind, da hochaffine autoreaktive T-Zellen im Körper normalerweise entweder durch die thymische negative Selektion oder später durch die periphere Toleranz durch Anergie ausgeschaltet werden, um den Körper so vor potentiell stark autoreaktiven Zellen zu schützen.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass M88 mehrere strukturell und funktionell unterschiedliche Antigene von verschiedenen Spezies, wie zum Beispiel bakterielle und humane Proteine, erkennt. Zudem wurden bei den Mutageneseexperimenten auch einige nicht-konservative Aminosäureaustausche in EcIF1 toleriert. Somit ist die Antigenerkennung von M88 eher „breit“ und „unspezifisch“ und damit auch schwieriger molekular zu definieren. Diese Beobachtung kann durch die Polyspezifität und Kreuzreaktivität von TZR erklärt wer-

den (Wucherpfennig, 2004; Wucherpfennig et al., 2007). Diese Begriffe bedeuten, dass manche TZR nicht nur einzelne genau definierte Antigenepitope, sondern auch verschiedene aber ähnliche Peptidmotive erkennen können. Im Fall des M88-Rezeptors könnten dies auch konformationelle, nicht lineare Peptidmotive auf einer Proteinoberfläche sein. Bei manchen Rezeptoren sind sogar einzelne Aminosäuren des Motivs austauschbar und für die Aktivierung scheinbar nicht relevant. Dies bedeutet, dass ein einzelner Rezeptor durchaus mehrere verschiedene aber ähnliche „Mimotope“ oder auch Konformationsepitope auf verschiedenen Proteinen erkennen kann. Solche „breiten“ Erkennungsspezifitäten, wie sie für den vorliegenden M88-Rezeptor beobachtet wurden, erinnern daher sowohl an die Mustererkennungsmechanismen der Rezeptoren der angeborenen Immunität (Iwasaki und Medzhitov, 2010), als auch an die Polyspezifität der $\alpha\beta$ -TZR (Wucherpfennig et al., 2007).

4.1.5 Weitere Antigene von M88

Wie bereits erwähnt, ist die Erkennung und Spezifität von M88 relativ „breit“, das heißt der Rezeptor kann durch diverse Antigene von verschiedenen Spezies aktiviert werden (s. Abschnitt 4.1.4). Daher ist es wahrscheinlich, dass neben den in dieser Arbeit untersuchten bakteriellen und humanen Proteinantigenen des Translationsapparates noch weitere, bis jetzt nicht identifizierte Antigene von M88 existieren.

Da aber wahrscheinlich eher Konformationsepitope als lineare Epitope erkannt werden, kann nicht einfach eine Sequenzanalyse vorgenommen werden, um das immunogene Potential eines bestimmten Proteins vorherzusagen. Für die Aktivierung des M88-Rezeptors muss das Epitop zudem in einer bestimmten räumlichen Orientierung auf der Proteinoberfläche exponiert sein. Dies muss nicht für alle Proteine, die eine potentiell kompatible Aminosäuresequenz tragen, der Fall sein. Für Vorhersagen müssten detaillierte Konformationsstrukturen der Kandidatenproteine vorhanden sein, um sie mit bereits bekannten Antigenen abzugleichen. Von den meisten Proteinen stehen solche Strukturinformationen bislang nicht zur Verfügung. Der schnelle Test von linearen synthetischen Zufallspeptiden (Pinilla et al., 1999; Nino-Vasquez et al., 2004), wie er bei $\alpha\beta$ -TZR eingesetzt wird, kann bei diesem Rezeptor daher ebenfalls nicht durchgeführt werden, um neue Antigene zu identifizieren.

4.1.6 Pathogenese durch M88

Die Erkennung von bakteriellen und humanen Proteinen könnte ein Hinweis auf molekulare Mimikry als Ursache der PM im Patienten sein (Oldstone, 1987). Die molekulare Mimikry ist eine gängige Theorie für die Ursache und Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. Sie bezeichnet daher auch die Polyspezifität von TZR im Zusammenhang mit Autoimmunität

(Wucherpfennig et al., 2007; Blank et al., 2007). Das Model der molekularen Mimikry besagt dabei, dass ein Rezeptor von mehreren verschiedenen Proteinen oder Peptiden aktiviert werden kann, die zwar ähnlich genug für eine Bindung des Rezeptors, aber nicht identisch sein müssen. Solche Ähnlichkeiten, die für eine Kreuz-Aktivierung eines potentiell autoreaktiven Rezeptors ausreichen, kommen beispielsweise auch zwischen Proteinen, die von Pathogenen (zum Beispiel Bakterien, Viren, Pilze usw.) abstammen und humanen Proteinen vor (Samarkos und Vaiopoulos, 2005). Daher treten manche Autoimmunerkrankungen auch gehäuft nach Infektionen mit bestimmten Pathogenen auf (Samarkos und Vaiopoulos, 2005; Kivity et al., 2009).

Die Frage, wie im Falle des M88-T-Zell-vermittelten PM-Patienten die Selbsttoleranz durchbrochen wurde, muss allerdings offen bleiben. Der Patient ist bereits verstorben und es sind keine Gewebeproben für weitere detailliertere Untersuchungen mehr vorhanden. Der Zusammenhang zwischen mikrobieller Umgebung und Autoimmunität ist zudem sehr komplex (Chervonsky, 2010). Außerdem stellte die $\gamma\delta$ -T-Zell-vermittelte PM einen medizinischen Einzelfall in der Literatur dar und selbst die intensive Suche nach weiteren Patienten blieb erfolglos.

Der invasive TZR M88 wurde erstmals von Hohlfeld et al., 1991 beschrieben. Dort wurde mit immunhistochemischen Färbungen und Elektronenmikroskopie gezeigt, dass die M88-T-Zellen tief in einzelne Muskelfasern eindringen und sie zerstören. Ein sehr ähnliches Bild von Myositis-Läsionen mit infiltrierenden und Muskelzell-zerstörenden T-Zellen zeigt sich auch bei der $CD8^+$ $\alpha\beta$ -T-Zell-vermittelten Myositis (Arahata und Engel, 1988; Hohlfeld und Engel, 1994; Bender et al., 1995; Goebels et al., 1996; Dalakas, 2004; Seitz et al., 2006). Bei der $\alpha\beta$ -T-Zell-vermittelten Myositis wird vermutet, dass die attackierten Muskelzellen mit unbekanntem Peptiden beladene MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren, die von den T-Zellen erkannt und angegriffen werden. Es könnte daher gleichermaßen bei der $\gamma\delta$ -T-Zell-vermittelten PM der Fall sein, dass ein auf den Muskelzellen Oberflächen-exponiertes Antigen von M88 erkannt wurde. Dabei könnte es sich *in vivo* im Patienten um bis jetzt noch nicht identifizierte Membranproteinantigene von M88 handeln, oder um intrazelluläre Proteine, die auf der Zelloberfläche exprimiert wurden. Bis heute ist allerdings nicht bekannt, ob und wie intrazelluläre Antigene unter pathogenen Bedingungen die Zelloberfläche erreichen können. Man könnte sich allerdings vorstellen, dass solche Mechanismen durch eine Entzündungsreaktion oder Infektion und den damit veränderten Stoffwechsel ausgelöst worden sein könnten. Zudem könnten die Muskelzellen auch erst durch Nekrose oder andere Mechanismen geschädigt worden sein und so ihren zytoplasmatischen Inhalt in den extrazellulären Raum abgegeben haben. Die Autoimmunreaktion gegen intrazelluläre Bestandteile wäre demnach erst als sekundärer Mechanismus nach bereits erfolgter Schädigung der Muskelzel-

len ausgelöst worden. Möglicherweise hatte der Patient auch Patienten-spezifische Mutationen oder Modifikationen, die zur Oberflächenexposition der Antigene führten. Die so zugänglichen Antigene könnten M88 aktiviert und die Erkrankung ausgelöst haben.

Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise dem SLE, sind intrazelluläre Antigene bekannt (Reichlin, 1995; Mok und Lau, 2003; Munoz et al., 2008). Bei vielen dieser Patienten tritt eine Immunreaktion gegen Zellkernbestandteile auf. Beim SLE konnte außerdem beobachtet werden, dass einige Antigene tatsächlich auf der Zelloberfläche für Autoantikörper zugänglich sind (Casciola-Rosen et al., 1994). Zudem ist bekannt, dass die humane Lysyl-tRNA-Synthetase nach TNF- α -Induktion von intakten Zellen sezerniert werden kann (Park et al., 2005). Weitere Untersuchungen zeigten, dass manche AA-RS, die hH-RS eingeschlossen, proinflammatorische Eigenschaften haben und Lymphozyten und dendritische Zellen durch Aktivierung der CCR5- und CCR3-Chemokin-Rezeptoren zum Entzündungsort rekrutieren können (Howard et al., 2002). Daher wäre es vorstellbar, dass von den angegriffenen Muskelzellen freigesetzte AA-RS Immunzellen rekrutieren, und so die natürliche und adaptive Immunantwort in der Myositis induzieren und aufrechterhalten.

Autoantikörper gegen nukleäre oder zytoplasmatische Bestandteile, AA-RS eingeschlossen, werden bei ca. 20 % aller Myositis-Patienten gefunden (Levine et al., 2003; Plotz, 2003; Dalakas, 2010). Der Nachweis dieser Autoantikörper stellt einen wichtigen diagnostischen Marker der Myositis dar. Bislang ist allerdings unklar, wie die B-Zell-Antworten gegen AA-RS während der Myositis entstehen, und ob die Antikörper ein direktes pathogenes Potential haben. Antikörper gegen die hH-RS (anti-Jo-1) (Mathews und Bernstein, 1983; Martin et al., 1995) stellen dabei den Hauptteil der Anti-Synthetasen-Antikörper dar. Durch diese Beobachtung ergibt sich bei der autoimmunen Myositis eine interessante Verbindung zwischen der frühen semi-angeborenen Immunantwort, die durch $\gamma\delta$ -T-Zellen vermittelt wird, und der späten adaptiven Immunantwort, die durch reife, Komplement-aktivierende Autoantikörper von B-Zellen vermittelt wird. Der pathogene TZR M88 aus der $\gamma\delta$ -T-Zell-vermittelten PM wird von denselben Antigenen aktiviert, die in anderen Formen der Myositis von Autoantikörpern erkannt werden. Die Epitope auf der Oberfläche der AA-RS, die von den M88-T-Zellen und den Antikörpern der B-Zellen erkannt werden, können dabei natürlich verschieden sein.

4.1.7 Ausblick

Mit den Studien über den $\gamma\delta$ -TZR M88 aus einem PM-Patienten konnten verschiedene intrazelluläre Antigene, zum Beispiel bakterielle und humane Proteine des Translationsapparates, identifiziert werden. Daher wäre es nun interessant, zu untersuchen, ob auch bei anderen Myositis-Patienten T-Zell-Reaktivitäten gegen diese Proteine vorkommen. Da es bisher keine weiteren Fälle von $\gamma\delta$ -T-Zell-vermittelter Myositis gab, könnten ebenso $\alpha\beta$ -T-Zellen bei der

normalen autoimmunen Myositis analysiert werden. Wie bereits beschrieben, wurde dies bei B-Zellen und Antikörpern bereits untersucht. So treten Autoantikörper gegen AA-RS häufig bei Myositis-Patienten auf.

Weiterhin wäre es sinnvoll, zu überprüfen, ob der M88-Rezeptor $V\gamma 1.3V\delta 2$ als Bestandteil des natürlichen Repertoires auch in gesunden Individuen nachzuweisen ist. Möglicherweise tritt dieser Rezeptor häufig auf und gesunde Personen sind gegenüber diesem potentiell auto-reaktiven Rezeptor tolerant. Da die meisten $\gamma\delta$ -T-Zellen allerdings in geringer Frequenz im Blut vorkommen, müssten verschiedene Gewebebiopsien von gesunden Individuen untersucht werden, und auch dort ist die Verteilung der Rezeptortypen nicht gleichmäßig, wodurch bestimmte Rezeptorketten wahrscheinlich nur sehr schwer nachzuweisen wären.

Zudem wäre es vielversprechend, ein induzierbares transgenes Tiermodell der M88-T-Zell-vermittelten PM zu etablieren, um die Pathogenese durch den M88-Rezeptor im Detail untersuchen zu können. Anschließend wäre zu überprüfen, ob im Tiermodell M88-T-Zell-vermittelte Muskelentzündungen und Infiltrationen ähnlich zu der PM im Menschen auftreten. Um die vollständigen Epitope zu identifizieren und um bessere Einblicke in die genauen molekularen Details der Bindung zu gewinnen, könnte M88 außerdem zusammen mit einem Antigen, wie beispielsweise dem EcIF1 oder der hH-RS, kristallisiert werden. Bislang scheiterten solche Versuche allerdings daran, M88 in ausreichenden Mengen löslich zu exprimieren. Zudem sind Ko-Kristalle aus TZR und Antigen experimentell äußerst schwierig herzustellen, wenn die Affinität zwischen TZR und Antigen, wie in diesem Fall, sehr niedrig ist.

4.2 Oligoklonale Banden Antikörper von Multiple Sklerose Patienten

Bereits seit vielen Jahren ist der Nachweis von OKB-Antikörpern im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten ein entscheidendes Kriterium bei der Diagnose. Die OKB wurden erstmals in den 1940er Jahren von Kabat beschrieben (Kabat et al., 1942; Kabat et al., 1948), bisher gelang es trotz intensiver Versuche allerdings nicht, ihre Rolle in der Immunpathogenese aufzuklären oder ihre Antigene zu identifizieren.

Bei den meisten OKB-Antikörpern handelt es sich um oligoklonal expandierte Populationen vom Komplement-aktivierenden IgG1-Subtyp, welche zahlreiche SHM aufweisen und über Jahre persistieren. Daher stammen sie wahrscheinlich von einer Antigen-induzierten Immunantwort im ZNS ab. Doch nur wenn die Antigene identifiziert werden und eine Verbindung zu aktiven, entzündlichen und pathogenen Prozessen im Gehirn hergestellt wird, kann gezeigt werden, ob die OKB-Antikörper tatsächlich an der Immunpathogenese der MS beteiligt sind. Daher wurde im zweiten Teil der Arbeit die Antigenspezifität der OKB-Antikörper von MS-Patienten, aufbauend auf der Arbeit von Obermeier, 2011, untersucht.

4.2.1 Frühere Strategien der Antigensuche

Wie bereits in Abschnitt 1.3.3.1 dargestellt, ist es von besonderer Bedeutung, die Antigene der OKB-Antikörper zu identifizieren. Bislang wurden dazu vor allem Experimente mit Liquor-Antikörpern aus zellfreiem Gesamt-Liquor durchgeführt. Der Nachteil bei diesem Ansatz ist, dass Gesamt-Liquor natürlich nicht nur die expandierten und intrathekal synthetisierten OKB-Antikörper, sondern auch die irrelevanten polyklonalen Antikörper enthält, welche durch die Blut-Hirn-Schranke aus dem Serum in den Liquor eingespült werden. Für die bisherige Antigensuche wurden die Liquorproben entweder mit Kandidatenantigenen im ELISA (Reiber et al., 1998; Derfuss et al., 2001; Ilyas et al., 2003) untersucht oder auf Proteinarrays (Roche et al., 2008; Beyer et al., 2012) eingesetzt. Bei anderen Studien wurde der Liquor auch für Immunoblots (Cepok et al., 2005; Kolln et al., 2006; Mathey et al., 2007; Lovato et al., 2008; Derfuss et al., 2009) verwendet, um neue Antigene zu identifizieren. Mit diesen Ansätzen kann allerdings nicht geklärt werden, ob die detektierten Signale von einem relevanten OKB-Antikörper oder vom polyklonalen Antikörperhintergrund stammen. Eine etwas neuere Strategie stützt sich auf die Publikation von Obermeier et al., 2008, in der gezeigt wurde, dass die OKB-Antikörper intrathekal von den Liquor-B-Zellen synthetisiert werden. Bei dieser Vorgehensweise wurden daher monoklonale Antikörper aus den L- und H-Ketten einzelner Liquor-B-Zellen kloniert, rekombinant exprimiert und im Anschluss für die Antigensuche eingesetzt. In einer Variante wurden dazu als Ausgangsmaterial für die Klonierungen CD138⁺ Plasmazellen aus dem Liquor isoliert (Yu et al., 2006). Andere Ansätze verwendeten nur klonal expandierte Plasmazellen (Lambracht-Washington et al., 2007; von Büdingen et al., 2008; Owens et al., 2009). Mit diesen Methoden kann zwar der polyklonale Hintergrund an Antikörpern im Liquor umgangen werden, aber es ist letztlich nicht nachzuweisen, ob eine zufällig ausgewählte Liquor-B-Zelle tatsächlich einen OKB-Antikörper produziert hat oder zu einem irrelevanten Antikörper gehört. Damit bleibt auch hier eine Zuordnung der identifizierten Antikörper und Antigene zu einzelnen OKB-Antikörpern und somit eine medizinische Relevanz offen.

Daher wurde in der Arbeitsgruppe eine neue Strategie entwickelt, mit der es möglich ist, einzelne OKB-Antikörper direkt vor dem polyklonalen Hintergrund an Antikörpern im Liquor zu identifizieren (Obermeier, 2011). Die IgG-Antikörper werden dazu zunächst durch Protein-G-Affinitätschromatographie aus dem Liquor isoliert und anschließend auf einem hochauflösenden 2D-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Distinkte expandierte IgG-Spots der OKB werden aus dem Gel isoliert und die L- und H-Kette durch Massenspektrometrie identifiziert. Durch Abgleich mit dem Ig-Transkriptom der Liquor-B-Zellen erhält man schließlich die vollständigen Sequenzen der Ketten. Mit dieser Methode konnten fünf rekombinante OKB-basierte Fab-Fragmente hergestellt und anschließend in die Antigensuche eingesetzt werden.

Damit war es erstmals möglich, unabhängig vom polyklonalen Antikörperhintergrund im Liquor, spezifisch nach den Antigenen der OKB-Antikörper zu suchen.

4.2.2 Suche nach den Antigenen der OKB-Antikörper

Für die Antigensuche wurden die rekombinant als monoklonale humane Fab-Fragmente exprimierten OKB-Antikörper in verschiedenen Experimenten eingesetzt.

4.2.2.1 Test einiger Kandidatenantigene

Zuerst wurden in Kooperation mit B. Obermeier verschiedene Kandidatenantigene untersucht. Bei ca. 89 % der MS-Patienten lässt sich, als eine Art Biomarker, eine Masern-Röteln-Varizella-Zoster-Reaktion (MRZ-Reaktion) (Reiber et al., 1998) des Liquors feststellen. MS-Patienten ohne OKB zeigen dagegen meist keine MRZ-Reaktion, weshalb ein Zusammenhang zwischen diesen Viren und der OKB-Produktion vermutet wird. Daher wurden zunächst indirekte Immunfluoreszenztests gegen bestimmte virale und bakterielle Erreger durchgeführt. Es konnte allerdings keine spezifische Bindung der OKB-basierten rFab-Fragmente an die getesteten Erreger nachgewiesen werden (Obermeier, 2011).

Immunhistochemische Färbungen von humanen Hirngefrierschnitten mit den OKB-basierten rFab-Fragmenten zeigten ebenfalls keine Erkennung spezifischer Strukturen, die sich eindeutig der Zellmembran, dem Zytoplasma oder dem Zellkern zuzuordnen ließen. Zusätzlich wurden einige standardisierte Immunfluoreszenztests gegen nukleäre und zytoplasmatische Antigene ausgeführt, die allerdings auch negativ waren (Obermeier, 2011).

Bei Obermeier, 2011 und auch in dieser Arbeit wurden Experimente mit Lipiden durchgeführt. Es konnte jedoch keine Reaktivität der rFab-Fragmente gegenüber Lipiden detektiert werden. In anderen Studien konnte solch eine Reaktivität bereits für IgG und IgM Antikörper aus dem Liquor von MS-Patienten gezeigt werden (Ilyas et al., 2003; Villar et al., 2005; Kanter et al., 2006; Brennan et al., 2011).

Des Weiteren konnte auch keine Bindung an Nukleinsäuren, wie sie von Williamson et al., 2001 schon für Antikörper aus dem Liquor von MS-Patienten beschrieben wurde, nachgewiesen werden. Allerdings wurden hier ebenfalls rekombinant exprimierte Antikörper aus Liquor-B-Zellen verwendet. Daher könnte dieses Signal ebenso vom polyklonalen Antikörperhintergrund stammen. Autoantikörper gegen DNA wurden ursprünglich bei der Autoimmunerkrankung SLE (Holman und Kunkel, 1957) beschrieben und treten dort bei ungefähr 70 % aller Patienten auf (Hahn, 1998; Rahman und Isenberg, 2008). Antikörper gegen DNA können aber auch bei anderen Autoimmunerkrankungen vorkommen.

Eine Polyreaktivität der OKB-Antikörper, nach der Definition und basierend auf dem Protokoll von Wardemann et al., 2003, konnte für die rFab-Fragmente nicht nachgewiesen werden. Bei einigen anderen B-Zell- und Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen, zum Beispiel beim SLE (Zhang et al., 2009a), wurde eine Polyreaktivität der Autoantikörper sowie ein pathogenes Potential bereits gezeigt.

Es wurden im Folgenden weitere und allgemeinere Methoden der Antigensuche gewählt, um auch neue, bis jetzt unbekannte Antigene der OKB-Antikörper identifizieren zu können.

4.2.2.2 Antigensuche mit Proteinarrays

Zunächst wurden humane Proteinarrays für die Antigensuche verwendet (Michaud et al., 2003; Robinson et al., 2003). Mit dieser modernen Methode können gleichzeitig sehr viele verschiedene humane Proteine im Mikroarraymaßstab untersucht werden. Der Vorteil ist dabei, dass die Proteine laut Hersteller in einer nativen und aktiven Konformation an die Oberfläche des Proteinarrays adsorbiert sind. Außerdem sind Proteine für eine Analyse zugänglich, die normalerweise nur in sehr geringen Konzentrationen in Zellen oder im Gewebe vorhanden sind, und daher mit anderen Methoden nur schwer zu detektieren wären. Andererseits ist man auf die vom Hersteller ausgewählten Proteine beschränkt. Zudem sind viele Proteine, unter anderem auch interessante Membranproteine, nicht auf dem Proteinarray enthalten, weil sie sehr aufwendig zu exprimieren sind. Solche Proteine fehlen daher bei der Analyse.

Proteinarrays werden mittlerweile in vielen verschiedenen Gebieten der Medizin und Industrie zur Evaluierung von Antikörper-Spezifitäten (Mattoon und Schweitzer, 2009; Schweitzer et al., 2010) eingesetzt. Bereits andere Arbeitsgruppen nutzten diverse Antigen-Mikroarrays für die Untersuchung der Antigenspezifität von Liquor-Antikörpern (Roche et al., 2008; Quintana et al., 2012; Beyer et al., 2012; Korn und Tumani, 2012) oder von Antikörpern im Serum von MS-Patienten (Quintana et al., 2008). Allerdings wurde auch in diesen Studien Gesamt-Liquor bzw. Serum verwendet, weshalb die detektierten Antigene nicht eindeutig den OKB-Antikörpern bzw. Autoantikörpern zugeordnet werden können.

Mit den rFab-Fragmenten, die von distinkten OKB-Antikörpern abstammen, kann dieses Problem umgangen werden. Sie wurden daher für eine Proteinarray-Antigensuche eingesetzt. Als Sekundärantikörper konnte nur ein polyklonaler Goat-anti-human-IgG-(H+L)-Alexa-647-Antikörper verwendet werden, da andere Antikörper für die Proteinarrays nicht geeignet waren. Da die Avidität der monovalenten rFab-Fragmente geringer ist, als die von intakten Antikörpern, waren die Signale wie erwartet schwächer als die Signale des Sekundärantikörpers. Die unspezifischen Hintergrundsignale des Sekundärantikörpers wurden daher durch die Auswertung abgezogen. Für Fab1 konnte so kein spezifisches Signal, für Fab2 sechs, für Fab3 drei, für Fab4 18 und für Fab5 vier Kandidatenantigene identifiziert werden.

Die rFab-Fragmente erkennen jeweils mehrere verschiedene Proteine auf dem Proteinarray. Das α -MOG-Fab erkannte zum Beispiel als Positivkontrolle neben dem MOG-Protein schwach zwei weitere Proteine. Die Tatsache, dass ein Antikörper an mehrere verschiedene Epitope binden kann, wird als Kreuzreaktivität, Polyspezifität oder Polyreaktivität bezeichnet (Wardemann et al., 2003; Notkins, 2004; Tsuiji et al., 2006; Wucherpfennig et al., 2007). Normalerweise zeigen besonders Antikörper aus dem naiven Repertoire, wie beispielsweise manche IgM-Antikörper, eine Polyreaktivität. Das Phänomen tritt aber ebenso bei anderen Antikörpern auf (Mouquet und Nussenzweig, 2011). Zudem ist auch bei Autoimmunerkrankungen, wie dem SLE (Yurasov et al., 2005; Mietzner et al., 2008), bekannt, dass sogar affinitätsgereifte Antikörper polyreaktiv sein können. Daher sind die Ergebnisse der Proteinarrays, die auf eine Polyspezifität der rFab-Fragmente hinweisen, durchaus mit der Literatur vereinbar.

Als mögliche Kandidatenantigene der rFab-Fragmente wurden durch die Proteinarray-Analysen ubiquitäre intrazelluläre Proteine (s. Tab. 3.7, Tab. 3.8 und Tab. 4.1) identifiziert. Ubiquitäre intrazelluläre Antigene von Liquor-Antikörpern, wie die Proteine Triosephosphatisomerase, GAPDH (Kolln et al., 2006) oder Transketolase (Lovato et al., 2008), wurden bereits in früheren Studien beschrieben, allerdings fehlte auch hier eine eindeutige Zuordnung zu den OKB-Antikörpern. Autoantikörper gegen intrazelluläre Proteine werden außerdem häufig in anderen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise dem SLE, der RA und der Myositis, nachgewiesen. Über die Bildung oder das mögliche pathogene Potential dieser Antikörper, die gegen eigentlich nicht zugängliche intrazelluläre Strukturen gerichtet sind, ist bislang allerdings nicht viel bekannt (Reichlin, 1995; Dalakas und Hohlfeld, 2003; Racanelli et al., 2011).

Die Kandidatenantigene SF17A, das bei Fab5 eine 78-fache Anreicherung gegenüber den Kontrollen zeigte, HOXA1 und NSP1 wurden für eine detailliertere Analyse ausgewählt. Die nativ gefalteten Proteine des Proteinarrays aus der Baculovirus-Insektenzell-Expression konnten dafür allerdings nicht direkt vom Hersteller der Proteinarrays für eine separate Einzelanalyse bezogen werden. Daher wurden zunächst Proteine von einem zweiten Hersteller aus einem anderen Expressionssystem, der *in vitro* Weizenkeimexpression, verwendet. Die Untersuchung der Kandidatenantigene SF17A, HOXA1 und NSP1 im Tüpfelblot und in der IP ergab jedoch bislang keine Bestätigung der Ergebnisse der Proteinarrays. Wahrscheinlich weisen die *in vitro* exprimierten Proteine allerdings keine native Konformation auf und werden deshalb nicht von den rFab-Fragmenten erkannt. Eine CD-Spektroskopie zur Überprüfung der Konformation war aufgrund der geringen Mengen und des Reinheitsgrades dieser Präparationen nicht möglich. Des Weiteren zeigten auch eigene Expressionsversuche des SF17A und des NSP1 in *E. coli*, dass sich diese Proteine nicht oder nur in sehr geringen Ausbeuten als lösliche Proteine exprimieren lassen und vermutlich nicht nativ gefaltet sind. Es ist daher anzu-

nehmen, dass die Proteine mit der nativen Konformation aus der Baculovirus-Insektenzell-Expression auf den Proteinarrays von den rFab-Fragmenten erkannt wurden, die Proteine aus der *in vitro* Weizenkeimexpression oder der *E. coli* Expression aber wahrscheinlich nicht nativ gefaltet sind und daher keine Bindung an die rFab-Fragmente erfolgte. Vorstellbar wäre natürlich auch ein falsch positives Signal des Proteinarrays. Der Proteinarray enthält zwar viele interne Kontrollen, trotzdem ist keine Methode absolut zuverlässig. Eine Verifizierung der Ergebnisse mit weiteren unabhängigen Methoden ist deshalb unabdingbar.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Expressionssystemen ist, dass Proteine aus der Baculovirus-Insektenzell-Expression zumindest teilweise glykosyliert sind, während Proteine aus der *in vitro* Weizenkeimexpression und der *E. coli* Expression nicht glykosyliert sind. Ob das Glykosylierungsmuster allerdings der humanen Glykosylierung *in vivo* entspricht bleibt offen, da Proteine aus Baculovirus-Insektenzell-Expressionen oft auch andere veränderte Glykosylierungsmuster aufweisen (Jarvis, 2003).

4.2.2.3 Antigen suche mit 2D-Westernblots

Um potentielle denaturierte Hirnantigene der OKB-Antikörper zu identifizieren, wurde eine 2D-Westernblot-Analyse durchgeführt. Mit dieser Methode wurden bereits verschiedene Antigene von Liquor-Antikörpern identifiziert (Cepok et al., 2005; Kolln et al., 2006; Mathey et al., 2007; Lovato et al., 2008; Derfuss et al., 2009). Als Ausgangsmaterial wurde humanes Hirnautopsiematerial von Individuen verwendet, die keine neurologische Erkrankung hatten. Daraus wurde ein Hirnlysate unter denaturierenden Bedingungen hergestellt. Als Sekundärantikörper wurde ein α -human-kappa-light-chain-HRP-Antikörper verwendet, da alle rFab-Fragmente die vollständige Sequenz der humanen C κ -Region besitzen. Mit der 2D-Westernblot-Analyse konnten allerdings nur wenige schwache Bindungen der rFab-Fragmente an denaturierte Proteine des Hirnlysats nachgewiesen werden. Zudem wurden aufgrund der hohen Sensitivität der Orbitrap-Massenspektrometrie in jedem isolierten Proteinspot mehrere verschiedene Proteine identifiziert (s. Tab. 3.9). Damit war eine Zuordnung, welches Protein tatsächlich von einem rFab-Fragment erkannt wurde, nicht möglich, da für ein Signal im Immunoblot theoretisch schon wenige Moleküle ausreichen würden. Die Auflösung der Proteine in der 2D-SDS-PAGE und im 2D-Westernblot ist daher wahrscheinlich nicht hoch genug, um Proteine vollständig voneinander zu trennen und spezifische Antigene der rFab-Fragmente identifizieren zu können. Mit der 2D-Westernblot-Analyse können außerdem nur denaturierte Antigene identifiziert werden. Die rFab-Fragmente könnten allerdings auch ausschließlich native Proteine erkennen. Des Weiteren sind in Gewebelysaten aufgrund der Verarbeitung einzelne Proteine, zum Beispiel Membranproteine, im Verhältnis unterrepräsentiert oder gehen beim Aufschluss ganz verloren. Andere Proteine hingegen kom-

men in Zellen oder im Gewebe nur in geringen Konzentrationen vor, so dass die Menge für eine Detektion im Immunoblot nicht ausreicht. So konnte zum Beispiel auch das MOG-Protein nicht auf dem 2D-Westernblot des α -MOG-Fab detektiert werden. Es zählt ebenfalls zu den seltenen Membranproteinen im Gehirn (Johns und Bernard, 1999). Daher sind 2D-Westernblots als Methode, um mit selbst hergestellten Hirnlysaten Antigene der rFab-Fragmente zu identifizieren, wahrscheinlich nicht sensitiv genug. Darüber hinaus sind 2D-Westernblots technisch sehr schwer reproduzierbar. Zwei verschiedene 2D-SDS-Polyacrylamidgele zeigen immer leichte Schwankungen in der Proteinfokussierung, selbst wenn sie parallel durchgeführt wurden. Dies erschwert eine spätere Zuordnung von Spots auf dem 2D-Westernblot zu Spots auf dem gefärbten Gel. Aus technischen Gründen konnten nicht alle 14 Gele für die fünf rFab-Fragmente und Kontrollen gleichzeitig durchgeführt werden. Dies macht eine Interpretation von 2D-Westernblot-Daten im Allgemeinen sehr schwierig.

4.2.2.4 Antigen suche mit Immunpräzipitationen

Zur Identifizierung von nativen Hirnproteinantigenen der rFab-Fragmente wurde die schnelle und effiziente Methode der Immunpräzipitation in Kombination mit Orbitrap-Massenspektrometrie (IP-Orbitrap) gewählt. Dazu wurde eine IP mit Hirnlysate, das unter nativen Bedingungen hergestellt wurde, durchgeführt und die präzipitierten Proteine wurden im Anschluss durch Orbitrap-Massenspektrometrie identifiziert. Mit dieser Methode konnten die Experimente für alle sechs rFab-Fragmente gleichzeitig parallel durchgeführt werden. Zudem ist der Proteomics-Ansatz (Yates et al., 2009) sehr sensitiv. Bei den IP-Experimenten wurden, ähnlich zu den Proteinarrays, ubiquitäre intrazelluläre Kandidatenantigene für Fab2, Fab4 und Fab5 (s. Tab. 3.10 und Tab. 4.1) identifiziert. Interessanterweise sind die identifizierten Proteine auch an der Transkriptionsregulation oder der RNA-Prozessierung im Zellkern und Zytoplasma beteiligt. Bei Fab2 wurde der „Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5“ identifiziert und bei Fab5 der „Histone deacetylase complex subunit SAP18“. Das „Methylosome protein 50“ wurde sogar bei drei rFab-Fragmenten identifiziert. Zudem konnte bei der Positivkontrolle α -MOG-Fab das Antigen MOG präzipitiert und identifiziert werden. MOG zählt zu den seltenen Membranproteinen im Gehirn und dies bestätigt die Sensitivität des Proteomics-Ansatzes.

4.2.2.5 Vergleich der Ergebnisse aus der Antigen suche

Beim Vergleich der Ergebnisse aus den drei verschiedenen Methoden, Proteinarray (s. Tab. 3.7 und Tab. 3.8), 2D-Westernblot-Analyse (s. Tab. 3.9) und IP-Orbitrap-Analyse (s. Tab. 3.10), zeigt sich keine Überschneidung der gefundenen Kandidatenantigene für die fünf OKB-

basierten rFab-Fragmente. Ein Grund dafür könnte sein, dass mit humanen Proteinarrays und IP-Experimenten von humanem Hirnlysät unter nativen Bedingungen nur Proteinantigene mit einer nativen Konformation detektiert werden. Mit der 2D-Westernblot-Analyse können hingegen nur denaturierte Antigene identifiziert werden. Außerdem könnte das veränderte Glykosylierungsmuster der Array-Proteine aus der Baculovirus-Insektenzell-Expression im Gegensatz zur humanen Glykosylierung der Hirnlysät-Proteine eine Rolle bei der Erkennung durch die rFab-Fragmente spielen. Des Weiteren sind einige der Proteine, die bei der IP mit Hirnlysät unter nativen Bedingungen gefunden wurden, nicht auf dem Proteinarray enthalten, und können daher bei der Proteinarray-Analyse nicht identifiziert werden. Wie bereits erwähnt, sind auf dem Proteinarray wiederum einzelne Proteine für eine Analyse angereichert, die in Gewebelysaten, wie sie für die 2D-Westernblot-Analyse und IP-Experimente eingesetzt wurden, nicht detektiert werden können, da diese Methoden nicht sensitiv genug sind. Aus den genannten Gründen scheint es plausibel, dass keine Schnittmenge zwischen den identifizierten Kandidatenantigenen aus den verschiedenen Methoden detektiert werden konnte.

Zusammengefasst wurden die Daten aus den Proteinarrays und IP-Orbitrap-Experimenten als wahrscheinlicher als die Ergebnisse der 2D-Westernblot-Analyse eingestuft. Eine kurze Übersicht der Ergebnisse aus den Proteinarrays (s. Tab. 3.7 und Tab. 3.8) und den IP-Orbitrap-Experimenten (s. Tab. 3.10) ist in Tab. 4.1 dargestellt. Die Ergebnisse der 2D-Westernblot-Analyse wurden nicht in die Tabelle aufgenommen, da bis zu 61 verschiedene Proteine in jedem Gelspot identifiziert wurden (s. Tab. 3.9). Tab. 4.1 zeigt, dass als Kandidatenantigene für Fab2, Fab3, Fab4 und Fab5 mehrere verschiedene nukleäre Proteine identifiziert wurden, die an der RNA-Prozessierung oder der Transkriptionsregulation beteiligt sind. Dies ist besonders interessant, da solche intrazellulären Antigene häufig auch bei anderen Autoimmunerkrankungen gefunden werden (Racanelli et al., 2011). Dies könnte auf einen allgemein zugrundeliegenden Mechanismus für die Entstehung und Funktion von Autoantikörper bei diesen Erkrankungen hindeuten.

Tab. 4.1: Übersichtstabelle der Kandidatenantigene der OKB-basierten rFab-Fragmente.

Es sind einige Kandidatenantigene aus der Proteinarray- und der IP-Orbitrap-Analyse angegeben. Die Proteine besitzen alle eine native Konformation. Beim Proteinarray sind nur die Kandidaten angegeben, die mindestens eine 6-fache Anreicherung gegenüber den Kontrollen zeigten, wobei Kinasen ausgeschlossen wurden. Die Ergebnisse der 2D-Westernblot-Analyse sind hier nicht aufgenommen, da jeweils mehrere Proteine in jedem Spot identifiziert wurden. Die Angaben zur Funktion stammen aus der UniProt-Datenbank. NA bedeutet, dass keine Informationen zur Verfügung standen.

Fab	Kandidatenantigen	Funktion	Methode
Fab1	-	-	-
	Uncharacterized protein C16orf48	Proteinbindung	Proteinarray
	cDNA clone IMAGE:4903661	NA	Proteinarray
Fab2	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	RNA-Prozessierung	IP-Orbitrap
	Methylosome protein 50	Spleißosom-Aufbau	IP-Orbitrap
Fab3	HOXA1	Transkription, Transkriptionsregulation	Proteinarray

Fab4	HOXA1	Transkription, Transkriptionsregulation	Proteinarray
	Caprin-1	Differenzierung, RNA-Bindung, Regulation, Inhibitor der Proteinsynthese	Proteinarray
	NSP1	Dopamin Rezeptor Bindung	Proteinarray
	Homeobox protein MOX-1	DNA-Bindung	Proteinarray
	Chromatin target of PRMT1 protein	Transkription, Regulation	Proteinarray
	T-complex protein 10A homolog 2	Interaktion mit ZIPK/DAPK3	Proteinarray
	Methylosome protein 50	Spleißosom-Aufbau	IP-Orbitrap
Fab5	SF17A	RNA-Prozessierung, Spleißen, Regulation, Bindung der PKA	Proteinarray
	NSP1	Dopamin Rezeptor Bindung	Proteinarray
	Histone deacetylase complex subunit SAP18	Transkription, Transkriptionsregulation	IP-Orbitrap
	Methylosome protein 50	Spleißosom-Aufbau	IP-Orbitrap

4.2.3 Affinität und Avidität der OKB-basierten Fab-Fragmente

Es wurden nur wenige schwache Bindungen der rFab-Fragmente an Antigene detektiert. Dies wirft die Frage nach der Affinität und Avidität der von OKB-Antikörpern abstammenden rFab-Fragmente auf. Die Affinität beschreibt dabei die Bindungsstärke einer einzelnen Bindung zwischen zwei Partnern, während die Avidität zusätzlich noch die Anzahl an Bindungen insgesamt mit einbezieht, die den Komplex stabiler machen. Die Bindungsreaktion zwischen Antikörper und Antigen lässt sich durch ein chemisches Gleichgewicht aus Bindung und Dissoziation beschreiben. Eine hohe Affinität des Antikörpers verschiebt das Gleichgewicht in Richtung Bindung, das Gleiche gilt für eine hohe Avidität, da der Komplex aufgrund mehrerer Bindungen stabiler ist. Neben der Affinität und Avidität des Antikörpers ist auch die Konzentration bzw. die Oberflächendichte des Antigens für eine stabile Komplexbildung von Bedeutung. Die Affinität der verwendeten IgG OKB-Antikörper sollte aufgrund einer vermutlich abgelaufenen Affinitätsreifung mit zahlreichen SHM in den CDR-Regionen relativ hoch sein. Daher spielt wahrscheinlich eher die Avidität der monovalenten rFab-Fragmente eine begrenzte Rolle. Ganze IgG-Antikörper besitzen, im Gegensatz zu monovalenten rFab-Fragmenten, zwei Antigenbindungsstellen (s. Abb. 1.3) und damit eine höhere Avidität. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, Antigene mit mindestens einer der Bindungsstellen zu binden und daran gebunden zu bleiben, höher als für nur eine Bindungsstelle. Dies ist unter experimentellen Bedingungen besonders wichtig, da die Immunkomplexe erhalten bleiben müssen, um spezifische Signale detektieren zu können. Möglicherweise könnten die rFab-Fragmente daher für eine höhere Avidität vor den Experimenten oligomerisiert werden. Dies könnte durch Präkomplexbildung mit einem Sekundärantikörper oder durch die BirA-Erkennungssequenz an der H-Kette der rFab-Fragmente durch Biotinylierung und Oligomerisierung mit Streptavidin erfolgen. Zudem könnte man auch ganze IgG-Antikörper mit zwei Bindungsstellen aus den OKB-basierten rFab-Fragmenten herstellen. Die so hergestellten

Komplexe oder ganzen Antikörper könnten im Anschluss für die Antigensuche eingesetzt werden.

4.2.4 Entstehung der OKB und ihre Rolle in der Immunpathogenese

Bislang ist wenig über die Entstehung von Auto- und OKB-Antikörpern bei der MS bekannt. Es gibt mehrere Theorien über die Rolle von viralen oder bakteriellen Infektionen (Gilden, 2005) und die damit verbundene mögliche molekulare Mimikry (Wekerle und Hohlfeld, 2003). So treten OKB ebenfalls bei einigen anderen, von Pathogenen ausgelösten inflammatorischen Prozessen des ZNS, wie der Neuroborreliose (Hansen et al., 1990), auf. Aber auch bei einigen weiteren Autoimmunerkrankungen, wie dem SLE (Ernerudh et al., 1985), der Neuromyelitis optica (NMO) (Bergamaschi et al., 2004) oder dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) (Krüger et al., 1981), können Antikörperbanden im Liquor von einigen Patienten nachgewiesen werden. Bei der molekularen Mimikry wird vermutet, dass zunächst eine normale Immunreaktion gegen ein bestimmtes Pathogen abläuft. Erst später kommt es durch Kreuzreaktivität der Lymphozyten oder der gebildeten Antikörper gegenüber körpereigenen Strukturen zum Verlust der Selbsttoleranz und zur Autoimmunität. Bei mehreren Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel dem Diabetes mellitus Typ I, der RA, dem SLE oder der Psoriasis, wird bereits ein Zusammenhang mit bestimmten Infektionen vermutet (Samarkos und Vaiopoulos, 2005). Für das GBS, einer akuten, monophasischen peripheren Nervenentzündung, ist dies mittlerweile eindeutig gezeigt worden (Yuki, 2000; Ang et al., 2004). Viele Patienten haben vor Krankheitsbeginn eine Infektion mit dem Bakterium *Campylobacter jejuni* (Hughes et al., 1999). Während dieser Infektion werden Antikörper gegen dessen Lipooligosaccharid gebildet. Diese Antikörper greifen später das Myelin der peripheren Nerven an, da das bakterielle Epitop einem Lipid des Myelins ähnelt.

Eine Rolle der OKB-Antikörper bei der Immunpathogenese der MS konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es ist daher unklar, ob die Antikörper an der initialen Schädigung von Nerven- und Gliazellen beteiligt und somit pathogen sind, oder vielleicht erst sekundär entstehen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Reaktivität der OKB-basierten rFab-Fragmente gegen spezifische neuronale Myelinantigene im Gehirn, wie sie bereits mehrfach für T-Zellen und Antikörper bei der MS gezeigt wurde (Johnson et al., 1986; Sun et al., 1991; Kerlero de Rosbo et al., 1993; Genain et al., 1999; O'Connor et al., 2005; Lalive et al., 2006; Zhou et al., 2006; Beltrán et al., 2012), nachgewiesen werden. Der Nachweis einer direkten Reaktivität gegen solche Bestandteile würde auf eine pathogene Rolle der OKB-Antikörper bei der Demyelinisierung und Axondegeneration bei der MS hindeuten.

Die OKB-Antikörper könnten daher ebenso Aufgaben beim Abtransport von Zell- und Myelindebris, der während der MS-Pathogenese anfällt, erfüllen, indem sie diese Bestandteile

opsonisieren und so die Phagozytose durch Makrophagen erleichtern (Brück et al., 1995; Vargas und Barres, 2007). Für das periphere Nervensystem wurde solch eine Funktion für Antikörper bereits beschrieben (Vargas et al., 2010). Bei einer Schädigung von Zellen durch verschiedene entzündliche und pathogene Mechanismen, wie sie bei der MS im ZNS ablaufen, werden immer auch intrazelluläre Bestandteile freigesetzt. Dadurch wären intrazelluläre Antigene für eine humorale Immunreaktion und Antikörper zugänglich. Dieser intrazelluläre Debris muss im Anschluss ebenfalls von Makrophagen beseitigt werden und daran könnten die gebildeten Antikörper beteiligt sein. Bei diversen anderen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise dem SLE und der Myositis, sind neben der MS bereits solche Autoantikörper gegen intrazelluläre Bestandteile beschrieben worden (Racanelli et al., 2011).

Die OKB-Antikörper gehören meist dem affinitätsgereiften und Komplement-aktivierenden IgG1-Subtyp an und persistieren über Jahre. Diese Eigenschaften deutet auf eine Antigen-induzierte Immunantwort hin. Wären die Antikörper allerdings tatsächlich an einer aktiven Schädigung der Axone und Demyelinisierung im ZNS beteiligt, so würde es wahrscheinlich nicht zu einem schubförmig-remittierenden, sondern eher zu einem akuten oder gar fulminanten Verlauf kommen. Die Hypothese, dass B-Zellen erst nach bereits eingetretener Schädigung ins ZNS rekrutiert werden, um dort Makrophagen beim Abtransport von Zelltrümmern zu helfen, würde die ständige anhaltende Antikörperproduktion über Jahre erklären, da die B-Zellen bei jedem Schub wieder ihren Antigenen ausgesetzt wären. Überschüssige Antikörper würden dabei durch die Zirkulation in den Liquor ausgeschwemmt werden und wären so als OKB nachweisbar.

4.2.5 Ausblick

4.2.5.1 Kurzfristige Ziele

Neben Experimenten, die darauf zielen weitere Antigene der fünf OKB-basierten rFab-Fragmente zu finden, sollten die bis jetzt gefundenen Kandidatenantigene zunächst mit weiteren unabhängigen Methoden, zum Beispiel mit IP-Experimenten, Westernblot-Analysen, ELISAs, Immunfluoreszenzfärbungen oder FACS-Analysen, verifiziert werden. Die potentiellen Antigene könnten dazu kommerziell erworben oder selbst exprimiert und gereinigt werden. Die gereinigten Proteine könnten im Anschluss in Experimente eingesetzt werden, die die Antikörper-Antigenbindung näher charakterisieren.

Zunächst sollten die Daten der Proteinarrays, vor allem die Kandidatenantigene SF17A, NSP1 und HOXA1, verifiziert werden. Eine Validierung mit Proteinen, die eine native Konformation besitzen, ist von besonderer Bedeutung, da die Proteine des Proteinarrays laut Hersteller nativ gefaltet sind, und die Proteine daher wahrscheinlich im denaturierten Zustand nicht von den rFab-Fragmenten erkannt werden. Daher ist es erforderlich, die Proteine zunächst in ei-

nem geeigneten Expressionssystem in ausreichenden Mengen nativ zu exprimieren und zu reinigen, oder nativ kommerziell zu erwerben. Im nächsten Schritt wäre es notwendig, mit den nativ gefalteten Proteinen beispielsweise IP-Experimente zur Verifizierung der Proteinarray-Daten durchzuführen. Da die Proteine des Proteinarrays im Baculovirus-Insektenzell-System exprimiert wurden und teilweise glykosyliert sind, ist es außerdem auch möglich, dass Glykosylierungen der Array-Proteine an der Bindung der rFab-Fragmente beteiligt sind.

Zudem ist es sinnvoll, interessante Kandidatenantigene aus der 2D-Westernblot-Analyse oder der IP-Orbitrap-Analyse auszuwählen und näher zu untersuchen. Dabei sind die Kandidatenantigene aus den IP-Experimenten, der „Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5“, der „Histone deacetylase complex subunit SAP18“ oder das „Methylosome protein 50“, den 2D-Westernblot-Ergebnissen zunächst vorzuziehen.

4.2.5.2 Längerfristige Ziele

Neben den in Abschnitt 4.2.5.1 erwähnten Zielen sollten langfristig auch noch weitere Antigene der rFab-Fragmente identifiziert werden. Dazu ist es sinnvoll, die rFab-Fragmente vor der Antigen suche zu oligomerisieren oder ganze Antikörper herstellen, um eine möglicherweise geringe Affinität durch eine höhere Avidität auszugleichen (s. Abschnitt 4.2.3) und so die Chancen für eine Bindung an Antigene zu erhöhen. Anschließend können weitere Experimente mit Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren oder Kohlehydraten durchgeführt werden, eventuell auch mit anderen Methoden oder unter optimierten Versuchsbedingungen.

Um neue Proteinantigene zu finden, könnten zum Beispiel Subfraktionen von verschiedenen Zell- oder Gewebelysaten, insbesondere Membran- oder Glykoproteinfraktionen (Mayer und Meinel, 2012) analysiert werden. Membranproteine sind als Antigene von besonderer Bedeutung, da sie durch ihre extrazellulären Domänen direkt für Autoantikörper zugänglich wären, und damit womöglich auch eine pathogene Relevanz hätten. Zusätzlich wäre es sinnvoll, niedrig exprimierte und seltene Proteine mit verschiedenen Methoden anzureichern und im Anschluss zu testen. Zudem könnten weitere Immunfluoreszenzfärbungen und FACS-Analysen von bestimmten Gewebe- oder Zelltypen neue Antigene aufzeigen.

Als weitere Stoffklasse sind auch Lipide näher zu untersuchen. Die Myelinschicht im ZNS besteht zu ca. 80 % aus Lipiden (Podbielska und Hogan, 2009), daher wären Lipide eine leicht zugängliche Zielstruktur für OKB- oder Autoantikörper in der MS (Ho et al., 2012). Es wäre unter anderem möglich, weitere Lipidklassen oder chemisch modifizierte Lipide zu untersuchen. Besonders oxidierte Lipide wären dabei interessant, da Antikörper gegen oxidierte Phospholipide schon im Liquor und Serum von MS-Patienten nachgewiesen werden konnten (Naidoo und Knapp, 1992; Qin et al., 2007) und auch im Gehirn von Patienten Lipidperoxidation stattfindet (Van Horssen et al., 2008).

Des Weiteren kommen Nukleinsäuren sowie deren Modifikationen als mögliche Antigene in Frage, da Autoantikörper gegen DNA und Kernproteine auch in anderen Autoimmunerkrankungen, wie dem SLE (Mok und Lau, 2003; Rahman und Isenberg, 2008), auftreten.

Vielversprechend wäre außerdem die Untersuchung von Biopsie- oder Autopsiematerial von MS-Patienten mit unterschiedlichen Methoden. Damit wäre es möglich, MS-spezifische Antigene zu detektieren. Solches Material ist allerdings sehr selten und meist nicht zugänglich.

Nach der Identifizierung einzelner Antigene wäre es weiterhin von Bedeutung, die molekularen Details und die Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung in weiteren Experimenten näher zu untersuchen und zu charakterisieren. Das genaue molekulare Epitop könnte zum Beispiel durch Mutagenesestudien der Antigene identifiziert werden. Experimente mit einzelnen Aminosäureaustauschen in den CDR-Regionen der Antikörper würden zudem aufzeigen, welche der insgesamt sechs CDR-Schleifen an der Antigenbindung beteiligt sind. Dazu könnten unter anderem Rückmutationen der SHM in den CDR1- und CDR2-Regionen zur Keimbahnsequenz in Betracht gezogen werden. Außerdem wäre es möglich, einzelne CDR-Regionen, wie beispielsweise die CDR3-Region, bei der durch die kombinatorische und junktionale Vielfalt bei der Generierung keine Rückmutation zur Keimbahnsequenz möglich ist, ganz auszutauschen oder die H- und L-Kette mit denen von anderen rFab-Fragmenten zu vertauschen. Wäre der Antikörper spezifisch für das Antigen, sollten die Mutationen oder Austausch zu einer geringeren Affinität führen. Die genauen Affinitäten zwischen Antikörper und Antigen könnten anschließend zum Beispiel durch Biacore-Messungen bestimmt werden. Zudem ist es erforderlich, mit weiterführenden Experimenten die Krankheitsrelevanz der identifizierten Antigene zu prüfen. Dazu könnte man untersuchen, ob auch in anderen MS-Patienten Reaktivitäten gegen diese Antigene auftreten.

Langfristig ist es außerdem notwendig, mit der etablierten Methode (Obermeier, 2011) weitere OKB-Antikörper von anderen MS-Patienten sowie deren Antigene zu identifizieren, um insgesamt eine höhere statistische Signifikanz und medizinische Relevanz gewährleisten zu können.

5 Anhang

5.1 Vektorkarten

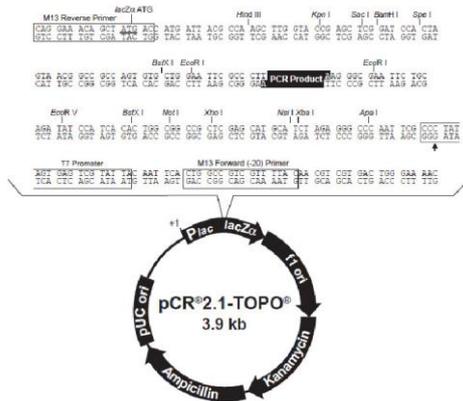


Abb. 5.1: Vektorkarte des pCR®2.1-TOPO®.

Die Abbildung stammt aus dem Handbuch „TOPO® TA Cloning®“ von Invitrogen und der Vektor wurde vor allem für Zwischenklonierungen eingesetzt. Abkürzungen: *Plac*: Promotor für das *lacZ*-Gen, *lacZα*: codierendes Gen für die β -Galactosidase (α -Fragment), *f1 ori*: Replikationsursprung des Phagen *f1*, Kanamycin- und Ampicillin-Resistenzgen, *pUC ori*: bakterieller Replikationsursprung (*E. coli*).

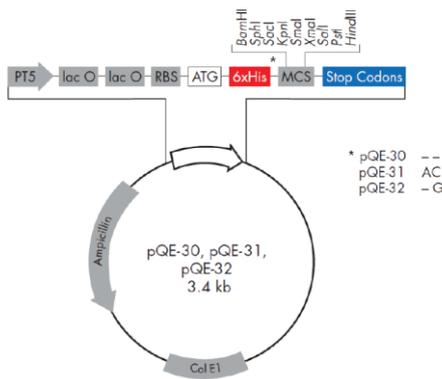


Abb. 5.2: Vektorkarte des pQE30.

Die Abbildung stammt aus dem Handbuch „The QIAexpressionist™“ von Qiagen. Dieser Vektor wurde für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* verwendet. Abkürzungen: PT5: T5 Promoter, *lac O*: Lac Operator, RBS: ribosomale Bindungsstelle, ATG: Startcodon, 6xHis: His₆-Peptid-Sequenz, MCS: multiple Klonierungsstelle mit Restriktionsschnittstellen, Stop Codons: Stopp Codon, Col E1: Col E1 Replikationsursprung, Ampicillin: Ampicillin-Resistenzgen, *lacIq*: *lacIq* Repressorgen.

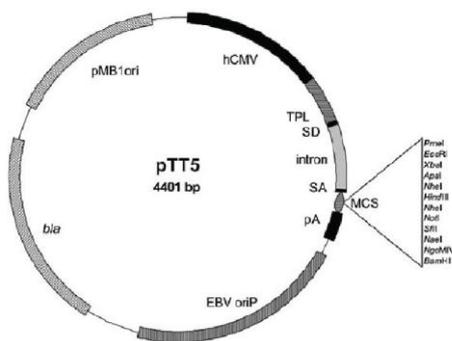


Abb. 5.3: Vektorkarte des pTT5.

Dieser Vektor wurde für die rekombinante Proteinexpression in HEK293E-Zellen verwendet. Abkürzungen: hCMV: Promotor des humanen Cytomegalovirus, TPL: *Tripartite leader*-Sequenz des Adenovirus, SD: Spleiß-Donor, SA: Spleiß-Akzeptor, MCS: multiple Klonierungsstelle, pA: Polyadenylierungsstelle des β -Globingens (Hase), EBV oriP: Replikationsursprung des Epstein-Barr-Virus, pMB1 ori: bakterieller Replikationsursprung (*E. coli*), *bla*: Gen codierend für β -Lactamase (Ampicillin-Resistenz) (Zhang et al., 2009b).

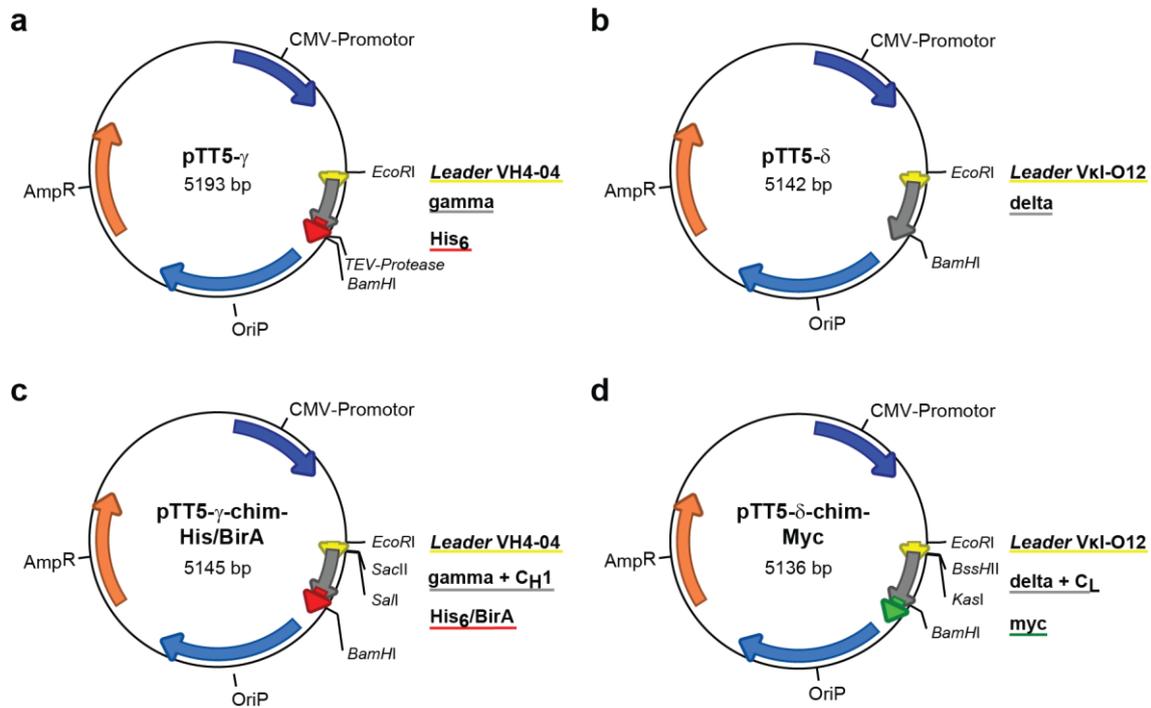


Abb. 5.4: pTT5-Konstrukte für die M88-Expression.

Für die Kassettenvektoren wurde der pTT5-Vektor verwendet (s. Abb. 5.3). Zusätzlich sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen angegeben. **(a)** Der Vektor pTT5- γ mit einer Größe von 5.193 bp. Er trägt die *Leader*-Sequenz VH4-04 (gelb) sowie die Sequenz für ein C-terminales His₆-Peptid (rot). **(b)** pTT5- δ mit einer Größe von 5.142 bp. Der Vektor trägt die *Leader*-Sequenz VκI-O12 (gelb). **(c)** pTT5- γ -chim-His/BirA mit einer Größe von 5.145 bp. Der Vektor trägt die *Leader*-Sequenz VH4-04 (gelb), die C_H1-Domäne des konstanten Teils der schweren IgG-Kette (grau) sowie die Sequenz für ein C-terminales His₆-Peptid und eine BirA-Erkennungssequenz (rot). **(d)** pTT5- δ -chim-Myc mit einer Größe von 5.136 bp. Der Vektor trägt die *Leader*-Sequenz VκI-O12 (gelb) und die C_L-Domäne der leichten IgG-Kette in voller Länge (grau) sowie ein C-terminales Myc-Peptid (grün). Zur Erstellung der Vektorkarten wurde das Programm „ApE-A Plasmid Editor Version 1.17“ verwendet. Verändert nach Obermeier, 2011.

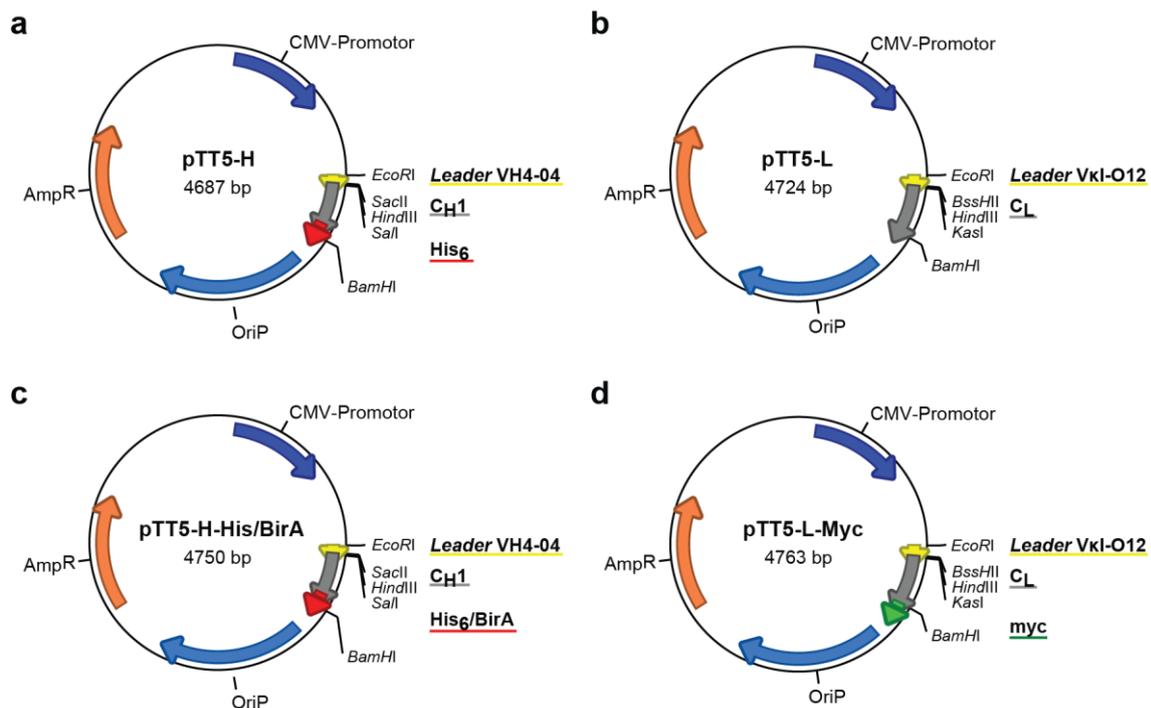


Abb. 5.5: pTT5-Konstrukte der Kassettenvektoren für die Fab-Expression.

Für die Kassettenvektoren wurde der pTT5-Vektor verwendet (s. Abb. 5.3). Zusätzlich sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen angegeben. **(a)** pTT5-H mit einer Größe von 4.687 bp. Der Kassettenvektor für die H-Kette trägt die *Leader*-Sequenz VH4-04 (gelb), die C_{H1}-Domäne des konstanten Teils (grau) sowie die Sequenz für ein C-terminales His₆-Peptid (rot). **(b)** pTT5-L mit einer Größe von 4.724 bp. Der Kassettenvektor für die L-Kette trägt die *Leader*-Sequenz Vkl-O12 (gelb) und die C_L-Domäne in voller Länge (grau). **(c)** und **(d)** Gleiche Vektorkonstrukte wie unter (a) und (b), nur dass in pTT5-H nach dem His₆-Peptid noch eine BirA-Erkennungssequenz und in pTT5-L C-terminal noch die Sequenz für ein Myc-Peptid eingefügt sind. Zur Erstellung der Vektorkarten wurde das Programm „ApE-A Plasmid Editor Version 1.17“ verwendet. Verändert nach Obermeier, 2011.

5.2 Sequenzen

5.2.1 $\gamma\delta$ -TZR V γ 1.3⁺V δ 2⁺ M88

DNA-Sequenz

γ -Kette

```
ATGCGGTGGGCCCTAGCGGTGCTTCTAGCTTTCTGTCTCTGCGAGTCAGAAATCTTCCAACCTTGAAGGGGAGAACGAAGTCAGTCACCAGGC
AGACTGGGTACATCTGCTGAAATCACTTGGCATCTTACTGTAACAAATACCTTCTACATCCACTGGTACCTACACCAGGAGGGGAAGGCCCCACA
CGCTCTTCTGTACTATGACGTCTCCACCAGGATGTGTTGGAATCAGGACTCAGTCCAGGAAAGTATATATACTACATACACCAGGAGGTGG
AGCTGGATATTGAGACTGCAAAATCTAATGAAAATGATTCGGAGTCTATTACTGTGCCACCTGGGACGGTTATTATTATAAGAACTCTTTG
GCAGTGGAAACAACACTTGTGTGCACAGATAAAACAACCTTGATGCAGACGTCTCCCCAAGCCCACTATTTTTCTTCTTCAATTGCTGAAACAAA
CTCCAGAAGGCTGGAACATACCTTTGTCTTCTTGAGAAAATTTTTCCCTGATGTTATTAAGATACATTGGCAAGAAAAGAAGAGCAACACGATT
CTGGGATCCCAGGAGGGGGAACACCATGAAGACTAACGACACATACATGAAATTTAGCTGGTTAACGGTGCCAGAAAAGTCACTGGACAAAAGAAC
ACAGATGTATCGTCAGACATGAGAATAATAAAAACGGAGTTGATCAAGAAATTTATCTTCTCCAATAAAGACAGATGTCATCACAATGGATCC
CAAAGACAATTTGTTCAAAAAGATGCAAAATGATACACTACTGCTGCAGCTCACAAAACCTCTGCATATTACATGTACCTCCTCTGCTCCTCAAG
AGTGTGGTCTATTTTGCATCATCACCTGCTGTCTGCTTAGAAGAACGGCTTCTGCTGCAATGGAGAGAAATCATAA
```

δ -Kette

```
ATGCAGAGGATCTCCTCCCTCATCCATCTCTCTCTTCTGCGGAGGAGTCATGTGAGCCATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAAACAGTGCCTG
TGCAATAGGGGTCCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGGAGAAGCGATCGGTAACACTACTATATCAACTGGTACAGGAAGACCCAAAGGTAA
CACAATCACTTTTATATACCGAGAAAAGGACATCTATGGCCTGGTTTCAAAGACAATTTCCAAGGTGACATTGATATTGCAAGAAGCCTGGCT
GTACTTAAGATACTTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTGTGCCTGTGACACTGTCTGGGTACCTCAAAGAGCTCCTGGGACA
CCGACAGATGTTTTTCCGAACTGGCATCAAACCTCTTCCGTGGAGCCCGAAGTCAAGCTCATACCAAACCATCCGTTTTTGTGATGAAAAATGG
AACAAATGTCGCTTGTCTGGTGAAGGAATTTACCCCAAGGATATAAGAATAAAATCTCGTGTCAATCCAAGAAAGATAACAGAGTTTGTATCCTGCT
ATTGTCATCTCTCCAGTGGGAAGTACAATGCTGTCAAGCTTGGTAAATATGAAGATTCAAATTCAGTGACATGTTTCAAGTCAACACGACAATA
AAACTGTGCACTCCACTGACTTTGAAAGTGAAGACAGATTCTACAGATCACGTAACAAAGGAAACTGAAAACACAAAGCAACCTTCAAAGAG
CTGCCATAAACCCAAAGCCATAGTTCATACCGAGAAGGTGAACATGATGTCCCTCACAGTGTCTGGGCTACGAATGCTGTTTCAAAGACTGTT
GCCGTCATTTTTCTTGGACTGCCAAGTTATTTTTCTTTGTAA
```

Proteinsequenz

γ -Kette

```
NLEGRTKSVTRQGTSSAEITCDLTVTNTFYIHWYLHQEGKAPQRLLYDVSSTARVDVLESLSPGKYTHTPRRWSWILRLQNLINDSGVYY
CAIWDGYYYKFLFGSGTTLVVTDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKLIHWQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYM
KFSWLTVPKSLDKHEHRCIVRHENKNGVDQEIIFPPIKTDVITMDPKDNC SKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLKSVVYFAIITCCLLR
RTAFCCNGEKS
```

δ -Kette

```
IELVPEHQTVPVSIGVPATLRCMKGAEIGNYYINWYRKTQGNITFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIAKNLAVLKILAPSERDEGSYYCA
CDTVWGTSKSSWDTRQMFGTGKLFVPEPRSQPHTKPSVFMKNGTINVACLVEKFPKDIRINLVSSKKITEFDPAAIVISPSGKYNAVKLKG
YEDSNSVTCVQHDNKTVHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSKHPKAIIVHTEKVNMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLTAKLFLF
```

5.2.2 sc-Fv-M88-TZR

DNA-Sequenz in pSecTag2Ahygro

```
ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCGGCCAGCCGCGCCAGCGCGCCGTACGAA
GCTTGATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAAACAGTGCCTGTGTCATAGGGGTCCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGGAGAAGCGATCGG
TAACTACTATATCAACTGGTACAGGAAGACCCAAAGGTAACACAATCACTTTTATATACCGAGAAAAGGACATCTATGGCCCTGGTTTCAAAGAC
AATTTCCAAGGTGACATTGATATTGCAAAGAACCTGGCTGTACTTAAGATACTTGACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTGTGCT
GTGACACTGTCTGGGTACCTCAAAGAGCTCCTGGGACACCCGACAGATGTTTTTCCGAACTGGCATCAAACCTTCTCGTGGAGCCCGAAGTGG
GTCATCGTCTCTGGTGTGACGGATCATCGTCTGGATCCAACCTTGAAGGGGAGAACGAAGTCAGTCACCAGGCAGACTGGGTCACTGCTGAA
ATCACTTGGCATCTTACTGTAACAAATACCTTCTACATCCACTGGTACCTACACCAGGAGGGGAAGGCCCCACAGCGTCTTCTGTACTATGACG
```

TCGCCACCGCAAGGGATGTGTTGGAATCAGGACTCAGTCCAGGAAAGTATTATACTCATACCCAGGAGGTGGAGCTGGATATTGAGACTGCA
AAATCTAATTGAAAATGATTCGGAGTCTATTACTGTGCCACCTGGGACGGTTATTATTATAAGAACTCTTTGGCAGTGGAACAACACTTGT
GTCACAGATAAAACAACCTTGATGCAGAGTCTCCCCAAGCCCACTATTTTCTCCTTCAATTGCTGAAACAACCTCGAGGAGGGCCCGAACAA
AACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA

Die grau markierten Sequenzen stammen aus dem Vektor und die unterstrichene Sequenz ist der *Linker*.

Proteinsequenz in pSecTag2Ahygro

d a a q p a r a a v r s l IELVPEHQTPVPSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYRKTQGNITTFIYREKDIYGPFGKDNFQGDID
IAKNLAVLKI LAPSERDEGSYYCADCVTWGTSKSSWDTRQMFPGTGIKLFVEPRSGSSSSGVDGSSSSGNLEGRTKSVTRQTGSSAEITCDLTV
TNTFYIHWYLHQEGKAPQRLLYYDVSTARDVLESGLSPGKYTYHTPRRWSWILRLQNLIENTDSGVYYCATWDGYYKLFVSGTTLVVTDKQLD
ADVSPKPTIFLPSIAET r g g p e e k l i s e e d l n s a v d h h h h h h

Die Kleinbuchstaben vorne sind das Signalpeptid und die Kleinbuchstaben hinten das Myc- und His₆-Peptid.

DNA-Sequenz in pET33b(+)

ATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAACAGTGCCTGTGTCAATAGGGGTCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGGAGAAGCGATCGGTAAC
ACTATAACAACCTGGTACAGGAAGACCAAGGTAACACAATCACTTTTCATATACCGAGAAAAGGACATCTATGGCCCTGGTTTCAAAGACAATTT
CCAAGGTGACATTGATATTGCAAAGAACCTGGCTGTACTTAAGATACTTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTGTGCCTGTGAC
ACTGTCTGGGGTACCTCAAAGAGTCTCGGGACACCCGACAGATGTTTTTCGGAACCTGGCATCAAACCTCTCGTGGAGCCCGAAGTGGGT
CGTCTCTGGTGTGACGGATCATCGTCTGGATCCAACCTTGGAAAGGAGAACGAAGTCACTCACCAGGCAGACTGGGTCTCTGCTGAAATCAC
TTGCGATCTTACTGTAAACAAATACCTTCTACATCCACTGTTACTACACAGGAGGGGAAGGCCCCACAGCGTCTTCTGTACTATGACGTCTCC
ACCGCAAGGGATGTGTTGGAATCAGGACTCAGTCCAGGAAAGTATTATACTCATACCCAGGAGGTGGAGCTGGATATTGAGACTGCAAAATC
TAATTGAAAATGATTCGGAGTCTATTACTGTGCCACCTGGGACGGTTATTATTATAAGAACTCTTTGGCAGTGGAACAACACTTGTGTGCAC
AGATAAAACAACCTTGATGCAGACGTCTCCCCAAGCCCACTATTTTCTTCTTCAATTGCTGAAACAA

Proteinsequenz in pET33b(+)

IELVPEHQTPVPSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYRKTQGNITTFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIAKNLAVLKI LAPSERDEGSYYCADC
VTWGTSKSSWDTRQMFPGTGIKLFVEPRSGSSSSGVDGSSSSGNLEGRTKSVTRQTGSSAEITCDLTVTNTFYIHWYLHQEGKAPQRLLYYDV
STARDVLESGLSPGKYTYHTPRRWSWILRLQNLIENTDSGVYYCATWDGYYKLFVSGTTLVVTDKQLDADVSPKPTIFLPSIAET

Die unterstrichene Sequenz ist der *Linker*.

5.2.3 M88 (HEK293E-Expression)

DNA-Sequenz

γ-Kette

ATGAAGCACCTGTGGTCTTCTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCGCGGTGGGTCCTGTCCAACCTTGAAGGGAGAACGAAGTCACTCACCAGGCAGA
CTGGGTCTCTGCTGAAATCACTTGCATCTTACTGTAAACAATACCTTCTACATCCACTGGTACCTACACCAGGAGGGGAAGGCCCCACAGCG
TCTTCTGTACTATGACGTCTCCACCGCAAGGGATGTGTTGGAATCAGGACTCAGTCCAGGAAAGTATTATACTCATACCCAGGAGGTGGAGC
TGGATATTGAGACTGCAAAATCTAATTGAAAATGATTCGGAGTCTATTACTGTGCCACCTGGGACGGTTATTATTATAAGAACTCTTTGGCA
GTGGAACAACACTTGTGTGCAGATAAAACAACCTTGATGCAGACGTCTCCCCAAGCCCACTATTTTCTTCTTCAATTGCTGAAACAAGCT
CCAGAAGGCTGGAACATACCTTGTCTTCTTGAGAAATTTTTCCCTGATGTTATTAAGATACATTTGGCAAGAAAAGAAGAGCAACACGATTCTG
GGGTCCCAGGAGGGGAACACCATGAAGACTAACGACACATACATGAAATTTAGCTGGTTAACCGTGCCAGAAAAGTCACTGGACAAAAGAACACA
GATGTATCGTCAGACATGAGAAATAATAAAAACGGAGTTGATCAAGAAATTTATCTTCTTCCAATAAAGACAGATGTCATCACAATGGACCCCAA
AGACAATTGTTCAAAGATGCAAAATGATACACTACTGCTGCAGGGGTGAGGGGAGAATCTTTATTTTTTCAGGGTGGGCACCATCACCATCACCAT
TAA

δ-Kette

ATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGCGCGCATGTATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAAAACAG
TGCCTGTGCTCAATAGGGGTCCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGGAGAAGCGATCGGTAACACTACTATATCAACTGGTACAGGAAGACCCA
AGGTAACACAACACTTTTCATATACCGAGAAAAGGACATCTATGGCCCTGGTTTCAAAGACAATTTCAAAGGTGACATTGATATTGCAAAGAAC
CTGGCTGTACTTAAGATACTTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTGTGCTGTGACACTGTCTGGGGTACCTCAAAGAGCTCCT
GGGACACCCGACAGATGTTTTTCGGAACCTGGCATCAAACCTCTCGTGGAGCCCGAAGTCAAGCTCATACCAAACCATCCGTTTTTGTGATGAA
AAATGGAACAATGTGCTGTGCTGGTGAAGGAGTTTACCCCAAGGATATAAGAATAAATCTCGTGTGATCCAAGAAGATAACAGAGTTTGTGAT
CCTGTATTGTGCTACTCTCCAGTGGGAAGTACAATGCTGTCAAGCTTGGTAAATATGAAGATTCAAATTCAGTGACATGTTTCAAGTCAACACG
ACAATAAAACTGTGCACTCCACTGACTTTGAAGTGAAGACAGATTTACAGATCACGTAACCAAGGAAACTGAAAACACAAAGCAACCTTC
AAAGAGCTGCCATAAACCCAAAGCCATAGTTCATACCGAGAAGTAA

Proteinsequenz

γ-Kette

MKHLWFLLLVAAAPRWVLSNLEGRTKSVTRQTGSSAEITCDLTVTNTFYIHWYLHQEGKAPQRLLYYDVSTARDVLESGLSPGKYTYHTPRRWS
WILRLQNLIENTDSGVYYCATWDGYYKLFVSGTTLVVTDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKIQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIHWQEKKSNTIL
GSQEGNTMKTNDTYMKFWSLTVPEKSLDKHEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFPPKTDVITMDPKDNCSDANDTLLQLQSGENLYFQGGHHHHHH

δ-Kette

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCIELVPEHQTVPVSIGVPATLRCMSKGEAIGNYYINWYRKTQGNITTFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIAKN
LAVLKILAPSERDEGSYYCACDTVWGTSSWDTRQMFPGTGIKLFVEPRSQPHTKPSVFMKNGTNVACLKVEFYPKDIRINLVSSKKITFEFD
PAIVISPSGKYNAVKLGKYEYEDNSVTCVQHDNKTVHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSKCHKPKAIVHTEK

Die grau markierten Sequenzen sind die *Leader* VH4-04 (γ -Kette) bzw. V κ I-O12 (δ -Kette).

5.2.4 Chimäres M88-Konstrukt (HEK293E-Expression)**DNA-Sequenz** **γ -Kette**

ATGAAGCACCTGTGGTTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCGCGGTGGGTCTGTCCAACCTGGAAGGGAGAACAAGTCAGTCaCCAGGCAGA
CTGGGTCACTCTGCTGAAATCACTTGCATCTTACTGTAACAAATACCTTCTACATCCACTGGTACCTACACCAGGAGGGGAAGGCCCCACAGCG
TCTTCTGTACTATGACGTCTCCACCGCAAGGGATGTGTTGGAATCAGGACTCAGTCCAGGAAAGTATTATACTCATACACCAGGAGGTGGAGC
TGATATTGAGACTGCAAAATCTAATTGAAAATGATTCGGAGTCTATTACTGTGCCACCTGGGACGGTTATTATATAAGAAACTCTTTGGCA
GTGGAACAACACTTGTGTGCACAGATAAAACAAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTTGGCACCCCTCTCCAAGTCGACCTCTGGGGGCACAGCGGC
CCTGGGCTGCTTGAAGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCCGGCT
GTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC
ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTTGACAAAACCTACCATCACCATCACCATCTCGAGCGAGCTCCCGG
GGCCTGAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATCGAATGGCACGAATAA

δ-Kette

ATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGCGCGCATGTGATATTTGGTGCCTGAACACCAACAG
TGCTGTGCAATAGGGTCCCTGCCACCTCAGGTGCTCCATGAAAGGAGAAGCGATCGGTAACACTACTATCACTGGTACAGGAAGACCCA
AGGTAACACAATCACTTTCATATACCGAGAAAAGGACATCTATGGCCCTGGTTTCAAAGACAATTTCCAAGGTGACATTGATATTGCAAGAAC
CTGGCTGTACTTAAGATACTTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTGTGCCTGTGACACTGTCTGGGGTACCTCAAAGAGCTCCT
GGGACACCCGACAGATGTTTTTCGGAACCTGGCATCAAACCTTCTGTTGGAGCCCCGAAGTCAGCCGGCGCCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATC
TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAAC
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAG
CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGC
CGAGGAACAAAACATCTCAGAAAGAGGATCTGCTGTGA

Proteinsequenz **γ -Kette**

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSNLEGRKTSVTRQGTGSSAEITCDLTVNTFYIHWYHQEGKAPQRLLYYDVSTARDVLESGLSPGKYYTHTPRRWS
WILRLQNLLENDGVVYCATWDGYYYKLFVSGTTLVVTDKQKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVGHVTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKTKVDKVEPKSCDKTHHHHHHLERAPGGLNDIFEAQKIEWHE

δ-Kette

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCIDLPEHQTVPVSIGVPATLRCMSKGEAIGNYYINWYRKTQGNITTFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIAKN
LAVLKILAPSERDEGSYYCACDTVWGTSSWDTRQMFPGTGIKLFVEPRSQPAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECAEQKLISEEDLL

Die grau markierten Sequenzen sind die *Leader* VH4-04 (γ -Kette) bzw. V κ I-O12 (δ -Kette) und die unterstrichenen Sequenzen sind die konstanten IgG-Regionen C_{H1} (γ -Kette) bzw. C_L (δ -Kette).

5.2.5 EcIF1wt, EcIF1-Mutanten, eIF1AY und mi-MOG**DNA Sequenzen**

Name	Sequenz
EcIF1wt	ATGGCCAAAGAAGACAATATTGAAATGCAAGGTACCGTTCCTTGAACGTTGCCTAATACCATGTTCCGCGTAGAGTT AGAAAACGGTCACTGGTACTGCACACATCTCCGGTAAAATGCGCAAAAACCTACATCCGCATCTGACGGGCGACA AAGTGACTGTTGAACTGACCCCGTACGACCTGAGCAAAGGCCGATTGTCTTCCGTAGTCGCTGA
EcIF1-V31M	ATGGCCAAAGAAGACAATATTGAAATGCAAGGTACCGTTCCTTGAACGTTGCCTAATACCATGTTCCGCGTAGAGCT AGAAAACGGTCACTGGTACTGCACACATCTCCGGTAAAATGCGCAAAAACCTACATCCGCATCTGACGGGCGACA AAGTGACTGTTGAACTGACCCCGTACGACCTGAGCAAAGGCCGATTGTCTTCCGTAGTCGCTGA
EcIF1-H30A	ATGGCCAAAGAAGACAATATTGAAATGCAAGGTACCGTTCCTTGAACGTTGCCTAATACCATGTTCCGCGTAGAGCT CGAGAACGGTGCCTGGTACTGCACACATCTCCGGTAAAATGCGCAAAAACCTACATCCGCATCTGACGGGCGACA AAGTGACTGTTGAACTGACCCCGTACGACCTGAGCAAAGGCCGATTGTCTTCCGTAGTCGCTGA
EcIF1-H35A	ATGGCCAAAGAAGACAATATTGAAATGCAAGGTACCGTTCCTTGAACGTTGCCTAATACCATGTTCCGCGTAGAGTT AGAAAACGGTCACTGGTACTGCACACATCTCCGGTAAAATGCGCAAAAACCTACATCCGCATCTGACGGGCGACA AAGTGACTGTTGAACTGACCCCGTACGACCTGAGCAAAGGCCGATTGTCTTCCGTAGTCGCTGA
EcIF1-Y44F	ATGGCCAAAGAAGACAATATTGAAATGCAAGGTACCGTTCCTTGAACGTTGCCTAATACCATGTTCCGCGTAGAGTT

	RIVFRSR
EcIF1-K39A	MRGSHHHHHHGSMAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG AM RKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKG RIVFRSR
EcIF1-K39Q	MRGSHHHHHHGSMAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG QM RKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKG RIVFRSR
EcIF1-M40A	MRGSHHHHHHGSMAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG KA RKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKG RIVFRSR
EcIF1-M40L	MRGSHHHHHHGSMAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG KL RKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKG RIVFRSR
EcIF1-M40P	MRGSHHHHHHGSMAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG KP RKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKG RIVFRSR
EcIF1-R41A	MRGSHHHHHHGSMAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG KA RKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKG RIVFRSR
EcIF1-R41Q	MRGSHHHHHHGSMAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG KM QKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKG RIVFRSR
EcIF1-R41K	MRGSHHHHHHGSMAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG KM KKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKG RIVFRSR
EcIF1-M40A/R41A	MRGSHHHHHHGSMAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG KA RKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKG RIVFRSR
EcIF1-K42A	MRGSHHHHHHGSMAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG KM RAKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKG RIVFRSR
EcIF1-K42Q	MRGSHHHHHHGSMAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG KM RQKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKG RIVFRSR
EcIF1-N43A	MRGSHHHHHHGSMAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG KM RAKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKG RIVFRSR
eIF1AY	MRGSHHHHHHGS P KNKGGKGNRRRGKNENESEKRELVEFKEDGQEYAVQVIKMLGNRLEA L CFDGVKRLCHIRGKLR KRVWINTSDIILVGLRDYQDNKADVILKYNADARSLSKAYGELPEHAKINETDTFGPGDDDEIQFDDIGDDEDIDDI
mi-MOG	MRGSGQFRVIGPGHPIRALVGDAAELPCRISPGKNATGMEVGVYRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTELLK ESIGEGKVALRIQNVRFSEGGYTCFFRDHSYQEEAAVELKVEDPFYWINPGRSRSHHHHHH
22,6 kDa Dephospho- CoA-Kinase	MRYIVALTGGIGSGKSTVANAFADLGINVIDADIARQVVEPGAPALHAIADHFGANMIADGTLQRRALRERIFAN PEEKNWLNALLHPLIQQETQHQQATSPYVLVWVPLLVENSLEYKKNRVLVVDVSPETQLKRTMQRDDVTRHEVQ ILAAQATREARLAVADDVIDNNGAPDAITASEVARLHAHYLQLASQFVSQEKPRSHHHHHH

Die grau markierten Sequenzen stammen von dem Expressionsvektor pQE30 und die Aminosäureaustausche sind fett gedruckt.

5.2.6 Weitere Proteinsequenzen der M88-Antigensuche

Name	Sequenz
EcD-RS (<i>E. coli</i> Aspartyl- tRNA-Synthetase 65,9 kDa)	MRTEYCGQLRLSHVGGQVTLGCVNRRRDLGSLIFIDMRDREGIVQVFFDPRADALKLASELRNEFCIQVTGT VRARDEKINIRDMATGEIEVLASSLTIINRADVPLDSNHVNTTEEARLKYRYLDLRRPEMAQRLKTRAKITSLV RRFMDHGFLDIETPMLTKATPEGARDYLVP SRVHKGFYALPQSPQLFKQLLMMSGFDRIYQIVKCFRDEDLR ADRQPEFTQIDVETSFMTAPQVREVMALVRHLWLEVKGVLDGDFPVMTFEAEARRYGSDKPDLRNPMELTDVA DLLKSVEFAVFAGPANDPKGRVAALRVPGGASLTKQIDEYGNFVKIYGAKGLAYIKVNERAKGLEGINSPVAK FLNAEIIEDILDRATAAQDGMIFFGADNKKIVADAMGALRLKVGKDLGLTDESKWAPLWIDFPMFEDDGGGL TAMHHPFTSPKDMTAAELKAAENAVANAYDMVINGYEVGGGVSRIHNGDMQQTVFGILGINEEEREKFGFL DALKYGTPPHAGLAFGLDRLTMLLTGTDNIRDVIAFPKTTAAACLMTPEAPSFANPTALAELSIQVVKKAENN
EcN-RS (<i>E. coli</i> Asparaginyl- tRNA-Synthetase) 52,6 kDa)	MSVVPVADVLRQAVDSEVTVRGWRTRRDSKAGISFLAVYDGSFCFDPVQAVINNSLPNYNEDVLRLLTGCVS IVTGKVVASPGGGQFEIQASKVEVAGWVEDPDTYMAAKRHSIEYLREVAHLRPRNTLIGAVARVRHTLAQAL HRFFNEQGGFWVSTPLITASDTEGAGEMFRVSTLDLENLPRNDQGVDFDKDFGKESFLTVSGQLNGETYACA LSKIYTFGPTFRAENSNTSRHLAEFWMLEPEVAFANLNDIAGLAEAMLKYVFKAVLEERADDKFFAERVDKDA VSRLERFIEADFAQVDYTDVAVTILENCRGFENPVYGVVLDLSEHERYLAEEHFAPVVVKNYPKDIKAFYML NEDGKTVAAMDVLAPGIGELIGGSQREERLDVLDERMLEMGLNKEDYWWYRDLRRYGTVPHSGFGLGFERLIAY VTGVQNVDRVIFPRTPRNASF
EcK-RS (<i>E. coli</i> Lysyl- tRNA-Synthetase) 57,6 kDa)	MSEQHAQGADAVVDLNNELKTRREKLANLREQGIAFPNDFRRDHTSDQLHAEFDGKENELEALNIEVAVAGRM MTRRIMGKASFVTLQDVGGRIQLYVARDDLPEGVYNEQFKKWDLDGLDILGAKGKLFKTKTGELSICHTELRLTK ALRPLPDKFHGLDQEQEARYRQRYLDLISNDESRTFKVRSQILSGIRQFMVNRGFMEVETPMQVIPPAAAAAP FITHHNALDLDMYLRIAPELYLKRLLVGGFERVFEINRNFNEGISVRHNPEFTMMELYMAYADYKDLIELTES LFRTLAQDILGKTEVTYGDVTLDFGKPFELKTMREAIKKYRPETDMADLNDNFSAKAIASISIGIHVKESWGLGR IVTEIFEEVAEHLIQPTFFITEYPAEVSPLARRNDVNPEITDRFEFFIGGREIGNGFSELNDAEDQAQRFLDQV AAKDAGDDEAMFYDEDYVTALEHGLPPTAGLIGIGIDRMVMLFTNSHTIRDVILFPAMPKPVK
EcIF1 (<i>E. coli</i> Translation initiation factor IF-1) 8,3 kDa)	MAKEDNIEMQGTVLETLPNTMFRVELENGHVVTAHISG KM RKNYIRILTGDKVTVELTPYDLSKGRIVFRSR
hPCNA (humanes)	MFEARLVQGSILKKVLEALKDLINACWDISSSGVNLQSMDSHVSQVLTSLRSEGFDTYRCDRNLAMGVNLT MSKILKCAAGNEDIITLRAEDNADTLALVFAPNQEKVSDYEMKLMDLVEQLGIPQEQYSCVVKMPSGEFARIC RDLSHIGDAVVISCAKDGKVFASAGELGNGNIKLSQTSNVDKEEAETIEMNEPVQLTFALRYLNFFTKATPLS

Proliferating cell nuclear antigen) 28.8 kDa	STVTLMSADVPLVVEYKIADMGLKYLAPKIEDEEGS
hH-RS (humane Histidyl-tRNA-Synthetase) 57,4 kDa	MAERAALEELVKLQGERVRLKQKASAELEIEEVAKLLKKAQLGPDSESKQKFLVTKPKGTRDYSPRQMAVRE KVFDVIRCFKRHGAEVLDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKQDGGELLSRLYDLTVPFARYLAMNKLNTNIK RYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFA ICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQHQGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQAL EGLGDLKLLFEYLLTFLGIDDKISFDLSLARGLDYDTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGVSVAAGGRYDGLVGMF DPKGRKVPVGLSIGVERIFSVIVEQLEALEEKIRTTETQVVLVSAQKLEERLKLSELWDAGIKABELLYKK NPKLLNLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKLDGVIKLRSVTSREEVDVREDLVEEIKRRTQGPLCIC
hA-RS (humane Alanyl-tRNA-Synthetase) 106,8 kDa	MDSTLTASEIRQRFIDDFPKRNEHTYVHSSATILPDDPTLLFANAGMNQFKPIFLNTIDPSHPMAKLSRAANTQK CIRAGGKHNDLDDVVGKDYVHHTFFEMLGWSWFGDYFKELACKMALELLTQEFPIERLYVTVYFGGDEAAGLEA DLECKQIWNQLGLDDTKILPGNMKDNFEMMGDTGFCGCPSEIHYDRIGGRDAAHLVNDQDPNVLEIWNLVFIQY NREADGILKPLPKSIDTGMGLERLVSLQNKMSNYDITLDFVPYFEAIQKGTGARPYTKGVGAEDADGIDMAYR VLADHARTITVALADGGRPDNTGRGYVLRRLRRAVRYAHEKLNASRGFFATLVDVVVQSLGDAPFELKKDPDM VKDIINEEVEVQFLKTLRGRRIIDRKIQSLGDSKTI PGDTAWLLYDITYGFPVDLTGLIAEEKGLVVDMDGFEFEE RKLALQKLSQKGGAGGEDLIMLDIYAIEELRARGLEVTDDSPKYNHLDSSGSYVFENTVATVMALRREKMFVEE VSTGQECGVVLDKTCFYAEQGGQIYDEGYLVKVDSSSEDKTEFTVKNAQVRGGYVLHIGTIYGLDKVGDQVWLF IDEPRRRPIMSNHTATHILNFALRSVLGEADQKGSVAPDRLRFDTAKGAMSTQKIKKAEIEANEMIEAAKAV YTQDCPLAAAKAIQGLRAVDFETYPDPVVRVSI GVPVSELLDDPSGPGAGSLTSVFEFCGGTHLRNSSHAGAFVIV TEEAIAKGIIRRI VAVTGAEAQKALRKAESLKKCLSVMEAKVKAQTAPNKDVQREIADLGEALATAVIPOWQKDE LRETLKSLKVMDDLDRASKADVQRVLEKTKQFIDSNPNQPLVILEMESGASAKALNEALKLFKMHSPQTSAM LFTVDNEAGKITCLCQVPQNAANRGLKASEWVQVVSGLMDGKGGGKDVSAQATGKNVGCLEALQLATSFAQLR LGDVKN
hT-RS (humane Threonyl-tRNA-Synthetase) 83,4 kDa	MFEKASSPSGKMGGEKPIGAGEEKQKEGGKKNKEGSGDGGRAELNPWEYIYTRLEMYNIIKAEHDSILAE KAEKDSKPIKVTLPDQKQVDAESWKTTTPYQIACGISQGLADNTVIAKVNNVVWDLDRPLEEDCTLELLKFEDEE AQAVYWHSSAHIMGEAMERVYGGCLCYGPPPIENGFIYDMYLEEGGVSSNDFSSLEALCKKIKKEKQAFERLEVK KETLLAMFKYKFKCRI LNEKVNTPTTIVYRCGLPIDLCRGPVHRHTGKIKALKIHKNSSTYWEKADMETLQR IYGISFPDPKMLKEWEKQEEAKNRDRHKIGRDQELYFFHELSPGSCFFLPKGAYIYNALIEFIRSEYRKRGFQ EVVTPNIFNSRLWMTSGHWQHYSENMFSEFEELFALKPMNCPGHCLMFDHRPRKSLVELPLRLADFGVLLHRNE LSGALTGLTRVRRFQDDAHIFCAMEQIEDEIKGCLDFLRTVYSVFGFSFKLNLSTRPEKFLGDI EVWDQAEKQ LENSLNEFGEKWELENSGDGAFYGPKIDIQIKDAIGRYHQCATIQDFQLPIRFNLTIVYSHDGDKKRPVIVHRA ILGSVERMIAIITENYGGKWPFWLSPRQVMVVPVGPTECDEYAKVVRQQFHDAKFMADIDLDPGCTLNKKIRNAQ LAQYNFILLVVGEEKISGTVNIIRTRDNKVHGERTISETIERLQQLKEFRSKQAEFEF
hLC1 (humane Formimidoyl-transferase-cyclodeaminase) 58,9 kDa	MSQLVECVPNFSEGKNQEVDAISGAIQTQPGCVLLDVGAPSTNRTVYTFVGPPECVVEGALNAAARVASRLID MSRHQGEHPRMGALDVCFFIPVVRGVSVDCEVLCAQAFGQRLAEELDVPVYLYGEAARMDSRRTLPAIRAGEYEA LPKKLQQAADWAPDFGPPSFFVPSWGATATGARKFLIAFNINLLGTKEQAHRIALNLREQRQKQDQPRGLKVKYGI GWYLDENLAQVSTNLLDFEVTALHTVYEETCREAQELSLPVVGSQVLVGLVPLKALLDAAAFYCEKENLFILEE EQRI RLVSRLGLDLSLCPFSPKERIIEYLVPERGPERGLGSKSLRAFVGEVARSAAAPGGGSVAAAAAAMGAAL GSMVGLMTYGRRQFQSLDTMRLIIPPFEASAKLTTLVADADAEFTAYLEAMRLPKNTPPEEKDRRTAALQEGE RRAVSVPLTLAETVASLWALQELARCGNLACRSQDLQVAAKALEMGVGFAGYFNVLINLRDITDEAFKQDIHHRV SSLQEAQTQAALVLDCLETRQE

5.2.7 Aminosäuresequenzen der humanen rekombinanten Fab-Fragmente

Fab1	H-Kette QVQLQESGFRLLVKPSEALSLTLCIVSGGSINSNTYYWDWLRQPPGKLEWIGSISYSGGTYYNPSLKNRVMTSVDTSNNQFSLK LSSVTAADTAVYCARHTPRQAYNILTSSQDYIYGMVWVGQGTVTVVSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHH
Fab-1039-s1	L-Kette DIVMTQSPSLSPVTPGEAASISCRSSQSLHSSGNNYLDWYLVKQKPPQLLIYLSGNRASGVDRFSGSGSGTDFTLKISR EAEDVGVYCYMCALETPPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Fab2	H-Kette QVQLVQSGGGLVQPGESVRLSCAVSGFSSSTTYWMSVWRQAPGKLEWVANINQDGRQEEYVDSVKGRFTISRDNANSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARRTYDFWGSGLAFDVWGQGTMTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHH
Fab-HM-63-s8	L-Kette DIQMTQSPVTLASVGDRTITCRASQSVSSYLWYQQKPGPEAPKLLIYAASRLHSGVPSRFSGSGSGTHFTLTVTSLLPEDF ATYYCQSYSNPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Fab3	H-Kette QVQLVQSGGGLVQPGGFLRLSCAASGFTFTNYEMNWRQAPGKLEWVSYISISGRTIYADSVKGRFTISRDNANSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARELSHWDGMIVVDSDAFDIWGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHH
Fab-HM-63-s9	L-Kette EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQNVSSNLAWYQQKPGQVPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLSQSEDF AVYYCQYNDWPRTFGRGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Fab4	H-Kette

Fab-NS-52	<p>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGGSIISGSIYWSVWRQSAKGLEWIGRISATGSTNYNPSLWSRVTIISVDTSKNQFSLK LTSVTAADTAVYYCARHSSYSDSSLYPWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHH</p> <p>L-Kette DIQMTQSPVTLASVGRVSIITCRASQGISNYLAWYQQKPKVPKLLIYAASSTLKSQVPSRFRSGSGSGTDFTLTITSLQPEDV DIYYCQKYSTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
Fab5	<p>H-Kette QVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCATSGFTFNSYNMNVWRQAPGKLEWLAYINSDSSTTYADSVKGRFTISRDDARRSLDLQM NSLRAEDTAVYYCARLSGYDWYSDESPLYHDYWGQGTTLVTVSSSTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHH</p>
Fab-HM-63-s2	<p>L-Kette SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDLGPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYQNTARPSGIPERFSGSTSGNTAALIISGTQAVDEA DIYCYQAWDGSVVVFGRTKLTVLRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
α-MOG-Fab	<p>H-Kette QVQLQQSGAELMKPGASVEISCKATGYTFSSFWIEWVKQRPHGLEWIGEILPGRGRITNYNEKFKGKATFTAETSSNTAYMQL SSLTSEDSAVYYCATGNTMVMNPYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHH</p>
Fab-8-18C5	<p>L-Kette DIVMTQSPSSLSVSAAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKYLAWYQQKPKVPPKLLIYGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS VQAEIDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
Fab1	<p>H-Kette-His/BirA QVQLQESGPRLVKPSSEALSITCIVSGGSIINSNTYYWDWLRQPPGKLEWIGSISYSGGTYNPSLKNRVMTMSVDTSSNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARHTPRQAYNITLSSQDYIYGGMDVWVGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHHLER</p>
Fab-1039-s1	<p>L-Kette-Myc DIVMTQSPSLPVTGEEAASISCRSSQSLHSSGNLYLDWYVQKPKGPPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCMALETTPPIITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECAEEQKLISEEDLL</p>

Die anderen rFab-Fragmente mit BirA-Erkennungssequenz an der H-Kette und Myc-Peptid an der L-Kette besitzen die gleichen Sequenzen wie die oben angegebenen rFab-Fragmente und zusätzlich am C-Terminus die rot eingefärbten Sequenzen für die BirA-Erkennungssequenz bzw. das Myc-Peptid.

5.2.8 Sequenzen der humanen Proteine SF17A, NSP1, NSP1Δ und eMOG

5.2.8.1 SF17A

DNA-Sequenz

ATGGCAGCGGCTACCATCGTGCACGACACGTCTGAGGCCGTGGAGCTCTGCCCTGCTTACGGCTTGTACCTGAAGCCCATACCAAGATGACCA
TCAGCGTGGCCTCCCGCAGCTGAAGCAGCCGGGAAGTCCATCTCCAACCTGGGAGGTGATGGAGAGGCTGAAGGGCATGGTGCAGAACCACCA
TTCTCCACGCTGGGTATTTCCAAGACACCATGGACTTCATCCGCTTCGAGGGGAGGTGGAGAACAAGAGCCTGGTCAAGTCTTTCTGGCC
TGCTGGACGGCAAGACCATCAAGCTCAGCGCTTCTCCGACATCTGAAGGTGCGCGCGCCGAGTTCAGATCGACTTCCCACCCGCCACG
ACTGGGACTCCTTCTCCGCGACGCCAAGGACATGAACGAGACCTGCGGGGGAGCGGCCGACACCATCCACCTGGAGGGGCTGCCCTGCAA
GTGGTTCGCCCTGAAGGAGTGGGCTCCGAGAAGCCAGCGAGGACGTCCTGGTCAAGGTGTTTGAAGAAGTTCGGGGAGATCCGGAATGTGGAC
ATCCCATGCTGGACTCCTACCGGAGGAGATGACGGGCCCAACTTCCACACCTTACAGTTCGGGGGGCACTTGAACCTCGAGGCCTATGTGC
AGTACCGCAGTACATGGCTTTCATCCAGCCATGAGCGCCCTGCGCGGATGAACTCATGTACAAGGGCGAGGACGGCAAGGCCGTGGCCTG
CAACATCAAGGTTTCTTTTGATTGACCAAAACCTGAGTGATGCTCAATTAAGAAGCGGAGCTGGAGAGGCAGAAGCTTCAGGAAGTGGAG
CAGCAAAGAGAAGAAAGCGCAGAGAGAAGGAAGCGGAGGAGAGGAGGAGGAGCGGAGGAAAGAAAGAAAGAGCTGGAAGAGCTGGAGC
GAGAGAGGAAAGAGAAGAGAAGCTTCGCAAGAGGGAGCAGAAGCAGAGGGAGCGGTGAGCTGCGCGGAATCAGAAGAAGCTGGAGAAGCTGCA
GGCGGAGGAGCAGAAGCAGCTGCAGGAGAAGATCAAGCTGGAGGAGCGCAAGCTGCTGCTGGCCCAGAGGAACCTGCAGTCCATCCGGCTCATC
GCCGAGCTGCTCAGCAGAGCCAAGGTACCGGGGGCTCCCTCTGCAGCCGCCAGCGCGCCGGCTGCCCTCAGTGCCTCCCTGAAATGCG
GGCGGCTCAGCGCCGCTTCCCGCGGCTGCAGCTGAGCTACGAACCAGCTTAAATGCCGAGGATGACGGCTCCTTCCCGGAGGGTGT
AGCGCTCGTCTGCTTCCCGATGA

Proteinsequenz

MRGSHHHHHHSMAAATIVHDTSEAVELCPAYGLYLKPI TKMTISVALPQLKQPGKSI SNWEVMERLKGVMQNHQFSTLRISKSTMDFIRFEGE
VENKSLVKSFLACLDGKTIKLSGFSIDILKVRAAEFKIDFPTRHDWDSFFRDAKDMNETLPGERPDIHLEGLPCKWFALKESGSEKPSSEDLVVK
VFEKFLGIRNVDI PMLDSYREEMTGRNFHTFSFGHLLNFEAYVQYREYMGFIQMSALRGMKLMYKGEDGKAVACNIVKSFDTKHLSDASIKK
RQLERQKLEQLEQQREEQKRREKEAEERQRAEERKQKELEELERERKREKLRKREKQQRDRELRRNQKLEKLEQAEQKLEKLEERKLL
LAQRNLQSI RLIAELLSRAKVPGGSLCSRQPRPGCPQCPLKCGRRHGAVSPAAAVATK PALMPRMTAPSREGVALVCRSR

5.2.8.2 NSP1

DNA-Sequenz

ATGGTGAAGTTGGGGAACAATTTTCGCAGAGAAGGGCACCAAGCAGCCGCTGCTGGAGGATGGCTTCGACACCATTCCCCTGATGACGCCCTCG
ATGTCAATCAGCTGCAGTTCCCGCCCCGGATAAAGTGGTTCGTGAAAATAAGACCGAGTATGAACCTGACCGCAAGAAAGGGAAAGCACGTCC
TCCCCAAATTTGCTGAGTTCACCGTCAGCATCACGGAGGGTGTACCCGAGAGGTTTAAGGTCTCCGTGTTGGTCTCTTCGCCCTGGCCTTCCTC
ACCTGCGTTCGTCTCCTGGTTGTCTACAAGGTGTACAAGTATGACCGCGCTGCCCGATGGGTTTCGTCTCAAGAACACCCAGTGCATCCCAG
AAGGCTTGGAGAGCTACTACGCGGAGCAAGACTCCAGTCCCCGGGAGAAATTTTACACAGTCAATAAACCACTACAACCTGGCCAAGCAGAGCAT
CACGCGCTCCGTATCGCCCTGGATGTCTAGTTCGTCTCAGAAGAGAAGCTGTCCGAGCAGGAGACTGAAGCGGCTGAGAAGTCAGCTTAG

Proteinsequenz

MRGSHHHHHHGSVMKLGNNFAEKGTQPLELEDGFDTIPLMTPLDVNQLQFPPDPKVVVTKTEYEPDRKKGKARPPQIAEFTVSIITEGVTERFK
VSVLVLFALAFLLTCVVFVLYVYKVKYDRACPDGFLKNTQCIPEGLESYYAEQDSSAREKFYTVINHYNLAKQSI TRSVSPWMSVLSEKLSAQ
ETEAAEKSA

5.2.8.3 NSP1Δ – ohne Transmembrandomäne

DNA-Sequenz

ATGGTGAAGTTGGGGAACAATTTTCGCAGAGAAGGGCACCAAGCAGCCGCTGCTGGAGGATGGCTTCGACACCATTCCCCTGATGACGCCCTCG
ATGTCAATCAGCTGCAGTTCCCGCCCCGGATAAAGTGGTTCGTGAAAATAAGACCGAGTATGAACCTGACCGCAAGAAAGGGAAAGCACGTCC
TCCCCAAATTTGCTGAGTTCACCGTCAGCATCACGGAGGGTGTACCCGAGAGGTTTAAGGTCTCCGTCTACAAGGTGTACAAGTATGACCGCGCC
TGCCCCGATGGGTTTCGTCTCAAGAACACCCAGTGCATCCCAGAAGGCTTGGAGAGCTACTACGCGGAGCAAGACTCCAGTGCCCGGGAGAAAT
TTTACACAGTCAATAAACCACTACAACCTGGCCAAGCAGAGCATCACGCGCTCCGTATCGCCCTGGATGTCTAGTTCGTCTCAGAAGAGAAGCTGTCT
CGAGCAGGAGACTGAAGCGGCTGAGAAGTCAGCTTAG

Proteinsequenz

MRGSHHHHHHGSVMKLGNNFAEKGTQPLELEDGFDTIPLMTPLDVNQLQFPPDPKVVVTKTEYEPDRKKGKARPPQIAEFTVSIITEGVTERFK
VSVYKVKYDRACPDGFLKNTQCIPEGLESYYAEQDSSAREKFYTVINHYNLAKQSI TRSVSPWMSVLSEKLSAQETEAAEKSA

5.2.8.4 eMOG

GQFRVIGPRHPRALVGVDELPCRISPGKNATGMEVGWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDGDQAPEYRGRTELLKDAIGEGKVTLLRIRNVRFSDG
GFTCFRRDHSYQEEAAMELKVDDPGSGGGTGHHHHHH

Die grau markierten Sequenzen stammen vom Expressionsvektor.

5.3 Abkürzungsverzeichnis

A	<u>A</u> denosin	DM	<u>D</u> odecyl <u>m</u> altoside
α	<u>a</u> nti (bei Antikörpern)	DMF	<u>D</u> imethyl <u>f</u> ormamid
AA-RS	<u>A</u> minoacyl-t <u>R</u> NA-S <u>S</u> ynthetase	DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
Abb.	<u>A</u> bbildung	DNA	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid (Desoxyribonukleinsäure)
$\alpha\beta/\gamma\delta$ -TZR	$\alpha\beta$ - bzw. $\gamma\delta$ - <u>T</u> - <u>Z</u> ell- <u>R</u> ezeptor	dNTP	2'- <u>d</u> eoxy- <u>N</u> ukleosid-5'- <u>T</u> riphosphat
AG	<u>A</u> rbeitsgruppe	dsDNA	<u>d</u> ouble <u>s</u> tranded <u>D</u> NA
AID	<u>a</u> ctivation- <u>i</u> nduced <u>c</u> ytidine <u>d</u> eaminase	DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> reitol
Ak	<u>A</u> ntikörper	EBNA	<u>E</u> pstein- <u>B</u> arr <u>n</u> ukleäres <u>A</u> ntigen
Amp	<u>A</u> mpicillin	EBV	<u>E</u> pstein- <u>B</u> arr- <u>V</u> irus
ANA	<u>A</u> nti- <u>n</u> ukleäre <u>A</u> ntikörper	EcD-RS	<u>A</u> spartyl-t <u>R</u> NA-S <u>S</u> ynthetase <u>E. coli</u>
ANCA	<u>A</u> nti- <u>N</u> eutrophile <u>z</u> ytoplasmatische <u>A</u> ntikörper	EcIF1	<u>T</u> ranslationsinitiationsfaktor <u>I</u> F1 <u>E. coli</u>
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat	EcK-RS	<u>L</u> ysyl-t <u>R</u> NA-S <u>S</u> ynthetase <u>E. coli</u>
APZ	<u>A</u> ntigen- <u>p</u> räsentierende <u>Z</u> elle	ECL	<u>e</u> nhanced <u>c</u> hemiluminescence
As	<u>A</u> minosäure	EcN-RS	<u>A</u> sparaginyl-t <u>R</u> NA-S <u>S</u> ynthetase <u>E. coli</u>
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat	<u>E. coli</u>	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
AU	<u>a</u> rbitrary <u>u</u> nits (relative Einheit)	EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etraacetat
BBB	<u>b</u> lood <u>b</u> rain <u>b</u> arrier	eIF1AY	<u>e</u> karyotischer <u>T</u> ranslationsinitiations- faktor <u>I</u> F1AY
bp	<u>B</u> asenpaare	ELISA	<u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine (Rinderserumalbumin)	ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
BZR	<u>B</u> - <u>Z</u> ell- <u>R</u> ezeptor	ESI	<u>e</u> lectrospray <u>i</u> onisation
bzw.	<u>b</u> eziehungsweise	et al.	<u>e</u> t <u>a</u> lii (und andere)
C	<u>C</u> ytosin	EtBr	<u>E</u> thidium <u>b</u> romid
C	<u>c</u> onstant (konstante Region)	F	<u>F</u> arad
ca.	<u>c</u> irca	FACS	<u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting (Durchflusszytometrie)
CD	<u>C</u> ircular <u>d</u> ichroismus	FCS	<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum (Fötale Kälberserum)
CD	<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation (Oberflächenantigenomenklatur) CD4/8 ⁺ CD4 bzw. CD8 positiv CD4/8 ⁻ CD4 bzw. CD8 negativ	FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> sothiocyanat
cDNA	<u>c</u> omplementary <u>D</u> NA	for	<u>f</u> orward (vorwärts)
CDR	<u>c</u> omplementarity <u>d</u> etermining <u>r</u> egion (Komplementaritäts-bestimmende Region)	FPLC	<u>f</u> ast <u>p</u> rotein <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography
CHAPS	<u>C</u> holamidopropyldimethyl- <u>a</u> mmonio <u>p</u> ropan <u>s</u> ulfonat	G	<u>G</u> uanin
CMV	<u>C</u> ytomegalovirus	GBS	<u>G</u> uillain- <u>B</u> arré- <u>S</u> yndrom
CSF	<u>c</u> erebrospinal <u>f</u> luid (Liquor cerebrospinalis)	Gen	<u>G</u> eneticin G418
CSR	<u>c</u> lass <u>s</u> witch <u>r</u> ecombination	γ -Kette	<u>g</u> amma-Kette
C-terminal	<u>c</u> arboxyterminal	GPR	<u>G</u> ene <u>P</u> ix <u>r</u> esult <u>f</u> ile
CTL	<u>c</u> ytotoxic <u>T</u> <u>l</u> ymphocytes (zytotoxische T-Lymphozyten)	GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
D	<u>d</u> iversity (Diversitäts-Region)	Gua ⁺ SCN ⁻	<u>G</u> uanidinium- <u>T</u> hiocyanat
DC	<u>d</u> endritic <u>c</u> ell (dendritische Zelle)	hA-RS	<u>h</u> umane <u>A</u> lanyl-t <u>R</u> NA-S <u>S</u> ynthetase
DEPC	<u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonat	HBS	<u>h</u> epes <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
δ -Kette	<u>d</u> elta-Kette	HCl	Salzsäure
		HEK293E	<u>h</u> uman <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney <u>2</u> 93 <u>E</u> BNA-1
		hH-RS	<u>h</u> umane <u>H</u> istidyl-t <u>R</u> NA-S <u>S</u> ynthetase
		H-Kette	<u>h</u> eavy <u>c</u> hain (schwere Kette)
		HLA	<u>h</u> uman <u>l</u> eukocyte <u>a</u> ntigen (humanes Leukozytenantigen)
		hLC1	humane „Formimidoyltransferase- Cyclodeaminase 1“

HOXA1	„Homeobox protein <u>Hox-A1</u> “	MS	<u>M</u> ultiple <u>S</u> klerose
hPCNA	<u>h</u> umanes „ <u>P</u> roliferating <u>C</u> ell <u>N</u> uclear <u>A</u> ntigen“	MWCO	<u>m</u> olecular <u>w</u> eight <u>c</u> ut- <u>o</u> ff
HPLC	<u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography	NA	<u>n</u> ot <u>a</u> vailable (keine Angaben verfügbar)
HRP	<u>h</u> orse <u>r</u> adish <u>p</u> eroxidase	NaOH	Natronlauge
HSV	<u>H</u> erpes <u>S</u> implex <u>V</u> irus	NEAA	<u>N</u> on- <u>E</u> ssential <u>A</u> mino <u>A</u> cid (nicht-essentielle Aminosäure)
hT-RS	<u>h</u> umane <u>T</u> hreonyl- <u>t</u> RNA- <u>S</u> ynthetase	NFAT	<u>n</u> uclear <u>f</u> actor of <u>a</u> ctivated <u>T</u> cells
Hyg	<u>H</u> ygromycin	NK-Zellen	<u>N</u> atürliche <u>K</u> illerzellen
IAA	<u>I</u> odacetamid	NMO	<u>N</u> euromyelitis <u>o</u> ptica
IBM	<u>I</u> nclusion <u>B</u> ody <u>M</u> yositis (Einschlusskörperchenmyositis)	NMR	<u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance
ID	<u>I</u> dentifikation	NSP1	„ <u>N</u> euron- <u>s</u> pecific <u>p</u> rotein family member 1“
IEF	<u>I</u> soelektrische <u>F</u> okussierung	NTA	<u>N</u> itriloacetat
Ig	<u>I</u> mmunglobulin	N-terminal	aminoterminal
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>	OB	<u>O</u> ligonukleotid/Oligosaccharid- <u>B</u> indung
IL-2	<u>I</u> nterleukin- <u>2</u>	OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
IP	<u>I</u> mmunpräzipitation	OKB	<u>O</u> ligoklonale <u>B</u> anden
IPG	<u>i</u> mmobilisierter <u>p</u> H- <u>G</u> radient	ORF	<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame (offenes Leseraster)
IP-Orbitrap	Kombination aus <u>I</u> mmunpräzipitation und <u>O</u> rbitaltrap-Massenspektrometrie	PAGE	<u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
IPTG	<u>I</u> sopropylthio- β - <u>G</u> alaktosid	PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
ITAM	<u>i</u> mmunoreceptor <u>t</u> yrosine-based <u>a</u> ctivation <u>m</u> otif	PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
J	<u>j</u> oining (Verknüpfungsregion)	PE	<u>P</u> hycoerythrin
Kan	<u>K</u> anamycin	PEI	<u>P</u> olyethylenimin
kb	<u>K</u> ilobasenpaare	PLP1	„ <u>M</u> yelin proteolipid protein 1“
KCl	<u>K</u> alium <u>c</u> hlorid	PM	<u>P</u> oly <u>m</u> yositis
K _D	<u>D</u> issoziationskonstante	PMSF	<u>P</u> henylmethylsulfonylfluorid
kDa	<u>K</u> ilodalton	PMT	<u>P</u> hotomultiplier- <u>T</u> ube (Verstärker)
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani Medium (komplexes Bakteriennährmedium)	PPI	<u>p</u> rotein- <u>p</u> rotein- <u>i</u> nteraction
LC	<u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography	PVDF	<u>P</u> olyvinylidenfluorid
L-Kette	<u>l</u> ight <u>c</u> hain (leichte Kette)	RA	<u>r</u> heumatoide <u>A</u> rthritis
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid	RAG	<u>r</u> ecombination <u>a</u> ctivating <u>g</u> enes
M88	$\gamma\delta$ -TZR (<u>M</u> yositis 88)	rev	<u>r</u> everse (rückwärts)
mAk	<u>m</u> onoklonaler <u>A</u> ntikörper	rFab	<u>r</u> ekombinant exprimierte <u>F</u> ab-Fragmente
MALDI	<u>m</u> atrix <u>a</u> ssociated <u>l</u> aser <u>d</u> esorption/ <u>i</u> onisation (Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation)	RNA	<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid (Ribonukleinsäure)
MBP	„ <u>M</u> yelin-basisches <u>P</u> rotein“	RNase	<u>R</u> ibonuklease
MCS	<u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite (Insertionsstelle für DNA-Fragmente auf einem Plasmid)	rpm	<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute (Umdrehungen pro Minute)
MHC	<u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex (Haupthistokompatibilitätskomplex)	rpm	(Umdrehungen pro Minute)
MOG	„ <u>M</u> yelin <u>O</u> ligodendrozyten <u>G</u> lykoprotein“	RPMI	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
MPI	<u>M</u> ax- <u>P</u> lanck- <u>I</u> nstitut	RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> ibonukleinsäure	RT	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskription
MRT	<u>M</u> agnetresonanztomographie	sc-Fv	<u>s</u> ingle- <u>c</u> hain <u>v</u> ariable <u>F</u> ragment
MRZ-Reaktion	<u>M</u> asern- <u>R</u> öteln- <u>Z</u> oster-Reaktion	SD	<u>s</u> tandard <u>d</u> eviation (STDEV Exel)
		SDS	<u>S</u> odiumdodecylsulfat
		SDS-PAGE	<u>S</u> DS- <u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
		sek. Ak	<u>s</u> ekundärer <u>A</u> ntikörper
		SF17A	„ <u>S</u> plicing <u>f</u> actor, arginine/serine-rich <u>17A</u> “
		SHM	<u>s</u> omatische <u>H</u> ypermutation

SLE	systemischer <u>L</u> upus <u>e</u> rythematodes	U	<u>U</u> racil
SPR	<u>s</u> urface <u>p</u> lasmon <u>r</u> esonance	usw.	<u>u</u> nd <u>s</u> o <u>w</u> eiter
ssDNA	<u>s</u> ingle <u>s</u> tranded <u>D</u> NA	UV	<u>U</u> ltraviolette <u>s</u> Licht
T	<u>T</u> hym <u>i</u> n	UZ	<u>U</u> ltrazent <u>r</u> ifuge
Taq	<u>T</u> hermophilus <u>a</u> quaticus	V	<u>v</u> ariable (variable Region)
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA-Puffer	V	<u>V</u> olt
TBS	<u>T</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline	vgl.	<u>v</u> ergle <u>i</u> che
TMB	<u>T</u> etramethylbenzidine	v/v	<u>v</u> olume <u>p</u> er <u>v</u> olume
TMD	<u>T</u> ransmembran <u>o</u> mäne	wt	<u>W</u> ildt <u>y</u> p
TMED	<u>T</u> etramethylethylendiamin	w/v	<u>w</u> eight <u>p</u> er <u>v</u> olume
TOF	<u>t</u> ime <u>o</u> f <u>f</u> light (Flugzeitanalysator)	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-
Tris	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan		<u>g</u> alactopyranosid
TZR	<u>T</u> -Zell- <u>R</u> ezeptor	z. B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
U	<u>U</u> nit (Einheit für Enzymaktivität)	ZNS	<u>Z</u> entralnervensystem

Aminosäuren wurden entsprechend dem Einbuchstabencode abgekürzt und für Formelgrößen wurden die international gebräuchlichen SI-Einheiten verwendet.

5.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Der T-Zell-Rezeptor-Komplex.	3
Abb. 1.2: T-Zell-Rezeptor Rearrangement.	5
Abb. 1.3: Aufbau eines IgG-Antikörpers.	7
Abb. 1.4: B-Zell-Entwicklung.	9
Abb. 1.5: Immunhistochemische Färbung einer Muskelbiopsie des $\gamma\delta$ -PM-Patienten.	12
Abb. 1.6: Nachweis oligoklonaler Banden Antikörper bei der MS-Diagnostik.	15
Abb. 2.1: Prinzip der PCR-Mutagenese von EcIF1.	32
Abb. 2.2: Klonierungsstrategie der Proteine NSP1 und NSP1 Δ	32
Abb. 2.3: Prinzip der ProtoArray Technologie.	56
Abb. 2.4: Prinzip des 2D-Westernblots.	58
Abb. 3.1: M88-T-Zell-Hybridome.	59
Abb. 3.2: Antigen suche mit einer <i>E. coli</i> cDNA-Bibliothek.	61
Abb. 3.3: Erkennung mehrerer bakterieller Proteine durch M88.	63
Abb. 3.4: Erkennung mehrerer humaner Proteine durch M88.	64
Abb. 3.5: Spezifische Erkennung humaner Aminoacyl-tRNA-Synthetasen durch M88.	65
Abb. 3.6: Struktur und Mutagenese von EcIF1.	66
Abb. 3.7: Expression und Charakterisierung des EcIF1.	67
Abb. 3.8: Expression und Reinheit der EcIF1-Proteine.	68
Abb. 3.9: Aktivierung von M88-Hybridomen durch EcIF1wt und mutierte EcIF1-Proteine.	69
Abb. 3.10: Denaturierung des bakteriellen EcIF1.	70
Abb. 3.11: Denaturierung der humanen hH-RS.	71
Abb. 3.12: De- und Renaturierung von EcIF1 und hH-RS.	72
Abb. 3.13: Erkennung von EcIF1-Peptiden durch M88.	73
Abb. 3.14: Spezifische Erkennung des EcIF1 durch M88.	74
Abb. 3.15: FACS-Färbung von M88-Hybridomen mit EcIF1-Oktameren.	75
Abb. 3.16: Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie von M88 mit EcIF1.	76
Abb. 3.17: Expressionsversuche von M88 in HEK293E-Zellen.	77
Abb. 3.18: Expression und Untersuchung des humanen eIF1AY.	78
Abb. 3.19: Expression der rekombinanten Fab-Fragmente.	80
Abb. 3.20: CD-Spektroskopie des α -MOG-Fab-His ₆ /BirA-Myc.	81

Abb. 3.21: Polyreaktivitäts-ELISA der rekombinanten Fab-Fragmente.	83
Abb. 3.22: Funktionstest des α -MOG-Fab-His ₆ /BirA-Myc für den Proteinarray.	85
Abb. 3.23: Proteinarray des α -MOG-Fab.	86
Abb. 3.24: Proteinarray-Signalverteilung der Positivkontrolle α -MOG-Fab.	87
Abb. 3.25: Überlappung der Ergebnisse der Proteinarrays.	92
Abb. 3.26: Visuelle Bestätigung ausgewählter positiver Proteine der Proteinarrays.	93
Abb. 3.27: Tüpfelblot mit Proteinen aus einer <i>in vitro</i> Weizenkeimexpression.	94
Abb. 3.28: Immunpräzipitation mit Proteinen aus einer <i>in vitro</i> Weizenkeimexpression.	94
Abb. 3.29: Antigensuche mit Hirnlysate.	97
Abb. 3.30: 2D-SDS-Polyacrylamidgel von humanem Hirnlysate.	97
Abb. 3.31: 2D-Westernblot-Analyse mit humanem Hirnlysate.	99
Abb. 3.32: Immunpräzipitation mit Hirnlysate.	101
Abb. 5.1: Vektorkarte des pCR®2.1-TOPO®.	127
Abb. 5.2: Vektorkarte des pQE30.	127
Abb. 5.3: Vektorkarte des pTT5.	127
Abb. 5.4: pTT5-Konstrukte für die M88-Expression.	128
Abb. 5.5: pTT5-Konstrukte der Kassettenvektoren für die Fab-Expression.	129

5.5 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Anteile der Sekundärstrukturen des EcIF1 in Prozent.	67
Tab. 3.2: Tryptische Peptide des EcIF1.	73
Tab. 3.3: Anteile der Sekundärstrukturen des humanen eIF1AY in Prozent.	79
Tab. 3.4: Anteile der Sekundärstrukturen des α -MOG-Fab-His ₆ /BirA-Myc in Prozent.	81
Tab. 3.5: Ergebnisse des Proteinarrays für das α -MOG-Fab.	88
Tab. 3.6: Ergebnisse der Proteinarrays für die sechs rFab-Fragmente.	88
Tab. 3.7: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der Proteinarrays.	89
Tab. 3.8: Positive Proteine der Proteinarrays.	91
Tab. 3.9: Ergebnisse der 2D-Westernblot-Analyse von denaturiertem humanem Hirnlysate. .	100
Tab. 3.10: Ergebnisse der IP-Orbitrap-Analyse von nativen humanen Hirnlysaten.	103
Tab. 4.1: Übersichtstabelle der Kandidatenantigene der OKB-basierten rFab-Fragmente. ...	121

5.6 Literaturverzeichnis

- Adams, E. J., Chien, Y.-H., and Garcia, K. C. (2005). Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science (New York, N.Y.)* *308*, 227–231.
- Adams, E. J., Strop, P., Shin, S., Chien, Y.-H., and Garcia, K. C. (2008). An autonomous CDR3delta is sufficient for recognition of the nonclassical MHC class I molecules T10 and T22 by gammadelta T cells. *Nature immunology* *9*, 777–784.
- Allison, T. J., and Garboczi, D. N. (2002). Structure of gammadelta T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. *Molecular immunology* *38*, 1051–1061.
- Allison, T. J., Winter, C. C., Fournié, J. J., Bonneville, M., and Garboczi, D. N. (2001). Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* *411*, 820–824.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* *215*, 403–410.
- Amor, S., Groome, N., Linington, C., Morris, M. M., Dornmair, K., Gardinier, M. V., Matthieu, J. M., and Baker, D. (1994). Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* *153*, 4349–4356.
- Andersson, M., Alvarez-Cermeño, J., Bernardi, G., Cogato, I., Fredman, P., Frederiksen, J., Fredrikson, S., Gallo, P., Grimaldi, L. M., and Grønning, M. (1994). Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* *57*, 897–902.
- Ang, C. W., Jacobs, B. C., and Laman, J. D. (2004). The Guillain-Barré syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends in immunology* *25*, 61–66.
- Arahata, K., and Engel, A. G. (1988). Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. IV: Cell-mediated cytotoxicity and muscle fiber necrosis. *Annals of neurology* *23*, 168–173.
- Arden, B., Clark, S. P., Kabelitz, D., and Mak, T. W. (1995). Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* *42*, 455–500.
- Awad, A., Hemmer, B., Hartung, H.-P., Kieseier, B., Bennett, J. L., and Stuve, O. (2010). Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* *219*, 1–7.
- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schröder, R., Deckert, M., Schmidt, S., et al. (2000). Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *The Journal of experimental medicine* *192*, 393–404.
- Bangham, R., Michaud, G. A., Schweitzer, B., and Predki, P. F. (2005). Protein microarray-based screening of antibody specificity. *Methods in molecular medicine* *114*, 173–182.
- Baranzini, S. E., Mudge, J., van Velkinburgh, J. C., Khankhanian, P., Khrebtkova, I., Miller, N. a, Zhang, L., Farmer, A. D., Bell, C. J., Kim, R. W., et al. (2010). Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature* *464*, 1351–1356.
- Barcellos, L. F., Sawcer, S., Ramsay, P. P., Baranzini, S. E., Thomson, G., Briggs, F., Cree, B. C. a, Begovich, A. B., Villoslada, P., Montalban, X., et al. (2006). Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Human molecular genetics* *15*, 2813–2824.
- Battiste, J. L., Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Wagner, G. (2000). The eIF1A solution structure reveals a large RNA-binding surface important for scanning function. *Molecular cell* *5*, 109–119.
- Beetz, S., Wesch, D., Marischen, L., Welte, S., Oberg, H.-H., and Kabelitz, D. (2008). Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology* *213*, 173–182.
- Beltrán, E., Hernández, A., Lafuente, E. M., Coret, F., Simó-Castelló, M., Boscá, I., Pérez-Miralles, F. C., Bungal, M., and Casanova, B. (2012). Neuronal antigens recognized by cerebrospinal fluid IgM in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*.
- Bender, A., Ernst, N., Iglesias, A., Dornmair, K., Wekerle, H., and Hohlfeld, R. (1995). T cell receptor repertoire in polymyositis: clonal expansion of autoaggressive CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine* *181*, 1863–1868.
- Bergamaschi, R., Tonietti, S., Franciotta, D., Candeloro, E., Tavazzi, E., Piccolo, G., Romani, A., and Cosi, V. (2004). Oligoclonal bands in Devic's neuromyelitis optica and multiple sclerosis: differences in repeated cerebrospinal fluid examinations. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* *10*, 2–4.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* *28*, 235–242.
- Beyer, N. H., Lueking, A., Kowald, A., Frederiksen, J. L., and Heegaard, N. H. H. (2012). Investigation of auto-antibody profiles for cerebrospinal fluid biomarker discovery in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* *242*, 26–32.
- Blank, M., Barzilai, O., and Shoefeld, Y. (2007). Molecular mimicry and auto-immunity. *Clinical reviews in allergy & immunology* *32*, 111–118.

- Blank, U., Boitel, B., Mège, D., Ermonval, M., and Acuto, O. (1993). Analysis of tetanus toxin peptide/DR recognition by human T cell receptors reconstituted into a murine T cell hybridoma. *European journal of immunology* 23, 3057–3065.
- Blink, S. E., and Miller, S. D. (2009). The contribution of gammadelta T cells to the pathogenesis of EAE and MS. *Current molecular medicine* 9, 15–22.
- Bohan, A., and Peter, J. B. (1975a). Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *The New England journal of medicine* 292, 403–407.
- Bohan, A., and Peter, J. B. (1975b). Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *The New England journal of medicine* 292, 403–407.
- Bonneville, M., O'Brien, R. L., and Born, W. K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews. Immunology* 10, 467–478.
- Booss, J., Esiri, M. M., Tourtellotte, W. W., and Mason, D. Y. (1983). Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 62, 219–232.
- Born, W. K., Reardon, C. L., and O'Brien, R. L. (2006). The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Current opinion in immunology* 18, 31–38.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. a, Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7297–7301.
- Brennan, K. M., Galban-Horcajo, F., Rinaldi, S., O'Leary, C. P., Goodyear, C. S., Kalna, G., Arthur, A., Elliot, C., Barnett, S., Linington, C., et al. (2011). Lipid arrays identify myelin-derived lipids and lipid complexes as prominent targets for oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 238, 87–95.
- Brenner, M. B., McLean, J., Dialynas, D. P., Strominger, J. L., Smith, J. A., Owen, F. L., Seidman, J. G., Ip, S., Rosen, F., and Krangel, M. S. (1986). Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322, 145–149.
- Bruder, J. (2009). Untersuchungen zur Antigenerkennung eines pathogenen gamma-delta T-Zell-Rezeptors; Diplomarbeit Universität Würzburg.
- Bruder, J., Siewert, K., Obermeier, B., Malotka, J., Scheinert, P., Kellermann, J., Ueda, T., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2012). Target specificity of an autoreactive pathogenic human $\gamma\delta$ -T cell receptor in myositis. *The Journal of biological chemistry* 287, 20986–20995.
- Brück, W., Porada, P., Poser, S., Rieckmann, P., Hanefeld, F., Kretzschmar, H. a, and Lassmann, H. (1995). Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology* 38, 788–796.
- Brück, W., and Stadelmann, C. (2003). Inflammation and degeneration in multiple sclerosis. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 24 Suppl 5, S265–7.
- von Büdingen, H.-C., Bar-Or, A., and Zamvil, S. S. (2011). B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Current opinion in immunology* 23, 713–720.
- von Büdingen, H.-C., Harrer, M. D., Kuenzle, S., Meier, M., and Goebels, N. (2008). Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies. *European journal of immunology* 38, 2014–2023.
- Carding, S. R., and Egan, P. J. (2002). Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* 2, 336–345.
- Casciola-Rosen, L., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *The Journal of experimental medicine* 179, 1317–1330.
- Cepok, S., Zhou, D., Srivastava, R., Nessler, S., Stei, S., Büssow, K., Sommer, N., and Hemmer, B. (2005). Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 115, 1352–1360.
- Champagne, E. (2011). $\gamma\delta$ T cell receptor ligands and modes of antigen recognition. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* 59, 117–137.
- Chervonsky, A. V. (2010). Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nature immunology* 11, 28–35.
- Chien, Y.-hsiu, and Konigshofer, Y. (2007). Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunological reviews* 215, 46–58.
- Clafin, J. L., and Berry, J. (1988). Genetics of the phosphocholine-specific antibody response to *Streptococcus pneumoniae*. Germ-line but not mutated T15 antibodies are dominantly selected. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 141, 4012–4019.
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., and Terhorst, C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annual review of immunology* 6, 629–662.

- Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502–1517.
- Consortium, T. U. (2009). The Universal Protein Resource (UniProt) 2009. *Nucleic acids research* 37, D169–74.
- Crowley, M. P., Fahrner, A. M., Baumgarth, N., Hampl, J., Gutgemann, I., Teyton, L., and Chien, Y. (2000). A population of murine gammadelta T cells that recognize an inducible MHC class Ib molecule. *Science (New York, N.Y.)* 287, 314–316.
- Dalakas, M. C. (2010). Immunotherapy of myositis: issues, concerns and future prospects. *Nature reviews. Rheumatology* 6, 129–137.
- Dalakas, M. C. (2004). Inflammatory disorders of muscle: progress in polymyositis, dermatomyositis and inclusion body myositis. *Current opinion in neurology* 17, 561–567.
- Dalakas, M. C. (2012). Pathogenesis and therapies of immune-mediated myopathies. *Autoimmunity reviews* 11, 203–206.
- Dalakas, M. C. (2011a). Pathophysiology of inflammatory and autoimmune myopathies. *Presse médicale (Paris, France : 1983)* 40, e237–47.
- Dalakas, M. C. (2011b). Review: An update on inflammatory and autoimmune myopathies. *Neuropathology and applied neurobiology* 37, 226–242.
- Dalakas, M. C., and Hohlfeld, R. (2003). Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 362, 971–982.
- Davis, M. M., and Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395–402.
- Davis, M. M., Boniface, J. J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y.-hsiu (1998). Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annual review of immunology* 16, 523–544.
- Davis-Harrison, R. L., Insaïdo, F. K., and Baker, B. M. (2007). T cell receptor binding transition states and recognition of peptide/MHC. *Biochemistry* 46, 1840–1850.
- Derfuss, T., Gürkov, R., Then Bergh, F., Goebels, N., Hartmann, M., Barz, C., Wilske, B., Autenrieth, I., Wick, M., Hohlfeld, R., et al. (2001). Intrathecal antibody production against *Chlamydia pneumoniae* in multiple sclerosis is part of a polyspecific immune response. *Brain : a journal of neurology* 124, 1325–1335.
- Derfuss, T., Parikh, K., Velhin, S., Braun, M., Mathey, E., Krumbholz, M., Kümpfel, T., Moldenhauer, A., Rader, C., Sonderegger, P., et al. (2009). Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 8302–8307.
- Disanto, G., Morahan, J. M., Barnett, M. H., Giovannoni, G., and Ramagopalan, S. V. (2012). The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 78, 823–832.
- Dornmair, K., Goebels, N., Weltzien, H.-U., Wekerle, H., and Hohlfeld, R. (2003). T-cell-mediated autoimmunity: novel techniques to characterize autoreactive T-cell receptors. *The American journal of pathology* 163, 1215–1226.
- Dornmair, K., Schneider, C. K., Malotka, J., Dechant, G., Wiendl, H., and Hohlfeld, R. (2004). Antigen recognition properties of a Vgamma1.3Vdelta2-T-cell receptor from a rare variant of polymyositis. *Journal of neuroimmunology* 152, 168–175.
- Durocher, Y., Perret, S., and Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic acids research* 30, E9.
- Dyment, D. a, Ebers, G. C., and Sadovnick, A. D. (2004). Genetics of multiple sclerosis. *Lancet neurology* 3, 104–110.
- Ebers, G. C. (2008). Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet neurology* 7, 268–277.
- Ernerudh, J., Olsson, T., Lindström, F., and Skogh, T. (1985). Cerebrospinal fluid immunoglobulin abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 48, 807–813.
- Exley, M., Terhorst, C., and Wileman, T. (1991). Structure, assembly and intracellular transport of the T cell receptor for antigen. *Seminars in immunology* 3, 283–297.
- Firestein, G. S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356–361.
- Fraussen, J., Vrolix, K., Martinez-Martinez, P., Losen, M., De Baets, M. H., Stinissen, P., and Somers, V. (2009). B cell characterization and reactivity analysis in multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews* 8, 654–658.
- Friedman, J. E., Lyons, M. J., Cu, G., Ablashl, D. V., Whitman, J. E., Edgar, M., Koskiniemi, M., Vaheri, A., and Zabriskie, J. B. (1999). The association of the human herpesvirus-6 and MS. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 5, 355–362.
- Fugger, L., Friese, M. a, and Bell, J. I. (2009). From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nature reviews. Immunology* 9, 408–417.
- Garcia, K. C., and Adams, E. J. (2005). How the T cell receptor sees antigen—a structural view. *Cell* 122, 333–336.
- Garcia, K. C., Adams, J. J., Feng, D., and Ely, L. K. (2009). The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple. *Nature immunology* 10, 143–147.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research* 31, 3784–3788.

- Genain, C. P., Cannella, B., Hauser, S. L., and Raine, C. S. (1999). Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature medicine* 5, 170–175.
- Gilden, D. H. (2005). Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet neurology* 4, 195–202.
- Gill, S. C., and von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical biochemistry* 182, 319–326.
- Girardi, M. (2006). Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *The Journal of investigative dermatology* 126, 25–31.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175–182.
- Godbey, W. T., Wu, K. K., and Mikos, a G. (1999). Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 60, 149–160.
- Goebels, N., Michaelis, D., Engelhardt, M., Huber, S., Bender, A., Pongratz, D., Johnson, M. A., Wekerle, H., Tschopp, J., Jenne, D., et al. (1996). Differential expression of perforin in muscle-infiltrating T cells in polymyositis and dermatomyositis. *The Journal of clinical investigation* 97, 2905–2910.
- Grieco, F. A., Vendrame, F., Spagnuolo, I., and Dotta, F. (2011). Innate immunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. *Seminars in immunopathology* 33, 57–66.
- Guex, N., and Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714–2723.
- HOLMAN, H. R., and KUNKEL, H. G. (1957). Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. *Science (New York, N.Y.)* 126, 162–163.
- Hahn, B. H. (1998). Antibodies to DNA. *The New England journal of medicine* 338, 1359–1368.
- Hansen, K., Cruz, M., and Link, H. (1990). Oligoclonal Borrelia burgdorferi-specific IgG antibodies in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *The Journal of infectious diseases* 161, 1194–1202.
- Harris, L. J., Skaletsky, E., and McPherson, a (1998). Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *Journal of molecular biology* 275, 861–872.
- Harty, J. T., Tvinnereim, a R., and White, D. W. (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual review of immunology* 18, 275–308.
- Hauser, S. L., Waubant, E., Arnold, D. L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R. J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., et al. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 358, 676–688.
- Hayday, A. C. (2009). Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* 31, 184–196.
- Hayday, A., and Geng, L. (1997). Gamma delta cells regulate autoimmunity. *Current opinion in immunology* 9, 884–889.
- Heidemann, R., Zhang, C., Qi, H., Larrick Rule, J., Rozales, C., Park, S., Chuppa, S., Ray, M., Michaels, J., Konstantinov, K., et al. (2000). The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology* 32, 157–167.
- Hein, T., and Hopfermüller, W. (2000). Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Der Nervenarzt*, 288–294.
- Ho, P. P., Kanter, J. L., Johnson, A. M., Srinagesh, H. K., Chang, E.-J., Purdy, T. M., van Haren, K., Wikoff, W. R., Kind, T., Khademi, M., et al. (2012). Identification of naturally occurring Fatty acids of the myelin sheath that resolve neuroinflammation. *Science translational medicine* 4, 137ra73.
- Hofbauer, M., Wiesener, S., Babbe, H., Roers, A., Wekerle, H., Dornmair, K., Hohlfeld, R., and Goebels, N. (2003). Clonal tracking of autoaggressive T cells in polymyositis by combining laser microdissection, single-cell PCR, and CDR3-spectratype analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4090–4095.
- Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2007). Revisiting the immunopathogenesis of the inflammatory myopathies. *Neurology* 69, 1966–1967.
- Hohlfeld, R., and Engel, A. G. (1994). The immunobiology of muscle. *Immunology today* 15, 269–274.
- Hohlfeld, R., Engel, A. G., Ii, K., and Harper, M. C. (1991). Polymyositis mediated by T lymphocytes that express the gamma/delta receptor. *The New England journal of medicine* 324, 877–881.
- Holmøy, T., Kvale, E. Ø., and Vartdal, F. (2004). Cerebrospinal fluid CD4+ T cells from a multiple sclerosis patient cross-recognize Epstein-Barr virus and myelin basic protein. *Journal of neurovirology* 10, 278–283.
- Holtmeier, W., and Kabelitz, D. (2005). gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chemical immunology and allergy* 86, 151–183.
- Van Horssen, J., Schreibeit, G., Drexhage, J., Hazes, T., Dijkstra, C. D., van der Valk, P., and de Vries, H. E. (2008). Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free radical biology & medicine* 45, 1729–1737.
- Howard, O. M. Z., Dong, H. F., Yang, D., Raben, N., Nagaraju, K., Rosen, A., Casciola-Rosen, L., Härtle, M., Kron, M., Yang, D., et al. (2002). Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoanti-

- gens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 196, 781–791.
- Hughes, R., Hadden, R. D., Gregson, N., and Smith, K. J. (1999). Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *Journal of neuroimmunology* 100, 74–97.
- Ilyas, A. A., Chen, Z.-W., and Cook, S. D. (2003). Antibodies to sulfatide in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 139, 76–80.
- Irving, B. A., and Weiss, A. (1991). The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64, 891–901.
- Ishizuka, J., Stewart-Jones, G. B. E., van der Merwe, A., Bell, J. I., McMichael, A. J., and Jones, E. Y. (2008). The structural dynamics and energetics of an immunodominant T cell receptor are programmed by its Vbeta domain. *Immunity* 28, 171–182.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science (New York, N.Y.)* 327, 291–295.
- Jarvis, D. L. (2003). Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology* 310, 1–7.
- Johns, T. G., and Bernard, C. C. (1999). The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Journal of neurochemistry* 72, 1–9.
- Johnson, D., Hafler, D. A., Fallis, R. J., Lees, M. B., Brady, R. O., Quarles, R. H., and Weiner, H. L. (1986). Cell-mediated immunity to myelin-associated glycoprotein, proteolipid protein, and myelin basic protein in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 13, 99–108.
- Jores, R., Alzari, P. M., and Meo, T. (1990). Resolution of hypervariable regions in T-cell receptor beta chains by a modified Wu-Kabat index of amino acid diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 9138–9142.
- KABAT, E. A., GLUSMAN, M., and KNAUB, V. (1948). Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. *The American journal of medicine* 4, 653–662.
- Kabat, E. A., Moore, D. H., and Landow, H. (1942). AN ELECTROPHORETIC STUDY OF THE PROTEIN COMPONENTS IN CEREBROSPINAL FLUID AND THEIR RELATIONSHIP TO THE SERUM PROTEINS. *The Journal of clinical investigation* 21, 571–577.
- Kanter, J. L., Narayana, S., Ho, P. P., Catz, I., Warren, K. G., Sobel, R. a, Steinman, L., and Robinson, W. H. (2006). Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nature medicine* 12, 138–143.
- Katayama, C. D., Eidelman, F. J., Duncan, a, Hooshmand, F., and Hedrick, S. M. (1995). Predicted complementarity determining regions of the T cell antigen receptor determine antigen specificity. *The EMBO journal* 14, 927–938.
- Kerlero de Rosbo, N., Milo, R., Lees, M. B., Burger, D., Bernard, C. C., and Ben-Nun, a (1993). Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *The Journal of clinical investigation* 92, 2602–2608.
- Kim, S.-M., Bhonsle, L., Besgen, P., Nickel, J., Backes, A., Held, K., Vollmer, S., Dornmair, K., and Prinz, J. C. (2012). Analysis of the Paired TCR α - and β -chains of Single Human T Cells. *PloS one* 7, e37338.
- Kivity, S., Agmon-Levin, N., Blank, M., and Shoenfeld, Y. (2009). Infections and autoimmunity--friends or foes? *Trends in immunology* 30, 409–414.
- Kjellin, K. G., and Vesterberg, O. (1974). Isoelectric focusing of CSF proteins in neurological diseases. *Journal of the neurological sciences* 23, 199–213.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nature reviews. Immunology* 9, 833–844.
- Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature reviews. Immunology* 8, 22–33.
- Koffler, D., Schur, P. H., and Kunkel, H. G. (1967). Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine* 126, 607–624.
- Kolln, J., Ren, H.-min, Da, R.-rong, Zhang, Y., Spillner, E., Olek, M., Hermanowicz, N., Hilgenberg, L. G., Smith, M. A., van den Noort, S., et al. (2006). Triosephosphate isomerase- and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-reactive autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177, 5652–5658.
- Korn, T., and Tumani, H. (2012). Patterns of intrathecal autoreactive antibodies in MS using antigen microarrays. *Neurology*, 10–13.
- Krogsgaard, M., and Davis, M. M. (2005). How T cells “see” antigen. *Nature immunology* 6, 239–245.
- Krüger, H., Englert, D., and Pflughaupt, K. W. (1981). Demonstration of oligoclonal immunoglobulin G in Guillain-Barré syndrome and lymphocytic meningo-radicularitis by isoelectric focusing. *Journal of neurology* 226, 15–24.

- Kypides, N. C., and Woese, C. R. (1998). Universally conserved translation initiation factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 224–228.
- LOWENTHAL, A., VANSANDE, M., and KARCHER, D. (1960). The differential diagnosis of neurological diseases by fractionating electrophoretically the CSF gamma-globulins. *The Journal of new drugs* 6, 51–56.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265–275.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lalive, P. H., Menge, T., Delarasse, C., Della Gaspera, B., Pham-Dinh, D., Villoslada, P., von Büdingen, H.-C., and Genain, C. P. (2006). Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein are serologic markers of early inflammation in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2280–2285.
- Lambracht-Washington, D., O'Connor, K. C., Cameron, E. M., Jowdry, A., Ward, E. S., Frohman, E., Racke, M. K., and Monson, N. L. (2007). Antigen specificity of clonally expanded and receptor edited cerebrospinal fluid B cells from patients with relapsing remitting MS. *Journal of neuroimmunology* 186, 164–176.
- Lassmann, H., Brück, W., and Lucchinetti, C. F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 17, 210–218.
- Lefranc, M. P. (2001). Nomenclature of the human T cell receptor genes. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.] Appendix 1, Appendix 10.*
- Letourneur, F., and Klausner, R. D. (1992). Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science (New York, N.Y.)* 255, 79–82.
- Letourneur, F., and Malissen, B. (1989). Derivation of a T cell hybridoma variant deprived of functional T cell receptor alpha and beta chain transcripts reveals a nonfunctional alpha-mRNA of BW5147 origin. *European journal of immunology* 19, 2269–2274.
- Levine, S. M., Rosen, A., and Casciola-Rosen, L. A. (2003). Anti-aminoacyl tRNA synthetase immune responses: insights into the pathogenesis of the idiopathic inflammatory myopathies. *Current opinion in rheumatology* 15, 708–713.
- Li, H., Lebedeva, M. I., Llera, A. S., Fields, B. A., Brenner, M. B., and Mariuzza, R. A. (1998). Structure of the Vdelta domain of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 391, 502–506.
- Linnington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., and Vass, K. (1988). Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *The American journal of pathology* 130, 443–454.
- Link, H., and Huang, Y.-M. (2006). Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *Journal of neuroimmunology* 180, 17–28.
- Litzenburger, T., Fässler, R., Bauer, J., Lassmann, H., Linnington, C., Wekerle, H., Iglesias, A., and Litzenburger, T. (1998). B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *The Journal of experimental medicine* 188, 169–180.
- Long, E. O., Rosen-Bronson, S., Karp, D. R., Malnati, M., Sekaly, R. P., and Jaraquemada, D. (1991). Efficient cDNA expression vectors for stable and transient expression of HLA-DR in transfected fibroblast and lymphoid cells. *Human immunology* 31, 229–235.
- Lovato, L., Cianti, R., Gini, B., Marconi, S., Bianchi, L., Armini, A., Anghileri, E., Locatelli, F., Paoletti, F., Franciotta, D., et al. (2008). Transketolase and 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase type I isoforms are specifically recognized by IgG autoantibodies in multiple sclerosis patients. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7, 2337–2349.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology* 47, 707–717.
- Lünemann, J. D., Jelčić, I., Roberts, S., Lutterotti, A., Tackenberg, B., Martin, R., and Münz, C. (2008). EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *The Journal of experimental medicine* 205, 1763–1773.
- Mao, Y., Vyas, N. K., Vyas, M. N., Chen, D.-H., Ludtke, S. J., Chiu, W., and Quioco, F. a (2004). Structure of the bifunctional and Golgi-associated formiminotransferase cyclodeaminase octamer. *The EMBO journal* 23, 2963–2971.
- Markovic-Plese, S., Hemmer, B., Zhao, Y., Simon, R., Pinilla, C., and Martin, R. (2005). High level of cross-reactivity in influenza virus hemagglutinin-specific CD4+ T-cell response: implications for the initiation of autoimmune response in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 169, 31–38.
- Martin, A., Shulman, M. J., and Tsui, F. W. (1995). Epitope studies indicate that histidyl-tRNA synthetase is a stimulating antigen in idiopathic myositis. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 1226–1233.
- Martin, J. R. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 and multiple sclerosis. *Lancet* 2, 777–781.

- Mathews, M. B., and Bernstein, R. M. (1983). Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity. *Nature* *304*, 177–179.
- Mathey, E. K., Derfuss, T., Storch, M. K., Williams, K. R., Hales, K., Woolley, D. R., Al-Hayani, A., Davies, S. N., Rasband, M. N., Olsson, T., et al. (2007). Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *The Journal of experimental medicine* *204*, 2363–2372.
- Mattoon, D. R., and Schweitzer, B. (2009). Antibody specificity profiling on functional protein microarrays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* *524*, 213–223.
- Mayer, M. C., and Meinl, E. (2012). Glycoproteins as targets of autoantibodies in CNS inflammation: MOG and more. *Therapeutic advances in neurological disorders* *5*, 147–159.
- Medana, I. M., Gallimore, a, Oxenius, a, Martinic, M. M., Wekerle, H., and Neumann, H. (2000). MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *European journal of immunology* *30*, 3623–3633.
- Meinl, E., Krumbholz, M., and Hohlfeld, R. (2006). B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Annals of neurology* *59*, 880–892.
- Meuer, S. C., Fitzgerald, K. A., Hussey, R. E., Hodgdon, J. C., Schlossman, S. F., and Reinherz, E. L. (1983). Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex. *The Journal of experimental medicine* *157*, 705–719.
- Michaud, G. A., Salcius, M., Zhou, F., Bangham, R., Bonin, J., Guo, H., Snyder, M., Predki, P. F., and Schweitzer, B. I. (2003). Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nature biotechnology* *21*, 1509–1512.
- Mietzner, B., Tsuiji, M., Scheid, J., Velinzon, K., Tiller, T., Abraham, K., Gonzalez, J. B., Pascual, V., Stichweh, D., Wardemann, H., et al. (2008). Autoreactive IgG memory antibodies in patients with systemic lupus erythematosus arise from nonreactive and polyreactive precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 9727–9732.
- Müller, E. (2012). Multiple sclerosis. *Advances in experimental medicine and biology* *724*, 222–238.
- Mok, C. C., and Lau, C. S. (2003). Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of clinical pathology* *56*, 481–490.
- Morita, C. T., Mariuzza, R. A., and Brenner, M. B. (2000). Antigen recognition by human gamma delta T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer seminars in immunopathology* *22*, 191–217.
- Mouquet, H., and Nussenzweig, M. C. (2011). Polyreactive antibodies in adaptive immune responses to viruses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Munoz, L. E., van Bavel, C., Franz, S., Berden, J., Herrmann, M., and van der Vlag, J. (2008). Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Lupus* *17*, 371–375.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* *102*, 553–563.
- Murphy, K. (2012). *Janeway's Immunobiology* 8th (Garland Science, Taylor & Francis Group).
- Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2008). *Janeway's Immunobiology* 7th (Garland Science, Taylor & Francis Group).
- Murzin, A. G. (1993). OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *The EMBO journal* *12*, 861–867.
- Müller, M. R., and Rao, A. (2010). NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nature reviews. Immunology* *10*, 645–656.
- Naidoo, R., and Knapp, M. L. (1992). Studies of lipid peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum in multiple sclerosis and other conditions. *Clinical chemistry* *38*, 2449–2454.
- Nino-Vasquez, J. J., Allicotti, G., Borrás, E., Wilson, D. B., Valmori, D., Simon, R., Martin, R., and Pinilla, C. (2004). A powerful combination: the use of positional scanning libraries and biometrical analysis to identify cross-reactive T cell epitopes. *Molecular immunology* *40*, 1063–1074.
- Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., and Weinshenker, B. G. (2000). Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* *343*, 938–952.
- Notkins, A. L. (2004). Polyreactivity of antibody molecules. *Trends in immunology* *25*, 174–179.
- Obermeier, B. (2011). *Multiple Sklerose : Charakterisierung oligoklonaler Antikörper im Liquor von Patienten*; Dissertation LMU München; urn:nbn:de:bvb:19-132389.
- Obermeier, B., Lovato, L., Mentele, R., Brück, W., Forne, I., Imhof, A., Lottspeich, F., Turk, K. W., Willis, S. N., Wekerle, H., et al. (2011). Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin. *Journal of neuroimmunology* *233*, 245–248.
- Obermeier, B., Mentele, R., Malotka, J., Kellermann, J., Kümpfel, T., Wekerle, H., Lottspeich, F., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2008). Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nature medicine* *14*, 688–693.

- Odegard, V. H., and Schatz, D. G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. *Nature reviews. Immunology* 6, 573–583.
- Oldstone, M. B. (1987). Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50, 819–820.
- Onesti, S., Desogus, G., Brevet, A., Chen, J., Plateau, P., Blanquet, S., and Brick, P. (2000). Structural studies of lysyl-tRNA synthetase: conformational changes induced by substrate binding. *Biochemistry* 39, 12853–12861.
- Owens, G. P., Bennett, J. L., Lassmann, H., O’Connor, K. C., Ritchie, A. M., Shearer, A., Lam, C., Yu, X., Birlea, M., DuPree, C., et al. (2009). Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Annals of neurology* 65, 639–649.
- Owens, G. P., Ritchie, A. M., Burgoon, M. P., Williamson, R. A., Corboy, J. R., and Gilden, D. H. (2003). Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171, 2725–2733.
- O’Connor, K. C., Appel, H., Bregoli, L., Call, M. E., Catz, I., Chan, J. a, Moore, N. H., Warren, K. G., Wong, S. J., Hafler, D. A., et al. (2005). Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175, 1974–1982.
- Park, S. G., Kim, H. J., Min, Y. H., Choi, E.-C., Shin, Y. K., Park, B.-J., Lee, S. W., and Kim, S. (2005). Human lysyl-tRNA synthetase is secreted to trigger proinflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6356–6361.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical biochemistry* 83, 346–356.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* 25, 1605–1612.
- Pham, P. L., Perret, S., Doan, H. C., Cass, B., St-Laurent, G., Kamen, A., and Durocher, Y. (2003). Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: peptone additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotechnology and bioengineering* 84, 332–342.
- Pinilla, C., Martin, R., Gran, B., Appel, J. R., Boggiano, C., Wilson, D. B., and Houghten, R. A. (1999). Exploring immunological specificity using synthetic peptide combinatorial libraries. *Current opinion in immunology* 11, 193–202.
- Plotz, P. H. (2003). The autoantibody repertoire: searching for order. *Nature reviews. Immunology* 3, 73–78.
- Pluschke, G., Rüegg, D., Hohlfeld, R., and Engel, A. G. (1992). Autoaggressive myocytotoxic T lymphocytes expressing an unusual gamma/delta T cell receptor. *The Journal of experimental medicine* 176, 1785–1789.
- Podbielska, M., and Hogan, E. L. (2009). Molecular and immunogenic features of myelin lipids: incitants or modulators of multiple sclerosis? *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 15, 1011–1029.
- Pohl, D. (2009). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 286, 62–64.
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. a, Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., et al. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology* 69, 292–302.
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.-peter, Kappos, L., Lublin, F. D., Metz, L. M., Mcfarland, H. F., O’Connor, P. W., et al. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Annals of neurology* 58, 840–846.
- Pon, C. L., Wittmann-Liebold, B., and Gualerzi, C. (1979). Structure--function relationships in *Escherichia coli* initiation factors. II. Elucidation of the primary structure of initiation factor IF-1. *FEBS letters* 101, 157–160.
- Prineas, J. W., and Wright, R. G. (1978). Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 38, 409–421.
- Prinz, J. C. (2003). The role of T cells in psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology : JEADV* 17, 257–270.
- Provencher, S. W., and Glöckner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33–37.
- Qin, J., Goswami, R., Balabanov, R., and Dawson, G. (2007). Oxidized phosphatidylcholine is a marker for neuroinflammation in multiple sclerosis brain. *Journal of neuroscience research* 85, 977–984.
- Qin, Y., Duquette, P., Zhang, Y., Talbot, P., Poole, R., and Antel, J. (1998). Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 102, 1045–1050.
- Quintana, F. J., Farez, M. F., Izquierdo, G., Lucas, M., Cohen, I. R., and Weiner, H. L. (2012). Antigen microarrays identify CNS-produced autoantibodies in RRMS. *Neurology*.
- Quintana, F. J., Farez, M. F., Viglietta, V., Iglesias, A. H., Merbl, Y., Izquierdo, G., Lucas, M., Basso, A. S., Houry, S. J., Lucchinetti, C. F., et al. (2008). Antigen microarrays identify unique serum autoantibody

- signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 18889–18894.
- Racanelli, V., Prete, M., Musaraj, G., Dammacco, F., and Perosa, F. (2011). Autoantibodies to intracellular antigens: generation and pathogenetic role. *Autoimmunity reviews* *10*, 503–508.
- Rahman, A., and Isenberg, D. a (2008). Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine* *358*, 929–939.
- Reiber, H., Ungefehr, S., and Jacobi, C. (1998). The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* *4*, 111–117.
- Reichlin, M. (1995). Cell injury mediated by autoantibodies to intracellular antigens. *Clinical immunology and immunopathology* *76*, 215–219.
- Rinaldi, S., Brennan, K. M., Goodyear, C. S., O’Leary, C., Schiavo, G., Crocker, P. R., and Willison, H. J. (2009). Analysis of lectin binding to glycolipid complexes using combinatorial glycoarrays. *Glycobiology* *19*, 789–796.
- Ritchie, A. M., Gilden, D. H., Williamson, R. A., Burgoon, M. P., Yu, X., Helm, K., Corboy, J. R., and Owens, G. P. (2004). Comparative analysis of the CD19+ and CD138+ cell antibody repertoires in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* *173*, 649–656.
- Robak, E., Niewiadomska, H., Robak, T., Bartkowiak, J., Błóński, J. Z., Woźniacka, A., Pomorski, L., and Sysa-Jedrezejowska, A. (2001). Lymphocytes Tgamma delta in clinically normal skin and peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus and their correlation with disease activity. *Mediators of inflammation* *10*, 179–189.
- Robinson, W. H., Steinman, L., and Utz, P. J. (2003). Protein arrays for autoantibody profiling and fine-specificity mapping. *Proteomics* *3*, 2077–2084.
- Roche, S., Dauvilliers, Y., Tiers, L., Couderc, C., Piva, M.-T., Provansal, M., Gabelle, A., and Lehmann, S. (2008). Autoantibody profiling on high-density protein microarrays for biomarker discovery in the cerebrospinal fluid. *Journal of immunological methods* *338*, 75–78.
- Rogers, P. R., Dubey, C., and Swain, S. L. (2000). Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* *164*, 2338–2346.
- Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., and Wilson, I. a (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual review of immunology* *24*, 419–466.
- Samarkos, M., and Vaiopoulos, G. (2005). The role of infections in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Current drug targets. Inflammation and allergy* *4*, 99–103.
- Sarikonda, G., Wang, H., Puan, K.-joo, Liu, X.-hui, Lee, H. K., Song, Y., Distefano, M. D., Prestwich, G. D., Morita, C. T., and Oldfield, E. (2008). Photoaffinity antigens for human gamma delta T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* *181*, 7738–7750.
- Schweitzer, B., Meng, L., Mattoon, D., and Rai, A. J. (2010). Immune response biomarker profiling application on ProtoArray protein microarrays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* *641*, 243–252.
- Schweitzer, B., Predki, P., and Snyder, M. (2003). Microarrays to characterize protein interactions on a whole-proteome scale. *Proteomics* *3*, 2190–2199.
- Scotet, E., Martínez, L. O., Grant, E., Barbaras, R., Jenö, P., Guiraud, M., Monsarrat, B., Saulquin, X., Maillet, S., Estève, J.-P., et al. (2005). Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* *22*, 71–80.
- Seitz, S., Schneider, C. K., Malotka, J., Nong, X., Engel, A. G., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2006). Reconstitution of paired T cell receptor alpha- and beta-chains from microdissected single cells of human inflammatory tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 12057–12062.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A., et al. (2007). Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *The Journal of experimental medicine* *204*, 2899–2912.
- Sette, M., van Tilborg, P., Spurio, R., Kaptein, R., Paci, M., Gualerzi, C. O., and Boelens, R. (1997). The structure of the translational initiation factor IF1 from E.coli contains an oligomer-binding motif. *The EMBO journal* *16*, 1436–1443.
- Shapiro-Shelef, M., and Calame, K. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nature reviews. Immunology* *5*, 230–242.
- Shen, Y., Zhou, D., Qiu, L., Lai, X., Simon, M., Shen, L., Kou, Z., Wang, Q., Jiang, L., Estep, J., et al. (2002). Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science (New York, N.Y.)* *295*, 2255–2258.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* *68*, 850–858.
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Ueda, T. (2001). Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nature biotechnology* *19*, 751–755.

- Shimizu, Y., Kanamori, T., and Ueda, T. (2005). Protein synthesis by pure translation systems. *Methods (San Diego, Calif.)* 36, 299–304.
- Shin, S., El-Diwany, R., Schaffert, S., Adams, E. J., Garcia, K. C., Pereira, P., and Chien, Y.-H. (2005). Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors. *Science (New York, N.Y.)* 308, 252–255.
- Siewert, K. (2011). Autoaggressive Human T Cell Receptors and their Antigen Specificities; Dissertation Universität Potsdam. *Molecular Immunology*.
- Siewert, K., Malotka, J., Kawakami, N., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2012). Unbiased identification of target antigens of CD8(+) T cells with combinatorial libraries coding for short peptides. *Nature medicine*.
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. a, and Jordan, M. S. (2009). T cell activation. *Annual review of immunology* 27, 591–619.
- Soldan, S. S., Berti, R., Salem, N., Secchiero, P., Flamand, L., Calabresi, P. A., Brennan, M. B., Maloni, H. W., McFarland, H. F., Lin, H. C., et al. (1997). Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nature medicine* 3, 1394–1397.
- Sospedra, M., and Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annual review of immunology* 23, 683–747.
- Sospedra, M., and Martin, R. (2006). Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Autoimmunity* 39, 3–8.
- Sprent, J., and Kishimoto, H. (2002). The thymus and negative selection. *Immunological reviews* 185, 126–135.
- Sriram, S., Stratton, C. W., Yao, S., Tharp, A., Ding, L., Bannan, J. D., and Mitchell, W. M. (1999). Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 46, 6–14.
- Starr, T. K., Jameson, S. C., and Hogquist, K. A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology* 21, 139–176.
- Stone, J. D., Chervin, A. S., and Kranz, D. M. (2009). T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology* 126, 165–176.
- Sun, J., Link, H., Olsson, T., Xiao, B. G., Andersson, G., Ekre, H. P., Linington, C., and Diener, P. (1991). T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 146, 1490–1495.
- Taki, T., Gonzalez, T. V., Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., and Setou, M. (2009). TLC blot (far-eastern blot) and its applications. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 536, 545–556.
- Tejada-Simon, M. V., Zang, Y. C. Q., Hong, J., Rivera, V. M., and Zhang, J. Z. (2003). Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 53, 189–197.
- Tetin, S. Y., Prendergast, F. G., and Venyaminov, S. Y. (2003). Accuracy of protein secondary structure determination from circular dichroism spectra based on immunoglobulin examples. *Analytical biochemistry* 321, 183–187.
- Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Thomas, S., Nussenzweig, M. C., and Wardemann, H. (2006). A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. *The Journal of experimental medicine* 203, 393–400.
- Turner, S. J., Doherty, P. C., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2006). Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nature reviews. Immunology* 6, 883–894.
- Vandvik, B., Natvig, J. B., and Wiger, D. (1976). IgG1 subclass restriction of oligoclonal IgG from cerebrospinal fluids and brain extracts in patients with multiple sclerosis and subacute encephalitis. *Scandinavian journal of immunology* 5, 427–436.
- Vargas, M. E., and Barres, B. A. (2007). Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annual review of neuroscience* 30, 153–179.
- Vargas, M. E., Watanabe, J., Singh, S. J., Robinson, W. H., and Barres, B. a. (2010). Endogenous antibodies promote rapid myelin clearance and effective axon regeneration after nerve injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11993–11998.
- Villar, L. M., Sádaba, M. C., Roldán, E., Masjuan, J., González-Porqué, P., Villarrubia, N., Espiño, M., García-Trujillo, J. A., Bootello, A., and Alvarez-Cermeño, J. C. (2005). Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *The Journal of clinical investigation* 115, 187–194.
- Wang, H., Fang, Z., and Morita, C. T. (2010). Vgamma2Vdelta2 T Cell Receptor recognition of prenyl pyrophosphates is dependent on all CDRs. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184, 6209–6222.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E., and Nussenzweig, M. C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science (New York, N.Y.)* 301, 1374–1377.
- Wekerle, H., and Hohlfeld, R. (2003). Molecular mimicry in multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 349, 185–186.

- Wiendl, H., Malotka, J., Holzwarth, B., Weltzien, H.-U., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2002). An autoreactive gamma delta TCR derived from a polymyositis lesion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* *169*, 515–521.
- Williamson, R. A., Burgoon, M. P., Owens, G. P., Ghausi, O., Leclerc, E., Firme, L., Carlson, S., Corboy, J., Parren, P. W., Sanna, P. P., et al. (2001). Anti-DNA antibodies are a major component of the intrathecal B cell response in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 1793–1798.
- Willis, S. N., Stadelmann, C., Rodig, S. J., Caron, T., Gattenloehner, S., Mallozzi, S. S., Roughan, J. E., Al-mendinger, S. E., Blewett, M. M., Brück, W., et al. (2009). Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain : a journal of neurology* *132*, 3318–3328.
- Wilson, R. K., Lai, E., Concannon, P., Barth, R. K., and Hood, L. E. (1988). Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families. *Immunological reviews* *101*, 149–172.
- Wucherpfennig, K. W. (2004). T cell receptor crossreactivity as a general property of T cell recognition. *Molecular immunology* *40*, 1009–1017.
- Wucherpfennig, K. W., Allen, P. M., Celada, F., Cohen, I. R., De Boer, R., Garcia, K. C., Goldstein, B., Greenspan, R., Hafler, D., Hodgkin, P., et al. (2007). Polyspecificity of T cell and B cell receptor recognition. *Seminars in immunology* *19*, 216–224.
- Wucherpfennig, K. W., Newcombe, J., Li, H., Keddy, C., Cuzner, M. L., and Hafler, D. A. (1992). Gamma delta T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 4588–4592.
- Wucherpfennig, K. W., and Strominger, J. L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* *80*, 695–705.
- Xu, B., Pizarro, J. C., Holmes, M. a, McBeth, C., Groh, V., Spies, T., and Strong, R. K. (2011). Crystal structure of a {gamma}{delta} T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1–6.
- Yates, J. R., Ruse, C. I., and Nakorchevsky, A. (2009). Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annual review of biomedical engineering* *11*, 49–79.
- Yu, X., Gilden, D. H., Ritchie, A. M., Burgoon, M. P., Keays, K. M., and Owens, G. P. (2006). Specificity of recombinant antibodies generated from multiple sclerosis cerebrospinal fluid probed with a random peptide library. *Journal of neuroimmunology* *172*, 121–131.
- Yuki, N. (2000). Current cases in which epitope mimicry is considered a component cause of autoimmune disease: Guillain-Barré syndrome. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *57*, 527–533.
- Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M. C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine* *201*, 703–711.
- Zhang, J., Jacobi, A. M., Wang, T., Berlin, R., Volpe, B. T., and Diamond, B. (2009a). Polyreactive autoantibodies in systemic lupus erythematosus have pathogenic potential. *Journal of autoimmunity* *33*, 270–274.
- Zhang, J., MacKenzie, R., and Durocher, Y. (2009b). Production of chimeric heavy-chain antibodies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* *525*, 323–36, xv.
- Zhang, L., Jin, N., Nakayama, M., O'Brien, R. L., Eisenbarth, G. S., and Born, W. K. (2010). Gamma delta T cell receptors confer autonomous responsiveness to the insulin-peptide B:9-23. *Journal of autoimmunity* *34*, 478–484.
- Zhou, D., Srivastava, R., Nessler, S., Grummel, V., Sommer, N., Brück, W., Hartung, H.-P., Stadelmann, C., and Hemmer, B. (2006). Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 19057–19062.
- Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., et al. (2001). Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science (New York, N.Y.)* *293*, 2101–2105.
- Zinkernagel, R. M., and Doherty, P. C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* *248*, 701–702.

5.7 Veröffentlichungen der Dissertation

Teile der Arbeit sind oder werden veröffentlicht:

5.7.1 Artikel

Bruder J, Siewert K, Obermeier B, Malotka J, Scheinert P, Kellermann J, Ueda T, Hohlfeld R, Dornmair K. Target specificity of an autoreactive pathogenic human $\gamma\delta$ -T cell receptor in myositis. *J Biol Chem.* 2012 May 1. doi: 10.1074/jbc.M112.356709. PMID: 22549773.

5.7.2 Konferenzbeiträge

Bruder J, Siewert K, Obermeier B, Hohlfeld R, Dornmair K. Antigen recognition motif of a pathogenic human gamma-delta T cell receptor. 10th International Congress of Neuroimmunology, Sitges (Barcelona, Spanien), 26.-30.10.2010. Abstract in *Journal of Neuroimmunology*, Volume 228, Issues 1-2, 15.11.2010. (Reisestipendium und Vortrag)

Bruder J, Siewert K, Obermeier B, Hohlfeld R, Dornmair K. Target specificity of an autoreactive human $\gamma\delta$ -T cell receptor in myositis. Fifth International Gamma-Delta T-Cell Conference Freiburg, 31.5.-2.6.2012. (Vortrag)

5.7.3 Poster

Dornmair K, Bruder J, Siewert K, Obermeier B, Hohlfeld R. Antigenic motif of an autoreactive human gamma-delta T cell receptor. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 22.-27.8.2010.

Bruder J, Siewert K, Obermeier B, Hohlfeld R, Dornmair K. Target specificity of autoreactive T cells in gamma-delta TCR mediated myositis. SAB-Meeting, MPI für Neurobiologie Martinsried, 16.-18.1.2012.

Bruder J, Obermeier B, Lottspeich F, Wekerle H, Hohlfeld R, Dornmair K. Molecular characterization of oligoclonal antibodies in Multiple Sclerosis patients. SAB-Meeting, MPI für Neurobiologie Martinsried, 16.-18.1.2012.

5.7.4 Eingeworbene Drittmittel

05/2012 Fördermittel der Friedrich-Baur-Stiftung
Projekt: Antigen-spezifität von oligoklonalen Antikörpern aus dem Liquor
cerebrospinalis von Multiple Sklerose Patienten

5.8 Ehrenwörtliche Erklärung

Gemäß der Promotionsordnung § 4 Abs. 3 S. 3, 5 und 8 der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999 geändert durch die Satzung vom 12. August 2009 erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe, und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Die Dissertation hat weder in gleicher oder ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologin Univ.“ habe ich keinen weiteren akademischen Grad erworben noch versucht zu erwerben.

Martinsried, 2. Juli 2012

Jessica Bruder