

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biologische Chemie

Struktur/Funktionsanalysen an Proteinen des menschlichen
Zentralnervensystems: MOG und Nogo

Hilke Zander

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prüfer der Dissertation:

Univ.-Prof. Dr. M. Schemann

1. Univ.-Prof. Dr. A. Skerra

2. Priv.-Doz. Dr. U. Jacob

(Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 05.06.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und
Umwelt am 04.08.2008 angenommen.

Für Raffael, Sita und Lila

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Die Proteine der Oligodendrozytenmembran	8
1.2	Degeneration und Regeneration von Neuronen im Zentralen Nervensystem (ZNS) höherer Vertebraten	10
1.2.1	Das neuronale Inhibitorprotein Nogo-A	11
1.3	Funktion von Autoantikörpern gegen das Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein (MOG) bei der Multiplen Sklerose (MS)	13
1.3.1	Multiple Sklerose, eine Autoimmunerkrankung	13
1.3.2	Das Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein (MOG)	15
1.4	Zielsetzungen dieser Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Biologisches Material	17
2.1.2	Plasmide	17
2.1.3	Oligodesoxynukleotide	18
2.1.4	Enzyme und sonstige Proteine	18
2.1.5	Chemikalien	22
2.1.6	Standards und Kits	22
2.1.7	Geräte	23
2.1.8	Verbrauchsmaterial	26
2.1.9	Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	28
2.2	Molekularbiologische und gentechnische Methoden	33
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	33
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	33
2.2.3	DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	34
2.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	35
2.2.5	Reverse Transkription RNA in cDNA	35
2.2.6	Gelelektrophorese und Reinigung von DNA	36
2.2.7	Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung	36
2.2.8	<i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA	36
2.2.9	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	38
2.2.10	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> durch Sekretion in das Periplasma	39
2.2.11	Produktion rekombinanter Proteine im Cytoplasma von <i>E. coli</i>	41
2.3	Zellbiologische Methoden	42
2.3.1	Kultivierung der Myelomzelllinie Ag8	42
2.3.2	Bestimmung der Zellzahl	43
2.3.3	Durchflusszytometrie	43
2.3.4	Komplement-abhängiger Zytotoxizitäts-Test	43
2.4	Proteinchemische Methoden	44
2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.4.2	Silberfärbung von Proteinen	45

2.4.3	Chromatographische Verfahren	45
2.4.4	Rückfaltung von Proteinen aus Einschlusskörpern	47
2.4.5	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	48
2.4.6	Konzentrierung von Proteinen	48
2.4.7	Ortsgerichtete Markierung von Fab-Fragmenten mit Fluorescein-5-maleimid	48
2.4.8	N-terminale Proteinsequenzierung	49
2.4.9	Partieller Trypsinverdau	49
2.4.10	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	49
2.4.11	Western Blotting	50
2.4.12	Epitope-Mapping	52
2.4.13	Analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation	53
2.4.14	Fluoreszenztitration	54
2.5	Histologische Methoden	54
2.5.1	Preparation der Objektträger	54
2.5.2	Gefrierschnitte	54
2.5.3	Luxol-Blau-Färbung von Myelinschnitten	54
2.5.4	Immunhistochemie	55
2.6	Computerprogramme und Datenbanken	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Herstellung funktioneller Fragmente des humanen Neuronalen Inhibitorproteins Nogo-A in <i>E. coli</i>	56
3.1.1	Konstruktion von pASK75hN5 zur Gewinnung eines verkürzten Fragments der zentralen Domäne von Nogo-A	56
3.1.2	Optimierung der gentechnischen Produktion des löslichen Nogo-A Fragments, Untersuchungen zur Rolle der Cysteinreste	58
3.1.3	Analyse der N-terminalen Region des Nogo-A Proteins durch limitierte Proteolyse	60
3.1.4	Charakterisierung des Oligomerisierungszustandes des Nogo-A-Fragments	61
3.1.5	Konstruktion von pN66 zur gentechnischen Herstellung des Nogo66-Fragmentes	63
3.2	Bakterielle Produktion und Reinigung des rekombinanten Nogo-Rezeptors (NgR)	65
3.2.1	Konstruktion des Expressionsvektors pGEX-NgR zur löslichen Produktion im Cytoplasma von <i>E. coli</i>	65
3.2.2	Konstruktion des Expressionsvektors pASK111-TrxNgR zur Produktion eines Thioredoxin-NgR-Fusionsproteins durch Rückfaltung	68
3.3	Untersuchung der Bindung des Nogo-Rezeptors und des IN-1 Fab Fragmentes an Nogo-A	70
3.3.1	Epitope Mapping von Nogo-A mit Hilfe von immobilisierten Peptiden	70
3.3.2	Substitutionsanalyse und Längenanalyse der Peptid-Epitops in Nogo66	73
3.3.3	Biochemische Bindungsexperimente zur weiteren Charakterisierung der Bindung von IN-1-Fab bzw. NgR an Nogo66	74

3.4	Bakterielle Produktion, Reinigung und funktionelle Charakterisierung des rekombinanten anti-MOG Fab-Fragmentes 8-18C5	77
3.4.1	Konstruktion von Expressionsvektoren für die bakterielle Produktion des Fab-Fragments	77
3.4.2	Untersuchungen der Antigenpezifität des Fab-Fragments	80
3.4.3	Untersuchung der Bindung an das native Antigen	82
3.5	Charakterisierung des Komplexes aus der extrazellulären Domäne von MOG und dem Fab-Fragment 8.18-C5	84
3.5.1	Konstruktion des Expressionsvektors pASK111-MOG, Produktion und Reinigung von löslichem MOG	84
3.5.2	Herstellung und Kristallisation des MOG/8.18C5 Fab-Komplexes	85
3.5.3	Strukturanalyse	86
4	Diskussion	88
4.1	Herstellung und Reinigung löslicher Fragmente des humanen Nogo-A in <i>E. coli</i> , Implikationen für Struktur und Membrantopologie	88
4.1.1	Das N-terminale Nogo-A Fragment hNogoAn5	88
4.1.2	Das Nogo66-Fragment	90
4.2	Herstellung und Reinigung löslicher Fragmente des humanen NgR in <i>E. coli</i>	91
4.3	Epitope mapping von Nogo-A mit dem Antikörper IN-1 und mit NgR mit der SPOT Technik	91
4.4	Etablierung eines Testsystems für die molekulare und funktionelle Charakterisierung klonal expandierter B-Lymphozyten bei der Multiplen Sklerose (MS)	94
4.5	Die Struktur des MOG/8-18C5-Fab-Komplexes	95
5	Zusammenfassung	97
6	Literatur	99
7	Abkürzungen	111
8	Anhang	112
8.1	Berechnete molare Masse und vorhergesagter molarer Extinktionskoeffizient der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine	112
8.2	Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten und neu konstruierten Plasmide	112
8.3	Aminosäure- und DNA-Sequenz der humanen Nogo-A	113

1 Einleitung

Die meisten Gewebe des menschlichen Körpers besitzen die Fähigkeit zur Regeneration. Organe wie Leber, Haut oder Knochen können sich durch Zellteilung zumindest teilweise reparieren. Im Nervengewebe ist Regeneration dagegen dadurch erschwert, dass sich adulte Nervenzellen nicht mehr teilen; Regeneration im Nervengewebe basiert daher ausschließlich auf dem Wachstum verletzter Nervenfasern. Im adulten Zentralen Nervensystem (ZNS) kommt hinzu, dass die Regeneration aktiv inhibiert wird, verletzte Nervenfasern werden nicht neu gebildet. Diese Eigentümlichkeit des Nervensystems erschwert die Therapie vieler Krankheiten des Zentralen Nervensystems, wie zum Beispiel Rückenmarksverletzungen, Schlaganfall oder Multiple Sklerose (MS).

Proteine der Myelinscheide wie Nogo-A sind kausal an der Inhibierung der Zellregeneration im ZNS beteiligt (Huber und Schwab, 2000). Die biochemische Charakterisierung des bekanntesten inhibitorischen Proteins, Nogo-A, sowie die Charakterisierung der Interaktion von Nogo-A mit seinen Bindungspartnern werden in Teil 1 dieser Arbeit beschrieben. MS ist gekennzeichnet durch die Zerstörung der Myelinscheiden im Gehirn, ein Prozess, an dem vermutlich Autoantikörper beteiligt sind. Teil 2 dieser Arbeit beschäftigt sich mit der rekombinanten Produktion eines im Tiermodell demyelinisierenden Antikörpers und der Charakterisierung seiner Antigen-Bindungsspezifität.

1.1 Die Proteine der Oligodendrozytenmembran

Das Nervengewebe ist eine morphologisch-funktionelle Einheit zur Reizaufnahme, -verarbeitung und -beantwortung. Es wird funktionell und anatomisch unterteilt in das periphere Nervensystem (PNS), das von den peripheren Nerven und Ganglionen gebildet wird, und das Zentrale Nervensystem, welches aus Gehirn und Rückenmark besteht. Vier Klassen von neuronalen Zelltypen werden im ZNS unterschieden: Nervenzellen (Neurone) mit ihren Ausläufern, den Nervenfasern (Axone), sowie Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten, die man auch als Neuroglia zusammenfasst (Junqueira, 1995).

Im ZNS bilden Oligodendrozyten mit ihren Zellmembranfortsätzen, welche die Nervenfasern spiralförmig in 10 bis 150 konzentrischen Lagen umhüllen, die sogenannte Myelinscheide (Abb. 1.1). Dieser "Isolationsstoff" ermöglicht die sprunghafte, spannungsvermittelte Erregungsleitung in myelinisierten Nervenfasern. Das myelinisierte Axon lässt sich in nodale, paranodale und internodale Bereiche unterteilen. Im ca. 1 mm langen Internodium ist das Axon von der kompakten Myelinschicht umgeben. Im paranodalen Bereich enden die Myelinlamellen in Form von hintereinander gelegten Schleifen, die mit Zytoplasma gefüllt sind. Jede dieser Schleifen ist ca. 0,2 μm breit und hat anders als im Internodium direkten Kontakt zum Axolemma, dem extrazellulären Bereich, der das Axon umschließt (Livingston *et al.*, 1973). Der nodale Bereich zwischen den Paranoden, auch Ranvierscher Schnürring genannt, ist ca 2 μm breit und im ZNS von Astrozyten umgeben (Raine, 1984). Das kompakte multilamellare Myelin besteht zu 70% aus Lipiden und zu 30% aus Proteinen (Trockengewicht). Der sehr hohe Lipidanteil und die Gegenwart myelin-spezifischer Proteine machen die Myelinmembran einzigartig im Vergleich zu anderen biologischen Membranen.

Im PNS wird die Myelinscheide von Schwannschen Zellen, einer anderen Art Gliazellen, gebildet. Sie bilden im Gegensatz zu den Oligodendrozyten nur eine einzige Myelinschicht aus. Unterschiede gibt es auch in der Zusammensetzung der Lipide, vor allem aber der Membranproteine. Es wird angenommen, dass

Unterschiede in degenerativen und regenerativen Prozessen in ZNS und PNS mit der unterschiedlichen Proteinstruktur der Myelinscheide zusammenhängen (Woolf und Bloechlinger, 2002).

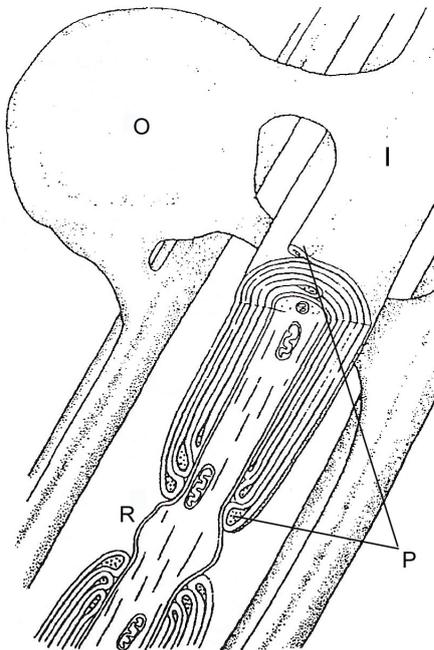


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Myelinscheide des Zentralen Nervensystems. ZNS Myelin wird von den Zellausläufern der Oligodendrozytenmembran gebildet. Das Zytoplasma wird verdrängt, wenn die Schichten sich zum kompakten multilamellaren Myelin formieren, bleibt aber in den paranodalen Schleifen (P) zurück und gewährleistet so einen kontinuierlichen zyttoplasmatischen Kanal zum Zellkörper des Oligodendrozyten. Im Gegensatz zu Schwannschen Zellen des PNS hüllt hier ein Oligodendrozyt mehrere Nervenfasern ein. (I) Internodium, (P) Paranode, (O) Oligodendrozyt, (R) Ranvierscher Schürring (Nodium) (nach Baumann und Pham-Dinh, 2001).

Die Struktur des kompakten Myelins wird durch seine Hauptproteinbestandteile bestimmt. Das Myelin Basic Protein (MBP) ist ein stark basisches Cytosolprotein, welches in elektrostatischer Wechselwirkung mit der negativ geladenen Lipiddoppelschicht steht und wahrscheinlich für die kompakte Ausbildung des Myelins benötigt wird. Dem Proteolipoprotein (PLP), einem Transmembranprotein, wird eine stabilisierende Funktion nach der Membrankompaktierung zugeschrieben. Zusammen machen diese Proteine rund 80% des Gesamtproteins im Myelin aus (Baumann und Pham-Dinh, 2001)

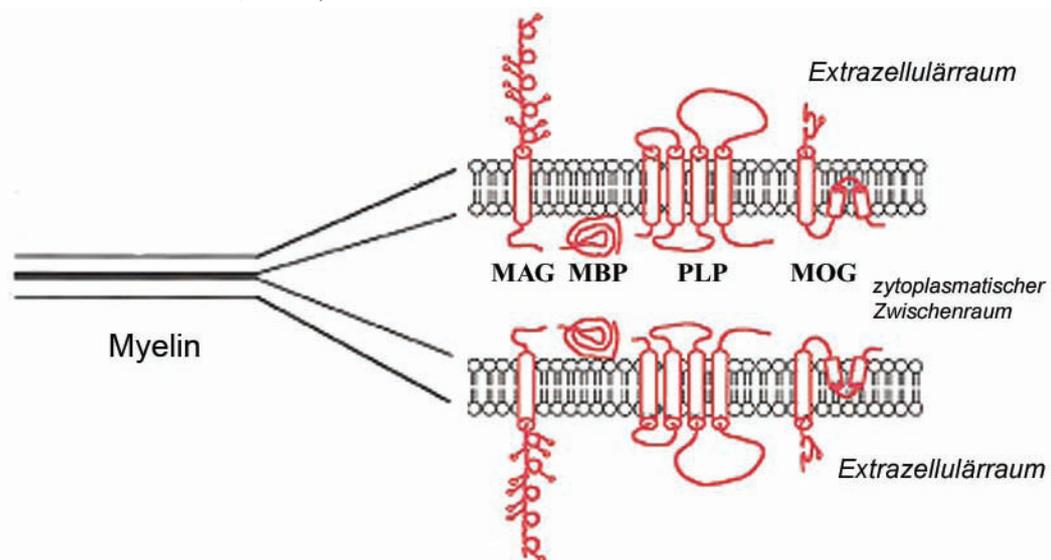


Abbildung 1.2: Myelinstruktur und Zusammensetzung im Zentralen Nervensystem. Das kompakte Myelin wird gebildet durch die Zusammenlagerung der äußeren Seiten der Oligodendrozytenmembran und der Zusammenlagerung der inneren Seiten. Die Myelinproteine MAG, MBP, PLP und MOG sind hier schematisch dargestellt (nach Baumann und Pham-Dinh, 2001).

Die Funktion der restlichen Membranproteine ist noch weitgehend ungeklärt. Prominente Beispiele sind das Myelin-Assoziierte Glycoprotein (MAG) und die ZNS-spezifischen Proteine Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), 2'-3'-cyclisches Nucleotid-3'-Phosphodiesterase (CNP), Myelin-Oligodendrozyten-spezifisches Protein (MOSP), Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein (OMgp), Myelin-Oligodendrozyten Basisches Protein (MOBP) und Nogo-A (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Einige dieser Proteine, zum Beispiel MAG, sind in den periaxonalen Membranen lokalisiert und spielen eine Rolle bei Glia-Axon Interaktionen (Quarles, 2002). MAG, OMgp und Nogo-A beeinflussen zudem die Neuroregeneration (s. Abschnitt 1.2) (Woolf und Bloechlinger, 2002).

Störungen der Myelinisierung der Nervenfasern führen zu schweren funktionellen Beeinträchtigungen des Nervensystems. Pathophysiologisch werden entwicklungsspezifische Defekte, bei denen kein Myelin gebildet wird (Dysmyelinisierungen), und degenerative Erkrankungen, bei denen die intakte Myelinschicht abgebaut wird (Demyelinisierungen), unterschieden. Zu letzteren gehört die Multiple Sklerose (s. Abschnitt 1.3)

1.2 Degeneration und Regeneration von Neuronen im Zentralen Nervensystem (ZNS) höherer Vertebraten

Die Unfähigkeit des adulten ZNS zur Regeneration ist seit Ende des 19. Jahrhunderts Gegenstand der Forschung (Ramon y Cajal, 1928). Die kombinierte Anwendung moderner biochemischer und zellbiologischer Methoden hat in den letzten Jahren zu großen Fortschritten im Verständnis kausaler Faktoren und in der Beschreibung beteiligter Mechanismen geführt. Als Reaktion auf eine Axotomie zeigen die Neuronen zunächst eine De-novo-Synthese von Proteinen, die sonst das axonale Wachstum während der Entwicklung des ZNS regulieren. Hierbei handelt es sich vor allem um Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-Jun (Chaisuksunt et al., 2000; Brook et al., 1998), oder Proteine, die bei der intrazellulären Signaltransduktion mitwirken, wie Bcl-2, CAP-23 und GAP-43. (Chen et al., 1997; Frey *et al.*, 2000).

Die Synthese dieser Proteine der Neurogenese führt in der verletzten Nervenzelle zur Ausbildung eines Wachstumskegels, gefolgt von einer Aussprossung und Verästelung der neugebildeten Fortsätze (Chaisuksunt *et al.*, 2000). Diese Ansätze zur Regeneration, die entsprechenden Vorgängen im PNS in morphologischer Hinsicht ähneln, sind im ZNS jedoch transient. Die Länge der neugebildeten axonalen Fortsätze beträgt nur den Bruchteil eines Millimeters, bevor es nach wenigen Stunden zur Retraktion und zum Kollaps des Wachstumskegels kommt. In der Folge atrophiert das Axon, es kommt zur Nekrose des gesamten Neurons und zum Zusammenbruch aller regenerativen Prozesse (David und Aguayo, 1981).

Schwab und Thoenen (1985) schlugen vor, dass das ZNS-Gewebe selbst das Wachstum der Nervenfasern behindert. Als Träger der inhibitorischen Aktivität wurden später die Oligodendrozyten des ZNS identifiziert (Caroni und Schwab, 1988b; Spillmann *et al.*, 1997; Schwab und Bartholdi, 1996). Den Schwannschen Zellen des PNS dagegen konnte eine wachstumsfördernde Wirkung nachgewiesen werden (Bunge, 1993). Neben verschiedenen Proteoglycanen konnten bis jetzt drei inhibitorische Oligodendrozytenproteine, MAG (Domeniconi *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002), OMgp (Wang *et al.*, 2002a) und Nogo-A (GrandPré *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Prinjha *et al.*, 2000),

nachgewiesen werden. Die inhibitorische Wirkung dieser Proteine wird zumindest teilweise durch Bindung an den Nogo-Rezeptor (NgR) vermittelt (Woolf und Bloechlinger, 2002).

1.2.1 Das neuronale Inhibitorprotein Nogo-A

Nogo-A (Huber und Schwab, 2000) ist ein integrales Membranprotein der Oligodendrozyten, dessen inhibitorische Wirkung auf das Wachstum bzw. die Regeneration von zentralnervösen Neuronen ausführlich beschrieben worden ist (Caroni und Schwab, 1988a; Spillmann *et al.*, 1998). Die cDNA für Nogo-A der Ratte (NI-220/250; Datenbank-Code: AJ242961) und die homologe Sequenz des Menschen (Datenbank-Code: AJ251383) wurden in gerichteter Weise kloniert bzw. anhand von Peptidsequenzen in Datenbanken identifiziert (GrandPré *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Prinjha *et al.*, 2000). Das nogo-Gen kodiert für die Proteine Nogo-A, Nogo-B und Nogo-C, die durch alternatives Spleißen bzw. unterschiedlichen Transkriptionsstart entstehen (Oertle *et al.*, 2003a; Chen *et al.*, 2000).

Die Transkription von nogo-A beschränkt sich bei Säugetieren hauptsächlich auf das adulte ZNS, wo Nogo-A sowohl von Oligodendrozyten als auch von einigen Neuronenpopulationen produziert wird. Es ist höchstwahrscheinlich auf der Innen- und Außenseite der Myelinscheide lokalisiert (Huber und Schwab, 2000). Die Spleißvariante Nogo-B wird dagegen ubiquitär produziert, während Nogo-C hauptsächlich im Muskelgewebe vorkommt (Tozaki *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002b; Hunt *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2002). Die Funktionen von Nogo-B und Nogo-C sind noch unklar (Schwab, 2004), jedoch wirken sie nicht inhibitorisch auf das Nervensystem.

Die Primärsequenz des humanen Nogo-A umfasst 1192 Aminosäuren und zeigt ein erhöhtes apparentes Molekulargewicht von 200 kDa in der SDS-Page (Chen *et al.* 2000; Abbildung 1.3). Die große N-terminale Region mit 819 Resten, die durch das Exon 3 kodiert wird, kommt in Nogo-B und -C nicht vor. Der N-Terminus zeigt keine Homologie zu bekannten Proteinen, während der C-Terminus (Reste 1004-1192) homolog zur Reticulon-Familie (RTN) ist (GrandPré *et al.*, 2000). Er beinhaltet zwei hydrophobe potentielle Transmembrandomänen, die eine Schleifenregion, genannt Nogo-66, einschließen (GrandPré *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Prinjha *et al.*, 2000), welche bei allen Nogo-Isoformen vorkommt.

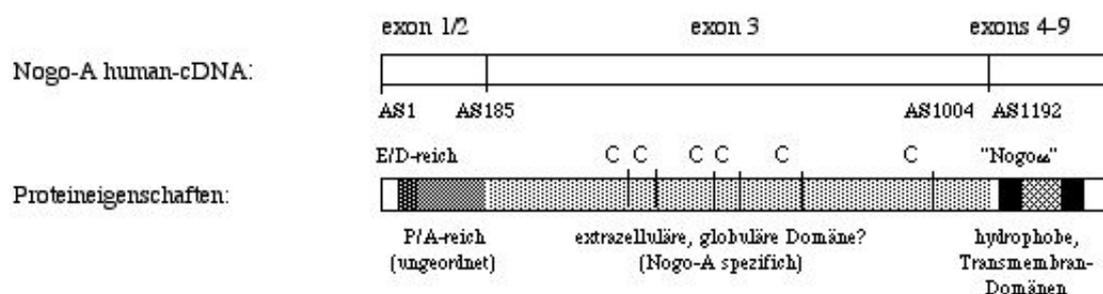


Abbildung 1.3: Strukturelle Eigenschaften des Neuronalen Inhibitorproteins Nogo-A. Während Exon Nr.1 und 2 des nogo Gens für einen Glu/Asp- bzw. Pro/Ser/Ala-reichen Abschnitt, der wahrscheinlich strukturell ungeordnet vorliegt, kodieren, sind durch die Exons Nr. 4-9 zwei Transmembrandomänen und ein kleiner vermutlich extrazellulärer Loop (Nogo66) kodiert. Das Genprodukt des Exons Nr. 3 zeigt Charakterisitika einer extrazellulären globular gefalteten Domäne mit sechs Cysteinresten, welche Disulfidbrücken ausbilden können.

Nogo-A enthält mehrere diskrete Regionen, die das Wachstum von Nervenfasern inhibieren können (Oertle *et al.*, 2003b; Prinjha *et al.*, 2000; GrandPré *et al.*, 2002). Zwei dieser Regionen scheinen von besonderer Bedeutung zu sein. So kann die C-terminale Nogo-66-Domäne alleine das Wachstum von Nervenfasern inhibieren und den Kollaps von Wachstumskegeln induzieren. Des Weiteren inhibiert eine zentrale Region des N-terminalen Nogo-A-spezifischen Teils (human: 567-748) das Wachstum von Nervenfasern wie auch die Ausbreitung von kultivierten Fibroblasten und induziert den Kollaps von Wachstumskegeln (Oertle *et al.*, 2003b).

Die Nogo-66-Domäne vermittelt die Bindung von Nogo-A an den Nogo-Rezeptor (NgR) (Fournier *et al.*, 2001; GrandPré *et al.*, 2000). NgR ist ein 443 Aminosäuren umfassendes Leucine-Rich-Repeat (LRR) Glycoprotein. Es wird hauptsächlich in ZNS-Neuronen und Axonen produziert, in deren Plasmamembran es über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker befestigt ist (Fournier *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; He *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002a; McGee und Strittmatter, 2003). Für die Signaltransduktion in das Cytoplasma bildet NgR wahrscheinlich einen Komplex mit dem p75 Nerve Growth Factor (NGF)-Rezeptor (Wong *et al.*, 2002; Schwab, 2004). Die Inhibition des axonalen Wachstums durch die Nogo-66-Domäne ist NgR-abhängig (Fournier *et al.*, 2001; GrandPré *et al.*, 2000). Die durch die N-terminale Nogo-A spezifische Domäne vermittelte Inhibition ist jedoch NgR-unabhängig (Niederöst *et al.*, 2002; Oertle *et al.*, 2003b). Allerdings deuten neuste Daten darauf hin, dass eine Region am äußersten C-terminalen Ende dieser Nogo-A-spezifischen Domäne ebenfalls mit NgR interagieren könnte (Hu *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zur Rolle im Regenerationsprozess ist die Struktur der inhibitorischen Domänen weitgehend unbekannt. Eine auf der Primärsequenz basierende Vorhersage ergab sieben potentielle N- sowie mehrere O-Glycosylierungsstellen für Nogo-A. Proteinchemische Analysen fanden jedoch keinen Hinweis auf eine tatsächliche Glycosylierung von Nogo-A (Spillmann *et al.*, 1998). Zudem besitzt das humane Nogo-A mehrere Cysteinreste, was auf strukturelle Disulfidbrücken hindeutet, wie sie häufig in den extrazellulären Domänen von Transmembranproteinen gefunden werden (Fiedler *et al.*, 2002).

Die Topologie von Nogo-A in der Oligodendrozytenmembran ist ebenfalls umstritten. Obwohl keine Signalsequenz vorhanden ist und es keine Evidenz für eine dritte Transmembrandomäne gibt, konnten sowohl der Nogo-A spezifische Teil als auch Nogo-66 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Oertle *et al.*, 2003b; Chen *et al.*, 2000; GrandPré *et al.*, 2000).

Die Identifizierung von Nogo-A als prominentem Träger inhibitorischer Aktivität im adulten zentralnervösen Myelin ermöglichte neue Strategien zu dessen funktioneller Neutralisierung. *In vitro* kann die inhibitorische Wirkung des ZNS-Myelins partiell durch Antikörper gegen Nogo-A, durch lösliche NgR-Fragmente und durch Peptide, die NgR blockieren, neutralisiert werden (Broesamle *et al.*, 2000; Caroni und Schwab, 1988a; Chen *et al.*, 2000; Fiedler *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2002; GrandPré *et al.*, 2002). *In vivo* (im Rattenmodell) führt die Applikation des monoklonalen Nogo-A Antikörpers IN-1 zu einer Regeneration der verletzten Neuronen unter Umwachsen der Läsion und zu einer Wiederherstellung der zuvor geschädigten motorischen Funktionen (Thallmair *et al.*, 1998; Schnell und Schwab, 1990; Bregman *et al.*, 1995).

IN-1 wurde durch Immunisierung von Mäusen mit angereicherten, inhibitorisch aktiven Myelinproteinen der Ratte produziert (Caroni und Schwab, 1988a). Um Nachteilen des IgM/k Antikörpers IN-1 zu begegnen, klonierten Bandtlow *et al.* (1996) die cDNA der variablen Domänen

(Kabat-datenbank:code 029919 für VI; code 029920 für Vh) und ermöglichten so die bakterielle Herstellung eines IN-1 Fab-Fragments. Mit einem partiell humanisierten Fab-Fragment konnten Brösamle *et al.* (2000) die Regeneration von corticospinalen Axonen der adulten Ratte nach Rückenmarksverletzung nachweisen. Weitere Verbesserungen der therapeutischen Wirkung im Tiermodell sind von einem tieferen Verständnis der Wirkungsweise von Nogo-A, seiner Interaktion mit dem -ggf. noch unbekannt- Rezeptor sowie der blockierenden Wechselwirkung zwischen Nogo-A und IN-1 zu erwarten.

1.3 Funktion von Autoantikörpern gegen das Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein (MOG) bei der Multiplen Sklerose (MS)

1.3.1 Multiple Sklerose, eine Autoimmunerkrankung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des ZNS, während der die Myelinscheiden und in unterschiedlichem Ausmaß auch die Axone selbst zerstört werden (Noseworthy *et al.*, 2000; Keegan und Noseworthy, 2002). Die Krankheit verläuft schubförmig oder chronisch progredient (30% der Fälle). Die Symptome sind unterschiedlich; je nach Lage der Läsion kann es zu Bewegungsstörungen, Paresen der Beine und/oder Arme, Sensibilitätsstörungen, Visusverlust, Schwindel oder Störung der Augenmotorik kommen. Histopathologisch ist MS durch sogenannte Plaques im Gehirn charakterisiert, die aus Regionen demyelinisierter Axone, umgeben von einer Schicht aus astroglialem Narbengewebe, bestehen. Der Verlust von Axonen kann bei MS signifikant sein und korreliert mit den klinischen Symptomen der Patienten (Lassmann *et al.*, 1998). MS ist die häufigste neuroimmunologische Erkrankung; rund 0,15 % der deutschen Bevölkerung sind betroffen. Das Erkrankungsalter liegt meist zwischen dem 15. und 50. Lebensjahr. Frauen sind, wie auch bei vielen anderen immunologischen Erkrankungen, doppelt so häufig betroffen wie Männer.

Die Ätiologie der MS ist weitgehend unbekannt. Sowohl genetische als auch Umweltfaktoren sind an der Entstehung der Krankheit beteiligt. Der Einfluss genetischer Faktoren wird daraus ersichtlich, dass Geschwister 20mal häufiger und Kinder Betroffener 12mal häufiger erkranken als der Bevölkerungsdurchschnitt und daraus, dass die Konkordanz bei eineiigen Zwillingen bei 30 % liegt. Eine Assoziation mit dem HLA-Antigen DR2 der MHC-Klasse II (vor allem bei Nordeuropäern verbreitet) wurde beobachtet, was auf einen immungenetischen Hintergrund hinweist (Martin *et al.*, 1992). Der Einfluss von Umweltfaktoren kann kausal davon abgeleitet werden, dass die Prävalenz von MS mit zunehmender Entfernung vom Äquator zunimmt und bei einem Umzug für Kinder das MS-Risiko des neuen Wohnortes gilt. Dies deutet auf eine Rolle von Viren oder auch Bakterien hin, die in den gemäßigten Breiten vorkommen und vorwiegend Kinder befallen. Obwohl zahlreiche Viren, darunter Masern- und Herpesviren, als potentielle Erreger von MS in der Diskussion sind und zum Teil im Tiermodell MS-ähnliche Symptome induzieren können, gibt es keinerlei gesicherte Erkenntnisse bezüglich der Auslösung von MS selbst (Sospedra und Martin, 2005).

Gegenwärtig wird angenommen, dass die Symptome von MS auf eine Autoimmunreaktion des Körpers gegen das ZNS-Myelin zurückgehen. Ein allgemeines Modell der Immunpathogenese von MS (Sospedra und Martin, 2005) geht davon aus, dass zunächst Myelin-autoreaktive T-Zellen

außerhalb des ZNS aktiviert werden. Als Aktivator könnten immunogene virale oder bakterielle Strukturen wirken, welche Ähnlichkeit zu Komponenten des Myelins besitzen, wodurch kreuzreaktive Immunzellen aktiviert werden (*Molecular Mimicry*). Alternativ könnten autoreaktive Zellen durch unspezifische inflammatorische Ereignisse, die während Infektionen auftreten, aktiviert werden (*Bystander activation*). Die kreuzreaktiven aktivierten T-Zellen durchqueren die Blut-Hirn-Schranke und werden im ZNS durch Myelinkomponenten reaktiviert, wodurch die Entzündungsreaktion in Gang gesetzt wird.

Lokale oder durch Cytokine angelockte Makrophagen schädigen durch phagozytotische Aktivität und die Freisetzung toxischer Mediatoren Myelin und Axone. Autoantikörper, die die geschädigte Blut/Hirn-schranke durchqueren oder auch lokal produziert werden, unterstützen den Prozess. Dieses Modell, welches MS als durch CD4+Th1-Zellen-vermittelte Krankheit betrachtet, basiert größtenteils auf Daten aus dem Tiermodell der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE); (Zamvil und Steinman, 1990). Im EAE-Modell führt die Injektion von Myelin-Komponenten in bestimmte Mausstämme zu einer CD4+Th1-vermittelten Autoimmunerkrankung. Die Krankheit kann ferner durch Transfer von encephalogenen CD4+T-Zellen auf gesunde Tiere übertragen werden (Pettinelli und McFarlin, 1981; Zamvil und Steinman, 1990; Martin *et al.*, 1992). Die Assoziation der MS mit dem HLA-Antigen DR2 der MHC-Klasse II unterstützt ebenfalls indirekt die These der MS als autoreaktive T-Zell vermittelte Krankheit.

Jedoch scheinen auch andere Faktoren des Immunsystems eine Rolle bei der MS zu spielen. In Patienten kann man erhöhte Zellzahlen im Liquor beobachten, wobei es sich in der Regel nicht nur um CD4+Th1-Zellen, sondern auch um Plasmazellen handelt. Letztere sind verantwortlich für eine intrathekale IgG-Synthese, die schon vor mehr als fünfzig Jahren von Kabat beschrieben wurde (Kabat *et al.*, 1950). Erste Hinweise auf Oligoklonalität (oder auch expandierte Immunglobulinfamilien) wurden von Lowenthal *et al.* (1960) entdeckt. Die sogenannten oligoklonalen Immunglobulinbanden (OKB) im Liquor von MS-Patienten sind eines der konstantesten Merkmale der Krankheit (Nachweis bei 95 % der MS-Patienten positiv; Tourtellotte *et al.*, 1984). D.h. bloß wenige B-Zell-Klone sind für die intrathekale IgG-Synthese verantwortlich.

B-Zellen können zur Pathogenese der MS durch verschiedene Mechanismen beitragen. Die Produktion von Myelin-spezifischen Antikörpern durch die klonal expandieren Plasmazellen im Liquor und die darauf folgende Zerstörung des Myelins durch Komplement-abhängige Lyse oder durch Opsonisierung des Myelins mittels Phagozytose scheinen jedoch entscheidend an der Pathogenese des MS beteiligt zu sein (Mead *et al.*, 2002; Goldenberg *et al.*, 1989; Genain *et al.*, 1999).

Die Antigenspezifität dieser Antikörper in der MS ist bisher unbekannt. Autoimmunreaktionen gegen verschiedene Myelinproteine, wie MBP, PLP oder MOG, können eine inflammatorische Antwort im Tiermodell auslösen und eine erhöhte Autoreaktivität gegenüber diesen Proteinen wurde bei den meisten MS-Patienten festgestellt (Sospedra und Martin, 2005). Allerdings ist MOG, welches an der Oberfläche der Myelinscheide und auf Oligodendrozyten lokalisiert ist, was es sehr erreichbar für Autoimmunreaktionen macht, das einzige Myelinprotein, für das eine klinische Evidenz hinsichtlich einer Autoimmunreaktion im Patienten existiert (Berger *et al.*, 2003; Genain *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1991).

1.3.2 Das Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein (MOG)

MOG wurde von Lebar *et al.* (1979) als dasjenige Myelinprotein identifiziert, das die demyelinisierende Autoantikörperreaktion in der EAE induziert. Wenige Jahre später wurde dasselbe Protein von Linington *et al.* (1984) aus Rattenhirn mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 8.18C5 durch Affinitätschromatographie isoliert. Sowohl aktive Immunisierung mit MOG als auch passive Immunisierung mit anti-MOG-Antikörpern (z.B. 8.18C5) induzieren starke Demyelinisierung im Mausmodell (Linington *et al.*, 1988; Genain *et al.*, 1995). MOG ist zudem das einzige bislang bekannte Antigen, das zusätzlich zur pathogenen demyelinisierenden Autoantikörperreaktion eine encephalogene T-Zell Antwort im Tiermodell auslöst (Iglesias *et al.*, 2001). Diese Daten aus dem MOG-induzierten Tiermodell stehen im Einklang mit den immunologischen und pathologischen Befunden bei MS-Patienten (Genain *et al.*, 1999). Die klinische Relevanz von MOG-induzierter EAE wird zusätzlich durch die Tatsache unterstützt, dass MOG als potentielles Zielprotein für B- und T-Zellantworten bei MS identifiziert wurde.

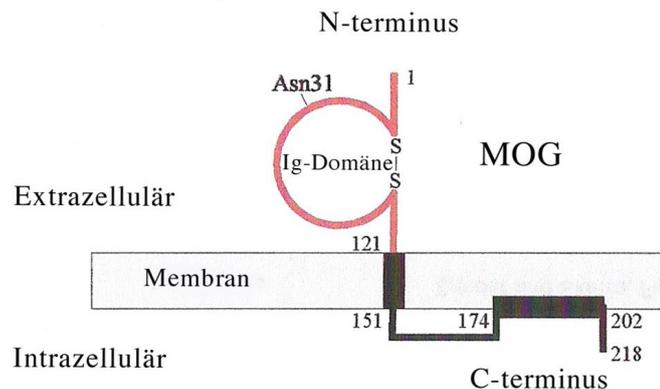


Abbildung 1.4: Model von MOG in der Plasmamembran der Oligodendrozyten.

Die N-terminale Ig-Domäne sitzt auf der extrazellulären Seite, der C-Terminus ist intrazellulär (nach Kröpfl *et al.* 1996). Die Nummern bezeichnen die Aminosäurereste.

MOG ist ein ZNS-spezifisches Typ-1 Transmembranprotein (26/28kD) der Oligodendrozyten. Das Protein ist an der Membranoberfläche, in der äußeren Lamelle des Myelins lokalisiert (Brunner *et al.*, 1989). Anders als viele andere ZNS-Proteine findet man MOG nur bei Säugetieren, hier ist es aber zwischen den Spezies hoch konserviert (Gardinier und Matthieu, 1993; Pham-Dinh *et al.*, 1994; Pham-Dinh *et al.*, 1993). MOG besteht aus 218 Aminosäuren und einem N-terminalen, nach dem Export abgeschnittenen Signalpeptid von 29 Aminosäuren. Die 128 extrazellulären N-terminalen Aminosäuren bilden eine Immunoglobulin-V (IgV)-Typ Domäne. Das erste der zwei hydrophoben Segmente in der zweiten Hälfte der Sequenz (Aminosäuren 129-149) bildet eine Transmembranhelix aus, während das zweite Segment (Aminosäuren 182-202) die Membran nicht durchdringt sondern von deren inneren Seite her eingelagert zu sein scheint. Entsprechend kommt der C-Terminus von MOG auf der cytosolischen Seite der Membran zu liegen (Abbildung 1.3). MOG besitzt mit Asn31 eine einzelne Glycosylierungsstelle. Ein Teil der MOG-Moleküle enthält das L2 / HNK-1 Epitop in der Zuckereinheit, das als Marker für Zelladhäsionsproteine gilt. Das *mog*-Gen befindet sich in der Major Histocompatibility Complex (MHC)-Region auf Chromosom 6 (beim Menschen).

Ein Modell der Membrantopologie (das nach Analyse mittels domänenspezifischer Antisera erstellt wurde) ist in Abbildung 1.3 gezeigt (Kroepfl *et al.*, 1996). Es besteht die Annahme, dass MOG als ein Rezeptor wirkt, die genaue Funktion bleibt aber unklar.

1.4 Zielsetzungen dieser Arbeit

Wie in Abschnitt 1.2 dargestellt, ist das Myelinprotein Nogo-A als Inhibitor der Nervenregeneration auf zellbiologischer Ebene gut untersucht. Auf biochemischer und struktureller Ebene ist jedoch wenig über dieses Transmembranprotein bekannt. Bis auf die RTN-Domäne am C-Terminus, zeigt Nogo-A keine Homologie zu bekannten Proteinen.

Um letztendlich die Strukturaufklärung durch Kristallisation und funktionelle Studien zu ermöglichen, wurde hier die humane N-terminale Nogo-A-spezifische Domäne kloniert, bakteriell synthetisiert und bis zur Homogenität gereinigt. Zudem sollte sowohl die Bindung zwischen Nogo-A und NgR als auch zwischen dem IN-1 Antikörper und der N-terminalen Nogo-A spezifischen Domäne charakterisiert werden.

Nachdem in den letzten Jahren viele Gruppen ihr Augenmerk vor allem auf die Rolle der T-Zellen bei der MS gerichtet haben, wendet sich in letzter Zeit das Interesse verstärkt den B-Zellen zu. Dies ist vor allem dadurch begründet, dass die o.g. Oligoklonalen Banden (OKB) eines der typischen Merkmale der MS sind. Diese OKBs, in der klinischen Diagnostik über isoelektrische Fokussierung nachgewiesen, stellen expandierte Immunglobulinfamilien im Liquor dar.

Die Untersuchung humaner Antikörper aus dem Liquor erforderte die Erstellung des rekombinanten Antikörperkonstruktes, Bindungsstudien im Western Blot, Immunhistochemie und *in-vivo*-Pathogenizitätstests. Zur Erprobung und Optimierung der geplanten einzelnen Untersuchungsschritte sollte zunächst ein Fab-Fragment eines charakterisierten Antikörpers hergestellt werden. Des Weiteren sollte MOG im Komplex mit dem 8-18C5 Fab-Fragment kristallisiert werden, um detaillierte Einblicke in ein konformationsabhängiges, möglicherweise immundominantes Epitop von MOG zu erlangen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

Gewebeschnitte

Hirn	<i>Rattus norvegicus</i> , 10 µm transversal
Rückenmark	<i>Rattus norvegicus</i> , 12 µm transversal

Eukaryontische Zellen

Myelomzelllinie X63-Ag8.6.5.3 (Ag8) (Kearney *et al.*, 1979)

Bacteriophagen

VCS-M13 Helferphage, Stratagene GmbH, Heidelberg

Escherichia coli K12-Stämme

CJ236i	<i>dut</i> , <i>ung</i> , <i>thi</i> , <i>relA1</i> [F': <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ZΔM15, Tn10(Tet ^r)] (Geisselsoder <i>et al.</i> , 1987; Fiedler und Skerra, 1999), von A. Skerra, TU München
JM83	<i>ara</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>rpsL</i> (= <i>strA</i>), φ80, <i>lacZ</i> ΔM15 (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985), von A. Skerra, TU München
TG1-F ⁻	<i>supE</i> , <i>hsdΔ5</i> , <i>thi</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>) von A. Skerra, TU München
W3110	F ⁻ , (Bachmann, 1972), von A. Skerra, TU München
XL1-Blue	<i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k -m _k ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ-, <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 [F': <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ZΔM15, Tn10(Tet ^r)] (Bullock <i>et al.</i> , 1987) von A. Skerra, TU München
BI21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> _β (r _β -m _β ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , (DE3), von A. Skerra, TU München
Origami	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> _β (r _β -m _β ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> , <i>ahpC</i> , <i>gor522::Tn10</i> (Tc ^R), <i>trxB::kan</i> von Novagen, Madison, WI, USA
HM125	F ⁻ , Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galk</i> , <i>thi</i> , <i>rpsL</i> (<i>strA</i>), Δ <i>phoA</i> (PvuII) ²⁵ , <i>degP</i> , <i>rpoH15</i> , <i>eda</i> (Meerman und Georgiou, 1994) von G. Georgiou, University of Texas at Austin, Tx, USA.

2.1.2 Plasmide

pASK75 (Skerra, 1994b), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München

pASK88-IN1 (Bandtlow *et al.*, 1996; Broesamle *et al.*, 2000), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München

pASK88-D1.3 (Skerra, 1994a), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München

pASK109-HRS3c (Schlapschy, 2004), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München

pASK106-IN1 (Fiedler *et al.*, 2002), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München

pASK107-IN1 (Fiedler *et al.* 2002), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München

pASK111 (Vogt und Skerra, 2001), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München

pSA1 (Schmidt und Skerra, 1994) aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München
 pMF1 (Fiedler *et al.* 2001), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München
 pGEX-5X von Amersham Bioscience Europe, Freiburg

2.1.3 Oligodesoxynukleotide

Sequenzierungsprimer:

D12: 5'-AAC TGC TCA TCA GAT GGC-3'

F55: 5'-CAC TGG CAC TCT TAC CG-3'

F83: 5'-AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA-3'

PR1: 5'-CGC AGT AGC GGT AAA CG-3'

PR3: 5'-TGG GTG AGC TCG ATG TC-3'

Oligodesoxynucleotide für Mutagenese und PCR:

hz1: 5'-AGTGCCACCTCCGAAAGTCCAAGGTACCGGGA
 GCACGTTTTGGCAATAGTAGATAGTAGATAGC-3'

hz2: 5'-GACATCGAGCTCACCCAA-3'

hz3: 5'-GCCACAGTCCTGTTGATCTCGAG-3'

hz4: 5'-TTGCTGATACCAGTTGACMNNMNNMNAATGTTTTTCAGAAGCACC-3'

hz5: 5'-GAAGGATGTTATTACTAACTAACTGGGCCTGCGCTACGGTAGC-3'

hz6: 5'-GACTCATGCAGTTTAACTTCCATTTTTTGCCCTCGTTATCTA-3'

hz7: 5'-CTGGGTGAGCTCGATGTCCACTTTATTTTCTCCATG-3'

hz8: 5'-GGCCTCTTCGTATGGTGGG-3'

hz9: 5'-ACTGCGGGTGTGACCAAGCG-3'

hz10: 5'-TGGGGATCCCATGCCAGGTGCCTGCGTA-3'

hz11: 5'-GGGAATTCAGCCTTCTGAGTCACCAGTCC-3'

hz12: 5'-CTGCAGGCCGATGGGGCCCTTGCCAGGTGCCTp(S)G-3'

hz13: 5'-GCTGCCTTCTGAGTCACCAGTp(S)C-3'

hz66.1: 5'-GACTATCCATATGAGGATATATAAGGGCGTGATC-3'

hz66.2: 5'-GCTCAGGGAATCAACTAAATCATC-3'

hz14: 5'-GCTACCGGTCTCGGCCAGTTAGTTAGTAATAAp(S)C-3'

hz15: 5'-TACTCTATCTCTGCTTGAGTGp(S)G-3'

sm1: 5'-CGGGTGACGCCAAGCGCTAGCGCAGCCCTGCAGGTC-3'

sm2: 5'-GGTGAGGTTGCGGGAGGCACGGAAGC-3'

sm3: 5'-GGTGAGGTTGCGGATGGCACGGAAGC-3'

sm4: 5'-CTCCTGCAGGCCGTTGCGGTCCAGGTG-3'

hmog1: 5'-ATCACGCGGCCGGGCAGTTCAGAGTGATAGp(S)C-3'

hmog2: 5'-GCTCACCCAGTAGAAAGGATCTTCTACp(S)C-3'

Oligo(dT)₂₀ *Primer* (von Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.4 Enzyme und sonstige Proteine

Alkalische Phosphatase aus Arctic Shrimp	USB, Cleveland, Ohio, USA
Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
	Phosphatase Konjugat

Anti-Human-C κ -Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Anti-Human-C κ -IgG (aus Kaninchen)	Dako GmbH, Hamburg
Anti-Maus-C κ -Alkalische Phosphatase Konjugat	Dako GmbH, Hamburg
Anti-Maus-IgG1-FITC	Dako GmbH, Hamburg
Anti-Maus-IgG1-HRP-Konjugat	Dako GmbH, Hamburg
Maus-IgG1 Kulturüberstand	Dako GmbH, Hamburg
Anti- <i>Strep</i> -tag II-Antiserum	Konjugat IBA GmbH, Göttingen
Anti- <i>Strep</i> -tag II-HRP-Konjugat	IBA GmbH, Göttingen
Benzonase [®] , Reinheitsgrad I (25 U/ μ l)	Avidin Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin (BSA), Frakt. V	E. Merck KGaA, Darmstadt
Carboanhydrase	Carl Roth GmbH &Co., Karlsruhe
DNase I aus Rinderpankreas, 2000 U/mg, Reinheitsgrad I	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Humanes Serum Albumin (HSA), Frakt. V	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	New England Biolabs GmbH, Schwalbach (5 u/ μ l)
Lysozym aus Hühnereiweiß, 95 %	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Komplement, Kaninchen	Dade Behring AG, Marburg
Ni-NTA-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Qiagen GmbH, Hilden
monoklonaler-Maus-IgG1-Antikörper	Dako GmbH, Hamburg
Ovalbumin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (2,5 u/ μ l) Stratagene,	Amsterdam, Niederlande
Proteinase K	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNase A aus Rinderpankreas	Reverse Transkriptase Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Streptactin-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Amersham Buchler GmbH & Co. KG Braunschweig
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	IBA GmbH, Göttingen
<i>Taq</i> DNA-Polymerase <i>High Fidelity</i>	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
Transferrin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase (3 Weiss U/ μ l)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
T4 DNA-Polymerase (3 U/ μ l)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
T4 Polynukleotidkinase (10 U/ μ l)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Trypsin	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
(bovine pancreas lyophilized powder)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

2.1.5 Chemikalien

Aceton	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Acrylamid-Fertiglösungen für Harnstoff-Gele (Sequagel)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Acrylamid-Stammlösung 30 %ig mit 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat, Na ₂ -Salz (ATP)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Agarose, electrophoresis grade	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose (low melting point), electrophoresis grade	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
Ammoniumacetat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck KGaA, Darmstadt;
Ampicillin, Natrium-Salz (Amp)	AppliChem, Darmstadt
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Antifoam A-Stammlösung	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bacto Agar	Acros Organics, Geel, Belgien
Bacto Tryptone	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Betain-Monohydrat	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Blocking Reagent	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Blue Dextran	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Borsäure	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-4-Toluidinsalz (BCIP)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	E. Merck KGaA, Darmstadt
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), > 99 %, DNase-, RNase-frei	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
D-Desthiobiotin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
DEPC-treated H ₂ O	IBA GmbH, Göttingen
Dichlordimethylsilan (2 % v/v in 1,1,1-Trichlorethan)	Invitrogen, Karlsruhe
Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-e'-aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester (NHS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDC)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
1,4-Dithiothreit (DTT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoat) (DTNB; Ellman's Reagenz)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylendiamin-tetraessigsäure-Na ₂ -2H ₂ O (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; AppliChem, Darmstadt
Essigsäure, 99,9 %	Riedel-de-Haën AG, Seelze
Ethanol p.a., 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol technisch	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanolamin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid (1 % w/v in Wasser)	E. Merck KGaA, Darmstadt; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
First Strand Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Gelatine	E. Merck KGaA, Darmstadt
Gibco BRL DMEM Glutamax medium	Invitrogen, Karlsruhe
D(+)-Glucose, Monohydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycogen	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Glutathion (reduziertes)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
GSH-Agarose	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Guanidin-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Pufferan für die Gewebezucht (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Imidazol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Isoamylalkohol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kaliumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Luxol Blau	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Lithiumcarbonat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
MEM (essentielle Aminosäuren)	Invitrogen, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Milchpulver (3 % Fett)	Vitalia GmbH, Sauerlach
Mineralöl (Heavy White Oil) für die PCR	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid	E. Merck KGaA, Darmstadt; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Amresco, Solon, Ohio, USA
Phenol, $\geq 99\%$, redestilliert	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Schuchardt & Co., Hohenbrunn
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
o-Phenylendimaleimid	Acros Organics, Geel, Belgien
Propidiumiodid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure conc. (HCl)	E. Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Sauerstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Stickstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Tetracyclin, Hydrochlorid (Tet)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
ThiaminHydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Triethanolamin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Ultra-Qualität (Tris)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
TRIZOL-LS-Reagenz	GIBCO-BRL, Eggenstein
Trypan Blau	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Harnstoff	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Zinksulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

2.1.6 Standards und Kits

DNA-Größenstandards:

l/BstEII-Verdau

100 bp DNA Leiter

1 kb DNA Leiter

New England Biolabs GmbH, Schwalbach

Protein-Größenstandards:

SDS-PAGE Standard, Low Range

Prestained SDS-PAGE Standard,
Broad RangeBio-Rad Laboratories GmbH, München;
New England Biolabs GmbH, Schwalbach

Kits zur DNA-Isolierung:

JETsorb Gel Extraction Kit

JETquick Plasmid Miniprep

QIAquick Gel Extraction Kit

Genomed GmbH, Bad Oeynhausen

Qiagen GmbH, Hilden

Plasmid Spin Kits:

QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit

QIAprep Plasmid Midiprep Kit

QIAquick PCR Purification Kit

Qiagen GmbH, Hilden

Kits zur DNA-Sequenzierung:

DNA-Sequencing Kit, Big Dye

Terminator Cycle Sequencing

Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt

ECL-Reagenz

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Fast-Red Kit

Abcam plc, Cambridge, UK

Restore™ Western Blot Stripping Buffer

Pierce, Rockford, IL, USA

SuperSignal-Detectionssystem

Pierce, Rockford, IL, USA

2.1.7 Geräte

ABI-Prism 310 Genetic Analyzer

Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt

Analytische Ultrazentrifuge Optima XL-A

Beckmann, Fullerton, CA, USA

Varioklav Typ 500

H & P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim

Bio-Mag 10 Magnetrührer

BCC Spezialgeräte, Göttingen

Brutschränke:

B 5060 EK

Heraeus Christ GmbH, Osterode

BM800

Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach

Pelion

Bayer, Frankfurt/Main

Durchflussdetektoren:

UV/Vis Filter Photometer

Knauer, Berlin

Variable Wavelength Monitor

Knauer, Berlin

2138 Uvicord S

LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

2138 Uvicord SII

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

UV/Vis UV-1 Photometer

Rainin, Woburn, MA, USA

FACS Calibur™

Becton Dickinson, San Jose, USA

ELISA-Photometer SpectraMax 250

Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

ELISA-Photometer

Dynatech, West Sussex, UK

Elektroblot-Apparatur

Eigenbau

Elektrophoresekammern

Eigenbau;

Biometra, Göttingen

Fermenter:

5 u. 10 L-Fermentersystem mit
Umwurfzylinder:

Schütt Labortechnik, Göttingen

C Flow Durchfluß-Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pH Meß- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pO ₂ Meß- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C Pump D Schlauchpumpen-Modul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
pH-Elektrode (Typ 465) I	Ingold Meßtechnik, Steinbach
O ₂ -Sensor (12/320 A-Type)	Mettler-Toledo, Steinbach
Fluorimeter LS 50 B	Perkin-Elmer, Norwalk, CT
Fraktionssammler:	
Redi Frac	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Multirac 2111	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Superrac 2211	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Ultrorac 7000	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
French Press	Spectrone Unicam, Rochester, USA
2003 Slab Gel Dryer	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Glasspritze 50 µl	Hamilton Company, Reno, USA
Heizrührer:	
IKA-Combimag	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG RCT	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG RET	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
Variomag	Monotherm H & P Labortechnik GmbH, München
HPLC:	
Dynamax SD-300 (Pumpe)	Rainin, Woburn, MA, USA
Dynamax UV-1 (Detektor)	Rainin, Woburn, MA, USA
Gradientenmischer	Rainin, Woburn, MA, USA
ÄKTA purifier	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Metallblockthermostate:	
Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux GmbH, Wertheim
Metallblockthermostat 2116	Gebrüder Liebisch, Bielefeld
Mikroskop: Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Netzgeräte:	
TN 300-120	Heinzinger, West Germany
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Power Pack P30	Biometra, Göttingen
LKB 2197	Power supply LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
PCR-Gerät UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
PCR-Gerät Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Peristaltische Pumpen:	
Miniplus 2	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
P1	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
pH-Meter:	
E512	Metrohm, Herisau
pH 526 und pH531	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
pH27	Knick, Berlin

Pipettierhilfen:

Pipetus akku
accu-jet

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Brand GmbH & Co., Wertheim

Pipetten:

Gilson P10, P20, P100, P200, P1000
Multipette 4780

Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Polaroid-Kamera MP4

Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA

Procise 492 Sequenzierer

Applied Biosystems, Weiterstadt

Rollenmischer IDL TRM-V

Kühn & Bayer, Nidderau-Heldenbergen

Signalschreiber:

REC 112
SE 120
2210
Knauer

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
ABB Goerz AG, Wien, Österreich
LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Knauer, Berlin

Schüttelapparate:

Wipptisch WT12
Typ 3012
Typ 3017

Biometra, Göttingen
Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Schüttelinkubatoren:

Modell G25

New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison,
New Jersey, USA

Modell TR-125/ITE-K

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Spektrophotometer:

Ultrospec 2000
Ultrospec 3000
Speed-Vac-Konzentrator
Sterilbank LaminAir HB2472
UV-Transilluminator TI3

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
UniEquip, Martinsried Univapo UVC 150H
Heraeus Christ GmbH, Osterode
Biometra, Göttingen

Vakuumpumpen:

Drehschieberpumpe RD4
Drehschieberpumpe RD15
Membranpumpe MZ2C

Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim

Vortex-Genie 2

Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA

Waagen:

Micro m3p
PAG Oerlikon PJ Precisa junior
2000C PAG Oerlikon Precisa 125 A
R160P
U5000D

Sartorius GmbH, Göttingen
W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt
W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt
Sartorius GmbH, Göttingen
Sartorius GmbH, Göttingen

Wasserbäder:

Haake F6/C25
Julabo PC/8A
Julabo UC/5B

Thermo Haake, Karlsruhe
Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Thermomixer 1460

Braun Melsungen AG, Melsungen

Zentrifugen:

Biofuge A	Heraeus Christ GmbH, Osterode
J-21C und J2-21 mit Rotoren JA-10 und JA-20	Beckman Instruments, München
Labofuge 6000	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Sigma 4K10	Sigma GmbH, Osterode
Sorvall RC 3B Plus mit Rotor H-6000A/HBB-6	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Sorvall RC 5B und RC 5C Plus mit Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Sorvall RMC 14	Sorvall Instruments, Bad Nauheim
Eppendorf 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Chromatographiesäulen	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Diafilm	Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA
Dialyseschläuche:	
Spectra/Por, MWCO: 6-8 kDa	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Spectra/Por, MWCO: 2-3 kDa	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Typ 27, MWCO: 12-16 kDa	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Dispenser-Tips 2,5 und 5 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg; Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20, 60 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
SDS-PAGE:	
Apparaturen, Glasplatten, Spacer, Dichtungen, Kämme	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg; Biometra, Göttingen Eigenbau
Größenausschlußchromatographie-Säulen:	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Superdex 75 HR 10/30	
Superdex 200 HR 10/30	
Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade	
Superdex 200 HiLoad 16/60 prep grade	
Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Konzentratoren:	
Makrosep 10K	Pall GmbH, Dreieich
Mikrosep 10K	Pall GmbH, Dreieich
Vivaspin 4, MWCO: 10 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Vivaspin 15, MWCO: 10 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG

Vivaspin 4, MWCO: 30 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Vivaspin 15, MWCO: 30 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Kunststoffröhrchen:	
Kulturröhrchen, 13 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PP-Röhrchen, 15 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PP-Röhrchen, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cellstar PP-Röhrchen, 15 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
CellstarPP-Röhrchen, 50 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Kulturgefäße (Zellkultur)	Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
Linbro-Gewebekulturplatte	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Membranfilter:	
Immobilon-P (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
GVWP (0,22 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Nitrocellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Falcon Micro Test III Flexible Assay-Plates	Becton Dickinson Labware, Oxnard, CA, USA
Objekträger	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
PD-10 Gelfiltrationssäulen	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Petrischalen aus Polystyrol	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipetten-Spitzen:	
blau (200-1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
gelb (5-200 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
kristallklar (0,5-10 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Combitips Biopur (RNase frei)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Polaroidfilm 667	Polaroid Deutschland, Offenbach
Röntgenfilm X-Omat DS	Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y, USA
Schwan-Stabilo-Klarsichtfolie aus PP	Müller & Nemecek GmbH, Frankfurt/Main
Säulenmaterialien:	
Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
POROS MC/M	PerSeptive Biosystems GmbH, Wiesbaden
Sterilfilter:	
Filtropur (0,45 und 0,22 µm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Millex HV (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Membransterilfilter (0,22 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman-Filterpapier 3MM	Bender & Hobein AG, München
Transfermembranen:	
Nitrozellulose	Schleicher & Schuell, Dassel
PVDF	Millipore GmbH, Eschborn
Zentrifugenbecher für Beckman-Rotoren JA-10 und JA-20, sowie für Sorvall-Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	Nalgene Company, New York, USA

2.1.9 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle Medien und Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen, Proteinen und DNA wurden entweder im Autoklav oder durch Filtration sterilisiert. Mit Ausnahme der Kulturmedien, die mit entionisiertem Wasser angesetzt wurden, wurden alle Lösungen unter Verwendung von Millipore® Wasser hergestellt. Sofern nicht anders angegeben, wurden Kulturplatten bei 4°C und Lösungen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Antibiotika wurden den Flüssigmedien erst kurz vor der Verwendung zugesetzt.

Antibiotika-Stammlösungen:

Für die Herstellung von Selektivmedien wurden folgende Antibiotika-Stammlösungen verwendet; die Lösungen wurden bei -20 °C gelagert, wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert (0,45 µm).

Ampicillin (Amp):	100 mg/ml in H ₂ O (1:1000 zum Medium)
Chloramphenicol (Cam):	30 mg/ml in 70 % Ethanol (1:1000 zum Medium)
Kanamycin (Kan):	35 mg/ml in Wasser (1:500 zum Medium)
Tetracyclin (Tet):	10 mg/ml in 70 % v/v Ethanol (1:1000 zum Medium)

LB-Medium:

- Bacto Tryptone 10 g/l
- Bacto Yeast Extract 5 g/l
- NaCl 5 g/l
- Bacto Agar 15 g/l (nur für Kulturplatten)
- Mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und im Autoklav sterilisiert.

Anhydrotetracyclin (aTc):	2 mg/ml in DMF (1:10.000 zum Medium) oder 5 mg/ml in DMF (1:10.000 zum Medium)
---------------------------	---

Lösungen für die Fermentation:

A) Mineralsalzlösung:

- 31 mM Na₂HPO₄ • 2 H₂O 5,51 g/l
- 19 mM KH₂PO₄ 2,58 g/l
- 25 mM NH₄Cl 1,33 g/l
- 5 mM Na₃-Citrat • 2 H₂O 0,47 g/l

Die Mineralsalzlösung hat nach dem Autoklavieren einen pH-Wert von 6,9.

- B) Glucoselösungen: 20 % (w/v) Glucose (separat autoklavieren)
50 % (w/v) Glucose (separat autoklavieren)
- C) MgSO₄-Stammlösung: 1 M MgSO₄ (separat autoklavieren)
- D) Thiamin-Stammlösung: 10,0 mg/ml Thiamin-Hydrochlorid (sterilfiltriert)
- E) FeCl₃-Stammlösung: 35,0 g/l FeCl₃ • 6 H₂O (mit konz. HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert; sterilfiltriert)
- F) Zn-Acetat-Stammlösung: 8,0 g/l Zn-Acetat • 2 H₂O (sterilfiltriert)

G) Spurenelement-Stammlösung (sterilfiltriert):

MnCl₂ • 4 H₂O 3,0 g/l
CuCl₂ • 6 H₂O 0,3 g/l
H₃BO₃ 0,6 g/l
CoC₁₂ • 6 H₂O 0,5 g/l
(NH₄)₆Mo₇O₂₄ • 4 H₂O 1,2 g/l
4 mM EDTA

H) Weitere Lösungen für die Fermentation:

12,5 % (w/v) NH₃ zur pH-Regulierung

Antifoam A, 30 % wässrige Lösung zur Unterdrückung von Schaumbildung

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:**TAE-Puffer:**

40 mM Tris
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA

TBE-Puffer:

89 mM Tris
89 mM Borsäure
2 mM EDTA

10x Auftragspuffer für Agarosegele:

Bromphenolblau 1 mg/ml
Xylencyanol 1 mg/ml
Glycerin 50 % v/v

Puffer für die SDS-PAGE:**1x SDS-Laufpuffer nach Fling & Gregerson (1986):**

50 mM Tris
190 mM Glycin
SDS 1 g/l
pH 8,8 stellt sich ein.

4x Lower-Tris:

3M Tris/HCl pH 8,85
SDS 4 g/l

4x Upper-Tris:

0,5 M Tris/HCl pH 6,8
SDS 4 g/l

5x Auftragspuffer:

250 mM Tris/HCl pH 8,0

SDS 7,5 % w/v

Glycerin 25 % v/v

Bromphenolblau 0,25 mg/ml

2-Mercaptoethanol 12,5 % v/v (bei reduzierendem Auftragspuffer)

Färbelösung:

Essigsäure 10 % v/v

Methanol 40 % v/v

Coomassie Brilliantblau R-250 0,25 % w/v

Entfärbelösung:

wie Färbelösung, aber ohne Coomassie Brilliantblau

Aufbewahrungslösung:

Essigsäure 7 % v/v

Glycerin 2 % v/v

Lösungen für die Silberfärbung von SDS-Gelen:**Fixierlösung:**

Methanol 50% v/v

Essigsäure 7,2% v/v

Formaldehyd (20 µl einer 37 %igen Lösung zu 40 ml Fixierlösung)

Waschpuffer:

50% Ethanol

Vorbehandlungspuffer:

Na₂S₂O₃ 200 µg/ml

Imprägnierlösung:

AgNO₃ 2 mg/ml

Formaldehyd (30 µl einer 37 %igen Lösung zu 40 ml)

Entwickler:

Na₂CO₃ 30 mg/ml

Formaldehyd (20 µl einer 37 %igen Lösung zu 40 ml)

Vorbehandlungspuffer (s.o./ 0,8 ml zu 40 ml)

Lösungen für die Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA:

Chloroform/Isoamylalkohol:

Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung im Verhältnis 24:1

Phenol:

Kristallines Phenol $\geq 99\%$ (unter Schutzgas destilliert) wird bei 65 °C im Wasserbad geschmolzen, mit 1/2 Volumen Wasser gemischt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Phenol/Chloroform:

Mit Wasser gesättigtes Phenol (s. o.) wird im Verhältnis 1:1 mit Chloroform/Isoamylalkohol gemischt und bei 4 °C aufbewahrt.

3 M Na-Acetat-Lösung pH 4.8:

3 M Na-Acetat wird mit Eisessig auf pH 4,8 eingestellt

Lösungen für Zellkultur:

Kulturmedium:

Gibco BRL DMEM Glutamax medium 500 ml

Fetales Kälberserum (FCS) 10 % v/v

Penicilin+Streptomycin 1% v/v

MEM (essentielle Aminosäuren) 1%

Einfriermedium:

Kulturmedium 45 % v/v

Fetales Kälberserum 45 % v/v

DMSO 10 % v/v

Sonstige Puffer:

AP-Puffer:

100 mM Tris

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

pH 8,8 mit HCl einstellen

FACS-Puffer:

PBS (s.o.)

0,3% v/v Fetales Kälberserum (FCS)

10 x Formamid-Auftragspuffer:

Formamid 98 % v/v

0,5 M EDTA 2 % v/v

Bromphenolblau 2 % w/v

Puffer für die Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC-Puffer):

50 mM NaH₂PO₄
0,5 M Betain
pH 7,5 mit 5 M NaOH einstellen

PBS:

4 mM KH₂PO₄
16 mM Na₂HPO₄
115 mM NaCl
pH 7,4 stellt sich ein

PBS/T:

PBS mit 0,1 % v/v Tween 20

PBS/T 0,5:

PBS mit 0,5 % v/v Tween 20

Periplasma-Aufschlusspuffer:

500 mM Saccharose
100 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

Benzonase-Puffer:

100 mM Tris/HCl pH 8,0
5 mM MgCl₂

Puffer für die Streptavidin-Affinitätschromatographie (SA-Puffer):

100 mM Tris/HCl pH 8,0
50 mM NaCl
1 mM EDTA pH 8,0

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM
1 mM EDTA

2.2 Molekularbiologische und gentechnische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten. Die Selektion auf Plasmide erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium.

Flüssigkulturen wurden mit LB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika angesetzt. Für Kulturen im 4 ml-Maßstab wurden 15 ml Kulturröhrchen verwendet, für größere Ansätze Erlenmeyerkolben mit mindestens 2,5 fachem Gefäßvolumen. Bis zu einem Volumen von 50 ml wurden die Kulturen direkt mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft. Die größeren Kulturen wurden im Verhältnis 1:50 mit einer stationären Übernachtskultur inokuliert und bei 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Zelldichten wurden durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm (OD_{550}) bestimmt. Zur dauerhaften Konservierung von mit Plasmiden transformierten *E. coli*-Stämmen wurde 0,5 ml einer stationären Übernachtskultur mit 1 ml sterilisiertem 87 % v/v Glycerin gemischt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Um *E. coli*-Zellen in eine transformationskompetente Form zu überführen, wurde die klassische $CaCl_2$ -Methode (Cohen, 1972; Sambrook, 1989) eingesetzt. Man erhielt je nach *E. coli*-Stamm ca. 105 bis 106 Transformanten pro μ g Plasmid-DNA.

50 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{550} = 0,5$ wurde die Kultur in ein 50 ml-Kunststoffröhrchen überführt und die Zellen wurden durch Zentrifugation (4100 g, 4 °C, 10 min) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 40 ml eiskalter 0,1 M $MgCl_2$ -Lösung aufgenommen und wie zuvor zentrifugiert. Das dabei erhaltene Sediment wurde in 20 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 2 ml 50 mM $CaCl_2$, 15 % v/v Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 200 μ l entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Dampfautoklaven sterilisiert und vor der Verwendung auf 4 °C abgekühlt.

Zur Transformation wurden 200 μ l Zellsuspension mit typischerweise 1 ng Plasmid-DNA oder 5 μ l eines Ligierungsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in ein 15 ml Kulturröhrchen überführt und 1 min im Wasserbad auf 42 °C erwärmt. Anschließend wurden 2 ml-LB-Medium zugegeben und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 μ l auf einer LB-Agarplatte, welche das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

2.2.3.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Plasmidisolierungskits der Firmen Genomed und Qiagen verwendet, deren Prinzip auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birboim, 1979) beruht.

Für die Analyse von Transformanten nach der Neukonstruktion von Plasmiden erfolgte die Isolierung im analytischen Maßstab. Dazu wurde eine 4 ml Übernachtskultur der Transformanten verwendet und die Isolierung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in 75 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8 aufgenommen und bei 4 bzw. -20°C gelagert.

Im präparativen Maßstab wurden 50 ml einer stationären Übernachtskultur zentrifugiert und die Plasmid-DNA gemäß den Herstellerangaben („Plasmid-Midi-Kit“ der Firma Qiagen) aufgearbeitet. Im letzten Schritt wurde die DNA in 100 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8 aufgenommen, wobei ca. 100 µg Plasmid-DNA erhalten wurden.

2.2.3.2 Präparation von einzelsträngiger Plasmid-DNA

Die für die Mutagenese nach Kunkel *et al.* (1987) benötigte zirkuläre, einzelsträngige DNA (ssDNA) wurde ausgehend von Plasmiden, die die intergenische Region des filamentösen Phagen f1 trugen, präpariert. Durch Infektion eines entsprechend transformierten *E. coli*-Stammes CJ236i mit dem VCS-M13 Helfer-Bakteriophagen wurde die Plasmid-DNA in einzelsträngiger Form in Phagemiden verpackt. Aus den sezernierten Phagemiden konnte die ssDNA daraufhin isoliert werden (Geisselsoder *et al.*, 1987; Vieira und Messing, 1987). Der verwendete Stamm CJ236i trägt ein F'-Plasmid (Skerra, unveröffentlicht) und kann somit die für die Infektion mit filamentösen Bakteriophagen vom Typ M13 benötigten Sex-Pili ausbilden. Darüber hinaus bewirken die chromosomalen Mutationen dut- und ung- den partiellen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin in die DNA.

4 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin bzw. Chloramphenicol) wurden mit einer Kolonie des *E. coli*-Stammes CJ236i, der mit dem gewünschten Plasmid transformiert worden war, angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Mit dieser stationären Kultur wurden 20 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum im Verhältnis 1:100 inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer $OD_{550} = 0,26$ geschüttelt. Dieser Kultur wurde 1 ml entnommen, mit VCS-M13 Helfer-Bakteriophagen entsprechend einer multiplicity of infection (moi) von 10 infiziert und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die infizierte Kultur vollständig in 20 ml LB/Kan-Medium, das mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (JA-20, 10000 rpm, 12100 g, 4 °C, 10 min), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit 10 µl einer 10 mg/ml RNase A-Lösung versetzt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Phagemidpartikel durch Zugabe von 5 ml einer frisch angesetzten Lösung von 3,5 M Ammoniumacetat, 20 % PEG 8000 für 30 min auf Eis gefällt. Dieser Ansatz wurde zentrifugiert (JA-20, 12200 rpm, 18000 g, 4 °C, 15 min), das Präzipitat in 200 µl Hochsalz-Puffer (300 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 18500 g, 4 °C, 2 min) entfernt.

Zur Abtrennung der Phagenhüllproteine wurde der Überstand zweimal mit 200 µl Phenol und je einmal mit 200 µl Phenol/Chloroform und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (siehe Abschnitt 2.2.5.7). Um die bei der Extraktion auftretenden Verluste an DNA gering zu halten, wurden die organischen Phasen in der gleichen Reihenfolge mit 100 µl TE-Puffer rückextrahiert. Die beiden wässrigen Phasen wurden vereinigt (ca. 300 µl), und die ssDNA wurde durch Zugabe von 30 µl (1/10 Volumen) 7,8 M Ammoniumacetat und 750 µl (2,5 Volumina) Ethanol für mindestens 1 h bei -20 °C gefällt. Das nach der Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 18500 g, 4 °C, 15 min) erhaltene Präzipitat wurde mit 500 µl 70 % v/v Ethanol gewaschen und im Speed-Vac-Konzentrator für 2 min getrocknet. Die ssDNA wurde in 20 µl TE-Puffer gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Abschätzung der isolierten DNA-Menge sowie zur Kontrolle des Reinheitsgrades wurde 1 µl einer 1:10 verdünnten Lösung auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Die erhaltenen Ausbeuten lagen je nach Plasmid zwischen 10 und 100 µg ssDNA.

2.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Gesamt-RNA-Präparation erfolgte mit Hilfe von TRIZOL-LS-Reagenz, das auf dem Prinzip der Guanidinium-Phenol-Chloroform Extraktion (Chomczynski und Sacchi, 1987) beruht. 250 µl B-Zellsuspension (ca. 1×10^6 Zellen) wurden mit 750 µl Trizol lysiert und mit 200 µl Chloroform versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und 30-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C wurde die obere, wässrige, RNA-enthaltene Phase abpipettiert, 10 µl -20°C wurde die RNA gefällt und anschließend bei 4°C mit 14000 rpm 20 min abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen, nochmals abzentrifugiert, luftgetrocknet und in 22 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mittels Spektralphotometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Verdünnung von 1:40. Die Reinheit der RNA-Lösung wurde über eine Kontrollmessung bei 280 nm (Absorptionbereich von Proteinen) bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.5 Reverse Transkription RNA in cDNA

Aufgrund ihrer relativen Instabilität wurde die mRNA vor weiterer molekularbiologischer Verwendung mittels einer reversen Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben.

Die erforderliche Menge an RNA (2-5 µg) wurde auf ein Volumen von 11 µl DEPC-H₂O eingestellt, danach 10 min bei 70°C inkubiert, um evtl. Sekundärstrukturen aufzulösen, und anschließend auf Eis gestellt.

Daraufhin wurde der Ansatz kurz auf 42°C erwärmt und die restlichen Reagentien, d.h. 1 µl Oligo-dT-Primer (20 ng/µl), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 2 µl Dithiothreitol (0.1 M), 4 µl 5x First Strand Buffer, 1 µl Reverse Transkriptase (200 u) wurden zugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte 60 min bei 42°C. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz im Anschluss für 10 min auf 70°C temperiert.

2.2.6 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurde generell 1 % w/v Suspension von Agarose in TAE-Puffer in der Siedehitze gelöst. Nach Abkühlen wurde 1/10.000 Volumen einer 1 % w/v Ethidiumbromidlösung zugegeben und die klare Lösung in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformer gegossen. Anschließend wurde das erstarrte Gel in eine mit TAE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und pro Tasche mit 10 µl DNA-Lösung, die vorher mit 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer versetzt worden war, beladen. Die Elektrophoresedauer betrug 60 min bei einer Spannung von 90 V. Anschließend wurden die DNA-Fragmente anhand der Interkalation des Ethidiumbromids durch Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Rotfilters photographiert.

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese im präparativen Maßstab durchgeführt. Im Gegensatz zur analytischen Gelelektrophorese wurde hier LMP-Agarose verwendet. Um Strahlenschäden zu vermeiden, wurde die DNA möglichst kurz bei verminderter Strahlenintensität sichtbar gemacht. Das Genfragment, als Bande in der Agarose, wurde mit dem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe eines Gel-Extraktions Kits (Genomed) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

2.2.7 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung

Die Phenol/Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung diente der Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 40 µl 3M NaOAc pH 4,8 versetzt, das Gesamtvolumen mit H₂O auf 400 µl eingestellt und mit 400 µl Phenol/Chloroform durch Schütteln gut gemischt. Nach Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere Phase isoliert und mit 1 ml Ethanol versetzt. Nach mindestens 30 min Inkubation bei -20°C wurde der Ansatz zentrifugiert (18500 g, 4°C, 30 min). Man erhielt ein kleines gelartiges Präzipitat, das noch einmal vorsichtig mit eiskaltem 750 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet wurde. Je nach Verwendungszweck wurde die DNA in 20 bis 100 µl TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.8 *In vitro*-Modifizierung von DNA

2.2.8.1 5'-Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Durch 5'-Phosphorylierung von DNA-Fragmenten (Oligodesoxynukleotiden, ungeschnittenen PCR-Fragmente) wurde deren kovalente Verknüpfung mit dem freien 3'-Ende eines DNA-Moleküls durch T4 DNA-Ligase ermöglicht. Dies war z. B. für die Zirkularisierung des durch DNA-Polymerase *in vitro* synthetisierten DNA-Stranges im Verlauf der ortsgerichteten Mutagenese notwendig (siehe Abschnitt 2.2.8.2). Die Phosphorylierung geschah mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase (PNK). Oligodesoxynukleotide bzw. PCR-Fragmente (200 pmol) wurden mit 3 µl 10x T4 Polynukleotidkinase-Puffer (700 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 50 mM Dithiothreitol, DTT), 1,2 µl 10 mM ATP und 0,5 µl (5 u) T4 Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 65 °C inkubiert, um die Polynukleotidkinase zu inaktivieren. Der Anteil des phosphorylierten Oligonukleotides bzw. PCR-Fragments, der nicht sofort für die ortsgerichtete Mutagenese bzw. Ligierung eingesetzt wurde, wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.8.2 Ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel

Die ortsgerechte Mutagenese wurde nach Vorschrift von Geisselsoder *et al.* (1987) entsprechend der Methode von Kunkel *et al.* (1987) durchgeführt. Dabei wird zunächst ein Oligodesoxynukleotid, welches die gewünschten Substitutionen trägt, mit der komplementären ssDNA des zu mutierenden Plasmids unter Ausbildung entsprechender Basenfehlpaarungen hybridisiert. In der sich anschließenden Polymerase-Reaktion dient das Oligodesoxynukleotid als *Primer* für die Synthese des zweiten DNA-Strangs, der mit Hilfe einer DNA-Ligase schließlich kovalent zirkularisiert wird.

Aufgrund der Herkunft des parentalen Stranges aus dem *E. coli*-Stamm CJ236i (siehe Abschnitt 2.2.3.3) und des damit verbundenen teilweisen Einbaus von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin wird ein Selektionsvorteil für den mutierten synthetischen Strang erzielt. Bei der Transformation eines ung⁺-Stammes (z. B. JM83, XL1-Blue) mit dem semisynthetischen DNA-Hybrid wird der parentale Strang durch das zelleigene Ung-System partiell degradiert und somit auf die im neu synthetisierten Strang kodierte Mutation selektiert.

Die Hybridisierung erfolgte jeweils in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 1 µl 10x Hybridisierungspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM MgCl₂), ca. 200 ng einzelsträngiger DNA (Abschnitt 2.2.3.3) und 3,3 pmol des phosphorylierten Oligodesoxynukleotids (Abschnitt 2.2.5.1). Der Ansatz wurde für 5 min auf 80 °C erhitzt, im Verlauf von mindestens 2 h langsam auf ca. 20 °C abgekühlt und schließlich auf Eis gestellt. Zur Neusynthese des zweiten DNA-Strangs wurde die Lösung zunächst auf Eis mit 1 µl 10x Synthesepuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM ATP, je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 3 u T4 DNA-Polymerase (New England Biolabs) sowie 3 u T4 DNA-Ligase (Promega) versetzt. Erst wurde für 5 min auf Eis, dann für 5 min bei RT und schließlich für 90 min bei 37 °C inkubiert. 5 µl des Reaktionsansatzes wurden anschließend mit 45 µl TE-Puffer verdünnt, 5 µl davon für die Transformation von *E. coli* JM83 verwendet und die restlichen 45 µl der Lösung bei -20 °C gelagert. Die verbliebenen 8 µl der unverdünnten Lösung wurden zur Kontrolle der *in vitro*-Reaktion auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen.

2.2.8.3 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Restriktionsanalyse von Plasmiden sowie zur Präparation von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die enzymatische Reaktion erfolgte dabei jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem bei der angegebenen Temperatur. Sollte eine Spaltung mit mehreren Restriktionsenzymen bei gleicher Temperatur erfolgen, wurde derjenige Puffer gewählt, in dem alle Enzyme die maximale Aktivität besaßen. Benötigten die Endonukleasen unterschiedliche Puffer oder verschiedene Reaktionstemperaturen, wurden die Reaktionen nacheinander, gegebenenfalls unter Erhöhung der Salzkonzentration durchgeführt.

2.2.8.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen

Zur selektiven Amplifizierung von Genen oder deren Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) verwendet. Die in der PCR eingesetzten Oligodesoxynucleotide flankierten den zu amplifizierenden Bereich und hatten an ihrem 3'-Ende eine aus mindestens 18 Basen bestehende, zur Matrize komplementäre Sequenz.

Wurde für die PCR die *Pfu* DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991) eingesetzt, die sich aufgrund ihrer *Proofreading*-Aktivität durch eine niedrige Fehlerrate auszeichnet, wurden die eingesetzten

Primer vor der 3' - 5' - Exonukleaseaktivität dieses Enzyms geschützt. In diesem Fall wurden modifizierte *Primer* verwendet, die an ihrem 3'-Terminus eine einzelne Phosphorthioatbindung besaßen (Skerra, 1992).

Der Standard-Reaktionsansatz für eine PCR mit der *Taq* DNA-Polymerase (Chien *et al.*, 1976) enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl 0,01-1 µg Matrizen-DNA und je 25 pmol der beiden *Primer*. Weiterhin enthielt der Ansatz 5 µl 10x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100), 3 µl MgCl₂ (25 mM) sowie 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Wurde die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, wurden 5 µl des mitgelieferten 10x *Pfu*-Puffers (200 mM Tris/HCl, pH 8,8, 20 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mg/ml BSA) verwendet, in dem bereits MgCl₂ enthalten war. Nach Auffüllen mit H₂O auf 50 µl wurde der Reaktionsansatz im Thermocycler für 2 min auf 94 °C erhitzt und 2,5 u der entsprechenden Polymerase wurden zugegeben (*Hot Start*-Technik). Die PCR wurde in aufeinanderfolgenden Zyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 1 min; 2. Hybridisierung (*Annealing*) der *Primer* an die DNA-Matrix bei 55 bis 60 °C (je nach Schmelztemperatur des gebildeten Hybrids) für 1 min; 3. Synthese der DNA bei 72 °C für 1,5 min (Polymerase-Reaktion). Der Zyklus wurde in der Regel 25mal durchlaufen und der Ansatz schließlich zur Vervollständigung der Syntheseprodukte für 5 min bei 60 °C inkubiert. Zum Vergleich wurde ein Reaktionsansatz ohne Matrizen-DNA mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen nachzuweisen.

2.2.8.5 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die Ligierungsreaktion wurde generell mit Hilfe der T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei einer Temperatur von 16°C und Inkubation über Nacht durchgeführt. Für einen Standardansatz wurden 0,5 µl T4 DNA-Ligase (3 Weiss u/µl; Promega), der vom Hersteller mitgelieferte Puffer und je ca. 50 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente eingesetzt. Zur Kontrolle wurden 50 fmol des Vektorfragments ohne Insert der Ligierungsreaktion unterworfen. 5 µl des Ligierungsansatzes wurden anschließend für die Transformation CaC₁₂-kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

2.2.9 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die Analyse von DNA-Abschnitten erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM 310-Sequenzierautomaten. Dazu wurde der ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet. Dieser enthält eine modifizierte *Taq* DNA-Polymerase (*AmpliTaq*; Tabor & Richardson, 1995) sowie Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), die mit jeweils unterschiedlichen Dichlorrhodamin-Molekülen gekoppelt sind (Rosenblum *et al.*, 1997). Auf diese Weise wird die naszierende DNA-Kette während der Polymerasereaktion abgebrochen und gleichzeitig mit dem der Terminatorbase entsprechenden Fluorophor markiert. Die so entstandenen DNA-Fragmente werden im Sequenziergerät mittels Kapillar-Elektrophorese in einem geeigneten Polymer (Performance Optimized Polymer 6, POP-6TM) aufgetrennt und ihre Fluoreszenzgruppen durch einen Argonionen-Laser angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wird von einer CCD (Charge-Coupled Device)-Kamera detektiert und als digitales Signal an einen Power Macintosh G3 Rechner weitergeleitet. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe einer geeigneten Software (ABI PRISM DNA Sequencing Analysis 3.3) interpretiert und als Elektropherogramm bzw. als Textdatei ausgegeben.

Zu 4 µl BigDye™ Ready Reaction Mix wurden je 2 µl Plasmid-DNA (ca. 200 ng), 2 µl eines

geeigneten *Primers* (1 μ M) und 2 μ l H₂O gegeben. Die Mischung wurde mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet und 25mal folgendem PCR-Zyklus unterworfen: 96 °C, 30 s; 55 °C, 15 s; 60 °C, 4 min. Danach wurde das PCR-Produkt durch Zugabe von 1 μ l 3 M Na-Acetat pH 4,8 und 25 μ l Ethanol (p. a.) für 20 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 20 min, 14.000 rpm), mit 70 % (v/v) Ethanol (p. a.) gewaschen, unter Vakuum (Speed-Vac) getrocknet und in 12 μ l des mitgelieferten TSR-Puffers resuspendiert. Nach Denaturierung der Probe bei 95 °C für 2 min wurde diese in ein dafür vorgesehenes Reaktionsgefäß überführt und im ABI PRISM 310-Sequenziergerät platziert. Das Gerät wurde durch den Einbau der Kapillare, Befüllen des Pumpenblocks mit Polymer und Bereitstellung des Elektrophoresepuffers nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Die Sequenzanalyse wurde schließlich mit Hilfe der Kontroll-Software (ABI PRISM 310 Data Collection) gestartet.

2.2.10 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* durch Sekretion in das Periplasma

Die Sekretion einer Polypeptidkette in den periplasmatischen Raum von *E. coli* erfolgte durch die Verwendung von Expressionsvektoren, auf denen das Strukturgen des zu produzierenden Proteins als Fusion mit dem Gen für eine bakterielle Signalsequenz (*OmpA* bzw. *PhoA*) vorlag (Skerra und Plückthun, 1988). Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran nach Induktion der Genexpression konnte die Periplasmafraktion mit dem rekombinanten Protein isoliert werden.

2.2.10.1 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben

2 l LB/Amp- bzw. LB/Cam-Medium wurden in einem 5 l-Erlenmeyerkolben im Verhältnis 1:50 mit der stationären Übernachtskultur (s 2.2.1) angeimpft. Die Kultur wurde bei 22 °C und 200 rpm geschüttelt und ihr Wachstum durch stündliche Probenentnahme zur Messung der Optischen Dichte (OD₅₅₀) verfolgt. Bei einer OD₅₅₀ von 0,5 wurde mit 200 μ l Anhydrotetracyclinlösung in DMF (2 mg/ml) induziert (Endkonzentration: 200 μ g/l). Die Induktionsdauer betrug je nach verwendetem Plasmid 2 bis 3 h.

Zur Ernte der Zellen wurde die Kultur auf sechs Zentrifugenbecher verteilt und zentrifugiert (4 °C, 15 min, 4200 g). Danach wurde der Medienüberstand vollständig abgenommen und die sedimentierten Zellen wurden auf Eis in insgesamt 20 ml eiskaltem Saccharose-Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert und in einem 50 ml Kunststoffröhrchen für die Dauer von 30 min auf Eis inkubiert. Zur Präparation des rekombinanten NogoA-Fragmentes wurde diese Suspension zusätzlich mit 4 mg Lysozym versetzt. Anschließend wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (Sigma 4K10, 5.000 rpm, 4 °C, 15 min sowie SS-34, 15000 rpm, 4 °C, 15 min). Der periplasmatische Extrakt wurde anschließend zur Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie über Nacht gegen das 100fache Volumen an entsprechendem Chromatographie-Puffer dialysiert.

Gesamtzellproben der Kultur zur Analyse im SDS-Page erhielt man durch Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 4 °C, 2 min) von 1 ml der Kultur und anschließende Resuspendierung der Zellen in 80 μ l Benzonalösung (12,5 U/ml in Benzonal-Puffer). Durch Zugabe von 20 μ l 5x Auftragspuffer (reduzierend) für SDS-PAGE wurden die Zellen lysiert. Im Verlauf einer einstündigen Inkubation bei 4 °C wurden die freigesetzten Nukleinsäuren durch die Benzonalase hydrolysiert und das Lysat wurde bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C eingefroren.

2.2.10.2 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter

Größere Mengen eines rekombinanten Proteins (< 5 mg) wurden nach einer von Schiweck & Skerra (1995) etablierten Methode durch Fermentation von *E. coli* hergestellt.

Bakterienzellen wurden hierbei in einem 5 L bzw. 10 L-Fermentergefäß in einem Mineralsalzmedium kultiviert, dem Ammoniak als Stickstoff- und Glucose als Kohlenstoffquelle zugeführt wurden. Durch Kontroll- und Regeleinheiten für die Temperatur, den pH-Wert (über die Ammoniaklösung) und den Sauerstoffpartialdruck wurden homöostatische Bedingungen während des gesamten Verlaufs der Fermentation gewährleistet. Als Expressionsstamm dienten der *E. coli* K12 Wildtyp W3110, und der Protease-defiziente Stamm HM125 (Meerman und Georgiou, 1994).

Als Vorvorkultur wurden 2 ml mit entsprechendem Antibiotikum versetztes LB-Medium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 6-8 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte daraufhin in 180 (360) ml Mineralsalzlösung (Die Angaben in Klammern gelten für den 8 L-Maßstab), der 20 (40) ml 20 % (w/v) Glucose, 2 (4) ml 1 M MgSO₄, 200 (400) µl Antibiotika-Stammlösung und 200 (400) µl Thiamin-Stammlösung zugesetzt worden waren. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1:1000 mit der Vorvorkultur angeimpft und für ca. 26 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zelldichte der stationären Vorkultur betrug typischerweise OD₅₅₀ = 1,5-2,0. Zur Bestimmung der Optischen Dichte wurden der Kultur entnommene Proben im Verhältnis 1:10 mit der Mineralsalzlösung verdünnt und im Spektrometer bei 550 nm vermessen.

Das Kulturgefäß wurde mit 3,5 l (7 l) Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert und auf dem Magnetrührer fixiert. Vor dem Inokulieren der Fermenterkultur wurde die Fermentationslösung auf 30 °C temperiert und über einen Trichter 400 (800) ml 20 % (w/v) Glucose, 40 (80) ml 1 M MgSO₄, je 4 (8) ml der entsprechenden Antibiotika-Stammlösung sowie der Thiamin-Stammlösung, je 2 (4) ml FeCl₃- und Zn-Acetat-Lösung, 5 (10) ml Spurenelement-Lösung sowie 100 (200) µl 30 %ige Antifoam A-Lösung hinzugegeben. Die Belüftung fand zunächst durch Druckluft statt, worauf dem im begasten Medium herrschenden Sauerstoffpartialdruck der relative Wert "100 %" zugeordnet wurde. Während des Verlaufs der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck durch gesteuerte Begasung mit Druckluft bzw. reinem Sauerstoff auf einen Wert ≈30 % des ursprünglichen Sättigungsdrucks eingestellt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak bei pH 7,0 konstant gehalten. Die Rührgeschwindigkeit betrug 470 rpm (entsprechend 40 % der Maximalleistung des Geräts). Das Medium wurde mit der gesamten stationären Vorkultur (200 bzw. 400 ml) angeimpft und für 2 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Temperatur auf 25 °C erniedrigt und es wurden nochmals 300 (600) µl Antifoam A zugegeben.

Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde 50 %ige (w/v) Glucose nach folgendem Protokoll zudosiert:

Ab einer Zelldichte von OD ₅₅₀	= 7,5	Zugabe mit	14 ml/h
	= 12,5	"	20 ml/h
	= 18,5	"	30 ml/h
	= 22,5	"	40 ml/h

Weiterhin wurden der Kultur bei OD₅₅₀ = 13 nochmals je 2 (4) ml Fe- bzw. Zn-Stammlösung und 5 (10) ml der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte

von $OD_{550} = 20$ durch Einstellen einer Konzentration von 0,5 mg Anhydrotetracyclin pro l Kultur induziert, die Kultivierung für weitere 2,5 h fortgesetzt und die Zellen wurden durch Zentrifugation (Sorvall RC 3B plus-Zentrifuge, H-6000 A- Rotor, 4 °C, 20 min, 5.000 rpm) geerntet.

Diesedimentierten Zellen wurden in ein kaltes 600 (1000) ml-Becherglas überführt und in vorgekühltem Periplasma-Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 M Saccharose) für 10 min auf einem Magnetrührer (300 rpm) resuspendiert. Das eingesetzte Puffervolumen betrug 2 ml l-1 OD-1. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 15 mM EDTA (0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0) und 250 µg Lysozym/ml (Lysozym-Stammlösung: 20 mg/ml im Aufschlusspuffer, frisch angesetzt) eingestellt und für 20 min auf Eis gerührt, um einen vollständigen Periplasmaaufschluss zu erreichen. Der periplasmatische Proteinextrakt wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt (Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500-Rotor, 4 °C, 20 min, 11.500 rpm) von den Sphäroplasten grob getrennt. In einem zweiten Zentrifugationsschritt (40 min, unter sonst gleichen Bedingungen) wurde der Extrakt von verbliebenen Zellen und Zellresten geklärt.

Da die in dieser Arbeit durch Fermentation hergestellten rekombinanten Proteine das *Strep*-tag-Affinitätsanhängsel trugen, wurde der periplasmatische Proteinextrakt gegen SA-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) dialysiert (3 x gegen 5 bzw. 10 l). Ausgefallenes Protein und Partikel wurden durch Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500-Rotor, 4 °C, 30 min, 11.500 rpm) und Sterilfiltrieren (0,45 µm) abgetrennt und die so erhaltene Proteinlösung wurde entweder sofort zur Chromatographie eingesetzt oder bei -20 °C eingefroren.

2.2.11 Produktion rekombinanter Proteine im Cytoplasma von *E. coli*

2.2.11.1 Produktion rekombinanter Fragmente des Nogo-Rezeptors (NgR) im Cytoplasma von *E. coli*

In dieser Arbeit wurde der rekombinante Nogo-Rezeptor (NgR) zunächst als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* (Smith und Johnson, 1988) und später als Fusionsprotein mit Thioredoxin (TrxA) aus *E. coli* (LaVallie et al., 1993) hergestellt. Hierbei war das Strukturgen nicht mit einer bakteriellen Signalsequenz für die Sekretion in das Periplasma fusioniert. Als Expressionsvektor für die Produktion des GST-NgR-Fusionsproteins diente das Plasmid pGEX-NgR. Die Expression des Fremdgens wurde dabei durch den mit IPTG induzierbaren tac-Promotor kontrolliert. Für die Produktion des Thioredoxin-NgR-Fusionsproteins wurde der Vektor pASK111-TrxNgR verwendet. Hier wird die Expression des Fremdgens durch den mit Anhydrotetracyclin induzierbaren tet-Promotor/Operator (Skerra, 1994b) kontrolliert. Bei Überproduktion dieser Fusionsproteine im Cytoplasma entstanden in beiden Fällen nicht lösliche Aggregate, sog. Inclusion Bodies, die isoliert und später rückgefaltet wurden.

2.2.11.2 Produktion eines NgR-Fragmentes als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase

Zur Anzucht wurden 2L LB-Medium, die mit 1mg/l Ampicillin versetzt worden waren, in einem 5 L-Erlenmeyerkolben mit 10 ml einer Übernachtskultur der mit dem Plasmid pGEX-NgR transformierten *E. coli*-Stämme JM83 oder Origami angeimpft. Im Fall der alternativen Produktion des GST-NgR-Fusionsproteins im *E. coli*- Stamm BL21 wurde 2 L LB/Amp-Medium mit 40 ml der Übernachtskultur inokuliert. Die Übernachtskultur wurde jeweils bei 37°C aufgezogen, die nachfolgende

Inkubation erfolgte bei 30°C oder 37°C. Bei $OD_{550} = 0,5$ wurde mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Induktionsdauer betrug 3h. Danach wurde die Kultur zügig auf sechs Zentrifugenbecher verteilt und abzentrifugiert (4 °C, 15 min, 4200 g). Die sedimentierten Zellen wurden in 20 ml Aufschlusspuffer (Zusammensetzung wie Periplasmaaufschlusspuffer, ohne Saccharose) aufgenommen und entweder sofort weiterverarbeitet (s. 2.2.11.4) oder bei -20°C gelagert.

2.2.11.3 Produktion des Thioredoxin-NgR-Fusionsproteins

Zur Anzucht wurden 2L LB-Medium, die mit 30 mg/L Chloramphenicol versetzt worden waren, in einem 5 L-Erlenmeyerkolben mit 10 ml einer Übernachtskultur des mit dem Plasmid pASK111-TrxNgR transformierten *E-coli*-Stamms JM83 inokuliert. Die Übernachtskultur wurde bei 37°C angezogen, die nachfolgende Inkubation erfolgte bei 30°C. Bei $OD_{550} = 0,5$ wurde mit 200 µl Anhydrotetracyclin-Lösung in DMF (2 mg/ml) induziert. Die Induktionsdauer betrug 3 h. Danach wurde die Kultur zügig auf sechs Zentrifugenbecher verteilt und abzentrifugiert (4 °C, 15 min, 4200 g). Die sedimentierten Zellen wurden in 20 ml Aufschlusspuffer (Zusammensetzung wie Periplasmaaufschlusspuffer, ohne Saccharose) aufgenommen und entweder sofort weiterverarbeitet (s. 2.2.11.4) oder bei -20°C gelagert.

2.2.11.4 Produktion von Nogo66 im Cytoplasma von *E. coli*

Als Expressionsplasmid für die Überproduktion des 66 Aminosäuren umfassenden Nogo66-Fragmentes diente der Vektor pN66. Das Nogo66-Gen lag hier C-terminal fusioniert mit einem His₆-Anhängsel vor, und die Expression des Gens wurde durch den mit IPTG induzierbaren Gen-10 Promotor ($\phi 10^P$) des Bakteriophagen T7 (Schmidt und Skerra, 1994) kontrolliert. Wie schon bei der cytosolischen Produktion des NgR fiel das rekombinante Nogo66-Fragment bei Überproduktion im Cytoplasma als Einschlusskörper aus.

Zur Anzucht wurden 2 L LB/Amp-Medium in einem 5 L-Erlenmeyerkolben mit 10 ml einer Übernachtskultur von *E-coli* BL21/pN66 angeimpft. Die Inkubation der Übernachtskultur wie auch der Hauptkultur erfolgte bei 37°C und 200 rpm. Bei $OD_{550} = 0,5$ wurde mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte über Nacht, d.h. die Induktionsdauer betrug ca. 16 h. Dann wurde die Kultur auf sechs Zentrifugenbecher verteilt und abzentrifugiert (4 °C, 15 min, 4200 g). Die sedimentierten Zellen wurden in 20 ml Aufschlusspuffer (Zusammensetzung wie Periplasmaaufschlusspuffer, ohne Saccharose) aufgenommen und entweder sofort weiterverarbeitet (s. 2.2.11.4) oder bei -20°C gelagert.

2.2.11.5 Präparation der Einschlusskörper

Die in 20 ml Aufschlusspuffer aufgenommenen Zellen wurden dreimal bei einem Druck von 1000 bar mit Hilfe der *French Press* aufgeschlossen. Danach wurde das Zellhomogenisat 30 min bei 20.000 g zentrifugiert und die präzipitierten Einschlusskörper sowie die lösliche Fraktion wurden getrennt bei -20 °C eingefroren.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung der Myelomzelllinie Ag8

Die Myelomzelllinie X63-Ag8.6.5.3 (Kearney *et al.* 1979; Bourqin, 2000b) wuchs im Kulturmedium (s.2.1.9) bei 37°C und 10 % CO₂. Die Zellen wurden alle 3-5 Tage mit frischem Medium 1/3 verdünnt.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Durch Trypan Blau-Färbung wurden tote Zellen spezifisch markiert. Die Zell-Suspension wurde dazu mit Trypan-Blau 1/100 verdünnt und 10 µl davon wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. 100-200 lebende Zellen (nicht angefärbt, rund) wurden unter dem Mikroskop gezählt. Die lebend-Zellzahl wurde wie folgt kalkuliert:

$$[\text{Zellen im großen Quadrat}] * [\text{Verdünnungsfaktor}] * 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

2.3.3 Durchflusszytometrie

Zelloberflächenantigene können durch spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper detektiert werden. Im *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS) wird die Lichtemission gemessen, die auftritt, wenn einzelne Zellen durch einen Laserstrahl (Anregungswellenlänge hier 488 nm) wandern, und ggf. zu deren Sortierung ausgenutzt. Verschiedene Parameter können dabei gemessen werden: die Größe (*Forward Scatter*, FSC) und die Granularität (*Side Scatter*, SSC) sowie insbesondere die Fluoreszenz der an das Oberflächenantigen gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper. In dieser Arbeit wurde ausschließlich Fluorescein-Isothiocyant (FITC, Emission bei 530 nm) als Fluorophor benutzt. Die DNA toter Zellen wurde mit Propidiumiodide gefärbt. Die Membran von lebenden Zellen ist für diesen Farbstoff undurchlässig.

Pro Ansatz wurden 2×10^5 Zellen in jeweils eine Vertiefung einer Kulturplatte mit 96 Vertiefungen gegeben. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (1200 rpm, 6 min, 4°C), der Überstand verworfen und die Zellen mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen. Der Waschschritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer, dem eine geeignete Konzentration am ersten Antikörper (8-18C5 Kulturüberstand bzw. Isotypenkontrolle IgG1 Konzentration 1 mg/ml Verdünnung 1:200 bis 1:1000) oder Fluorescein-markiertes Fab-Fragment (8-18C5- Fab b.z.w. HRS3C-Fab Konzentration 100 µg/ml; Verdünnung 1: 2 bis 1:50) zugegeben wurde, aufgenommen und für 30 min bei 4°C inkubiert. Die geeignete Verdünnung der Antikörper musste für jeden Versuch ausgetestet werden. Die Zellen wurden anschließend wie oben zweimal im FACS-Puffer gewaschen. War der erste Antikörper nicht markiert, folgte eine zweite 30 minütige Inkubation bei 4°C mit einem FITC-markierten anti-Maus-IgG1-Antikörper. Anschließend wurden die Zellen zweimal für 30 min gewaschen, mit 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen transferiert. Propidiumiodid wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben. Die Fluoreszenzintensität wurde im FACS-Gerät bestimmt und durch die vom Hersteller mitgelieferte Software ausgewertet.

2.3.4 Komplement-abhängiger Cytotoxizitäts-Test

Antikörper geeigneter Subklasse, die an die Zelloberfläche gebunden sind, induzieren Zellyse in Gegenwart von Komplement. Die Aktivierung der Komplementkaskade erfolgt durch den Fc-Teil des Antikörpers und kann deshalb nicht durch Bindung eines Fab-Fragments an die Zelloberfläche erfolgen. In diesem Fall kann jedoch die Effektorfunktion durch Zugabe eines zweiten Antikörpers rekonstituiert werden, der beispielsweise an die konstanten Domänen des Fab-Fragments bindet. In unserem Testsystem wurden MOG-transfizierte X63-Ag8.6.5.3 Zellen (Bourquin, 2000b), die MOG an ihrer Oberfläche präsentieren, mit dem 8-18C5 Fab-Fragment und anschließend mit einem gegen

das Fab-Fragment gerichteten Antikörper (anti-mouse C κ IgG oder anti-*Strep*-tag Antiserum) markiert. Die darauf folgende Zugabe von Komplement sollte zur Komplement-abhängigen Lyse der Zellen führen.

10⁵-Zellen wurden pro Ansatz in 50 μ l Assaypuffer (DMEM, 1% FCS) verdünnt und in eine Vertiefung einer "96-well-Platte" pipettiert. Dazu wurden Antikörper in einer 1/10-1/100 Verdünnung oder rekombinante Fab-Fragmente in einer Konzentration von 20 μ g/ml gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C und 10 % CO₂ wurden die Zellen einmal mit Assaypuffer gewaschen. Im zweiten Inkubationsschritt (37°C und 10 % CO₂) wurde, nach Abzentrifugation der Zellen, der zweite Antikörper (anti-mouse-C κ -IgG, oder anti-*Strep*-tag-Antiserum) in einer 1/100 Verdünnung in Assaypuffer und einem Volumen von 50 μ l zugesetzt. Nach 30 min wurde das Komplement (aus Kaninchen) in verschiedenen Verdünnungen, die zuvor ausgetestet wurden, zugesetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂. Nach einer Stunde wurden die Zellen abzentrifugiert, 25 μ l des Überstandes abgenommen und mit 25 μ l LDH-Reagenz (Roche) versetzt. Das Absterben der Zellen führt zu einem erhöhten Lactatdehydrogenase (LDH)-Spiegel im Kulturüberstand. Die LDH-Aktivität wurde hier an eine Enzymatische Reaktion gekoppelt, bei der das im LDH-Reagenz enthaltene Tetrazoliumsalz INT (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid) zu Formazan reduziert wird. Das Formazan ist wasserlöslich und hat ein Absorptionsmaximum bei 500 nm. Nach 10 min Inkubation mit LDH-Reagenz wurde die Absorption bei 500 nm im ELISA-Photometer (Dynatech) gemessen.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen erfolgt mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Puffersystems von Fling und Gregerson (1986). Die elektrophoretische Mobilität der durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladenen Proteine wird durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels bestimmt und verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse des Proteins (Creighton, 1986). Je nach Größe des zu analysierenden Proteins wurden 8 %ige, 10 %ige, 12 %ige oder 15 %ige SDS-Polyacrylamidtrenngelle verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte in der Regel in Trenngelen mit einer Größe von 8 x 5,5 cm bei einer Dicke von 0,75 mm.

Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 5 ml enthielt 1,25 ml 4x Lower-Tris sowie einen sich nach der gewünschten Konzentration richtenden Anteil einer 30 %igen (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid. Zur Herstellung von 10 %igen Gelen wurden 1,5 ml, für 12 %ige Gele wurden 2 ml und für 15 %ige Gele 2,5 ml der Acrylamid-Stammlösung verwendet. Nach dem Polymerisationsstart durch Zugabe von 1,3 μ l TEMED und 25 μ l 10 % (w/v) APS wurden 3,6 ml bis 4 ml der Trenngelmischung zwischen abgedichtete Glasplatten pipettiert und mit 1 ml Wasser überschichtet, um Luftzutritt zu vermeiden. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser vollständig abgezogen. Für die Herstellung der 5 %igen Sammelgelmischung wurden 0,5 ml Acrylamid-Stammlösung und 0,75 ml 4x Upper-Tris mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 3 ml aufgefüllt. Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 1,5 μ l TEMED und 18 μ l 10 % (w/v) APS gestartet. Die Lösung wurde auf das polymerisierte Trenngel zwischen die Glasplatten

gegossen, und es wurde ein Taschenformer mit zehn Zähnen eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt, die mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt wurde.

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 20 µl Proteinlösung mit 5 µl 5x Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. In die Probenaschen des vollständig polymerisierten Gels wurden dann je 20 µl Proteinlösung pipettiert und die Elektrophorese mit Maximalwerten von 120 V und 30 mA in Gang gesetzt. Nach ca. 2 h hatte der Bromphenolblau-Marker die untere Gelkante erreicht. Daraufhin wurde die Elektrophorese gestoppt, das Sammelgel abgetrennt, das Trenngel entnommen und für 20 min in Coomassie-Blau-Färbelösung geschwenkt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Schwenken in Entfärbelösung sichtbar gemacht und das Gel bis zur Trockenkonservierung in Aufbewahrungslösung bei 4 °C gelagert.

Bei geringeren Proteinkonzentrationen wurden die Proteine nicht mit Coomassie-Blau gefärbt sondern durch die sensitivere Silberfärbung nachgewiesen.

2.4.2 Silberfärbung von Proteinen

Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 30 min in 40 ml Fixierlösung geschwenkt. Nachdem es dreimal jeweils 5 min in 50 % Ethanol gewaschen worden war, wurde das Gel für 1 min in 40 ml Pretreatment-Lösung geschwenkt, dreimal kurz mit H₂O dest. gewaschen und anschließend 20 min in 40 ml Imprägnierlösung geschwenkt. Nach zweimaligem kurzen Waschen mit H₂O dest. wurden die Proteine durch Zugabe von 40 ml Entwickler-Lösung sichtbar gemacht und nach gegebener Zeit die Reaktion mit Fixierlösung abgestoppt.

2.4.3 Chromatographische Verfahren

2.4.3.1 Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Die Isolierung rekombinanter Proteine aus der periplasmatischen Zellfraktion einer *E. coli*-Kultur in Form von Fusionsproteinen mit dem *Strep*-tag oder dem *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel (Schmidt und Skerra, 1993; Skerra und Schmidt, 2000) erfolgte mit Hilfe der Streptavidin-Affinitätschromatographie.

Die Periplasmafraktion (siehe Abschnitt 2.3.1) wurde dazu über Nacht bei 4 °C gegen das etwa 100fache Volumen an SA-Puffer dialysiert und vor dem Auftragen auf die Chromatographie-Säule zur Entfernung von Proteinaggregaten sterilfiltriert (0,45 µm). Eine Streptavidin-Sepharose-Säule mit der immobilisierten Streptavidin-Mutante Nr. 1 (Voss und Skerra, 1997), entsprechend einer Beladung an Streptavidin von 5 mg/ml, wurde bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie – anhand der Absorption bei 280 nm (A_{280}) – mit SA-Puffer gespült. Bis zu einem Volumen von 30 ml Periplasmafraktion wurde ein Bettvolumen von 2 ml verwendet. In diesem Fall wurde die Chromatographie bei einer konstanten Flussrate von 20 ml/h betrieben. Bei größeren Volumina (bis zu 120 ml Periplasmafraktion aus der Fermentation) wurde eine Säule mit 8 ml Bettvolumen bei einer konstanten Flussrate von 80 ml/h betrieben.

Die Periplasmafraktion wurde auf die Säule aufgetragen und anschließend mit SA-Puffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Das über das *Strep*-tag bzw. *Strep*-tag II gebundene rekombinante Protein wurde daraufhin mit einer 2,5 mM Lösung an D-Desthiobiotin in SA-Puffer eluiert. Zur Regenerierung wurde das D-Desthiobiotin durch Spülen mit 5 mM HABA in SA-Puffer verdrängt, bis das Säulenmaterial eine intensive Orangefärbung

annahm. Das gebundene HABA wurde schließlich durch Spülen mit SA-Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Säule entfernt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden durch SDS-PAGE ermittelt, vereinigt und gegen einen geeigneten Puffer dialysiert. Nach Sterilfiltration (0,45 µm) wurde das Protein üblicherweise bei 4 °C gelagert

2.4.3.2 *Affinitätschromatographie an GST-Agarose*

Die Isolierung rekombinanter Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus der löslichen Zellfraktion einer *E. coli*-Kultur erfolgte durch Reinigung über GSH-Agarose (über SH-Brücken gekoppelte Glutathion-Agarose ; Simons und Vander Jagt, 1981).

Eine GSH-Agarose-Säule mit 1 ml Bettvolumen wurde bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie mit SA-Puffer gespült. Die lösliche Proteinfraction (s. 2.2.11.4) wurde vor dem Auftragen auf die Chromatographie-Säule zur Entfernung von Proteinaggregaten sterilfiltriert (0,45 µm). 10 ml der löslichen Fraktion wurden auf die Säule aufgetragen und anschließend mit SA-Puffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Das über GST gebundene rekombinante Protein wurde daraufhin mit einer 5 mM Glutathionlösung (red.) in SA-Puffer eluiert.

2.4.3.3 *Metallchelate-Affinitätschromatographie*

Das Prinzip der Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC; Porath *et al.*, 1975) beruht auf der Bindungswechselwirkung von funktionellen Gruppen auf der Proteinoberfläche, vor allem Cystein- oder Histidin-Seitenketten, zu immobilisierten Übergangsmetallionen. Auch rekombinante Proteine mit fusionierten Oligohistidin-Sequenzen können wegen ihrer ausgeprägten Affinität zu chelatisierten Metallionen auf diese Weise gereinigt werden (Hochuli, 1988; Skerra *et al.*, 1991). Die Immobilisierung der Übergangsmetallionen erfolgt durch chelatisierende chemische Gruppen, die auf einem Säulenmaterial fixiert sind. Hier wurde eine Sepharose-Matrix mit gebundenen Iminodiessigsäure-Gruppen (*Chelating Sepharose Fast Flow*) als Chelatbildner eingesetzt, und als Übergangsmetallion wurde Zn^{2+} verwendet. Zur spezifischen Bindung des rekombinanten Proteins diente das C-terminale His₆-tag.

Zur Isolierung eines rekombinanten Proteins aus 20 ml Periplasmaextrakt wurde eine Säule mit einem Bettvolumen von 2 ml verwendet. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines UV/VIS-Durchflussphotometers bei 280 nm dokumentiert. Der periplasmatische Proteinextrakt (siehe Abschnitt 2.2.10) wurde zur Entfernung des Komplexbildners EDTA vor dem Auftragen auf die Säule gegen 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,5 dialysiert, anschließend durch Zugabe an Festsubstanz auf eine Konzentration von 0,5 M Betain eingestellt und sterilfiltriert.

Die Säule wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe zunächst mit einer Flussrate von 20 ml/h betrieben und mit 20 ml Wasser bis zum Erreichen der Basislinie gespült. Dann wurde mit 10 ml 10 mM $ZnSO_4$ beladen, mit 20 ml Wasser nachgespült und schließlich mit 20 ml IMAC-Puffer äquilibriert.

Anschließend wurde die periplasmatische Proteinfraction aufgetragen und bis zum Erreichen der Basislinie mit IMAC-Puffer nachgespült. Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgte durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten mit 40 ml Gesamtvolumen von 0 bis 300

mM Imidazol/HCl in IMAC-Puffer bei einer verringerten Flussrate von 10 ml/h. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen von 1,5 ml aufgefangen. Nach der Elution wurde die Säule zur Entfernung der Zn^{2+} -Ionen mit 20 ml Regenerierungspuffer (1 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0) und anschließend mit 10 ml Wasser gespült.

Der Proteingehalt der Eluatfraktionen und deren Reinheit wurde mittels SDS-PAGE bestimmt. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an reinem rekombinanten Protein wurden vereinigt, gegen einen für nachfolgende Experimente geeigneten Puffer dialysiert und nach Sterilfiltration (0,45 μ m) bei 4 °C gelagert.

Das rekombinante Nogo66-His₆-Fragment wurde unter denaturierenden Bedingungen durch IMAC gereinigt. Die Säule wurde zunächst wie oben vorbereitet. Der Puffer enthielt in diesem Fall 6M Gdn/HCl in PBS. 1 ml Einschlusskörper, solubilisiert in 6M Gdn/HCl in PBS, wurden auf die Säule aufgetragen und die Säule wurde mit 50 mM Imidazol/HCl in PBS/ 6M Gdn/HCl gewaschen. Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgte in diesem Fall durch 300 mM Imidazol/HCl in PBS/ 6MGdn/HCl bei einer verringerten Flussrate von 10 ml/h.

2.4.3.4 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie ermöglicht die Trennung von Proteinen gemäß ihrer Größe sowie Form und wurde in der vorliegenden Arbeit zur Feinreinigung von rekombinanten Proteinen bzw. zur Isolierung des 8-18C5-Fab/MOG-Komplexes verwendet. Die Chromatographie wurde an einem ÄKTA-System automatisch betrieben. Die verwendeten Chromatographie-Puffer wurden sterilfiltriert und durch Anlegen eines Vakuums für 30 min unter Rühren entgast.

Zur Reinigung der Fab-Fragmente wurde die präparative Superdex 75 *HiLoad* 16/60 *prep grade* Säule verwendet. Diese besitzt ein Säulenbettvolumen von 124 ml und einen Auflösungsbereich von 3 bis 75 kDa. Zur Reinigung des 8.18-C5-Fab/MOG-Komplexes diente eine Superdex 75 *HiLoad* 26/60 mit 320 ml Bettvolumen. Für die Reinigung des rekombinanten NogoA-Fragmentes wurde eine präparative Superdex 200 *HiLoad* 16/60 *prep grade* Säule benutzt. Diese weist ebenfalls ein Säulenbettvolumen von 124 ml auf, hat aber einen Auflösungsbereich von 10 bis 600 kDa.

Beide Säulen wurden vor der Trennung bei einer Flussrate von 1 ml/min mit 2 Säulenvolumina Chromatographie-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) äquilibriert. Von der Proteinlösung (typische Konzentration: 1-5 mg/ml) wurde jeweils 1 ml mit Hilfe einer 1 ml Probenschleife aufgetragen. Über einen Fraktionskollektor wurden Fraktionen á 4 ml gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE auf Reinheit der Proteinlösung untersucht. Die Säulen wurden anschließend durch Spülen mit einem Säulenvolumen an 0,5 M Natronlauge regeneriert, mit Wasser gespült und in 20 % Ethanol gelagert

2.4.4 Rückfaltung von Proteinen aus Einschlusskörpern

2.4.4.1 Nogo-Rezeptor

Die Einschlusskörper wurden in PBS-Puffer, dem 6 M Gdn/HCl zugesetzt war, gelöst. Dazu wurden sie mindestens für 3 h bei RT auf einem Roll-Schüttler gedreht und unlösliche Teile anschließend durch Zentrifugation abgetrennt. Die Proteinkonzentration der gelösten Einschlusskörper betrug ca. 10 mg/ml. Die Rückfaltung erfolgte bei 4°C durch 100fache Verdünnung der Lösung im

Rückfaltungspuffer. Dabei wurde die Lösung tropfenweise in das Puffergefäß, das sich auf einem Magnetrührer befand, gegeben. Zwischen den Zugaben wurde solange gewartet, bis sich die Lösungen komplett gemischt hatten. Der verwendete Rückfaltungspuffer hatte folgende Zusammensetzung: 55 mM Tris/HCL pH 8,2; 264 mM NaCl; 11 mM KCl; 2,2 mM MgCl₂; 2,2 mM CaCl₂; 0,3 mM Laurylmaltosid; 440 mM Saccharose; 550 mM Arginin; 1 mM DTT. Aggregate wurden anschließend 15 min bei 14000 rpm abzentrifugiert.

2.4.4.2 *Nogo66*

Die Einschlusskörper wurden wie oben beschrieben gelöst. Rückfaltung erfolgte nach Aufreinigung mittels IMAC (s. 2.4.3.3). Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und durch 100fache Verdünnung in PBS in ähnlicher Vorgehensweise wie beim Nogo-Rezeptor rückgefaltet.

2.4.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Lösungen gereinigter Proteine wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm unter Berücksichtigung der Eigenabsorption des für die vorherige Dialyse verwendeten Puffers mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt.

Die dazu notwendigen molaren Extinktionskoeffizienten wurden jeweils mit Hilfe der Computerprogramme TRANSLATE und PEPTIDESORT aus dem Programmpaket UWGCG (Devereux *et al.*, 1984) errechnet (siehe Tabelle 1, Anhang). Die Koeffizienten werden dabei näherungsweise als Summe der Absorptionsbeiträge der aromatischen Aminosäuren der vollständig entfalteten Peptidkette bestimmt (Gill und von Hippel, 1989).

2.4.6 Konzentrierung von Proteinen

Für verschiedene Experimente waren Lösungen mit erhöhter Proteinkonzentration notwendig. Dazu wurde das gereinigte Protein zunächst dreimal gegen den gewünschten Puffer dialysiert und die Lösung mittels einer Konzentratoreinheit (Vivaspin, Makrosep) mit einer geeigneten Ausschlussgröße (10 oder 30 kDa) durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 4 °C, 3.000 g) auf ein der jeweiligen Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Die Proteinlösung wurde dann in ein Reaktionsgefäß überführt, eventuell aggregiertes Protein abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 4 °C, 20 min, 14.000 rpm) und der Überstand abgenommen. Die Konzentration einer 1:10 verdünnten Probe der Lösung wurde schließlich durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt.

2.4.7 Ortsgerichtete Markierung von Fab-Fragmenten mit Fluorescein-5-maleimid

Für die ortsgerechte Mutagenese wurde ausgehend vom Expressionsplasmid pASK107-8.18C5 der Vektor pASK109-8.18C5 konstruiert. Dieser trägt die Gensequenzen für das 8.18C5 Fab-Fragment mit konstanten humanen Domänen und einem einzelnen reaktiven Cysteinrest am Carboxyterminus der leichten Kette. Die Umsetzung mit Fluorescein-5-Maleimid (Curtis und Cowden, 1980) erfolgte an dieser freien Thiolgruppe.

Zur Kopplung wurde das gereinigte Fab-Fragment in PBS, 0,1 mM EDTA auf eine Konzentration von ca. 2 mg/ml in 700 µl gebracht und zur Reduktion der freien Thiolgruppe auf 10 mM β-Mercaptoethanol in einem Gesamtvolumen von 1 ml eingestellt. Die Konzentration des Proteins

im Gesamtansatz betrug somit ca. 1,4 mg/ml. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde das Mercaptoethanol durch Gelfiltration an einer Pharmacia PD-10 Säule mit PBS-Puffer abgetrennt. Die Proteinkonzentration wurde anschließend spektroskopisch bestimmt und auf 1 mg/ml eingestellt und 50 µl einer frischen Lösung von 10 mM Fluorescein-5-maleimid in DMF wurden hinzugegeben. Die Kopplungsreaktion erfolgte für 4 h bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss. Überschüssiges Fluorescein-5-maleimid wurde durch erneute Gelfiltration an einer PD-10 Säule abgetrennt und die erhaltenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert. Dabei wurde die markierte leichte Kette des Fab-Fragmentes im Gel durch Anregung bei einer Wellenlänge von 312 nm als fluoreszierende Bande sichtbar gemacht.

2.4.8 N-terminale Proteinsequenzierung

Zur Bestimmung der aminoterminalen Aminosäuresequenz von Proteinen wurden ca. 10 µg gereinigte Proteinlösung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines Borat-Laufpuffers (100 mM Tris-Base, 100 mM Borsäure pH 8,3 mit HCl eingestellt, 0,1 % w/v SDS) separiert. Alle anderen Lösungen waren identisch mit den sonst verwendeten Lösungen (siehe Abschnitt 2.4.2). Anschließend wurde der Elektrotransfer auf eine Immobilon-P-Membran (siehe Abschnitt 2.5.1) mit Transferpuffer (20 % v/v Methanol in Borat-Laufpuffer) durchgeführt. Nach Beendigung des Elektrotransfers wurde die Membran für 5 min in Coomassi-Färbelösung (siehe Abschnitt 2.4.2) geschwenkt und bis zur Entfärbung des Hintergrunds mit Entfärbelösung gewaschen. Die Membran wurde mit bidestilliertem Wasser gespült und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Für die Sequenzanalyse wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten.

2.4.9 Partieller Trypsinverdau

Bei der limitierten Proteolyse des Nogo-A Fragments wurden 10 µl einer frisch hergestellten Trypsinlösung (5 µg/ml in 1 mM HCL) zu 80 µl hNogoAn5 (1 mg/ml in PBS) gegeben. Zu definierten Zeitpunkten wurden 10 µl Proben entnommen, mit 2 µl PMSF (100 mM) gemischt und anschließend auf Eis inkubiert. Die Proben wurden schließlich durch SDS-PAGE (15 %) analysiert.

2.4.10 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bindungsaktivität von Immunglobulinen und deren Fab-Fragmenten gegenüber ihrem jeweiligen Antigen wurde mit Hilfe des ELISA nachgewiesen. Dazu wurde das Antigen an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert und nach Applikation des Antikörpers dessen Bindung vermittelt durch Zweitreagenzien durch chromogene Enzymreaktion nachgewiesen.

Die Bindung von rekombinanten Fab-Fragmenten bzw des Nogo-Rezeptors an das Nogo66 oder das rekombinante N-terminale Nogo-A-Fragment (hNogoAn5) wurde mit Hilfe eines Anti-Digoxigenin Fab -Alkalische Phosphatase-Konjugats nachgewiesen. Die durch die Alkalische Phosphatase katalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat wurde photometrisch anhand der Absorption des p-Nitrophenolats bei 405 nm im ELISA-Photometer Spectra-Max 250 gemessen.

Zunächst wurden die Fab-Fragmente bzw. der Nogo-Rezeptor (TrxANgRΔ) mit Digoxigenin markiert. Dazu wurde rekombinantes Protein in PBS mit Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester in einem molaren Verhältnis von 1:2 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das überschüssige Reagenz wurde anschließend durch Gelfiltration mit

einer PD-10-Säule vom Protein getrennt. Zur Durchführung des Assays wurden in jede Vertiefung einer Reihe auf der Mikrotiterplatte jeweils 50 µl Antigenlösung (Nogo66: 1 µg/ml in PBS; hNogoAn5: 100 µg/ml in PBS) pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Absättigung verbliebener Bindungsstellen wurde anschließend jede Vertiefung für 1 Stunde mit jeweils 200 µl einer Blockierungslösung (3 % w/v BSA in PBS/T 0,5) inkubiert. Die Vertiefungen wurden daraufhin dreimal mit PBS/T gespült und ausgeklopft. Anschließend wurden je 100 µl der Lösung des jeweiligen digoxigenierten Fab-Fragments bzw. digoxigenierten NgR-Fragments in PBS/T in die erste Vertiefung einer Reihe pipettiert. In den darauffolgenden Vertiefungen jeder Reihe wurden zunächst 50 µl PBS/T vorgelegt. Ausgehend von der Proteinlösung der ersten Vertiefung wurden jeweils 50 µl Protein entnommen, in die darauffolgende Vertiefung pipettiert, gemischt und auf diese Weise wurde eine Verdünnungsreihe in PBS/T hergestellt. Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde wurde wiederum dreimal mit PBS/T gespült.

Für den Nachweis des gebundenen Fab-Fragments bzw. NgR-Fragments wurde das Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugat 1:2500 in PBS/T verdünnt und zu je 50 µl pro Vertiefung zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen zweimal mit PBS/T und zweimal mit PBS gespült. Schließlich wurden jeweils 50 µl einer 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat-Lösung, gelöst in AP-Puffer zupipettiert. Die Platte wurde in das auf 25 °C temperierte SpectraMax 250 ELISA-Photometer eingesetzt, und nach 5 minütiger Äquilibrierung wurde die Zunahme der Absorption bei 405 nm für 30 min aufgezeichnet.

2.4.11 Western Blotting

Für den immunchemischen Nachweis eines Proteins im Western Blot wurde das Proteingemisch zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend durch Elektrotransfer auf eine hydrophobe Membran überführt und das gewünschte Protein schließlich in einem immunchemischen Verfahren selektiv angefärbt. Rekombinante Proteine konnten meist über ihr Affinitätsanhängsel mit Hilfe geeigneter Nachweisreagenzien nachgewiesen werden.

Die SDS-PAGE wurde durchgeführt wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben und das Trenngel anschließend für 20 min in Transferpuffer (20 % v/v Methanol in 1x SDS-Laufpuffer) geschwenkt. Der Elektrotransfer erfolgte auf eine Nitrocellulose-Membran.

Für den Elektrotransfer wurden 4 Blatt Whatman-Filterpapier (8,5 cm x 5,5 cm) mit Transferpuffer getränkt und unter Vermeidung von Luftblasen auf die Edelstahl-Kathodenplatte der Elektrobloßapparatur gelegt. Darauf wurden das Trenngel, die mit Transferpuffer benetzte Membran sowie weitere 3 Blatt mit Puffer getränktes Whatman-Filterpapier gestapelt. Nach Aufsetzen der Graphit-Anodenplatte wurde der Elektrotransfer für 45 min bei einer konstanten Spannung von 10 V betrieben. Die Nitrocellulose-Membran wurde anschließend dreimal für jeweils 15 min in 10 ml PBS/T geschwenkt.

2.4.11.1 Immunchemischer Nachweis der humanen konstanten Domäne der leichten Kette (C κ)

Die leichten Ketten von intakten Immunglobulinen oder Fab-Fragmenten wurden entweder direkt mit Hilfe eines Anti-Human-C κ -Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugats oder durch einen Anti-Human-C κ -Antikörper aus Kaninchen in Verbindung mit einem Anti-Rabbit-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat aus Schwein – als Zweitantikörper – nachgewiesen. Im ersten Fall wurde

die Membran mit den transferierten Proteinen für 1 h in 10 ml PBS/T mit einer 1:1000 Verdünnung des Anti-Human-C κ -Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugats geschwenkt und wie unten beschrieben angefärbt. Im anderen Fall wurde die Membran für 1 h in 10 ml PBS/T mit einer 1:1000 Verdünnung des Anti-Human-C κ -IgG inkubiert, anschließend dreimal für jeweils 10 min mit 10 ml PBS/T gewaschen und danach wiederum für 1 h in 10 ml einer 1:1000 Verdünnung des Anti-Rabbit-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugats geschwenkt.

Zur selektiven Anfärbung der rekombinanten Proteine wurde die Membran im Anschluss an die Inkubation mit dem jeweiligen Alkalische Phosphatase-Konjugat dreimal für 5 min mit 10 ml PBS/T und einmal mit AP-Puffer gewaschen. Durch Inkubation in 20 ml AP-Puffer unter Zusatz von 10 μ l NBT (75 mg/ml in 70 % DMF) und 60 μ l BCIP (50 mg/ml in DMF) wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht (Blake *et al.*, 1984). Nachdem die gewünschte Intensität erreicht war, wurde die Färbereaktion durch mehrmaliges Waschen mit bidestilliertem Wasser gestoppt und die Membran zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

2.4.11.2 *Immunchemischer Nachweis anhand des Strep-tag bzw. Strep-tag II Affinitätsanhängsels*

Um das *E. coli* Biotin-Carboxyl-Carrierproteins abzusättigen, wurde die Membran zunächst nach dem Transfer für 10 min in 10 ml PBS/T mit 2 mg/ml Avidin inkubiert. Danach wurden direkt 10 μ l eines Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugats zugegeben, für 1 h geschwenkt und wie oben beschrieben angefärbt.

2.4.11.3 *Immunchemischer Nachweis der Bindung zwischen Nogo-A und IN1-Fab; Nogo66 und IN1-Fab sowie Nogo66 und Nogo-Rezeptor*

Die Proteine wurden hier durch Elektrobplot auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde für 1 h mit 3 % w/v Milchpulver in PBS/T abgesättigt und anschließend mit einer 100 nM Lösung von digoxigenierten Fab-Fragmenten bzw. Nogo-Rezeptor (s. 2.4.9) in PBS/T inkubiert. Bindung wurde durch Inkubation mit Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische Phosphatase Konjugat nachgewiesen. Die Chromogene Reaktion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.4.11.4 *Immunchemischer Nachweis der Bindung zwischen MOG und dem monoklonalen Antikörper 8-18C5 bzw. 8-18C5 Fab-Fragment*

Zur Probenvorbereitung wurden 1 μ l rekombinantes MOG¹²⁵ (ca. 1 μ g/ml in PBS), 1 μ l Hirnextrakt der Maus (Homogenisiert in PBS, bei -20 °C gelagert) und 5 μ l einer Zellsuspension (80 μ l X63-Ag8.6.5.3-Zellen in Kulturmedium, ca. 106 Zellen) mit PBS auf ein Volumen von 20 μ l gebracht und mit 5 μ l Auftragspuffer versetzt und wie in 2.4.1 beschrieben weiterverarbeitet. Nachdem die Proben auf eine Nitrozellulosemembran transferiert worden waren, wurde die Membran zunächst mit dem über ProteinA gereinigtem 8-18C5-Antikörper (Konzentration ca. 1 μ g/ml in PBS/T/ 5 % w/v Milchpulver) 1h inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal in PBS-T gewaschen und gebundenes Protein wurde anhand eines Peroxydase-gekoppelten Zweitantikörpers (anti Maus-IgG; 1:5000 in PBS/T/5 % w/v Milchpulver verdünnt, ca. 1h Inkubation) nachgewiesen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/T wurde die Membran für 1 min mit ECL-Reagenz bedeckt. In einer Dunkelkammer wurde anschließend die Chemilumineszenz durch Exposition der Membran auf HyperFilm detektiert. Die Verwendung von PVDF-Membran und der Antigen-Nachweis mittels des ECL-Systems ermöglichten durch sogenanntes „Stripping“ die Primäantikörper zu entfernen und die Membran

mit einem anderen primären Antikörper erneut zu inkubieren. Dazu wurde die Membran zwei Mal für 20 min mit PBS/T, dann 30 min mit Restore™ Western Blot Stripping Buffer und abschließend zwei Mal mit PBS/T für 20 min gewaschen.

2.4.12 Epitope-Mapping

Die Epitopanalyse des IN-1-Antikörpers und die Bestimmung der NgR-Bindungsstelle im Nogo-A-Protein erfolgte mit Hilfe eines Arrays von synthetischen Peptiden auf einer Zellulosemembran. Das Raster von überlappenden 15mer Peptiden, welche die gesamte Aminosäuresequenz des menschlichen Nogo-A abdeckten, oder auch spezifische Arrays für die Substitutions- und Längenanalyse, wurden automatisch nach dem Standardprotokoll zur SPOT-Synthese (Frank, 2002) mit einem Syntheseautomaten von Jerini (Berlin) hergestellt. Die Peptide wurden dabei auf einer aminoreaktiven Zellulosemembran als räumlich separierte Spots synthetisiert. Dabei wurde ein b-Alanin-Dipeptid zwischen dem C-Terminus eines jeden Peptids und der Membranoberfläche eingeführt und das Peptid dann schrittweise mittels der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc-) Festphasen-Peptidsynthese vom C-Terminus her verlängert. Die Sequenzdateien wurden mit der Software DIGEN (Jerini, Berlin) generiert. Alle Peptide waren N-terminal acetyliert.

2.4.12.1 *Nachweis der Bindung mittels eines anti-Strep-tag-Antikörper-Peroxidasekonjugats*

Die Membran wurde zur Vorbereitung kurz mit Ethanol gewaschen und anschließend dreimal für 10 min in TBS (50 mM Tris/HCl pH 8; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) geschwenkt. Um unspezifische Wechselwirkungen zu verhindern, wurde die Membran über Nacht in 10 % v/v Blocking-Reagenz (Boehringer, Mannheim) in MBS-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,05 % v/v Tween-20; 1 % w/v Saccharose) inkubiert. Nach einmaligem Waschen in TBS-T (50 mM Tris/HCl pH 8; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,05 % v/v Tween-20) wurde die Membran für 1 h in einer 2 µM Lösung des Fab- bzw. NgR-Fragments geschwenkt. Die Membran wurde anschließend dreimal in TBS-T gewaschen und gebundenes Protein wurde anhand des *Strep*-tags durch Inkubation mit HRP-konjugiertem anti-*Strep*-tag Antikörper (1:1000 in MBS) nachgewiesen. Die Detektion der Bindung erfolgte mit Hilfe des SuperSiChemilumineszenz-Detektionssystems durch Auflegen eines Hyperfilms auf die Membran und anschließende photographische Entwicklung.

2.4.12.2 *Nachweis der Bindung mittels StrepTactin-Alkalische-Phosphatase-Konjugats*

Zum Nachweis mit Hilfe des Alkalische-Phosphatase-Konjugats wurde nach dem von Frank und Overwin (1996) publizierten Protokoll vorgegangen. Die Membran wurde zur Vorbereitung kurz mit Ethanol gewaschen und anschließend dreimal für 10 min in TBS geschwenkt. Um unspezifische Wechselwirkungen zu unterbinden, wurde die Membran über Nacht in 10 % v/v Blocking-Reagenz in MBS-Puffer inkubiert. Nach einmaligem Waschen in TBS-T (50 mM Tris pH 8, 137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,05 % v/v Tween-20) wurde die Membran für 1 h in einer 2 µM Lösung des Fab- bzw. NgR-Fragments geschwenkt. Die Membran wurde anschließend dreimal in TBS-T gewaschen und mit StrepTactin-AP-Konjugat in MBS (1:1000 Verdünnung) inkubiert.

Die chromogene Nachweisreaktion erfolgte nach zweimaligem Waschen in TBS-T und CBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na-Citrat pH 7; 0,05 mM MgCl₂) durch Zugabe von 60 µl MTT (50 mg 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in 1 ml 70 % w/v DMF) und 40 µl BCIP (60 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat p-Toluidin Salz in 1 ml DMF) in 10 ml CBS.

2.4.12.3 *Regenerierung der Membran*

Zur Regenerierung wurde die Membran zweimal für 10 min in Wasser geschwenkt und solange in DMF inkubiert, bis die blaue Färbung der Signale abgelöst war (ca. 10 min). Danach wurde noch einmal für 10 min in DMF gewaschen. Nach dreimaligem Waschen in Wasser (10 min) wurde die Membran dreimal für 10 min in Puffer SM-A (8 M Urea, 1 % w/v SDS in PBS: 0,5% β -Mercaptoethanol kurz vor Gebrauch zugegeben und mit Eisessig auf pH 7 eingestellt) bei 40°C im Ultraschallbad gewaschen, um evtl. gebundenes Protein zu entfernen. Die Membran wurde anschließend dreimal für 10 min in Puffer SM-B (10 % v/v Essigsäure, 50 % v/v Ethanol) gewaschen und nach dreimaligem abschließenden Waschen in Ethanol getrocknet und bei -20°C gelagert.

2.4.13 Analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation

Die Analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation eignet sich zur exakten Bestimmung von Molekulargewichten unter nativen Bedingungen, da bei dieser Methode die Form der Proteine und deren hydrodynamischer Radius keine Rolle spielen (Laue und Stafford, 1999). Zur Messung wurden 150 μ l der Proteinlösung des rekombinanten hNogoAn5 mit Konzentrationen von etwa 0,3 mg/ml bis 0,8 mg/ml in SA-Puffer in einer Messzelle (Rotortyp Ti-60) einer Beckman XL-I-*Analytical Ultracentrifuge* eingeschlossen. Als Referenz diente 200 μ l SA-Puffer. Die Proteinprobe und die Referenz wurden rotiert. Die Geschwindigkeit wurde dem zu erwartenden Molekulargewicht angepasst, im vorliegenden Fall 8000 rpm. Während des Laufes sedimentiert das Protein zum Zellenboden, wobei sich ein Konzentrationsgradient einstellt, der durch das entgegengesetzte Wirken der Diffusion zustandekommt. Die Detektion des Gradienten erfolgt über ein integriertes UV-Spektrometer und eine Interferenzoptik. Die Zentrifugation erfolgte solange (hier 72 h), bis über 12 h keine Veränderung des Konzentrationsgradienten in der Messzelle mehr stattfand. Die Analyse des Konzentrationsgradienten liefert das exakte Molekulargewicht unter der Voraussetzung, dass nur eine Spezies in der Messzelle vorliegt. Um proteolytische Prozesse während der Laufzeit auszuschließen, wurde die Probe vor und nach dem Lauf durch SDS-PAGE analysiert. Zur Auswertung des UZ-Laufes wurden die Daten mit Hilfe des Programms Origin (Beckmann, Fullerton, USA) und Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA, USA) unter Verwendung folgender Formel durch nicht lineare Regression angepasst:

$$c = c_0 e^{\frac{\omega^2 (1 - v\rho) M / 1000000 (r^2 - r_0^2)}{2RT}} + \text{Baseline}$$

c bzw. c_0 : Makromolekül-Konzentration; M : Molmasse des Makromoleküls; v : "partialspezifisches Volumen" des Makromoleküls, in sehr guter Näherung seine reziproke Dichte; ρ : Dichte des Lösungsmittel; ω : Winkelgeschwindigkeit des Rotors; r : Abstand des Maximums des Konzentrationsgradienten vom Rotorzentrum R : Gaskonstante

Näherungsweise wurde für die Dichte der Lösung $\rho = 1,01$ g/ml angenommen und für das spezifische Volumen des Proteins ein aus den Aminosäuren errechneter Wert. Dieser lag zumeist in der Größenordnung von 0,73 ml/g (Stromer *et al.*, 2004).

2.4.14 Fluoreszenztitration

Die Fluoreszenztitration wurde verwendet, um die Bindungskonstante des synthetischen Peptids α Abz-TIKELRRLFL-NH₂ aus Nogo66 gegenüber dem Nogo-Rezeptor und dem IN-1-Fab-Fragment zu bestimmen. Dabei machte man sich zunutze, dass sich bei der Bildung des Protein/Ligand-Komplexes die Fluoreszenzeigenschaften mindestens eines Bindungspartners – hier nur des Proteins – veränderten. Die Auswertung der gemessenen Fluoreszenzen einer Konzentrationsreihe ermöglichte die Ermittlung der Komplex-Dissoziationskonstante.

Die Proteinlösung wurde dreimal gegen PBS dialysiert und sterilfiltriert, bevor die Proteinkonzentration eingestellt wurde. Alle verwendeten Lösungen, sofern nicht in organischen Lösungsmitteln angesetzt, wurden sterilfiltriert (Millex HV 0,45 μ M). Die Lösung des Liganden wurde grundsätzlich frisch angesetzt und lichtgeschützt aufbewahrt. Fluoreszenzintensitäten wurden mit einem Perkin Elmer LS 50 B Fluorimeter gemessen, wobei die Spaltbreiten für die Anregung und Emission so gewählt wurden, dass die gemessenen Fluoreszenzintensitäten zwischen 100 und 900 Einheiten lagen. Die Messungen wurden in einer mit einem Rührer ausgestatteten 1 cm² Quarzküvette durchgeführt, welche mit 2 ml der Proteinlösung zunächst für 15 min auf 25 °C thermostatisiert wurde.

Experimentelle Durchführung:

Das synthetisierte 2-Aminobenzoyl(Abz)-gekoppelte Nogo66-Peptid α Abz-TIKELRRLFL-NH₂ wurde in H₂O bidest gelöst und in Portionen von 2 μ l der Proteinlösung (2 ml einer 1 μ M Lösung von TrxA-NgR Δ bzw. IN-1 Fab-Fragment in TBS) zugesetzt und zwecks Gleichgewichtseinstellung jeweils für 1 min unter Rühren im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenz der Tryptophanreste der Proteine wurde bei 295 nm angeregt und das Fluoreszenzsignal bei 340 nm anschließend gemittelt über 10 s gemessen. Die geringe Volumenzunahme im Verlauf der Titration (insg. 40 μ l entsprechend 2 %) wurde bei der Auswertung vernachlässigt.

Die gemessenen Fluoreszenzwerte eines Titrationsexperimentes wurden durch Subtraktion des Pufferwertes korrigiert, auf 100 % skaliert und gegen die Gesamtkonzentration des zugegebenen Liganden aufgetragen. Die Anpassung der Kurve erfolgte nach Vogt und Skerra (2001) durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Computerprogrammes „Kaleidagraph“ unter Anpassung von f_p , f_{PL} und K_D .

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Präparation der Objektträger

Um das Ablösen der Gewebe zu verhindern wurden, die Objektträger mit 1 %iger Gelatine-Lösung benetzt und vor der Benutzung luftgetrocknet.

2.5.2 Gefrierschnitte

10 μ m Schnitte wurden mit dem Cryostaten geschnitten und bei -70°C eingefrohren

2.5.3 Luxol-Blau-Färbung von Myelinschnitten

Mit dieser Methode erhält man eine spezifische Blaufärbung der grauen Substanz. Die Schnitte wurden für 2 h bei 56°C in Luxol-Blau-Lösung inkubiert und anschließend in 70 % Ethanol und

in H₂O gewaschen. Selektive Entfärbung der weißen Substanz wurde durch kurze Inkubation des Schnittes in 0.05 % w/v Lithiumcarbonat erreicht. Danach wurden die Schnitte ebenfalls mit 70 % Ethanol und H₂O gewaschen. Die Schnitte wurden anschließend für 6 min mit Calcium-Rot, welches die Zellkerne rot anfärbt, gegengefärbt. Nach Waschen in 70 % Ethanol wurde der Schnitt getrocknet.

2.5.4 Immunhistochemie

Alle Inkubationsschritte fanden in einer Feuchten Kammer statt. 12 µm dicke Gefrierschnitte auf Objektträgern wurden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und für 10 min in eiskaltem Aceton fixiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an Gewebeproteine zu verhindern, wurde mit TBS, 4 % w/v BSA für 20 min blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS im Färbetrog wurden 100 µl der Fab-Fragment-Lösung mit einer Konzentration von 100 µg/ml in TBS auf die Gewebesektion pipettiert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Gebundenes Fab-Fragment wurde nach dreimaligem Waschen mit TBS (Färbetrog) durch Aufpipettieren von jeweils 100 ml Anti-Human-C_κ-Antikörper Alkalische Phosphatase Konjugat (Verdünnung 1:100 in TBS) bzw Streptavidin-Alkalische-Phosphatase Konjugat (Verdünnung 1:100 in TBS) und einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur nachgewiesen. Die Entwicklung erfolgte nach dreimaligem Waschen in TBS. Für die chromogene Nachweisreaktion wurde der *Fast-Red*-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

Für die direkte Fluoresceinmarkierung von Hirnschnitten wurden die mit Fluoreszein gekoppelten Fab-Fragmente (s. 2.4.6) in einer Konzentration von 50 µg/ml in TBS eingesetzt, 100 µl der Lösung auf die Gewebesektion pipettiert und die Hirnschnitte für 1 h mit der Proteinlösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit TBS gewaschen. Die entwickelten Schnitte wurden eingedeckelt unter einem Mikroskop bei 10-bis 30facher Vergrößerung analysiert und fotografiert.

2.6 Computerprogramme und Datenbanken

Zur Analyse von DNA- und Proteinsequenzen sowie zur Planung von Oligodesoxynukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese und die PCR wurden die Programme MAP, MAPSORT, TRANSLATE, PEPTIDESORT sowie der Sequenzeditor SEQED aus dem Programmpaket UWGCG (Devereux *et al.*, 1984) eingesetzt. Die Visualisierung von dreidimensionalen Proteinstrukturen erfolgte mit Hilfe des Programms Insight II (Version 95.0.3, MSI/Biosym Technologies) an einer Indigo 2-Workstation der Firma Silicon Graphics. Gele aus der SDS-PAGE wurden mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.) digitalisiert und das erhaltene Bild bloß hinsichtlich Helligkeit und Kontrast optimiert. Sequenz- und Strukturdaten von Proteinen wurden unter Verwendung folgender im World Wide Web zugänglicher Datenbanken erhalten:

Protein Data Bank	http://www.rcsb.org/pdb
ExpASy Molecular Biology Server	http://www.expasy.ch
KabatMan (Martin, 1996)	http://www.bioinf.org.uk/abs
The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest	http://www.immuno.bme.nwu.edu

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung funktioneller Fragmente des humanen Neuronalen Inhibitorproteins Nogo-A in *E. coli*

Voraussetzung für die biochemische Charakterisierung und ggf. Kristallisation von Nogo-A war die Bereitstellung ausreichender Mengen von rekombinanten Nogo-A-Fragmenten mit hohem Reinheitsgrad. Ein Nogo-A-Fragment der Ratte wurde bereits erfolgreich kloniert und in funktionellen Studien getestet (Fiedler *et al.*, 2002). Bislang war es jedoch nicht möglich, dessen Struktur aufzuklären, da der Reinheitsgrad der Proteinpräparationen nicht ausreichend war (Fiedler *et al.*, 2002; Fiedler, 2002).

In dieser Arbeit wurde daher die Proteinpräparation für das humane Homologe hinsichtlich Reinheit und biochemischer Homogenität optimiert. Zum Zweck der gentechnischen Produktion der N-terminalen Nogo-A spezifischen Domäne (NogoAn), die vermutlich extrazellulär lokalisiert ist, wurde von dem Vektor pASK75hN3 (Hettich, 2001) ausgegangen. Das NogoAn-Strukturgen, welches komplett von dem genomischen Exon 3 kodiert wird (Oertle *et al.* 2003a), war zur Konstruktion dieses Vektors, ausgehend von humaner genomischer DNA, amplifiziert und in einen Standardvektor für die heterologe Produktion in *E. coli*, pASK75strepII (Skerra und Schmitt, 2000), subkloniert worden. Die Sekretion des N-terminalen zentralen Fragments aus dem nativen Nogo-A Protein (Aminosäuren 246 bis 966) in den periplasmatischen Raum von *E. coli* wurde durch die dem Aminoterminus vorangestellte *OmpA*-Signalsequenz vermittelt. Die Transkription des Strukturgens war unter Kontrolle des chemisch induzierbaren Tetracyclin-Promotor/Operators. Die Reinigung erfolgte in einem Schritt mit Hilfe des carboxyterminalen *Strep*-tag II durch Streptavidin-Affinitätschromatographie (Skerra und Schmitt, 2000) des rekombinanten Proteins. Dies gestattete die Isolierung des löslichen Nogo-A Fragments hNogoAn3, was den Ausgangspunkt für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Verbesserungen hinsichtlich Ausbeute und Reinheit bildete.

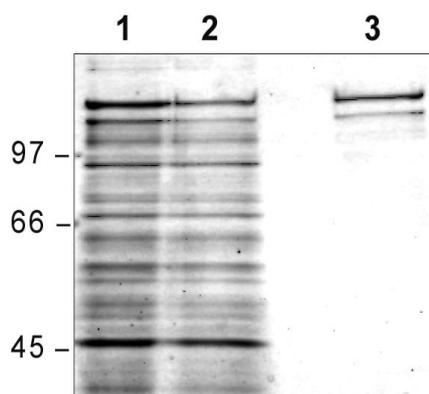


Abbildung 3.1: SDS-PAGE (10%) des in *E. coli* JM83 hergestellten und durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten hNogoAn3.

Der gegen SA-Puffer dialysierte Periplasmaextrakt einer 2 L Kultur wurde auf eine Streptavidin-Affinitätssäule aufgetragen, nicht gebundenes Protein ausgewaschen und gebundenes rekombinantes Protein mit 2,5 mM Desthiobiotin in SA-Puffer eluiert. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt. Aufgetragen wurden jeweils 20 μ l der periplasmatischen Proteinfraktion (1), die nicht an die Affinitätssäule gebundenen Proteine (2) und des Eluats (3). Molmassen sind in kDa angegeben.

3.1.1 Konstruktion von pASK75hN5 zur Gewinnung eines verkürzten Fragments der zentralen Domäne von Nogo-A

HNogoAn3 wurde in *E. coli* JM83 produziert und anschließend aufgereinigt (Abb. 3.1). Hierbei kam es zu einem erheblichen proteolytischen Abbau des rekombinanten Proteins. Das gereinigte Nogo-A-Fragment zeigte in der SDS-PAGE 2 Banden (Abb. 3.1), wobei die obere dem intakten Genprodukt entsprach (Anteil ca. 70 %). Die andere Fraktion repräsentierte ein verkürztes

Die periplasmatische Produktion und Reinigung von hNogoAn5 mit Hilfe von JM83/pASK75 hN5 erfolgte wie bereits unter Abschnitt 3.1 beschrieben. Zusätzlich wurde das Fragment über Gelfiltration an einer Superdex200-Säule gereinigt. Dies ergab eine Ausbeute von 190 µg l-1 Kulturvolumen. Verglichen mit hNogoAn3 (ca. 150 µg l-1 Kulturvolumen) konnte die Ausbeute leicht erhöht werden. Die berechnete molare Masse des rekombinanten Fragments betrug 72,6 kDa und der Extinktionskoeffizient $e_{280} = 0,72 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (zum Vergleich hNogoAn3: 80,6 kDa). Wie schon das native Protein voller Länge (Schwab, 2004), zeigte hNogoAn5 jedoch ein ungewöhnliches Laufverhalten im SDS-PAGE, was dazu führte, dass die apparente Molmasse ca. 110 kDa betrug.

Die Analyse der Präparation von hNogoAn5 mittels SDS-PAGE ergab im Hinblick auf die intakte Bande der Polypeptidkette einen Reinheitsgrad von ca. 95 % (das entsprechende rekombinante Fragment aus der Ratte zeigte lediglich 90 %; Fiedler, 2002). Die minimalen Verunreinigungen durch kürzere Proteinfragmente deuteten auf Degradation durch periplasmatische Proteasen hin. Durch Produktion von hNogoAn5 in HM125, einem Bakterienstamm mit defizienter periplasmatischer Protease DegP (Meerman und Georgiou, 1994), konnte der Reinheitsgrad der Proteinpräparationen weiter verbessert werden (Abb. 3.3). Damit wurde eine hochreine (ca. 98 %), nahezu homogene Präparation des N-terminalen Nogo-A-Fragments hNogoAn5 erhalten.

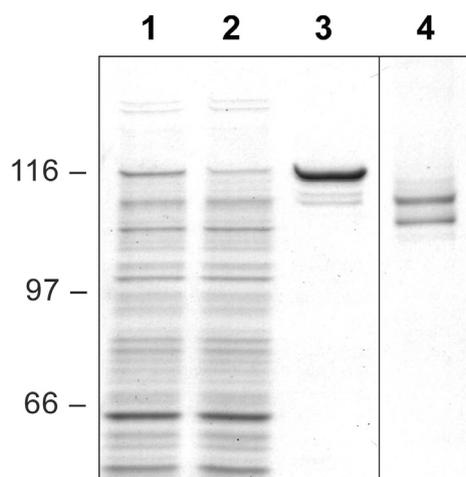


Abbildung 3.3: SDS-PAGE (10%) des in *E. coli* HM125 hergestellten und durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten hNogoAn5.

Der gegen SA-Puffer dialysierte Periplasmaextrakt einer 2 L Kultur wurde auf eine Streptavidin-Affinitätssäule aufgetragen, nicht gebundenes Protein ausgewaschen und gebundenes rekombinantes Protein mit 2,5 mM Desthiobiotin in SA-Puffer eluiert. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie gefärbt. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl der periplasmatischen Proteinfraction (1), der nicht an die Affinitätssäule gebundenen Proteine (2) und des eluierten Proteins hNogoAn5 im reduzierten (3) sowie im nicht reduzierten Zustand (4). Molmassen sind am linken Gelrand in kDa angegeben.

3.1.2 Optimierung der gentechnischen Produktion des löslichen Nogo-A Fragments, Untersuchungen zur Rolle der Cysteinreste

Bei der Analyse der Gelfiltrationsproben mittels SDS-PAGE, wobei vor der Elektrophorese kein Reduktionsmittel zugesetzt worden war, wurde eine erhebliche Heterogenität festgestellt. Diese war vor allem auf die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken zurückzuführen, was zur teilweisen Multimerisierung des Proteins führte. Diese Aggregate konnten bei Gelfiltration jedoch vom monomeren Anteil getrennt werden (s. auch Abschnitt 3.1.4). Zudem wurde der monomere Anteil des Proteins in *E. coli* als zwei Disulfidisomere produziert (Abb. 3.3), welche in ungefähr gleichen Anteilen auftraten. Die insgesamt beschleunigte gelelektrophoretische Mobilität der beiden Banden deutete darauf hin, dass im hNogoAn5 mindestens eine Disulfidbindung ausgebildet ist, eine weitere Bindung in *E. coli* aber nur partiell entsteht und möglicherweise für die Faltung als lösliches Protein entbehrlich ist. Um die Beteiligung der einzelnen Cysreste zu untersuchen, wurden im Rahmen der

Bachelorarbeit von K. Greiff daher alle sechs im humanen Nogo-A-Fragment vorhandenen Cysteinreste ausgetauscht. Ausgehend von pASK75-hN5 wurden die Positionen Cys424, Cys464, Cys559, Cys597, Cys699 und Cys912 durch Alanin substituiert (Die Nummerierung der Cysteinreste bezieht sich auf die Wildtyp-Sequenz).

Die sechs mutierten Versionen des hNogoAn5 wurden in *E. coli* HM125 wie zuvor produziert und im SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen sowie durch Gelfiltrationschromatographie analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Mutanten hNogoAn5(C424A), hNogoAn5(C559A) und hNogoAn5(C597A) wie das ursprüngliche hNogoAn5 inhomogenes Laufverhalten im SDS-PAGE zeigten, also ebenfalls Disulfidomere ausbildeten. Dies deutete auf eine Beteiligung an essentiellen Disulfidbindungen. Im Gegensatz dazu konnten die drei Mutanten hNogoAn5(C464A), hNogoAn5(C699A) und hNogoAn5(C912A) mit höherer Ausbeute produziert werden und zeigten in Gelfiltrationsexperimenten sehr wenig Aggregatbildung bzw. Multimerisierung. Proben der gereinigten hNogoAn5-Mutanten C464A, C699A und C912A zeigten im nicht reduzierten Zustand ein prominentes Disulfidomer in der SDS-PAGE. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass diese Cysteinreste möglicherweise an der unvollständig gebildeten Disulfidbindung beteiligt sind.

Vor allen die Mutante hNogoAn5(C912A) lieferte gute Ausbeuten (verdreifacht im Vergleich zum Wild-Typ-Protein) und zeigte sich sowohl im SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abb. 3.4) als auch in Gelfiltrationsexperimenten als besonders homogen. Dies deutete darauf hin, dass Cys 912 keine für die Faltung des Proteins wichtige Disulfidbrücke ausbildete. Um festzustellen, welcher der anderen Cystein-Reste 464 und 699 an der nicht essentiellen Disulfidbindung beteiligt ist, wurden zwei Doppelmutanten hNogoAn5(C464A/C912A) und hNogoAn5(C699A/C912A), durch Umklonierung aus pASK75hNogoAn5C464A, pASK75hNogoAn5C699A und pASK75hNogoAn5C912A konstruiert. Dazu wurden, durch Schnitt mit den Restriktionsendonucleasen *XbaI* und *SacI*, die nogo-Genfragmente mit den Cystein-Mutationen C464A und C699A zusammen mit der *OmpA*-Signalsequenz aus pASK75hNogoAn5C464A und pASK75hNogoAn5C699A isoliert. Die beiden Genfragmente wurden in den mit *XbaI/SacI* geschnittenen und isolierten Vektor pASK75-hN5(C912A) eingesetzt.

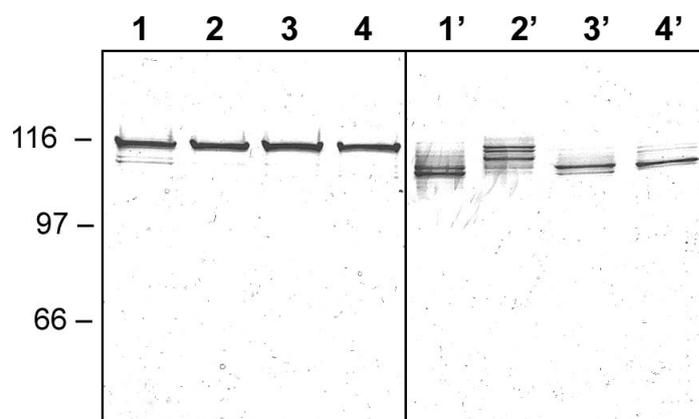


Abbildung 3.4: Analyse der durch Affinitätschromatographie und Gelfiltration über Sephadex200 aus dem Periplasma gereinigten hNogoAn5-Varianten durch SDS-PAGE (8%). Die Proben 1-4 (links) wurden vor der Elektrophorese mit b-Mercaptoethanol reduziert, die Proben 1'-4' nicht. Spur 1: w/hNogoAn5; Spur 2: hNogoAn5(C464A/C912A); Spur 3: hNogoAn5(C912A); Spur 4: hNogoAn5(C699A/C912A).

Nacherneuer Produktion der hNogoAn5-Varianten in *E. coli* HM125 und Reinigung über Streptavidin-Affinitätschromatographie wurde ihr Aggregationsverhalten und das Laufverhalten im SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen verglichen. Die Expression von hNogoAn5(C464A/C912A) führte zu stark reduzierten Ausbeuten an löslichem Protein, welches aus dem Periplasma isoliert werden konnte. In Gelfiltrationsexperimenten konnte zudem eine starke Multimerisierung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), und das Laufverhalten in der SDS-PAGE, wenn die Proben nicht reduziert worden waren, war inhomogen (Abb. 3.4). Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante hNogoAn5(C699A/C912A) nur minimale Aggregatbildung in Gelfiltrationsexperimenten. Auch waren praktisch keine Disulfidisomere im SDS-PAGE sichtbar (Abb. 3.4).

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die Cysteinreste 699 und 912 offenbar keine strukturell wichtige Disulfidbrücke im hNogoAn5 bilden, ggf. nicht-native Cysteinbrücken ausbilden. Auf der anderen Seite sind Cys424, 464, 559 und 597 für die korrekte Proteinfaltung essentiell und scheinen, zwei Disulfidbrücken auszubilden.

Das rekombinante Fragment hNogoAn5(C699A/C912A) konnte mit guter Ausbeute (400 µg 1-l Kulturvolumen) produziert werden. Die Proteinpräparation war homogen und wies einen Reinheitsgrad von ca. 99 % auf. hNogoAn5(C699A/C912A) wurde daher für die nachfolgende biochemische Charakterisierung der N-terminalen Nogo-A Domäne und für Bindungsstudien (s. 3.3) hauptsächlich verwendet.

3.1.3 Analyse der N-terminalen Region des Nogo-A Proteins durch limitierte Proteolyse

Da bislang keine Strukturinformationen zur N-terminalen Domäne des Nogo-A-Proteins bekannt sind, wurde zunächst versucht, mögliche Domänengrenzen durch limitierte Proteolyse zu identifizieren (Fontana *et al.*, 1999). Als Enzym wurde hier Trypsin gewählt, welches nach Lys- und Arg-Resten schneidet und somit eine relativ breite Substratspezifität hat. Partieller Verdau des hNogoAn5(C464A/C912A) führte zu einer Anreicherung von hauptsächlich zwei großen Fragmenten (Abb. 3.5) mit relativen Molmassen von 66 kDa und 45 kDa. Das Muster des Verdau deutete somit auf zumindest zwei definierte Domänen im Sequenzabschnitt 334-966 des humanen Nogo-A hin. Um die exakte Lage dieser Domänen im N-terminalen Nogo-A zu bestimmen, wurde das Reaktionsprodukt nach SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert und die zwei prominenten Banden wurden durch N-terminale Edman-Abbau sequenziert.

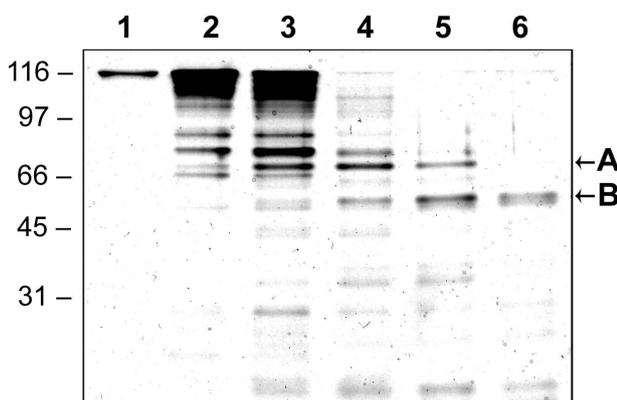


Abbildung 3.5: SDS-PAGE (8%) von hNogoAn5(C699A/C912A) nach partiellem Verdau durch Trypsin.

Spur 1-6 zeigen das Muster des proteolytischen Verdau nach 0, 1, 5, 10, 15, und 30 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur und pH 7,5. Das Enzym/Substratverhältnis betrug ca. 1/1500. Die prominenten Produkte des Verdau sind mit Pfeilen markiert und wurden durch N-terminale Sequenzierung analysiert.

Die Sequenzierung ergab, dass die N-termini beider Polypeptide identisch waren. Die Trypsinspaltstelle lag zwischen oder direkt nach den Aminosäureresten Lys 372 und Arg 373. Demnach mussten sich die C-Termini der beiden Fragmente unterscheiden. Die berechnete Molmasse des verkürzten Fragments von hNogoAn(C699A/C912A) mit dem Beginn bei Position 374 und einem intakten Ende nach dem *Strep*-tag II beträgt 64.9 kDa. Geht man davon aus, dass dieses Fragment kein ungewöhnliches Laufverhalten im SDS-PAGE zeigt, könnte die Bande "A" (Abb. 3.5) dem Polypeptid mit einem intakten C-Terminus entsprechen.

3.1.4 Charakterisierung des Oligomerisierungszustandes des Nogo-A-Fragments

Die Quartärstruktur von hNogoAn bzw. hNogoAn(C699A/C912A) wurde mittels Gelfiltrationschromatographie, analytischer Ultrazentrifugation und chemischen Quervernetzungsexperimenten untersucht. In Gelfiltrationsexperimenten mit einer Sephadex200-Säule zeigte sich, dass sowohl rekombinantes hNogoAn5 als auch seine Cystein-Substitutionsvarianten sich wie Oligomere verhielten und bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 360 kDa von der Säule eluieren. Diese Elutionsfraktionen unterschieden sich im Laufverhalten klar von den teilweise ebenfalls vorhandenen Aggregaten, die im Ausschlussvolumen der Säule eluieren (bei Variante hNogoAn(C699A/C912A) traten keine Aggregate auf; s. 3.1.2 (Abb. 3.6). Angesichts der Molmasse des monomeren hNogoAn5 von 72 kDa, schien hNogoAn5 somit als Pentamer in Lösung vorzuliegen.

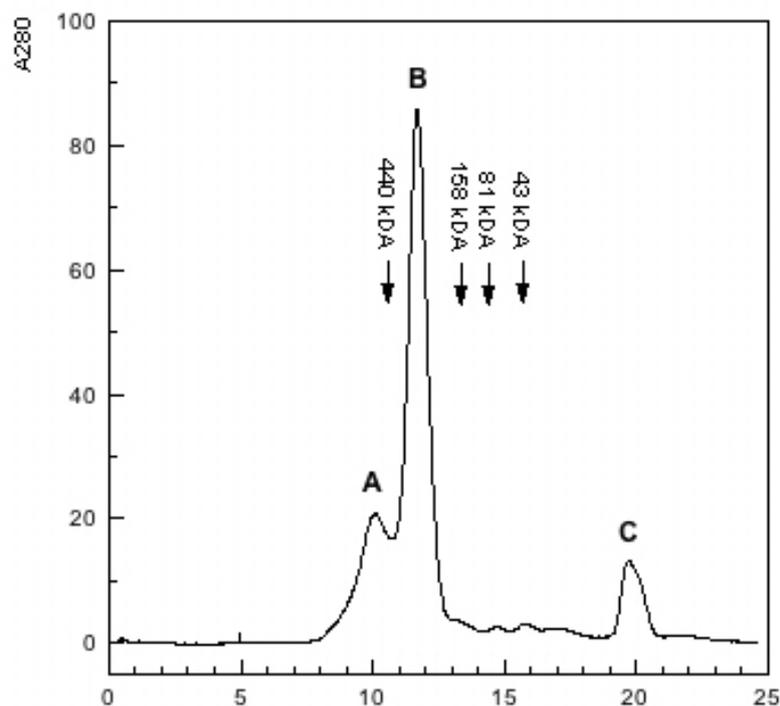


Abbildung 3.6: Analytische Größenausschlusschromatographie von hNogoAn5.

Das Retentionsvolumen des hNogoAn5 an der Superdex 200 HR 10/30 Säule mit SA-Puffer als Laufpuffer entspricht einem Molekulargewicht von ca. 360 kDa. V_0 bezeichnet das Ausschlussvolumen und V_t das Totalvolumen der Säule. Die Pfeile zeigen das Elutionsvolumen von Markerproteinen (Ovalbumin, Aldolase, Transferrin, Ferritin). A: Aggregate; B: lösliches hNogoAn5; C: nicht-proteinogene Kontaminationen.

Um den oligomeren Zustand genauer zu charakterisieren, wurden zunächst chemische Quervernetzungsexperimente durchgeführt. Als chemische Crosslinker dienten Dissuccimidyl-Suberat (DSS), Dissuccimidyl-Glutarat (DSG) und Ethylenglycol-bis(succinimidylsuccinat) (EGS). Alle drei sind homobifunktional und vernetzen benachbarte Aminogruppen. Sie unterscheiden sich lediglich in der Armlänge (DSS: 11,4 Å; DSG: 7,7 Å; EGS: 16,1 Å). In einer SDS-PAGE der behandelten Proben von hNogoAn5(C699A/C912A) konnte jedoch keine kovalente Multimerisierung gezeigt werden.

Daraufhin wurden Proben von hNogoAn5(C699A/C912A) durch analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation untersucht. hNogoAn5(C699A/Cys912A) wurde hierfür in drei verschiedenen Konzentrationen (0,8 mg/ml; 0,3 mg/ml und 0,1 mg/ml) in die Messzellen gegeben. Die Proben wurden zentrifugiert, bis Gleichgewicht erreicht wurde (drei Tage), und anschließend durch SDS-PAGE analysiert. Es zeigte sich, dass die Proben dabei weitgehend stabil geblieben waren, d.h. kein nennenswerter proteolytischer Abbau stattgefunden hatte (Abb. 3.7). Lediglich bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml wurden Abbauprodukte entdeckt, Diese Probe wurde daher nicht zur Auswertung herangezogen.

Die Auswertung des Konzentrationsprofils aus der analytischen Ultrazentrifugation ergab eine Masse des Proteins bzw. des Proteinkomplexes von $60 \pm 0,4$ kDa (Proteinkonzentration 0,8 mg/ml) bzw. $79,9 \pm 5,2$ kDa (Proteinkonzentration 0,3 mg/ml). Da diese Wertenäherungsweise der Masse des monomeren hNogoAn5(C699A/C912A) mit 72 kDa entsprachen, sollte hNogoAn5 als Monomer in Lösung vorliegen. Die Ursache der frühen Elution des hNogoAn5-Fragments bei ca 360 kDa in den obigen Gelfiltrationsexperimenten ist somit nicht in einer Oligomerisierung, sondern in Besonderheiten der Sekundär- oder Tertiärstruktur zu suchen.

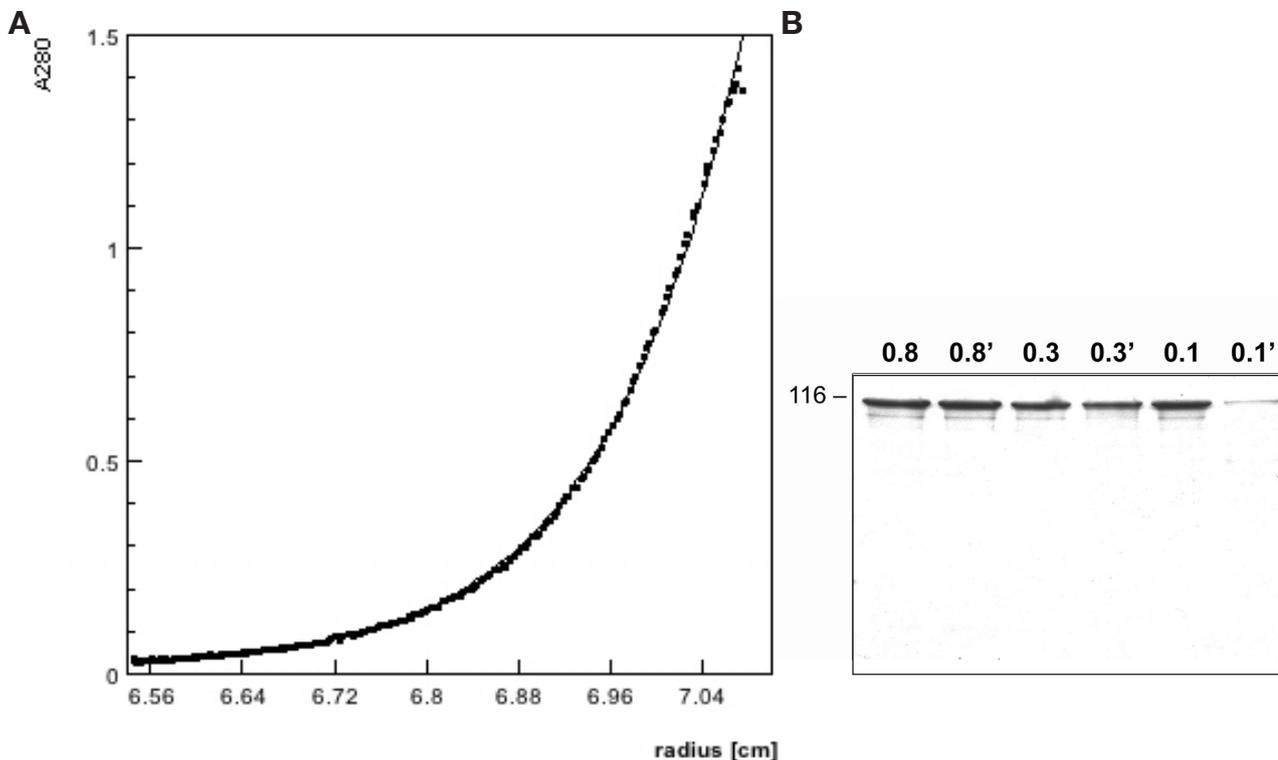


Abbildung 3.7: Analytische Ultrazentrifugation von hNogoAn5(C699A/C647A). Das Protein wurde in einer Konzentration von 0,8 mg/ml in 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA in die Messzelle (Ti60 Rotor; 6 Sektoren-Rotor mit 12 mm Spaltgröße) gegeben und für 72 Stunden bei 8000 rpm und 20°C zentrifugiert. **A:** Die kalkulierte Masse betrug $60 \pm 0,4$ kDa. **B:** SDS-PAGE (10 %) der hNogoAn5(C699A/C647A)-Proteinproben mit Konzentration von 0,8, 0,3 bzw. 0,1 mg/ml vor und nach (markiert mit ') dem Ultrazentrifugationsschritt.

Das PCR-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym *NdeI* geschnitten und gereinigt. Ein Derivat des Vektors pRSET5a (Schoepfer, 1993), der für die extrazelluläre Domäne des CD16 C-terminal mit dem His₆-tag fusioniert, kodiert (M. Fogarasi und M. Schlapschy, Publikation in Vorbereitung), wurde mit den Restriktionsenzymen *NdeI* (am Startpunkt der Translation) und *Eco47III* (direkt vor dem His₆-tag) geschnitten und das PCR-Fragment inseriert. In dem resultierenden Plasmid pN66 (Abb. 3.8B) stand das Nogo66-Genfragment unter der Kontrolle des Gen 10 Promotors des T7 Bakteriophagen (Schmidt und Skerra, 1994) und führte zur Produktion des Nogo66-His₆-Fragmentes im Cytosol von *E. coli*.

Die Produktion des rekombinanten Nogo66-Fragments erfolgte im 2 L-Maßstab in *E. coli* BL21/pN66 durch Induktion bei OD₅₅₀ = 0.5 mit IPTG (s. Abschnitt 2.2.11). SDS-PAGE des Gesamtzellproteins, das zu verschiedenen Zeitpunkten der Produktion analysiert wurde, zeigte, dass der Anteil des rekombinanten Nogo66-Fragments mit der Zeit akkumulierte. Die Proteinproduktion über Nacht war möglich (Abb. 3.9A). Nach Aufschluss der Bakterien mittels *French Press* wurde die Präparation durch Zentrifugation in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion getrennt. Das Nogo66-Fragment befand sich in der unlöslichen Fraktion, lag demnach in Form von Einschlusskörpern vor (Abb. 3.9B). Die Reinigung des Nogo66-Fragments erfolgte nach Solubilisierung der Aggregate mit Hilfe von Gdn-HCl, anhand des am Carboxyterminus fusionierten Hexahistidin-Anhängsels in einem Schritt durch IMAC. (Abb. 3.9C). Nogo66 konnte unter denaturierenden Bedingungen von der Säule eluiert werden. Auch in Anwesenheit von GuHCl blieb ein Großteil des Proteins ans Säulenmaterial gebunden, da die Bindung des Nogo66-His₆ an das Säulenmaterial relativ fest war, jedoch konnte ein Teil des Nogo66-Fragmentes von der Säule eluiert werden. Anschließend wurde das Protein durch Verdünnung in PBS zurückgefaltet, wobei ein Großteil des Nogo66-His₆ ausfiel und anschließend abzentrifugiert wurde. Trotz der hohen Verluste war im Überstand dennoch ausreichende Mengen an gefaltetem Nogo66 für Bindungsexperimente (s. Abschnitt 3.3).

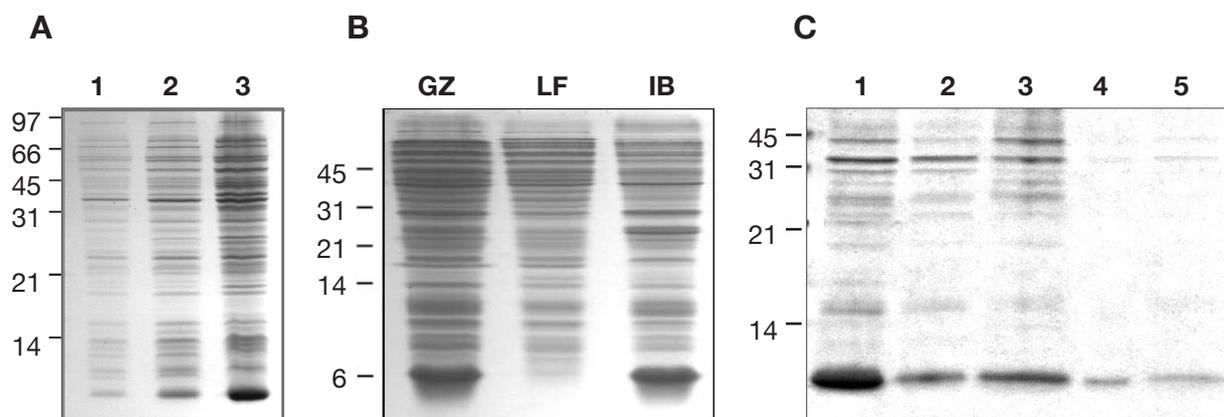


Abbildung 3.9: Produktion des Nogo66-Fragmentes in von BL21/pN66. A: Analyse der Produktion von Nogo66-His in BL21 vor Induktion (1), 2 h nach Induktion (2) und nach Inkubation über Nacht (3) durch SDS-PAGE (15 %). **B:** Die Zellen wurden durch French Press aufgeschlossen, anschließend abzentrifugiert und die Proben des Gesamtzelllysats (GZ), der löslichen Fraktion (LF) und der Einschlusskörper (IB) durch SDS-PAGE analysiert. **C:** Das rekombinante Nogo66-Fragment wurde aus den solubilisierten Aggregaten durch IMAC gereinigt. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl des auf die Säule aufgetragenen Solubilisats (1), der nicht an die Säule gebundenen Proteinfraction (2), des Eluats bei 50 mM Imidazol (unspezifisch gebundenes Protein) (3) und des Eluats (4 und 5).

Die so erhaltene Präparation des Nogo66 wies anhand der SDS-PAGE einen zufriedenstellenden Reinheitsgrad auf. Daher wurde auf weitere Optimierungsschritte verzichtet. Nogo66 wurde im Folgenden im Western Blot und ELISA zur Charakterisierung der Bindung des IN-1 Fab-Fragments und des Nogo-Rezeptors an Nogo66 eingesetzt.

3.2 Bakterielle Produktion und Reinigung des rekombinanten Nogo-Rezeptors (NgR)

Der Nogo-Rezeptor NgR ist ein Membranprotein, das über einen Glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Axonmembran fixiert ist. Das 473 Aminosäuren große Protein besteht hauptsächlich aus einer leucinreichen globulären Domäne, die N-terminal und C-terminal durch cysteinreiche Regionen umgeben wird (Fournier *et al.*, 2001). Insgesamt enthält der NgR 14 Cystein-Reste. Deren Tendenz, nicht native Disulfid-Bindungen einzugehen, fördert die Aggregation des Proteins und erschwerte seine heterologe Produktion in *E. coli*.

3.2.1 Konstruktion des Expressionsvektors pGEX-NgR zur löslichen Produktion im Cytoplasma von *E. coli*

Fournier und Mitarbeiter (2001) hatten den Nogo-Rezeptor bereits als Fusionsprotein mit der Gluthathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* hergestellt. Die Fusion mit der GST, einem dimeren Protein aus *Schistosoma japonicum* (Smith und Johnson, 1988) mit einem Molekulargewicht von 26 kDa je Monomer, sollte die korrekte Faltung des NgR ermöglichen. Solche Fusionsproteine können in *E. coli* produziert und nach dem Zellaufschluss durch Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose von den übrigen Bestandteilen des Bakterienlysates getrennt werden. Auf dieser Strategie basierend, wurde die Sequenz der Ektodomäne des Nogo-Rezeptors (AS 26-445, SWISS-PROT Eintrag Q9BZR6, ohne Signalpeptid und GPI-Anker) mit den Primern hz10 und hz11 mittels PCR aus cDNA von menschlichem Hirngewebe (freundlicherweise von E. Meindl, Abteilung Neuroimmunologie, MPI für Neurobiologie zur Verfügung gestellt) amplifiziert. Die Inserterung des mit *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen PCR-Produktes in den Vektor pLITMUS39 führte zum Vektor pLITMUSNgR. Nachdem die Basensequenz des NgR-Gens überprüft worden war, wurde es durch Umklonierung in den Vektor pGEX5X umkloniert (Abb. 3.10).

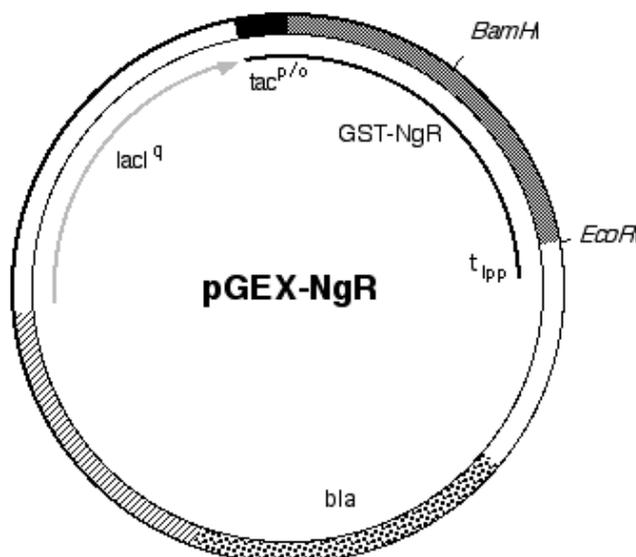


Abb.3.10 A: Konstruktion des Expressionsplasmids für das GST-NgR-Fusionsprotein. Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pGEX-NgR, das für ein Fusionsprotein aus Nogo-Rezeptor (AS 26-445) und GST kodiert. Das Gen steht unter der Kontrolle des mit IPTG induzierbaren tac-Promotor/Operators und wird durch den Lipoprotein-Transkriptionsterminator abgeschlossen. ori bezeichnet den Replikationsursprung des pBR322-Plasmids.

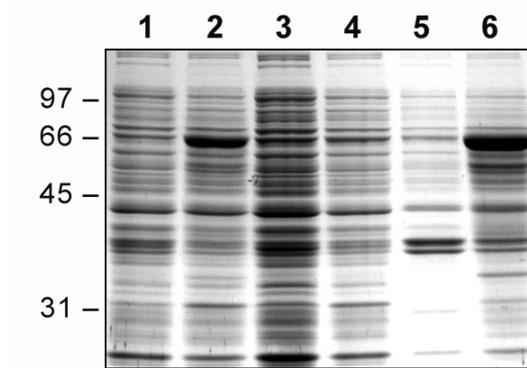


Abbildung 3.11: SDS-PAGE zum der Expressionsversuch von JM83/pGEX-NgR. Zwei 2L Schüttelkolben mit JM83/pGEX-NgR wurden bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert und die Produktion des GST-NgR-Fusionsproteins wurde in einer der Kulturen bei OD 0.5 mit 0,5 μ M IPTG induziert. Aufgetragen wurden jeweils 1 μ l Gesamtzellaufschluss, 3 h nach Induktion mit IPTG (2). Als Kontrolle diente die uninduzierte Kultur (1). In Spur 3 und 4 wurde jeweils 1 μ l des löslichen Überstandes nach Aufschluss der Zellen (uninduziert (3), induziert (4)) aufgetragen. In Spur 5 und 6 sind korrespondierende Proben der *inclusion bodies* aufgetragen.

Da sich evtl. auch kleine Mengen an löslichem GST-NgR im Überstand des Zelllysats befinden konnten, wurde versucht, das rekombinante Protein daraus mittels GSH-Agarose-Affinitätschromatographie zu isolieren (Abb. 3.12). Das erhaltene Protein zeigte bei Analyse durch 12% SDS-PAGE zwei Banden (Abb. 3.12B), davon eine erwartungsgemäß bei 70 kDa. Die zweite prominente Bande hatte eine Größe von ca. 66 kDa, was zunächst auf ein Abbauprodukt hindeutete. Die N-terminale Sequenzierung der Bande ergab jedoch die Anfangssequenz „AAKDYKFGNARVKM“. Nach BLAST-Suche konnte das Protein eindeutig als das Chaperon GroEL identifiziert werden (Braig *et al.*, 1994, Swiss Prot Entry: P0A6F5). GroEL besteht aus sieben 66 kDa Untereinheiten. Die geringe Menge des GST-NgR in der löslichen Fraktion lag demzufolge als Komplex mit GroEL vor und war demnach höchstwahrscheinlich ungefaltet.

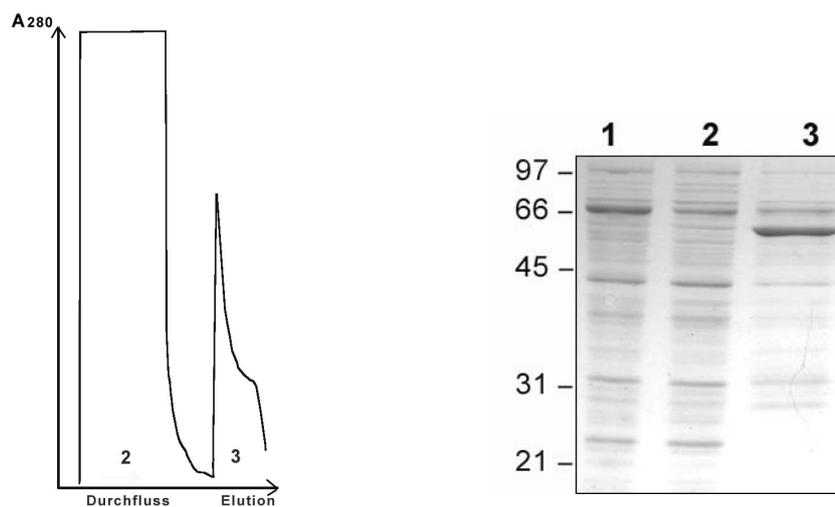


Abbildung 3.12: Reinigung des GST-NgR-Fragmentes aus der löslichen Zellfraktion von *E. coli*.

A: Isolierung des rekombinanten NgR-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe der GST durch Reinigung an GSH-Agarose. Die für die Analyse in B) gesammelten Fraktionen sind durch die Zahlen 2 und 3 markiert. B: SDS-PAGE-Analyse (12%) der Fraktionen aus A). Aufgetragen wurden jeweils 5 μ l der löslichen Proteinfraction (1) des nicht an die Säule gebundenen Wirtspoteins (2) sowie des kompetitiv mit Glutathion eluierten Proteins (3). Molmassen sind am linken Rand angegeben.

Erste Versuche, GST-NgR aus den *Inclusion Bodies* rückzufalten, waren erfolglos. Die von Fournier *et al.* (2001) veröffentlichten Ergebnisse zur bakteriellen Produktion eines solchen Fusionsproteins konnten somit nicht reproduziert werden. Dies steht im Einklang mit Berichten von Schimmele *et al.* (2005), denen es ebenfalls nicht gelang löslichen NgR in *E. coli* herzustellen.

3.2.2 Konstruktion des Expressionsvektors pASK111-TrxNgR zur Produktion eines Thioredoxin-NgR-Fusionsproteins durch Rückfaltung

Da die Rückfaltung des GST-NgR Fusionsproteins erfolglos verlief, wurde, NgR als Fusionsprotein mit Thioredoxin (TrxA aus *E. coli*) an seinem N-Terminus hergestellt. Thioredoxin kann die Löslichkeit von rekombinanten Proteinen erhöhen (LaVallie *et al.*, 1993) und hat gegenüber GST den Vorteil, dass es kein Homodimer bildet, sondern normalerweise als relativ kleines 15 kDa Monomer vorliegt. Die extrazelluläre Domäne des NgR (AS 26-445) wurde mittels PCR mit den *Primern* hz12 und hz13 von pGEX-NgR amplifiziert und das PCR-Produkt mit *SfiI* geschnitten. Anschließend wurde es in den mit *BglI* (generiert ein zu *SfiI* kompatibles Ende) und *Eco47III* (generiert ein stumpfes Ende direkt vor dem *Strep*-tag) geschnittenen Vektor pASK111-TrxDKK inseriert. Der resultierende Vektor wurde als pASK111-TrxNgR bezeichnet (Abb. 3.13). Der Vektor kodiert somit für ein Fusionsprotein aus NgR und Thioredoxin am N-Terminus und dem *Strep*-tag am C-Terminus (Molmasse 60 kDa).

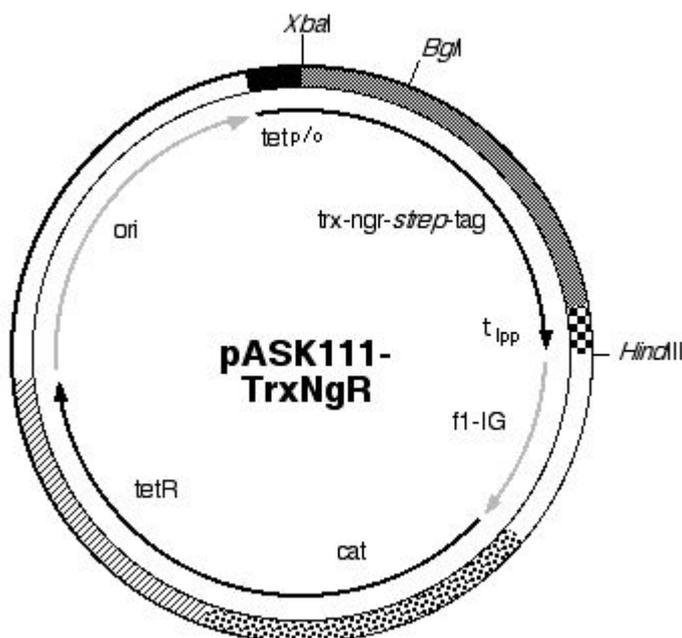


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pASK111-TrxNgR, das für ein Fusionsprotein aus dem Nogo-Rezeptor (AS 26-445) und bakteriellem Thioredoxin kodiert. Die Transkription des Strukturgens kodierend für Thioredoxin, NgR und das Strep-tag steht unter der Kontrolle des tetA Promotor/Operators (tetp/o) und wird durch den Lipoprotein-Terminator beendet (t_{lpp}). Der Promotor wird im nicht induzierten Zustand durch das konstitutiv exprimierte tet-Repressor-Gen (tetR) reprimiert, das als zweites Element in einem dicistronischen Operon mit dem Gen der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (cat-Chloramphenicol-Resistenz) angeordnet ist.

Analog zu GST-NgR (s. Abschnitt 3.4.1) erfolgte die bakterielle Produktion des TrxA-NgR-Fusionsproteins (TrxA-NgR) im 2 L Schüttelkolben in den *E. coli* Stämmen JM83, BL21 und Origami. Die Induktion erfolgte bei OD 0.5 durch Zugabe von 50 µM aTc. 3 h danach wurden die Zellen aufgeschlossen und fraktioniert. Die Analyse der Zellfraktionen durch SDS-PAGE ergab, dass das Thioredoxinfusionsprotein zwar produziert wurde (Abb. 3.14), aber erneut hauptsächlich als *Inclusion Bodies* auftrat. Reinigung des Proteins aus der löslichen Fraktion mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie und anschließende Analyse durch SDS-PAGE ergab, dass das Protein in dieser Fraktion wiederum im Komplex mit GroEL vorlag (nicht gezeigt). Verschiedene Versuche, TrxA-NgR aus den *Inclusion Bodies* zurückzufalten, blieben erfolglos.

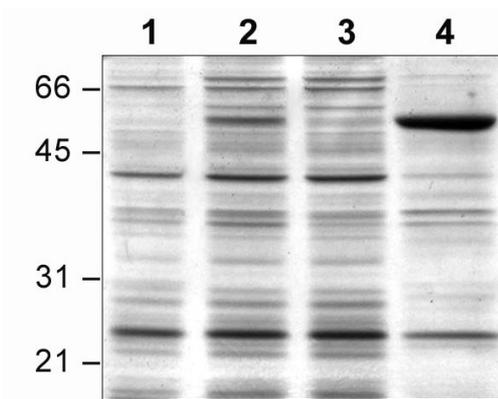


Abbildung 3.14: SDS-Page Analyse der Expression von JM83/pASK111-TrxNgR

Zwei 2 L Schüttelkolben mit JM83/pASK111-TrxNgR wurden bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert, und die Produktion des Fusionsproteins wurde bei OD 0.5 mit 50 µM atc induziert. Aufgetragen wurden jeweils 1 µl Gesamtzellaufschluss vor Induktion (1) und 3 h nach Induktion mit atc (2); löslicher Überstand nach Aufschluss der Zellen (3); unlösliche Fraktion (4).

Auf der Grundlage der bekannten Struktur des NgR (He *et al.*, 2003; Nie *et al.*, 2003), wurde daraufhin nur die eigentliche Liganden-Bindungsdomäne des NgR (As 26-310) in *E. coli* produziert. Diese beinhaltet die zentrale Leucin-reiche β -Faltblattstruktur ohne die C-terminale Cystein-reiche Region. Zudem wurden die freien Cystein-Reste an den Positionen 80 und 140 durch andere Aminosäuren ausgetauscht. Bei Analyse der Kristallstruktur (PDB Code: 1p8t) mit dem Programm Insight ergaben sich zwei plausible Möglichkeiten der Mutagenese für Cys80 zu Serin und zu Isoleucin sowie eine für Cys140 zu Asparagin. Damit konnte die Anzahl der Cysteine auf vier Disulfidbrücken beschränkt werden. Für die gentechnische Herstellung des resultierenden Fragmentes TrxA-NgR Δ CT wurden ausgehend von Einzelstrang-DNA des Vektors pASK111-TrxNgR die Codons für die letzten 136 Aminosäuren (As 311 bis 447) mit Hilfe des Oligonucleotids sm1 durch ortsgerichtete Mutagenese deletiert. Danach wurden, ausgehend von Einzelstrang-DNA des erhaltenen pASK111-TrxNgR Δ CT, die Vektoren pASK111-TrxNgR Δ CTC80SC140N sowie pASK111-TrxNgR Δ CTC80IC140N durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Oligonucleotiden sm2, sm3 bzw. sm4 konstruiert.

Die Produktion der Fusionsproteine TrxA-NgR Δ C80SC140N und TrxA-NgR Δ C80IC140N erfolgte analog zu TrxA-NgR in *E. coli* JM83. Eine Analyse der Zellfraktionen durch SDS-PAGE ergab, dass alle Fragmente *Inclusion Bodies* in *E. coli* vorlagen. Die *Inclusion Bodies* wurden isoliert, gewaschen und in 6 M Guanidiniumchlorid, 100 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM Mercaptoethanol, 2 mM EDTA solubilisiert. Die Rückfaltung der NgR-Fragmente wurde zunächst im kleinen Maßstab mit dem Screen FoldiT (Hampton Research) getestet. Beide Fragmente ließen sich in Anwesenheit von Arginin und Saccharose als Stabilisatoren sowie mit Laurylmaltoside als Detergens (Puffer Nr.4) zurückfalten, die Ausbeute an löslichem Protein schien dabei mit TrxA-NgR Δ C80SC140N jedoch etwas höher. Deshalb wurde im Folgenden mit diesem Fragment, bezeichnet als TrxA-NgR Δ weitergearbeitet. Nach Abzentrifugation ungelöster Anteile erfolgte die Reinigung des Fusionsproteins durch Streptavidin-Affinätschromatographie (Abb. 3.15).

Die Ligandenbindungsdomäne des NgR konnte in dieser Form letztendlich als Thioredoxin-Fusionsprotein zur Homogenität gereinigt werden und stand also für Bindungsstudien zur Verfügung.

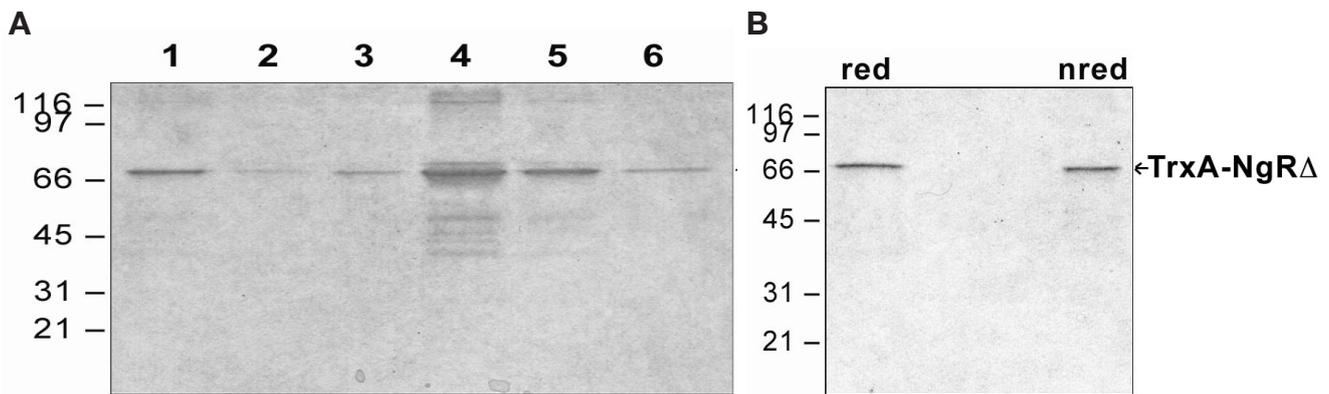


Abbildung 3.15: SDS-PAGE des mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten TrxA-NgR Δ -Fusionsproteins. Die Inclusion Bodies aus JM83/ pASK111-TrxNgR Δ CTC80SC140N wurden solubilisiert und durch schnelle Verdünnung in rückgefaltet. Nach Dialyse gegen 50 mM Tris/HCL pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA und Abzentrifugation der unlöslichen Aggregate wurde die Lösung über eine Streptavidinsäule gereinigt. A) Auf das SDS-Gel aufgetragen wurden jeweils 20 μ l der rückgefalteten Proteinfraktion (1) des nicht an die Affinitätssäule gebundenen Proteins (2) und des Eluats (Spur 3-6). B) Das Eluat aus A wurde hier im reduzierten (red.) und im nicht reduzierten Zustand (nred) aufgetragen. Molmassen sind in kDa angegeben. Die Protein-Banden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt.

3.3 Untersuchung der Bindung des Nogo-Rezeptors und des IN-1 Fab Fragmentes an Nogo-A

3.3.1 Epitope Mapping von Nogo-A mit Hilfe von immobilisierten Peptiden

Sowohl die Bindungsstelle des NgR als auch das Epitop des IN-1-Antikörper sollten durch Bindungsstudien an immobilisierten Peptiden aus der Nogo-A-Sequenz charakterisiert werden. Dazu wurde die komplette Nogo-A-Sequenz in überlappenden 15er-Peptiden kovalent in „Spots“ an einer Zellulosemembran synthetisiert. Die Peptidsequenzen hatten einen Abstand von jeweils drei Aminosäuren, so dass für die Sequenz des humanen Nogo-A (1192As) insgesamt 394 Peptide immobilisiert wurden.

3.3.1.1 Identifizierung des IN-1 Epitopes

IN-1 ist ursprünglich ein IgM-Antikörper und somit wahrscheinlich ein Produkt der primären Immunantwort (Bandtlow *et al.*, 1996). Fiedler *et al.* (2000) setzten daher Affinitätsmaturierung ein, um, ausgehend von dem rekombinanten IN-1 Fab-Fragment (Bantlow *et al.*, 1996), ein Fab-Fragment (IN-1II.1.8) mit erhöhter Bindungsaffinität zur N-terminalen Region von Nogo-A herzustellen. Sowohl die Bindung des chimären IN-1 Fab Fragments als auch die der *in vitro* affinitätsmaturierten Mutante IN-1II.1.8 an Nogo-A wurde im Folgenden charakterisiert. Als Kontrolle diente das gegen MOG-gerichtete 8-18C5 Fab-Fragment (Breithaupt *et al.*, 2003). Es unterscheidet sich nur in den variablen Domänen vom rekombinanten IN-1 Fab-Fragment und zeigt im Western Blot keine Kreuzreaktivität gegenüber Nogo-A. Alle Fragmente hatten humane konstante Domänen und waren am C-Terminus der schweren Kette mit dem *Strep*-tag II fusioniert, so dass sie mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt werden konnten (Abb. 3.16).

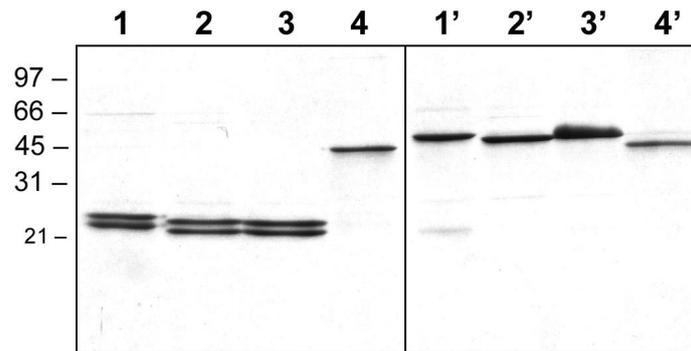


Abbildung 3.16: Analyse der gereinigten Fab-Fragmente und des Fusionsproteins TrxA-NgR Δ durch SDS-PAGE (12%). Die Proben 1-4 wurden vor der Elektrophorese mit β -Mercaptoethanol reduziert, die Proben 1'-4' (rechts) sind nicht reduziert. Aufgetragen wurde jeweils 1 μ g gereinigtes Protein. Spur 1 und 1': 8-18C5 Fab-Fragment; Spur 2 und 2': IN-1 Fab-Fragment; Spur 3 und 3': IN-1(II.1.8) Fab-Fragment; Spur 4 und 4': TrxA-NgR Δ . Molmassen sind am linken Rand in kDa angegeben.

Die "Spot"-Membran wurde mit einer 2 μ M Lösung der Fab-Fragmente inkubiert. Bindung der Fab-Fragmente an die Membran wurde durch anschließende Inkubation mit einem Alkalische-Phosphatase-Konjugat von StrepTactin anhand des *Strep*-tags nachgewiesen. Lediglich die Bindung des IN-1 Fab-Fragments an die Membran wurde zunächst auch mittels Peroxidase-gekoppeltem anti-*Strep*-tag-Antiserums bestimmt. In den folgenden Experimenten wurde dieses Reagenz jedoch nicht mehr verwendet, da die Peroxidase-Reaktion offenbar die immobilisierten Peptide angreift und die Membran nach dem Experiment nicht mehr regeneriert werden konnte.

Das IN-1 Fab-Fragmente und das IN-1II.1.8 Fab-Fragment zeigten deutliche Bindung an die Peptide 366-368 (Abb. 3.17A, Daten für das IN-1II.1.8 Fab-Fragment nicht gezeigt). Die Peptide umfassten die Aminosäuresequenz LGHVNSTIKELRRLFLVDDL (AS 1096-1116 in Nogo-A). Dieser Abschnitt ist Teil der Nogo66-Domäne (As 1055-1120) (GranPre *et al.*, 2000). Wurde die Membran mit dem 8-18C5 Fab-Fragment inkubiert (Abb. 3.17C), zeigte sich ein ähnliches Muster (Bindung zu den Peptiden 366-368), auch wenn die Signale schwächer waren. Die Signale bei den Peptiden Nr. 9, Nr. 238 und Nr. 291 waren im Gegensatz zu den obigen Signalen unspezifisch und traten auch bei Inkubation der Membran mit StrepTactin-AP allein auf (nicht gezeigt). Sowohl für das IN-1 Fab-Fragment als auch für die affinitätsmaturierte Variante IN-1II.1.8 wurde keine Bindung innerhalb der N-terminalen Region von Nogo-A nachgewiesen. Das vermutete Epitop für IN-1 in der N-terminalen Domäne des Nogo-A konnte daher nicht näher bestimmt werden.

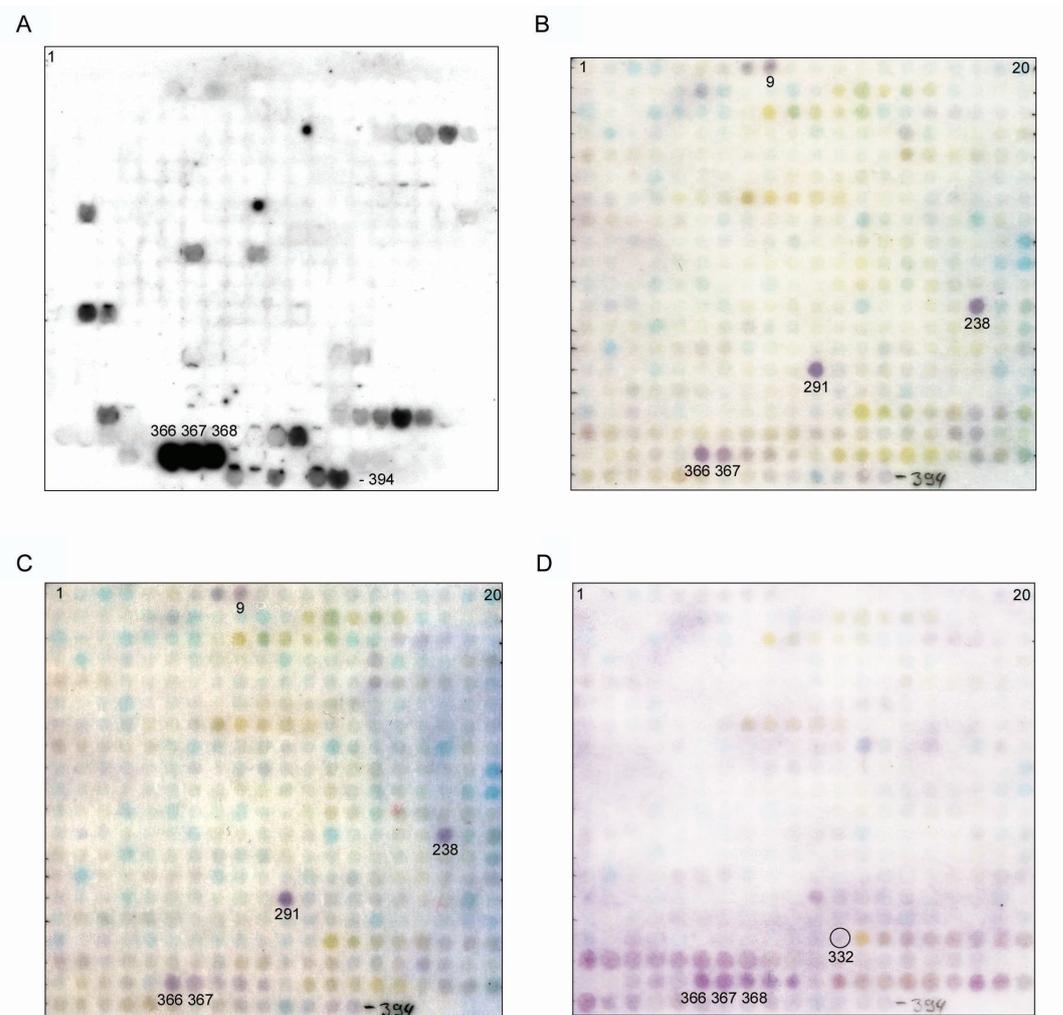


Abbildung 3.17: Epitopanalyse des humanen Nogo-A. 15er Peptide aus der Sequenz des humanen Nogo-A (1192As) wurden auf einer Membran durch SPOT-Synthese kovalent fixiert. Die Membran trägt 394 Spots bestehend aus Peptiden, die jeweils um drei Aminosäuren versetzt sind, so dass der erste Spot das Peptid mit den AS 1-15 der Nogo-A-Sequenz beinhaltet, der zweite AS 4-18 etc., bis zu AS 1178-1192. Die Membran wurde mit dem rekombinanten IN-1 Fab-Fragment (2 μ M) und einem Sekundärantikörper (anti *Strep*-tag) als HRP-Konjugat inkubiert. Die Signale wurden mit Hilfe des *SuperSignal* Chemolumineszenz-Systems entwickelt. Die drei Spots mit dem intensivsten Signalen entsprachen den aufeinanderfolgenden Peptiden 366 (LGHVNSTIKELRRLF), 367 (VNSTIKELRRLFLVD) und 368 (TIKELRRLFLVDDLVD), die alle in der Nogo66-Region liegen. Weniger intensive Signale wurden bei den Spots 59 (APKRRGSSGSVDETL), 222 (SVSLKKVSGIKKEIK), 337 (LYWRDIKKTGVVFGA), 352 (FRIYKGVQAIQKSD) und 349 (AKIQAKIPGLKRKAE) beobachtet. Die Signale schienen jedoch nicht spezifisch zu sein, da sie nicht auftraten, wenn ein anderer Sekundärantikörper benutzt wurde (s. (B)). (B) Eine neue Membran mit dem gleichen SPOT-Array wurde wiederum mit dem IN-1 Fab-Fragment (2 μ M) inkubiert, jedoch anschließend mittels *StrepTactin*/AP-Konjugat und MTT/BCIP als chromogenen Substrat entwickelt. Auch hier zeigten sich Signale bei den Peptiden 366 und 367. Die Spots Nr. 9, Nr. 238 und Nr. 291 wurden dagegen auch bei Inkubation der Membran mit dem *StrepTactin*/AP-Konjugat alleine angefärbt (Daten nicht gezeigt); die Signale waren somit unspezifisch. (C) Die Membran wurde mit dem rekombinanten 8-18C5 Fab-Fragment (2 μ M) inkubiert und wie in (B) entwickelt. (D) Die Membran wurde mit dem rekombinanten NgR-Fusionsprotein (TrxA-NgR Δ ; 2 μ M) inkubiert und anschließend wie in (B) und (C) entwickelt. Auch hier zeigten die Peptide Nr. 366-368 prominente Signale. Der Hintergrund war jedoch allgemein höher, insbesondere für die Transmembranregionen, welche die Nogo66-Domäne einrahmen. Peptid Nr. 332 (AIFSAELSKTSVVDL; Reste 994-1008), die potentielle Bindungsstelle des NgR im N-terminalen Nogo-A (Hu et al.2005) zeigte dagegen kein erkennbares Signal. .

3.3.3 Biochemische Bindungsexperimente zur weiteren Charakterisierung der Bindung von IN-1-Fab bzw. NgR an Nogo66

3.3.3.1 *Das IN-1-Fab-Fragment erkennt sowohl die N-terminale Domäne von Nogo-A als auch das Nogo66-Fragment auf dem Western Blot*

Die Bindung der rekombinanten Fab-Fragmente bzw. des NgR-Fusionsproteins an die bakteriell produzierte N-terminale Nogo-A Domäne sowie an das rekombinante Nogo66 wurde im Western Blot genauer untersucht. Dafür wurden Nogo66 und hNogoAn5 (s.3.1) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (Abb. 3.21). Anschließend wurde die Membran mit den Fab-Fragmenten IN-1, IN-1II.1.8, 8-18C5 und TrxA-NgR Δ , jeweils in mit Digoxigenin-markierter Form, inkubiert und gebundenes Protein mittels AP-konjugiertem Anti-DIG-Fab-Fragment detektiert (Abb. 3.19). In diesen Experimenten wurde die N-terminale Nogo-A-spezifische Domäne vom IN-1 Fab-Fragment erkannt, was mit vorherigen Ergebnissen übereinstimmt (Chen et al., 2000; Fiedler et al., 2002). Das 8-18C5 Fab-Fragment zeigte dagegen erwartungsgemäß kein Bindungssignal. Das rekombinante NgR-Fragment, welches in vorherigen Studien als Rezeptor für die Nogo66-Domäne beschrieben wurde (Fournier et al., 2001), band ebenfalls nicht an das N-terminale-Nogo-A-Fragment. Im Gegensatz dazu wurde Nogo66 nicht nur von dem NgR-Fusionsprotein TrxA-NgR Δ im Western Blot erkannt, sondern auch von den Fab-Fragmenten IN-1 und 8-18C5 sowie der affinitätsmaturierten IN-1 Variante II.I.8 (Daten nicht gezeigt). Dies unterstützt die Beobachtungen aus dem Epitope mapping (3.5.1), wo alle Reagentien signifikante Bindung an das Nogo66-Peptid „VNSTIKELRRLF“ zeigten.

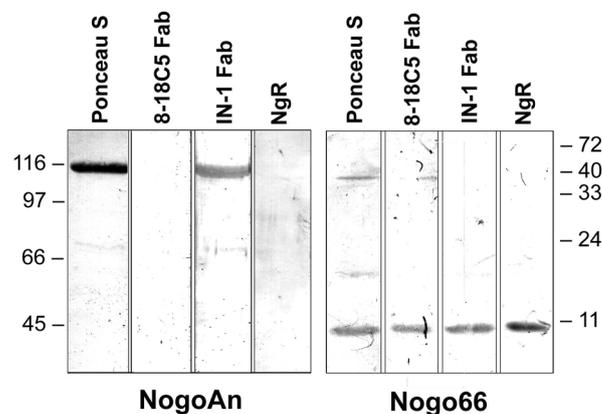


Abbildung 3.19: Bindung des IN-1 Fab-Fragments und des rekombinanten NgR Fusionsproteins an hNogoAn5 (links) und Nogo66 (rechts) auf dem Western Blot. Rekombinantes hNogoAn5(C699A/C912A) wurde aus dem Periplasmaextrakt von *E. coli* anhand des *Strep*-tag II gereinigt und 8 % SDS-PAGE unterzogen. Nogo66 wurde mit Hilfe des His₆-tags aus solubilisierten Einschlusskörpern gereinigt, rückgefaltet und 15 % SDS-PAGE unterzogen. Nach dem Transfer auf ImmobilonP-Membranen wurden die Membranen in zwei Gruppen von Streifen, die jeweils Spuren mit identischen Proben repräsentierten, geschnitten. Diese wurden dann entweder mit Ponceau S gefärbt oder mit 100 nM Lösungen der gereinigten digoxigenierten Fab-Fragmente bzw. des rekombinanten NgR-Fusionsproteins (TrxA-NgR Δ) inkubiert und anschließend mit einem Anti-Digoxigenin Fab-Fragment-AP-Konjugat und NBT/BCIP als Substraten entwickelt.

3.3.3.2 Bindungsstudien mittels ELISA und Fluoreszenztitration

Die Bindungsaktivität der rekombinanten Fab-Fragmente und des NgR bezüglich der Antigene hNogoAn5 und Nogo66 wurde schließlich unter nicht denaturierenden Bedingungen im ELISA getestet (Abb. 3.20). Dafür wurde eine Mikrotiterplatte zunächst mit hNogoAn5 bzw. Nogo66 beschichtet und es wurden freie Bindungsstellen mit BSA gesättigt. Danach wurde mit gereinigten digoxigenierten Fab-Fragmenten und TrxA-NgR Δ -Cys in steigender Verdünnung inkubiert. Gebundenes Protein wurde mittels AP-konjugierten Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment nachgewiesen.

Das IN-III.I.8 Fab-Fragment zeigte konzentrationsabhängige Bindungssignale für hNogoAn5, wie schon von Markus Fiedler beschrieben wurde (Fiedler et al., 2002). Das 8-18C5 Fab-Fragment und das NgR-Fragment lieferten hingegen kein nennenswertes hNogoAn5-Bindungssignal im Vergleich zum Hintergrundsignal mit BSA (Abb. 3.20A). Jedoch zeigten gegenüber dem Nogo66-Antigen sowohl NgR als auch das IN-1 Fab-Fragment im ELISA starke konzentrationsabhängige Bindungssignale (Abb. 3.20B), im Einklang mit den Ergebnissen aus der Western Blot Analyse. Für das Lysozym-spezifische D1.3 Fab-Fragment (Skerra, 1994a), das als weitere Kontrolle getestet wurde (Daten nicht gezeigt), wurde dagegen keine signifikante Bindungsaktivität nachgewiesen

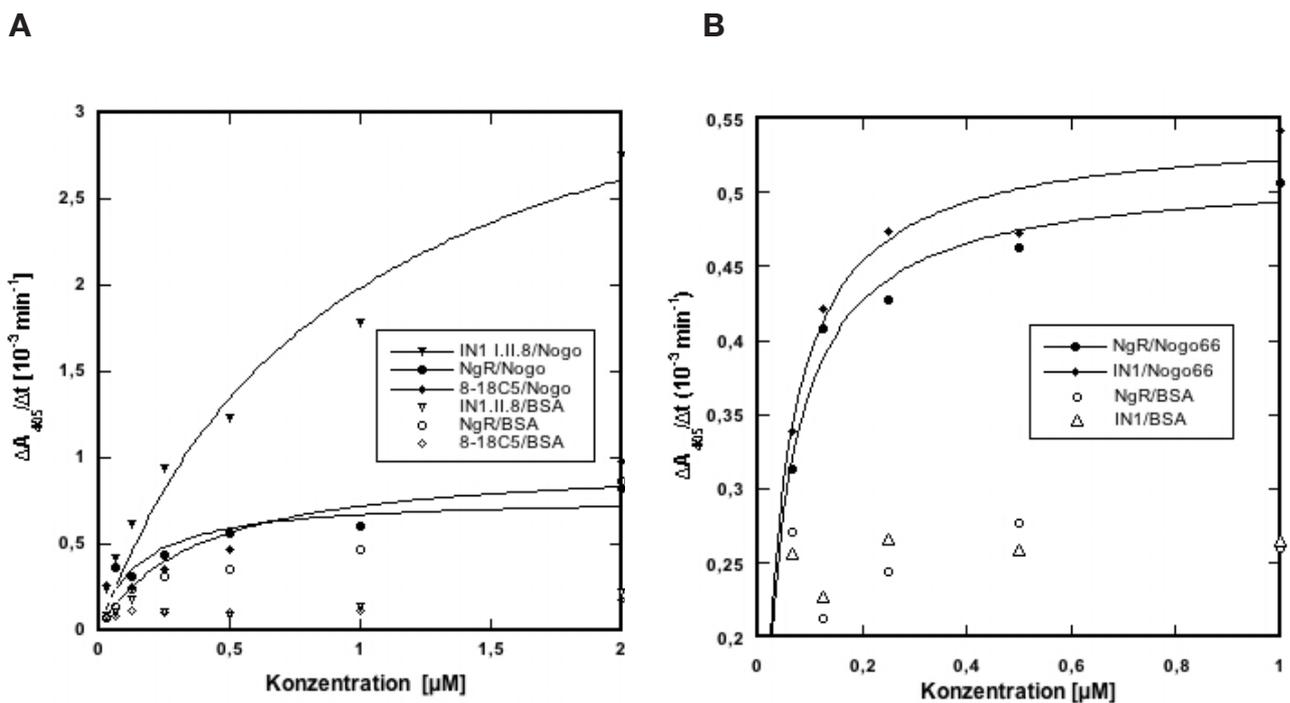


Abbildung 3.20: Vergleich der Bindungsaktivitäten der IN-1 Fab-Fragmente und des rekombinanten NgR-Fusionsproteins im ELISA. (A) Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit rekombinantem hNogoAn5 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder BSA (Kontrolle) inkubiert, blockiert und es wurde digoxigeniertes Fab-Fragment bzw. TrxA-NgR Δ in einer Konzentrationsreihe zugegeben. (B) Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit rekombinantem Nogo66 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder BSA (Kontrolle) inkubiert, blockiert und es wurde digoxigeniertes Fab-Fragment bzw. TrxA-NgR-Cys in einer Konzentrationsreihe zugegeben. Gebundenes Protein wurde jeweils durch AP-konjugiertes Anti-DIG Fab-Fragment und p-Nitrophenylphosphat nachgewiesen.

Um die Dissoziationskonstante der Interaktion zwischen TrxA-NgR Δ bzw. dem IN-1 Fab-Fragment und dem Nogo-66-Peptid „IKELRRL“ in Lösung zu bestimmen, wurden Fluoreszenztitrationsexperimente durchgeführt. Dafür wurden jeweils definierte Mengen des mit der 2-Aminobenzoylgruppe (Abz) gekoppelten Nogo66-Peptids (Voss und Skerra, 1997) zu einer 1 μ M Lösung des gereinigten Proteins gegeben und die Emission der Fluoreszenz von Tyr und Trp bei 340 nm verfolgt (Abb. 3.21). Im Fall des TrxA-NgR Δ wurde die Proteinfluoreszenz zu 52 % gequenchet. Die nach dem Massenwirkungsgesetz bestimmte Ausgleichskurve lieferte eine Dissoziationskonstante von $10,3 \pm 0,7 \mu$ M. Dieser moderate Affinitätswert ist nicht untypisch für lineare Epitopeptide. Im Vergleich hierzu war der Quenchingeffekt des IN-1 Fab-Fragmentes deutlich schwächer. Die nach dem Massenwirkungsgesetz bestimmte Ausgleichskurve durch die Daten lieferte in diesem Fall eine Dissoziationskonstante von etwa 30 μ M.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das IN-1 Fab-Fragment die N-terminale Nogo-A Domäne bindet. Die Bindungsstelle konnte jedoch durch oben beschriebene Epitopanalyse nicht genauer bestimmt werden, da es sich höchstwahrscheinlich um ein diskontinuierliches Epitop handelt. Weiterhin bindet das IN-1 Fab-Fragment offensichtlich an eine Region im Nogo66-Fragment. Die Bindung scheint jedoch nicht spezifisch zu sein, da der Kontrollantikörper 8-18C5 ebenfalls an diese Region bindet. Auch NgR erkennt diese Region in Nogo66. Dagegen konnte in diesem Fall keine Bindung an die N-terminale Nogo-A-Domäne nachgewiesen werden.

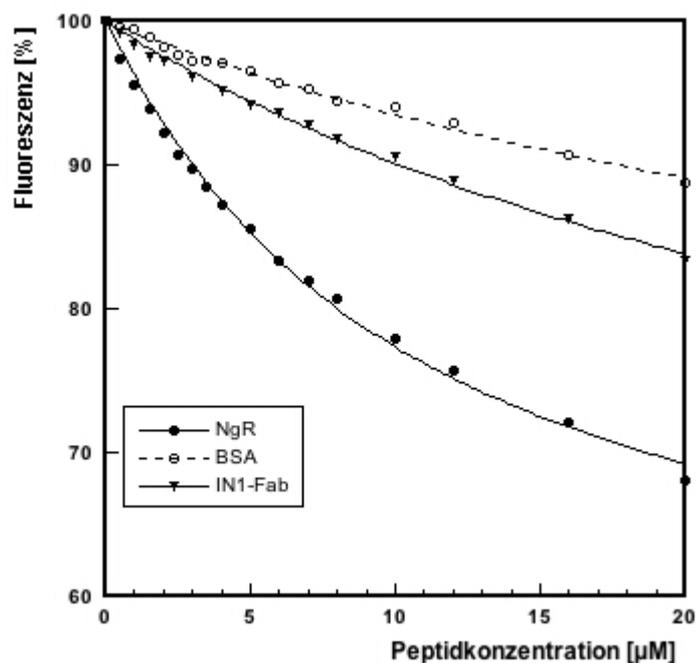


Abbildung 3.21: Fluoreszenztitration des rekombinanten NgR-Fusionsproteins und des IN-1 Fab-Fragments mit dem synthetischen Nogo66-Peptid (oAbz-TIKELRRLFL-NH₂).

1 μ M Proteinlösung in PBS wurde vorgelegt und mit einer Stammlösung des Peptids, das mit der Abz-Gruppe als Fluoreszenz-Quencher gekoppelt war, versetzt. Die Proteinfluoreszenz wurde bei 295 nm angeregt und bei 340 nm gemessen. Die Messwerte wurden mittels nichtlinearer Regression gemäß dem Massenwirkungsgesetz angepasst (siehe Abschnitt 2.4.13).

3.4 Bakterielle Produktion, Reinigung und funktionelle Charakterisierung des rekombinanten anti-MOG Fab-Fragmentes 8-18C5

Der Antikörper des Maus-Hybridoms 8-18C5 erkennt spezifisch das Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein (MOG) von Maus und Mensch und ruft im Tiermodell eine ausgeprägte Demyelinisierung hervor (Linnington *et al.*, 1988). Er repräsentiert daher ein ideales Modellsystem für die Untersuchung humaner autoreaktiver Antikörper aus dem Liquor (Sun *et al.*, 1991). Dazu wurden in dieser Arbeit Expressionsvektoren für das 8-18C5 Fab-Fragment konstruiert, bei denen die Strukturgene für die leichte und schwere Immunglobulinkette unter der Kontrolle des tet-Promotor/Operators stehen (Skerra, 1994a+b). Für die Sekretion in das bakterielle Periplasma liegen die Strukturgene für die leichte und schwere Immunglobulinkette an ihren 5'-Enden mit den Signalsequenzen des Outer Membrane Protein A (*OmpA*) bzw. der Alkalischen Phosphatase (*PhoA*) fusioniert vor (Skerra, 1994a). Nach Translokation der Polypeptidketten über die innere Membran der Bakterienzelle werden diese Signalpeptide abgespalten. In dem vorherrschenden oxidierenden Milieu können sich die beiden Polypeptidketten falten, die intra- und interchenaren Disulfidbrücken ausbilden und die beiden Immunglobulinketten zum funktionellen Fab-Fragment assoziieren (Skerra, 1989). Das korrekt gefaltete Fab-Fragment kann anschließend mit Hilfe eines an den Carboxy-Terminus der schweren Immunglobulinkette fusionierten Affinitätsanhängsels aus der periplasmatischen Proteinfraction isoliert werden.

3.4.1 Konstruktion von Expressionsvektoren für die bakterielle Produktion des Fab-Fragments

Für die Synthese des chimären 8-18C5 Fab-Fragments, welches humane konstante Domänen trägt, als Fusionsprotein mit dem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel (Skerra, 1994a; Schiweck und Skerra, 1997) wurde zunächst der Expressionvektor pASK88-8-18C5 konstruiert. Dafür wurde zunächst von Norbert Goebels cDNA aus einer Gesamt-RNA-Präparation der Hybridomazellen synthetisiert und die Gensequenzen der variablen Domänen wurden mittels PCR mit degenerierten *Primern* amplifiziert. Die *Primer* waren so geplant, dass sie mit den relativ konstanten 5' und 3'-Enden der VH bzw. VL-Domänen hybridisierten. Die PCR-Produkte wurde anschließend in den Fab-Fragment-Expressionsvektor pASK88 (Schiweck und Skerra, 1997) inseriert. Die korrekte Zusammensetzung des Plasmids pASK88-8.18C5 (Abb.3.22) wurde durch Sequenzanalyse bestätigt.

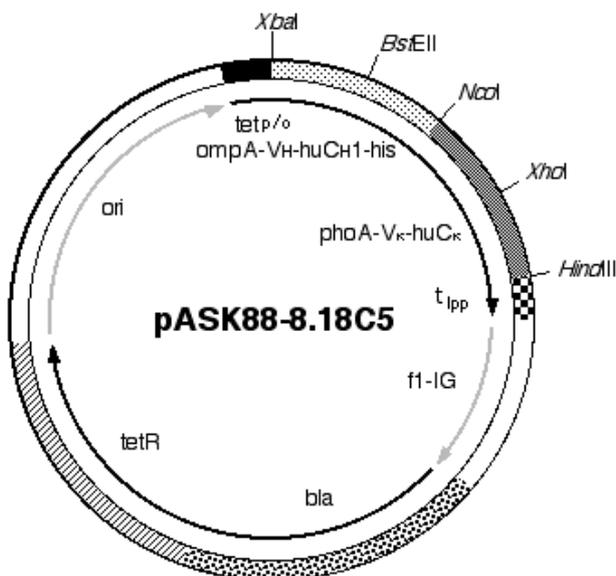


Abb.3.22: A.) Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pASK88-8-18C5. pASK88-8-18C5 kodiert für das chimäre 8-18C5 Fab-Fragment, bestehend aus den variablen Domänen des murinen Antikörpers 8-18C5 und der CH1 γ 1-Domäne sowie der C κ -Domäne des Menschen. Die Strukturgene VH-CH1 γ 1 und V κ -C κ liegen zur Sekretion in den periplasmatischen Raum von *E. coli* an ihren 5'-Enden fusioniert mit den bakteriellen Signalsequenzen des Outer Membrane Protein A (*ompA*) bzw. der Alkalischen Phosphatase (*phoA*) vor. Am 3'-Ende des Gens der schweren Kette befindet sich die kodierende Sequenz für ein Hexahistidin-Affinitätsanhängsel (*his*₆). Abkürzungen sind in Abb.3.2 beschrieben.

VH: *PstI/NsiI*

1 GAAGTTAAAC**ctgcat**gagtcaggggctgggttggtGAAGCCTGGGGCCTCAGTGGAGATA
GluValLysLeuGlnGluGlnSerGlyAlaGluValLysProGlyAlaSerValGluIle

61 TCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTTCAGTAGCTTCTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGG
SerCysLysAlaThr**GlyTyrThrPheSerSerPheTrpIleGlu**TrpValLysGlnArg

121 CCTGGACATGGCCTTGAGTGGATAGGAGAGATTTTACCTGGAAGAGGTAGAACTAACTAC
ProGlyHisGlyLeuGluTrpIleGly**GluIleLeuProGlyArgGlyArgThrAsnTyr**

181 AATGAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCCTGAGAAACATCCTCCAACACAGCCTAC
AsnGluLysPheLysGlyLysAlaThrPheThrAlaGluThrSerSerAsnThrAlaTyr

241 ATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAACTGGTAAT
MetGlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaThr**GlyAsn**

BstEII

301 ACGATGGTAAACATGCCATACTggggccaagcaccac**ggtcaccg**gtctctca
ThrMetValAsnMetProTyrTrpGlyGlnGlyThrLeuValThrValSerSer

VK: *SstI*

gacatc**gagctc**accagctctccatcctccctggctgTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACT

1 AspIleGluLeuThrGlnSerProSerSerLeuAlaValSerAlaGlyGluLysValThr 60

ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCAAAGAAGACTACTTGGCC

61 MetSerCys**LysSerSerGlnSerLeuLeuAsnSerGlyAsnGlnLysAsnTyrLeuAla** 120

TGGTACCAGCAGAAACCAGGGCTGCCTCCTAAACTCTTGATCTACGGGGCATCCACTAGG

121 TrpTyrGlnGlnLysProGlyLeuProProLysLeuLeuIleTyr**GlyAlaSerThrArg** 180

GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTTCACTCTTACC

181 **GluSer**GlyValProAspArgPheThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThr 240

ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATCATAGTTAT

241 IleSerSerValGlnAlaGluAspLeuAlaValTyrTyrCys**GlnAsnAspHisSerTyr** 300

XhoI

CCGCTCacgttcggagcagcaccac**ctcgag**atcaaa

301 **ProLeuThr**PheGlyAlaGlyThrLysLeuGluIleLys

Abbildung 3.22: B.) Nucleotid- und Aminosäuresequenz der variablen Domänen des Antikörpers 8-18C5 kloniert in pASK88. Die Sequenzen am 3' und 5'-Ende, die Teil der degenerativen *Primer* sind, sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Die Aminosäuresequenzen, beginnend mit der ersten AS der muren Antikörperkette sind darunter angegeben. Die Aminosäuren der CDRs sind blau markiert. Die für die Inserierung des Gens in den Expressionsvektor pASK88 notwendigen Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *PstI*, *BstEII*, *SstI* und *XhoI* sind rot markiert.

Für spätere Bindungsstudien wurde weiterhin ein Plasmid konstruiert, welches für das chimäre 8-18C5 Fab-Fragment mit dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel am C-Terminus der schweren Kette kodiert. Dieses Affinitätsanhängsel ermöglichte die Reinigung des produzierten Fab-Fragments mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (Schmidt und Skerra, 1994). Ausgehend von dem

Vektor pASK88-8.18C5, wurde durch Umklonierung der V-Gene mit den Restriktionsenzymen *Xba*I, *Bst*EII (Umklonierung VH) und *Sst*I, *Xho*I (Umklonierung Vk) in pASK107-IN1 (Fiedler, 2002) das Plasmid pASK107-8.18C5 hergestellt.

Zusätzlich wurde das Fab-Fragment auf den Vektor pASK109 (Schlapschy, 2004a) mittels Verwendung der oben genannten Restriktionsenzyme kloniert, was die ortsgerichtete Kopplung mit Fluorescein-5-maleimid über einen ungepaarten Cysteinrest am Carboxy-Terminus der leichten Kette zuließ. Die schwere Kette war hier ebenfalls carboxyterminal mit dem *Strep*-tag II fusioniert.

Aufgrund seiner guten Sekretionseigenschaften in Verbindung mit der relativ effizienten Faltung periplasmatisch sekretierter heterologer Proteine empfahl sich für die gentechnische Herstellung des chimären 8-18C5 Fab-Fragments der *E. coli*-Stamm JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Nach dessen Transformation mit den Expressionsvektoren wurden Produktionskulturen im 2 L-Maßstab angesetzt. Bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ wurde die Genexpression des Fab-Fragments durch Zugabe von 200 µg aTc pro L Kulturmedium induziert. 3 h nach Induktion befanden sich alle Kulturen im Übergang zur stationären Wachstumsphase, wobei noch keine Zellyse zu beobachten war. Zu diesem Zeitpunkt wurden jeweils die Zellen geerntet und die periplasmatische Proteinfraction wurde präpariert. Die Isolierung des chimären 8-18C5 Fab-Fragments aus der periplasmatischen Proteinfraction erfolgte anschließend mittels Metallchelat- bzw. Streptavidin-Affinitätschromatographie.

Die Analyse der Eluatfraktionen durch SDS-PAGE zeigte, dass das Fab-Fragment sowohl durch Metallchelat- als auch mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie zur Homogenität gereinigt werden konnte. In Anwesenheit des Reduktionsmittels wurde die interchenare Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Immunglobulinkette gespalten. Die beiden Ketten waren als Banden mit etwa gleicher Intensität bei 31 kDa bzw. 32 kDa sichtbar (Abb. 3.23). Ohne Reduktionsmittel war eine einzelne Bande bei 50 kDa zu sehen, die dem Fab-Fragment mit der interchenaren Disulfidbrücke entsprach (nicht gezeigt). Das Fab-Fragment wies einen Reinheitsgrad von über 95% auf. Es war keine Ausbildung von Disulfidisomeren zu erkennen. Die relative Ausbeute an funktionellem Fab-Fragment gekoppelt mit *Strep*-tag betrug 0,25 mg/l Kulturvolumen.

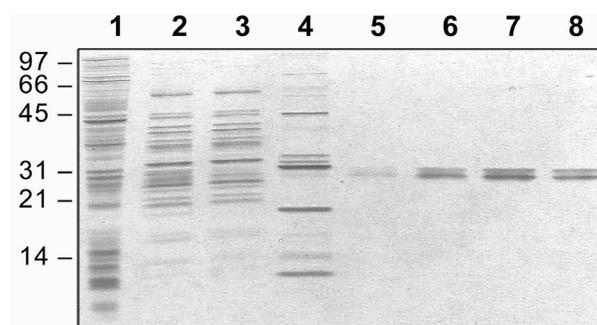


Abbildung 3.23: SDS-PAGE der Einschrittreinigung des chimären 8-18C5 Fab-Fragments mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie. *E. coli* JM83/pASK88-8-18C5 wurde im 2 L-Maßstab bei 22 °C kultiviert, die periplasmatische Proteinfraction gewonnen und daraus das 8-18C5 Fab-Fragment durch IMAC an Zn²⁺/IDA-Sepharose mit einem Imidazolgradienten von 0 bis 300 mM isoliert. Auf ein 15 %iges SDS-PAGE-Gel wurde im reduzierten Zustand je eine Probe des Gesamtzellextrakts (Spur 1), des periplasmatischen Proteinextraktes (Spur 2), des Durchlaufs der Säule (Spur 3) sowie der Eluatfraktion von schwach an die Säule gebundenem Wirtspolypeptid (Spur 4) sowie von vier Eluatfraktionen des kompetitiv eluierten, rekombinanten Fab-Fragments (Spur 5 bis 8) aufgetragen.

3.4.2 Untersuchung der Antigenpezifität des Fab-Fragments

Das MOG ist ein integrales Membranprotein der Oligodendrozytenmembran und hauptsächlich auf der Außenseite der Myelinscheide von Nerven lokalisiert (Sospedra und Martin, 2005). Das Protein wurde vor allem mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 8-18C5 in der weißen Substanz des zentralen Nervensystems, u.a. im Balken (Corpus Callosum) sowie in den Nervenbahnen des Striatums und der Commissura anterioris, nachgewiesen (Linington *et al.*, 1988).

Um die Bindungseigenschaften des rekombinanten Fab-Fragments zu analysieren und mit denen des monoklonalen Antikörpers zu vergleichen, wurde es zunächst für den Western Blot mit Proben von rekombinantem MOG^{IgD} (extrazelluläre Ig-Domäne As 1-125) (Breithaupt *et al.* 2003), Hirnextrakt der Maus und Zellysat von MOG-transfizierten Zellen Ag8-zellen (Maus-Myelomzelllinie X63-Ag8.6.5.3 s. 3.4.3; Bourquin, 2000a) eingesetzt. Abbildung 3.24A zeigt die Bindung des monoklonalen Antikörpers 8-18C5 an rekombinantes MOG^{IgD}, an endogenes MOG in Hirnextrakt und an MOG mit dem MOG-Vektor transfizierter Ag8-Zellen. Der Antikörper zeigt keine Bindung an untransfizierte Ag8-Zellen. Inkubation der Membran mit dem 8-18C5 Fab-Fragment zeigte ebenfalls Bindung des Fab-Fragments an MOG^{IgD} und natives endogenes MOG. Es war ersichtlich, dass es keinen Unterschied in der Spezifität gab.

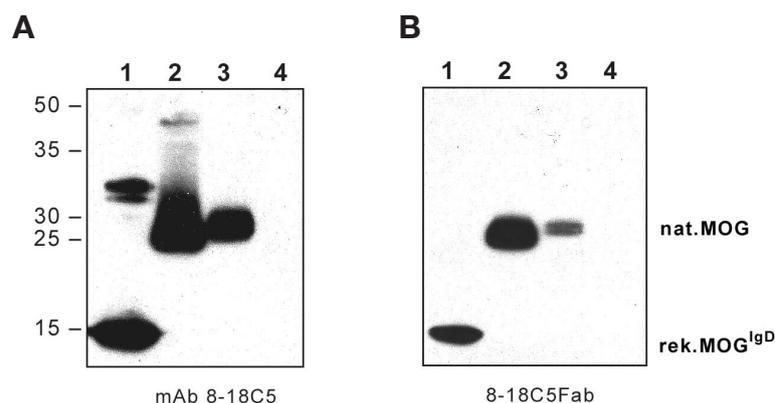


Abbildung 3.24: Nachweis von MOG durch den monoklonalen Antikörper 8-18C5 und dessen rekombinantes Fab-Fragment mittels Western Blotting. Auf einem 12% SDS-Gel wurden die rekombinante extrazelluläre Domäne des MOG (Spur 1), Proteinextrakt aus Hirngewebe der Maus (Spur 2), Zellysat von MOG-transfizierten Ag8-Zellen (Spur 3) und Zellysat von wt-Ag8-Zellen (Spur 4) aufgetragen und nach Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde zunächst mit monoklonalen 8-18C5-Antikörper und peroxidasekonjugiertem Anti-Maus- κ -Antikörper inkubiert und anschließend mit ECL-Reagenz entwickelt. Für die Detektion der Chemolumineszenz wurde ein Hyperfilm MP 10 s auf die Membran gelegt und anschließend entwickelt (A). Nach der Entfernung der gebundenen Antikörper wurde die Membran mit 8-18C5-Fab-Fragment und Peroxidasekonjugiertem Anti-Human- κ -Antikörper inkubiert und wie zuvor entwickelt (B).

Zur weiteren Charakterisierung des 8-18C5 Fab-Fragmentes wurde es zum immunhistochemischen Nachweis von MOG an Kryoschnitten des Hirns der Ratte verwendet (Abb.3.25). - Das 8-18C5 Fab-Fragment färbte die myelinisierten Bereiche- insbesondere das Corpus callosum und die Nervenbahnen der Capsula interna. Keine Färbung der myelinisierten Bereiche wurde für das als Negativkontrolle verwendete Fab-Fragment des anti-CD30-Antikörpers HRS3c (Schlapschy *et al.*, 2004) beobachtet (nicht gezeigt).

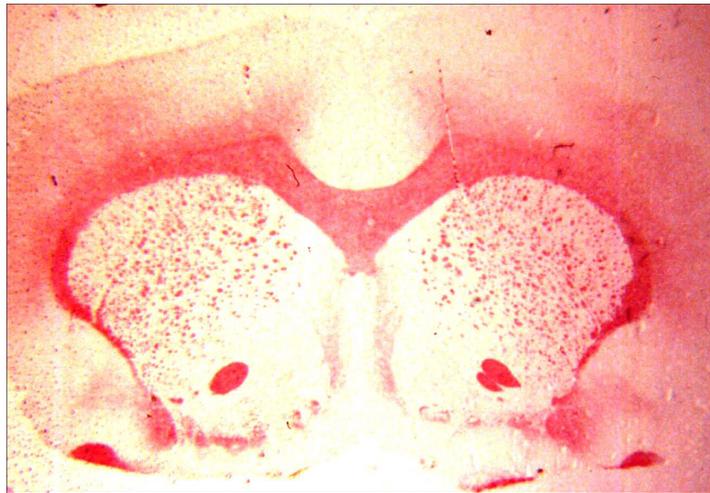


Abbildung 3.25: Anfärbung der Weißen Substanz im Hirn der Ratte mit Hilfe des 8-18C5 Fab-Fragments. Aceton fixierte Gefirnschnitte wurde mit Fab-Fragment-Lösung mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ in TBS inkubiert. Gebundenes Fab-Fragment wurde hier mit einem Anti-Human- κ -Antikörper, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, nachgewiesen Für die chromogene Nachweisreaktion wurde der Fast-Red-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

Weiterhin erwies sich das 8-18C5 Fab-Fragment geeignet für den Immunfluoreszenznachweis von MOG an Kryoschnitten des Rattenhirns. Zu diesem Zweck wurden das 8-18C5 Fab-Fragment sowie das HRS3c Fab-Fragment (als Negativkontrolle) unter Verwendung des Vektors pASK109 (Schlapschy, 2004) mit einem freien Cysteinrest am Carboxyterminus der leichten Kette in *E. coli* hergestellt. Die Reinigung der Fab-Fragmente erfolgte mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie. Danach wurde eine ortsspezifische Markierung der Antikörperfragmente an dem reaktiven Cysteinrest durch Umsetzung mit Fluorescein-5-maleimid vorgenommen. Die so markierten Fab-Fragmente wurden auf die Schnitte appliziert und gebundenes Fab-Fragment wurde direkt durch Anregung bei 490 nm im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen (Abb. 3.26). Die Analyse der Schnitte ergab eine hochsensitive spezifische Markierung der myelinhaltigen Regionen.

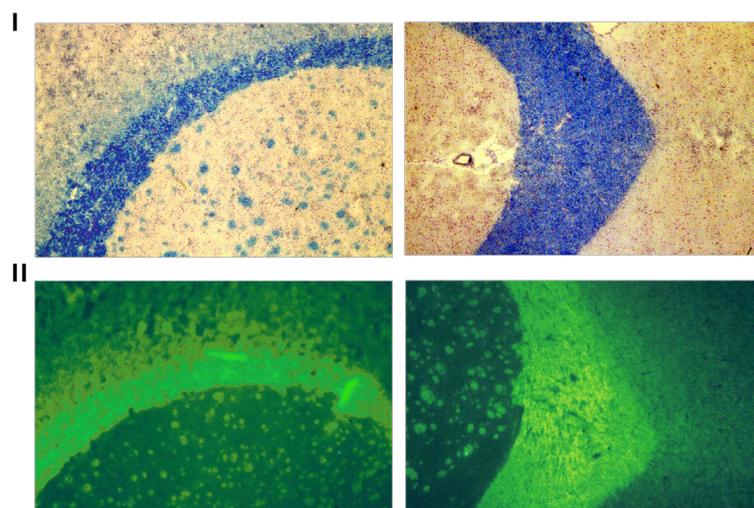


Abbildung 3.26: Spezifischer Nachweis myelinhaltiger Regionen im ZNS der Ratte durch Immunfluoreszenz mit der Hilfe von fluoresceinmarkiertem 8-18C5 Fab-Fragment. (I) selektive Anfärbung von Myelin durch Luxol-Blau; (II) Fluoreszenznachweis mit dem markierten 8-18C5 Fab-Fragment.

3.4.3 Untersuchung der Bindung an das native Antigen

Schließlich wurde die Bindung des 8-18C5 Fab-Fragments an natives zelluläres MOG als Antigen getestet und mit dem monoklonalen 8-18C5-Antikörper verglichen. Die Maus-Myelomzelllinie X63-Ag8.6.5.3 („Ag8“, Kearney *et al.*, 1979) war zuvor mit dem MOG-Vektor stabil transfiziert worden (Bourqin, 2000a). Die Zellen wurden direkt mit Fluorescein-markiertem 8-18C5 Fab-Fragment inkubiert und anschließend im FACS analysiert. Als Negativkontrolle diente Fluorescein-markiertes HRS3c Fab-Fragment (s. 3.4.2). Parallel wurden die Zellen mit dem monoklonalen 8-18C5-Antikörper markiert und gebundener Antikörper wurde mit fluoreszeinkmarkiertem Anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. Eine entsprechende Isotypenkontrolle wurde durchgeführt.

Die Färbung der transfizierten Ag8-Zellen mit dem monoklonalen 8-18C5-Antikörper, gefolgt von einem fluoreszenzmarkierten-Sekundärantikörper, zeigte eine Oberflächenexpression des MOG-Proteins bei mehr als 95 % der Zellen (Abb. 3.27), jedoch keine bei untransfizierten Ag8-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Färbung der Ag8-Zellen mit dem Fab-Fragment lieferte ein qualitativ ähnliches Ergebnis, allerdings bei schwächerer Fluoreszenzintensität (Abb. 3.27).

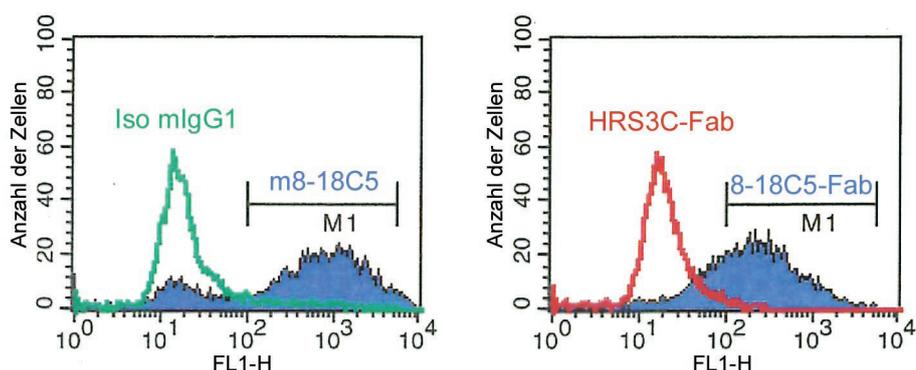


Abbildung 3.27: FACS Analyse der Oberflächenexpression von MOG in transfizierten Ag8-Zellen.

Mit dem MOG-Expressionsvektor transfizierte Zellen wurden mit monoklonalem 8-18C5 Antikörper (links) und 8-18C5-Fab-Fragment (rechts) inkubiert und durch Durchflusszytometrie analysiert. Iso mIgG1 und HRS3C-Fab bezeichnen die jeweiligen Isotypenkontrollen.

3.4.3.1 Komplementaktivierung in Gegenwart von Sekundär-Antikörpern

MOG-spezifische Autoantikörper führen nach Bindung an die Oberfläche der Oligodendrozytenmembran *in vivo* zur Demyelinisierung. Dieser Effekt wird durch eine Kombination aus komplementabhängiger Lyse und ADCC-abhängigen Effektormechanismen vermittelt (Piddlesden *et al.*, 1991). Da Effektormechanismen durch den Fc-Teil der Antikörper vermittelt werden, kann durch das hier hergestellte 8-18C5 Fab-Fragment keine Demyelinisierung *in vivo* ausgelöst werden. Um später Antikörper aus dem Liquor von MS-Patienten auf ihre demyelinisierenden Eigenschaften testen zu können, war es wichtig, einen Fc-Teil mit den Fab-Fragmenten zu koppeln. Dies geschah hier durch Zugabe eines intakten Sekundärantikörpers und wurde zunächst im komplementabhängigen Zytotoxizitätsassay *in vitro* untersucht. (Abb. 3.28). Hierzu wurden MOG-transfizierte Ag8-Zellen mit dem 8-18C5 Fab-Fragment, welches am C-terminus

der schweren Kette das *Strep*-tag II trug, Anti-*Strep*-tag Antiserum und Kaninchenkomplement inkubiert. Anschließend wurde die Mortalität der Zellen durch Detektion der Lactatdehydrogenase im Überstand bestimmt. Bei einer 8-18C5 Fab-Konzentration von 10 µg/ml und einer 1/50 Verdünnung des Antiserums lysierten ca. 70 % der MOG-transfizierten Ag8-Zellen abhängig von der Komplementkonzentration. Im Gegensatz dazu konnte kein Effekt bei Inkubation der Zellen mit dem Kontroll-Fab-Fragment HRS3c oder bei nicht-transfizierten Ag8-Zellen festgestellt werden (Abb. 3.28). Somit konnte das 8-18C5 Fab-Fragment *in vitro* in Gegenwart eines Anti-*Strep*-tag-Antiserums komplementabhängige Lyse induzieren.

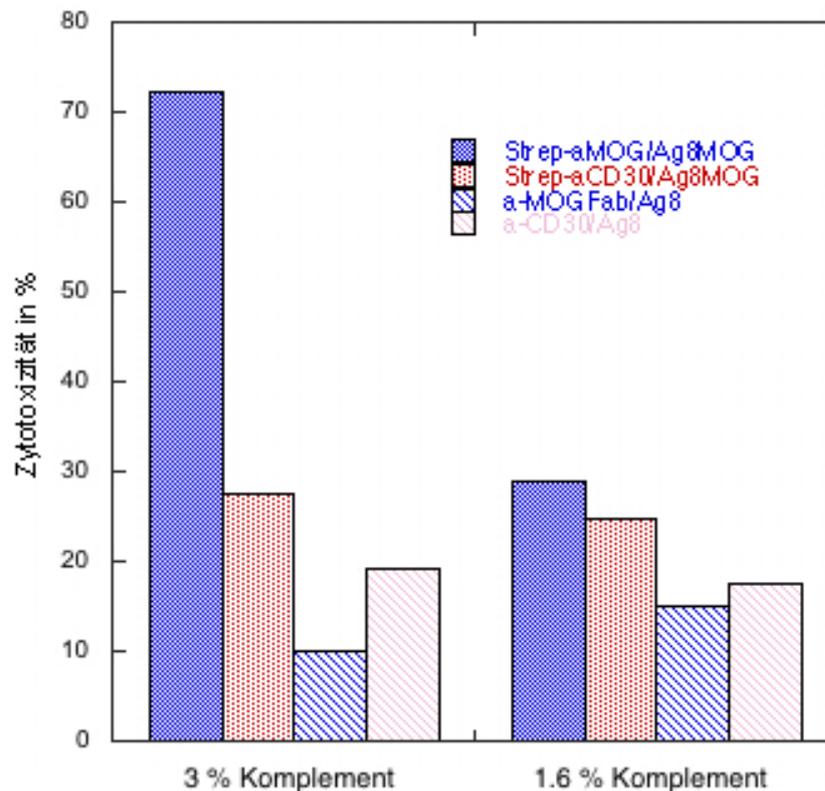


Abbildung 3.28: komplementabhängige Lyse von MOG-transfizierte Ag8-Zellen durch das 8-18C5 Fab-Fragment mit dem *Strep*-tag II am C-Terminus der schweren Kette. LDH-Konzentration (Zytotoxizität) im Kulturüberstand wurde nach Inkubation von MOG-transfizierten bzw. nicht transfizierten Ag8-Zellen mit 8-18C5 Fab-Fragment oder HRS3c Fab-Fragment und einem Anti-*Strep*-tag Antiserum bei zwei verschiedenen Komplementkonzentrationen (3 % v/v und 1.6 % v/v) gemessen. *Strep*-a-MOG/Ag8MOG bezeichnet MOG-transfizierte Ag8-Zellen, inkubiert mit 8-18C5-Fab-*Strep*-tag II (blau); *Strep*-a-CD30/Ag8MOG bezeichnet MOG-transfizierte Ag8-Zellen, inkubiert mit HRS3c-Fab-*Strep*-tag II (rot); *Strep*-a-MOG/Ag8 bezeichnet untransfizierte Ag8-Zellen, inkubiert mit 8-18C5-Fab-*Strep*-tag II (hellblau, gestreift); *Strep*-a-CD30/Ag8 bezeichnet untransfizierte Ag8-Zellen, inkubiert mit HRS3c-Fab-*Strep*-tag II (rosa, gestreift). Die Zytotoxizität ist in % angegeben. Als 100% wurde die LDH-Konzentration im Kulturüberstand bei Lyse durch das Detergenz NP40 bestimmt.

3.5 Charakterisierung des Komplexes aus der extrazellulären Domäne von MOG und dem Fab-Fragment 8.18-C5

Um Einblick in die strukturellen Grundlagen der pathogenen Autoimmunreaktion gegen MOG zu gewinnen, sollte zum einen die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des MOG (As 1-126, MOG^{Igd}), insbesondere aber die des Komplexes von MOG^{Igd} mit dem chimären Fab-Fragment des demyelinisierenden monoklonalen Antikörpers 8-18C5 der Maus (s. 3.4) aufgeklärt werden.

3.5.1 Konstruktion des Expressionsvektors pASK111-MOG, Produktion und Reinigung von löslichem MOG

Die Gewinnung von funktionellem und gefaltetem MOG^{Igd} war die Voraussetzung für die Kristallisierung und Charakterisierung des Komplexes des 8-18C5 Fab-Fragments mit seinem Antigen. Die extrazelluläre Immunglobulin-domäne von MOG des Menschen war bereits auf den bakteriellen Expressionsvektor pQE30 kloniert worden (Brehm *et al.*, 1999; Swiss Prot Entry: Q16653). Die Sequenzhomologie dieses Proteins zum murinen MOG und zum MOG der Ratte beträgt ca. 85 %. Das rekombinante Protein fiel bei der Produktion in Form von Einschlusskörpern an. Für die bakterielle Produktion in gefalteter Form wurde der entsprechende Genabschnitt als Fusion mit der *OmpA*-Signalsequenz (Movva *et al.*, 1980) auf dem Vektor pASK111 (Vogt und Skerra, 2001), kloniert, was die Sekretion des Antigenfragments in das Periplasma von *E. coli* ermöglichte. Unter den oxidativen Bedingungen dieses Zellkompartiments sollte sich die Disulfidbindung des rekombinanten MOG ausbilden können.

Der Genabschnitt für die extrazelluläre Domäne wurde mit der *Primerkombination* hMOG1 / hMOG2 sowie dem Plasmid pQE30MOG als Matrize durch PCR unter Verwendung der *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert (Abb. 3.29a), mit *EagI* geschnitten und über die Restriktionsschnittstellen *BsaI* und *Eco47III* in pASK111 kloniert. Die korrekte DNA-Sequenz des Inserts wurde durch Sequenzierung mit den *Primern* F83 und PR1 bestimmt. Das Plasmid wurde als pASK111-MOG benannt (s. Abb. 3.29).

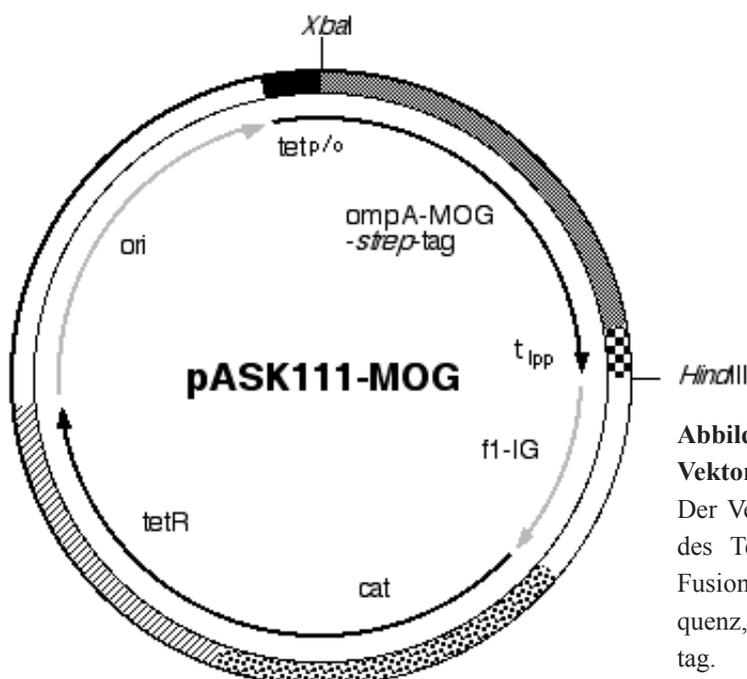


Abbildung 3.29: Schematische Darstellung des Vektors pASK111-MOG.

Der Vektor kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ($tet^{P/O}$) für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen *OmpA*-Signalsequenz, dem MOG-Antigenfragment und dem Strep-tag.

Die bakterielle Produktion des MOG^{Igd} erfolgte im 2 L-Maßstab im *E. coli*-Stamm JM83, wie unter Abschnitt 3.1.1 beschrieben. Da die Zellen stark zur Lyse neigten, musste die periplasmatische Fraktion bereits 2,5 h nach Induktion präpariert werden; die Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt eine Dichte von OD₅₅₀ = 0.9. Das anschließend mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigte Protein wurde mittels SDS-PAGE bzw. Western-Blot analysiert (nicht gezeigt). Es zeigte sich, dass MOG^{Igd} nur in geringen Mengen in löslicher Form hergestellt wurde (ca. 20 µg/L Kulturmedium; OD₅₅₀ = 0.9). Trotz der geringen Ausbeute konnte hier zum ersten Mal reines, gefaltetes MOG gereinigt werden (Abb. 3.30).

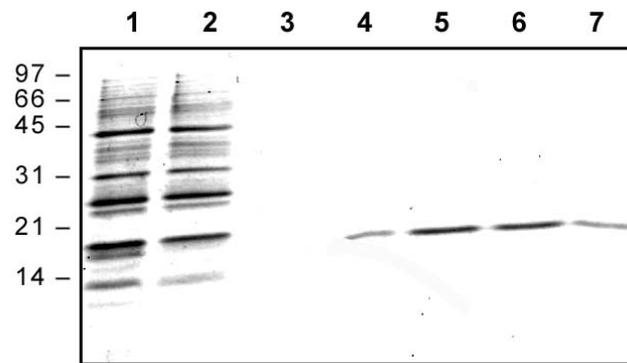


Abbildung 3.30: SDS-PAGE des mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten MOG-Proteins.

E. coli JM83/pASK111-MOG wurde im 2 L-Maßstab bei 22 °C kultiviert, bei OD₅₅₀=0,9 für 2,5 h mit 200 µg/l aTc induziert, die periplasmatische Proteinfraction gewonnen und daraus das MOG-Protein mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl der periplasmatischen Proteinfraction (1), der nicht an die Affinitätssäule gebundenen Proteine (2) und des Eluats (Spur 3-7). Molmassen sind in kDa angegeben. Die Protein-Banden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt.

Für Kristallisierungsexperimente reichten die Mengen an MOG^{Igd} allerdings nicht aus, deshalb wurde für die folgenden Experimente MOG^{Igd} aus der Ratte aus *Inclusion Bodies* zurückgefaltet und aufgereinigt (Breithaupt, 2005).

3.5.2 Herstellung und Kristallisation des MOG/8.18C5 Fab-Komplexes

Die für Kristallisationsexperimente erforderlichen Mengen des 8-18C5 Fab-Fragments (ca. 20 mg Protein) wurden mit Hilfe eines etablierten Fermentationsverfahrens in *E. coli* gentechnisch hergestellt. Die Produktion des chimären 8-18C5 Fab-Fragmentes erfolgte dabei unter Verwendung von Chloramphenicol zur Selektion. Ein entsprechender Expressionsvektor mit der Chloramphenicol- und Ampicillin-Resistenz wurde durch Umklonierung der gesamten für das chimäre 8-18C5 Fab-Fragment mit dem *Strep*-tag II kodierenden Gensequenz aus pASK107-8.18C5 in pASK75cat(-) (Fiedler, 2002) hergestellt. Mit dem erhaltenen Vektor pASK107cat(-)-8.18C5 transformierte *E. coli* W3110 wurden zur Fermentation verwendet. So konnte reproduzierbar eine Ausbeute des 8-18C5 von ca. 1mg Protein pro Liter Kulturmedium erzielt werden.

Das Fab-Fragment wurde durch Streptavidin-Affinitäts-Chromatographie und Gelfiltration gereinigt (Abb. 3.31). Anschließend wurde das rekombinante 8-18C5 Fab-Fragment in äquimolarem Verhältnis mit dem rekombinanten MOG^{Igd} (Aminosäuren 1-125) in PBS gemischt und der Komplex durch Gelfiltration isoliert. Da MOG^{Igd} im Überschuss vorhanden war, konnte der Komplex aus Antigen und Fab-Fragment gut vom nicht komplexierten Protein getrennt werden (Abb. 3.32).

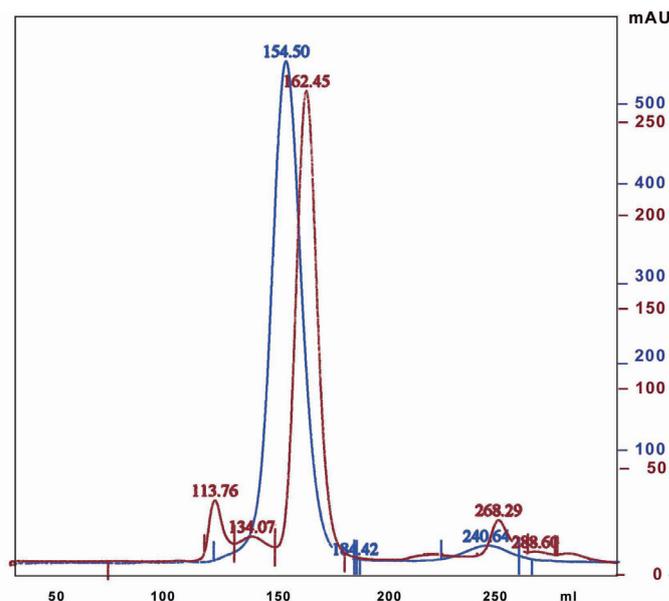


Abbildung 3.31: Elutionsprofil der präparativen Gelfiltration zur Isolierung des MOG^{IgD}/8-18C5-Fab-Komplexes. Blaue Kurve: 5 mg des 8-18C5 Fab-Fragments in PBS wurde auf eine präparative Gelfiltrationssäule (Superdex 200 HiLoad 26/60) aufgetragen und bei einer Flussrate von 5 ml/min aufgetrennt. Gleichzeitig wurde die Absorption des Eluats bei 280 nm gemessen und Fraktionen a 10 ml gesammelt. Rote Kurve: Das aufgereinigte 8-18C5 Fab-Fragment wurde äquimolar mit MOG^{IgD} in PBS gemischt und über eine präparative Gelfiltrationssäule wie oben aufgereinigt.

Die für die Kristallisation erforderliche Konzentrierung des Komplexes gelang nur bis 3.5 mg/ml (in 5 mM MOPS/KOH, pH 7,5, 50 mM NaCl) aufzukonzentrieren, bei höheren Konzentrationen blieb der Fab-MOG-Komplex nicht in Lösung. Die Kristallisationsansätze wurden im Volumenverhältnis 1 (Reservoir, 0,5 μ l): 4 (Protein, 2 μ l) angefertigt, um eine stärkere Konzentrierung des Proteins im Tropfen zu bewirken. MOG^{IgD}/8-18C5 kristallisierte initial bei verschiedenen Kristallisationsbedingungen. Die Kristalle hatten eine Form von sehr dünnen Nadeln. Die besten Kristalle wurden mit 100 mM Tris/HCL, pH 8,5; 12-16% PEG8000 bei 20°C nach 14 Tagen bis 2 Monaten erhalten.

Einige der dicksten Nadeln (Durchmesser ca. 20 μ m) wurden von Constanze Breithaupt getestet und erlaubten am Synchrotron (DESY, Hamburg, BW6) die Sammlung eines Röntgen-Beugungsdatensatzes bis 3,0 Å Auflösung, allerdings bei einer anisotropen Mosaizität von 1,9°. Durch Auswertung der Daten mit DENZO in fünf Intervallen, in denen jeweils optimierte elliptische Spot-Parameter gesetzt wurden, konnten Strukturfaktoren berechnet werden. Die Raumgruppe des MOG^{IgD}/8-18C5 Kristalls erwies sich als P21 mit den Zellparametern $a = 124,5$ Å, $b = 40,0$ Å, $c = 134,2$ Å, $\beta = 107,8$ °. Pro asymmetrischer Einheit lagen zwei Monomere vor, woraus sich ein Lösungsmittelgehalt von 47% ergab. Die Struktur des Komplexes wurde schließlich von Constanze Breithaupt durch Molecular Replacement gelöst (Breithaupt *et al.*, 2003).

3.5.3 Strukturanalyse

MOG^{IgD} zeigt einen Immunglobulin-ähnlichen Faltungstyp. Seine Ig-Domäne besteht aus 113 As, weist zehn β -Stränge auf, die die Faltblätter A'GFCC'C'' (vorderes Faltblatt) und ABED (hinteres Faltblatt) bilden. Die Glycosylierungsstelle an Asn31 befindet sich im gut zugänglichen, der Myelinmembran abgewandten BC-Loop (Abb. 3.32).

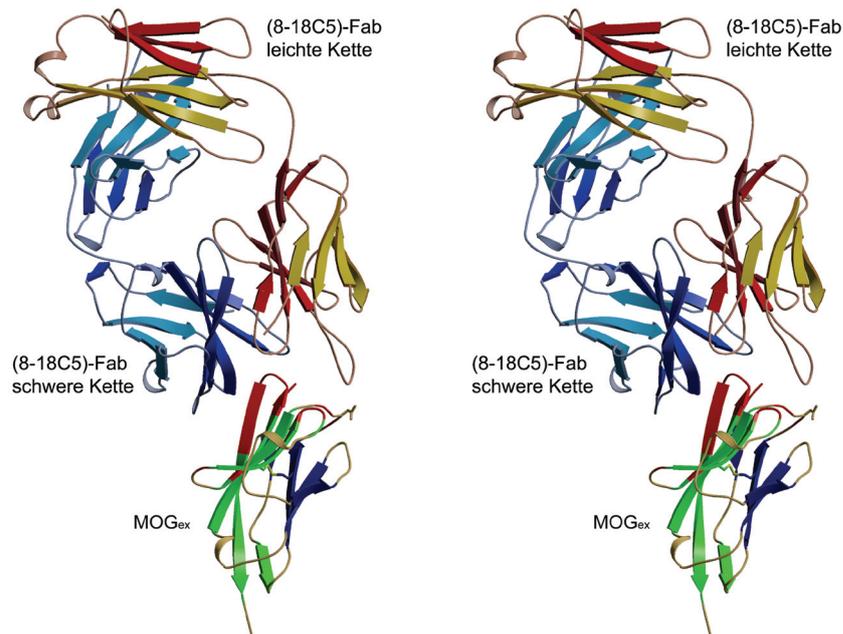


Abbildung 3.32: Stereoabbildung des MOGIgD/8-18C5-Fab Komplexes. Das Fab-Fragment bindet an die Myelinmembran-abgewandte „Oberseite“ von MOGI^{gD} den N-Terminus sowie die Schleifen BC, C’C’’ und FG-loop.

Die dreidimensionale Struktur des MOGI^{gD}/8-18C5-Fab-Komplexes zeigt, dass der Antikörper an die der Membran abgewandte “Oberseite” von MOGI^{gD} bindet. Dabei werden 815 Å der MOG Oberfläche bedeckt, was für Protein-Antikörperwechselwirkungen normal ist (Sundberg und Mariuzza, 2002). Wechselwirkungen gibt es mit dem N-Terminus und den Schleifen BC-, C’C’’ und FG. Es handelt sich also um ein hochgradig diskontinuierliches Epitop (Abb. 3.32). Im Zentrum des Epitops befinden sich die Aminosäuren des FG-Loops sowie des angrenzenden G-Stranges (AS 101-108). Dieser Schleifenbereich macht ca. 65 % der gesamten Interaktionsfläche aus und wird durch die Komplexbildung mit dem 8-18C5 Antikörper vollständig in einer Höhlung verborgen, die von den drei CDRs der schweren Kette sowie von Tyr32 und Tyr94 der leichten Kette gebildet wird.

Die Beteiligung der leichten Kette am Paratop beschränkt sich auf Aminosäuren des CDR1 und die Reste 92-94 (Nummerierung nach Kabat) in CDR3. CDR1 und CDR3 der leichten Kette entsprechen der Keimbahn-Sequenz IgVk8-28. Bemerkenswert ist die Länge von CDR1; mit 17 Aminosäuren gehört sie zu den längsten, die für VkCDR1 Sequenzen beobachtet wurden (Al-Lazikani *et al.*, 1997). Dies ermöglicht der CDR1-Region, Kontakte zu Resten von MOG außerhalb des zentralen Epitops auszubilden. Die Hauptkontakte von MOG zur leichten Kette werden von den Aminosäuren der Loops BC- und C’C’’ gebildet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle Aminosäuren von MOG, die zum Epitop beitragen, 100 %ig zwischen den Spezies Ratte, Maus und Mensch konserviert sind. Es handelt sich um ein hochgradig diskontinuierliches Epitop. Das Paratop von 8-18C5 erweist sich als recht typisches Antikörperparatop. Fünf der sechs CDRs tragen zur Bindung von MOG bei, wobei der Hauptteil der Interaktionsfläche von den CDRs der schweren Kette gebildet wird.

4 Diskussion

4.1 Herstellung und Reinigung löslicher Fragmente des humanen Nogo-A in *E. coli*, Einblicke in Struktur und Membrantopologie

4.1.1 Das N-terminale Nogo-A Fragment hNogoAn5

Frühere Untersuchungen an Nogo-A befassten sich in erster Linie mit seiner zellbiologischen Funktion, jedoch kaum mit dessen molekularer Struktur (Huber und Schwab, 2000). Die gentechnische Herstellung eines löslichen und biologisch aktiven Nogo-A-Fragments mit Inhibitoraktivität erlaubte es, tiefere Einblicke in die biochemischen Eigenschaften von Nogo-A zu gewinnen.

Für die gentechnische Herstellung in *E. coli* wurde ein Fragment auf Exon 3 kodierten Proteinabschnitts, welcher die zentrale N-terminale, vermutlich globuläre Domäne von Nogo-A bildet, ausgewählt. Dieser Abschnitt beinhaltet die Region, welche die inhibitorische Aktivität vermittelt (Oertle *et al.*, 2003b).

Die heterologe Produktion und Reinigung eines für die Spleißform A von Nogo spezifischen Fragments aus der Ratte (As 234-940), genannt NiFr2, durch Sekretion der Polypeptidkette in das Periplasma von *E. coli* war bereits zuvor etabliert worden (Horn, 1998; Fiedler *et al.*, 2002). NiFr2 zeigte jedoch auch nach Optimierung der Produktionsbedingungen und der Polypeptidlänge eine erhebliche Tendenz zum proteolytischen Abbau. Die Präparation war nicht ausreichend homogen, um weitergehende biochemische Analysen durchzuführen.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Alternative das menschliche Analogon von NiFr2 hergestellt, welches mit dem Protein aus der Ratte zu 73% homolog ist. Das Nogo-A Protein des Menschen weist nur sechs Cysteinreste im Vergleich zu acht in der Ratte auf, was sich günstig auf dessen bakterielle Herstellung auswirken sollte. Darüber hinaus ist die Verfügbarkeit des menschlichen Nogo-A Proteins für die weitere Entwicklung eines möglichen therapeutischen Reagens von großer Bedeutung. Das zunächst produzierte N-terminale Fragment hNogoAn3 (As 246-966) (Hettich, 2001) zeigte wiederum eine erhebliche Tendenz zu proteolytischem Abbau, wobei eine prominente Spaltstelle zwischen Val325 und Lys326 (bezogen auf die komplette Sequenz von Nogo-A) nachgewiesen werden konnte.

Ein ähnlicher proteolytischer Hotspot war für das Rattenanalogon NiFr1 beschrieben worden (Fiedler *et al.*, 2002; Horn, 1998). Die N-terminalen Aminosäuren des Nogo-A bis zur Position 326 (Mensch) sind höchstwahrscheinlich nicht an der Ausbildung einer definierten Struktur beteiligt. Die Verkürzung des Nogo-A Fragments auf die Aminosäuren 334 bis 966 bewirkte eine Verbesserung der Homogenität. Die Gesamtproteinausbeute wurde ebenfalls erhöht. Die Produktion des als hNogoAn5 bezeichneten Fragments in dem Protease-defizienten *E. coli*-Stamm HM125 (Meerman und Georgiou, 1994) führte zu einer Erhöhung der Ausbeute an intaktem Proteinfragment. Nach Analyse im SDS-PAGE war die Präparation des durch Streptavidin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigten rekombinanten Fragments von Nogo-A weitgehend frei von Kontaminationen aufgrund proteolytischen Abbaus. Die Ausbeute und Reinheit des hNogo-A-Fragments war signifikant besser als die des rekombinanten Proteins der Ratte.

Ein generelles Problem bei der heterologen Synthese von nativen Proteinen in *E. coli* ist die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken während des Faltungsvorgangs im periplasmatischen Raum (Wall und Plückthun, 1995). Die sechs Cysteinreste in den hergestellten humanen Nogo-A Fragmenten hatten offensichtlich einen negativen Einfluss auf Ausbeute und Homogenität der Präparationen. Das N-terminale Nogo-A-Fragment hNogoAn5 fiel in *E. coli* als zwei Disulfidisomere an, die in ungefähr gleichen Anteilen auftraten. Die Tatsache, dass beide Formen im SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen erhöhte elektrophoretische Mobilität und somit eine kompaktere Konformation aufweisen, deutet auf das Vorhandensein von mindestens einer strukturellen Disulfidbrücke. Das Auftreten verschiedener Disulfidisomere ist ein Anzeichen dafür, dass mindestens eine Disulfidbrücke unter den Bedingungen des periplasmatischen Bakterienkompartiments nicht effizient gebildet wird. Die Tatsache, dass das Protein demnach in löslicher Form isoliert werden kann, deutet darauf hin, dass die Disulfidbrücke für die globuläre Faltung des Proteins nicht essentiell ist. Substitutionsanalyse der insgesamt sechs Cysteinreste ergab, dass mindestens eine, vielleicht zwei strukturelle Disulfidbindungen zwischen den Cysteinresten an den Positionen 424, 464, 559 und 597 gebildet werden, während Cys 699 und Cys 912 für die korrekte Faltung nicht notwendig zu sein scheinen (Greiff, 2003).

Da die an der korrekten Faltung beteiligten Disulfidbindungen im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas schlecht ausgebildet werden, ist eine extrazelluläre Lokalisation der N-terminalen Domäne des Nogo-A *in vivo* wahrscheinlich. Diese Annahme wird auch dadurch unterstützt, dass die beschriebenen Nogo-A Fragmente effizient im Periplasma von *E. coli* sekretiert, prozessiert und gefaltet werden können. Die N-terminale, für die Spleißform A spezifische Region des Nogo-Proteins konnte durch Immunohistochemie an Oligodendrocyten in Zellkultur und Biotinylierungsexperimente an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Oertle *et al.*, 2003b).

In der Sequenz des nativen Nogo-A konnte jedoch bislang keine konventionelle Signalsequenz, wie sie normalerweise die Translokation einer N-terminalen extrazellulären Domäne eines Typ I Membranproteins vermittelt (von Heinje, 1996), identifiziert werden. Es sind aber alternative posttranslationale Mechanismen bekannt, die eine entsprechende Topologie bewirken können (Cocquerel *et al.*, 2002; Goder und Spiess, 2001; Lu *et al.*, 1998).

Demgegenüber gibt es auch Evidenz für eine extrazelluläre Lokalisation der Nogo66- Domäne (Oertle *et al.*, 2003b; Fournier *et al.*, 2001). Da in der Sequenz des Nogo-A-Proteins nur zwei potentielle Transmembrandomänen ermittelt werden konnten, welche die Nogo66-Domäne, flankieren kann sich folglich nur eine der beiden Domänen (Nogo66 oder N-terminales Nogo-A) extrazellulär befinden. Die widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich derzeit am besten durch zwei alternative Membrantopologien des Nogo-A erklären (Oertle *et al.*, 2003b). Die N-terminale Domäne von Nogo-A könnte somit verschiedene Funktionen extra- und intrazellulär ausfüllen.

4.1.1.1 Biophysikalische Untersuchungen und Domänenanalyse der N-terminalen Region des Nogo-A

Bei Gelfiltrationsexperimenten zeigte das lösliche Nogo-A-Fragment hNogoAn5 und dessen Cys-Substitutionsvarianten ein Elutionsverhalten, welches für größere Proteine oder Komplexe typisch ist. Deshalb wurde zunächst angenommen, dass hNogoAn5 in Lösung als Oligomer vorliegt. Dies konnte jedoch durch Quervernetzungsexperimente und analytische Ultrazentrifugation nicht bestätigt werden. Bei Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers des hNogoAn(C699A-

C912A) erhält man 7,78 nm, was der Größe eines globulären Proteins von ca. 81 kDa entspricht. hNogoAn5 ist somit vermutlich ein Monomer in Lösung, welches sich allerdings unter Bedingungen der Gelfiltration atypisch verhält.

Ein ungewöhnliches Laufverhalten des hNogoAn5 wurde auch unter Bedingungen der SDS-PAGE beobachtet. Hier zeigt sowohl das rekombinante hNogoAn5, wie auch schon das native Protein aus der Ratte (Schwab, 2004), eine Mobilität wie wesentlich größere Proteine: Die Bande für hNogoAn5 erscheint bei ca. 110 kDa, die kalkulierte Masse beträgt jedoch 71 kDa. Das ungewöhnliche Laufverhalten in der Gelfiltration und der SDS-PAGE könnte auf ausgedehnte ungeordnete Sequenzabschnitte in der N-terminalen Nogo-A Region hinweisen. Diese Schlussfolgerung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass das rekombinante hNogo5 relativ anfällig für periplasmatische Proteasen ist (s.4.1.1).

Auch CD-Messungen zeigten, dass ein signifikanter Teil der N-terminalen Region des Nogo-A möglicherweise in einer Random-Coil-Konformation vorliegt (Zander *et al.*, 2007). Partieller proteolytischer Verdau des N-terminalen Nogo-A Fragments hNogoAn5(C699A/C912A) deutete ebenfalls darauf hin, dass vor allem die N-terminale Hälfte des Nogo-A eine eher ungeordnete Struktur aufweist. Im Gegensatz dazu scheint der C-terminale Teil, der die sechs Cysteinreste enthält, zumindest zum Teil eine globuläre Faltung einzunehmen. Der Nachweis von Disulfidbrücken im hNogoAn5 unterstützt die Vermutung, dass zumindest der C-terminale Teil der N-terminalen Nogo-A Region eine gefaltete Konformation annimmt.

Auch die bioinformatische Analyse der Primärstruktur des Nogo-A mittels FoldIndex (Prilusky *et al.*, 2005) und DisEMBL (Linding *et al.*, 2003) ergab, dass große Abschnitte des Proteins Charakteristiken nativ-ungeordneter Proteine zeigen (Uversky *et al.*, 2000; Fink, 2005). Eine NMR-Analyse der inhibitorischen Region (As 567-748) (Oertle *et al.*, 2003b) zeigte, dass das entsprechende Fragment nur partiell strukturiert ist (Li *et al.*, 2004), auch wenn das Fehlen möglicher stabilisierender Kontakte mit anderen Regionen der großen Extramembrandomäne oder von Disulfidbrücken, insbesondere die unter Beteiligung des Cysteinrests 597, hierbei eine Rolle gespielt haben könnte.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten könnten helfen, die geordneten Regionen dieses außergewöhnlichen Myelinproteins besser einzugrenzen, was weitere Aufschlüsse über seine biologische Funktion geben und die Suche nach bislang unbekanntem neuronalen Rezeptoren unterstützen könnte.

4.1.2 Das Nogo66-Fragment

Die Beobachtung, dass die molekulare Interaktion zwischen Nogo66 und NgR zu inhibitorischen Effekten bei der ZNS-Regeneration führt, macht die Bindungsstelle zwischen Nogo66 und NgR zu einem vielversprechenden Ziel für das Design therapeutischer Agentien.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Nogo66-Fragment mit einem C-terminalen His₆-tag als Einschlusskörper in *E. coli* synthetisiert und durch Metallchelate-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Nach Rückfaltung durch schnelle Verdünnung in PBS wurde lösliches Nogo66 erhalten; die Ausbeute war allerdings gering (Ausbeute ca. 5%). Li *et al.* (2004) berichteten, dass Nogo66 in wässriger Lösung unlöslich ist und hohe Tendenz zur Aggregation zeigt.

Schimmele *et al.* (2005) konnten jedoch bis zu 25 μM Lösungen des Fragments durch Rückfaltung bei einem pH-Wert über 8 herstellen. Es ist daher anzunehmen, dass die Ausbeute an löslichen Nogo66 durch Optimierung der Rückfaltungsbedingungen vergrößert werden kann.

4.2 Herstellung und Reinigung löslicher Fragmente des humanen NgR in *E. coli*

Für die biochemische Charakterisierung der Interaktion zwischen Nogo-A und seinem Rezeptor NgR war die Produktion der löslichen Liganden-Bindungsdomäne von NgR notwendig. Zunächst wurde NgR als Fusionsprotein mit GST in *E. coli* produziert. Im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen (Fournier *et al.*, 2001) wurde kein lösliches Fusionsprotein erhalten. Durch Rückfaltung aus Einschlusskörpern konnte ebenfalls kein lösliches Protein gewonnen werden. Auch anderen Gruppen gelang es bis dato nicht, NgR löslich in Bakterien zu synthetisieren (Schimmele *et al.*, 2005). Die Produktion von NgR in Insektenzellen (He *et al.*, 2003) ließ sich aus technischen Gründen in unserem Labor nicht durchführen.

Als Faltungsmediator wurde daher das Thioredoxin gewählt. Thioredoxin kommt in vielen eukaryotischen und prokaryotischen Zelltypen vor und erhält eine reversibel reduzierbare Disulfidbindung (Holmgren, 1985). Im Gegensatz zu GST handelt es sich um ein Monomer mit einer Größe von bloß 12 kDa. Thioredoxin von *E. coli* weist eine hohe Löslichkeit im Cytoplasma auf. Daten aus unserem Labor (S. Meurer, 1999) und von anderen Gruppen zeigen, dass die Produktion von korrekt gefalteten heterologen Proteinen in *E. coli* durch Koexpression mit Thioredoxin erhöht werden kann (Vallie *et al.*, 1992; Yasukawa *et al.*, 1995). Das Thioredoxin übernimmt dabei vermutlich die Aufgabe eines intramolekularen Chaperons, indem es die Aggregation von partiell gefalteten Polypeptidketten unterdrückt.

Dennoch führten weder die Expression der gesamten extrazellulären Domäne des NgR (N-terminal fusioniert mit Thioredoxin) noch die Expression der verkürzten Ligandenbindungsdomäne (He *et al.*, 2003; Barton *et al.*, 2003) von NgR (As 26-310) als Thioredoxin Fusionsprotein (TrxA-NgR Δ) zu einer Produktion von löslichem Fusionsprotein im Cytoplasma von *E. coli*. Wurde TrxA-NgR Δ aus den erhaltenen Einschlusskörpern zurückgefaltet, ging das Fusionsprotein effizient in Lösung.

Die Beobachtung, dass die Rückfaltung von rekombinanten Proteinen in Gegenwart von Thioredoxin mit höherer Ausbeute durchgeführt werden kann, wurde bereits beschrieben (Pigiet und Schuster, 1986). Aufgrund der 10 Cystein-Reste im nativen NgR ist anzunehmen, dass ohne Faltungshelfer nicht-physiologische Disulfidbindungen die korrekte Faltung behindern. N-terminale Fusion mit der Oxidoreduktase Thioredoxin scheint deren Isomerisierung während der Rückfaltung zu fördern und auch die Proteinaggregation zu vermindern.

4.3 Epitope mapping von Nogo-A mit dem Antikörper IN-1 und mit NgR mit der SPOT Technik

Die oben beschriebenen wohl charakterisierten rekombinanten Proteine wurden für Bindungsstudien eingesetzt. Die physiologischen Auswirkungen der Bindung von NgR und IN-1 an das Myelinprotein Nogo-A sind gut beschrieben (McGee und Strittmatter, 2003; Schwab, 2004; Woolf und Bloechlinger, 2002).

Eine detaillierte proteinchemische Charakterisierung dieser Interaktionen fehlt allerdings. In dieser Arbeit sollten daher die Bindungsstellen mittels eines Peptid-Arrays, das durch die SPOT Technik hergestellt wurde, eingegrenzt werden. Mit dieser Methode wurden in letzter Zeit eine Reihe von Protein-Protein Bindungsstellen identifiziert (Frank, 2002).

Zellbiologische Studien haben gezeigt (Fournier *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2001), dass die inhibitorische Aktivität der C-terminalen Region von Nogo-A, Nogo66, NgR-abhängig ist. Im Einklang damit konnte hier eine Bindung zwischen dem NgR-Fusionsprotein TrxA-NgR Δ und dem bakteriell produzierten Nogo66 mittels Western Blot und ELISA gezeigt werden. In der Bindungsstudie mit dem Peptid-Array und der darauf folgenden Substitutions- und Längenanalyse konnte die Bindungsstelle für TrxA-NgR Δ auf ein Peptid mit einer Länge von 7 As eingeschränkt werden (IKXLRRL; X¹P).

Diese Sequenz ist Teil der Nogo66-Domäne (IKELRRL, As 49-55, entsprechen Position 1103-1109 in der kompletten Sequenz des humanen Nogo-A). IKELRRL ist auch Teil des so genannten Pep4, welches den As 31-55 von Nogo66 entspricht und hauptsächlich für die inhibitorische Aktivität von Nogo66 verantwortlich zu sein scheint (GrandPré *et al.*, 2000). Dieses Peptid induziert den Kollaps des Wachstumkegels und inhibiert das Nervenwachstum ab einer Konzentration von 4 μ M (GrandPré *et al.*, 2000). Jedoch ist die inhibitorische Potenz dieses Peptids viel schwächer als die des gesamten Nogo66-Fragments. Die geringere inhibitorische Aktivität des Pep4 könnte aus dem Verlust einer konformationellen Stabilisierung durch benachbarte Abschnitte im Nogo66 resultieren. Vermutlich tragen aber auch andere Regionen in der Nogo66-Domäne zu der inhibitorischen Aktivität im nanomolaren Bereich bei. Tatsächlich wurde für das Peptid NEP1-40 (As 1-40 der Nogo66-Domäne) gezeigt, dass es *in vitro* an NgR (in COS7 Zellen exprimiert) bindet und zudem *in vivo* die Inhibition des Axonwachstums durch das ZNS blockiert (GrandPré *et al.*, 2002).

In Fluoreszenztitrationsexperimenten mit TrxA-NgR Δ und dem synthetischen Nogo66-Epitopepeptid (oAbz-TIKELRRLFL-NH₂) wurde ein K_D-Wert der Interaktion von rund 10 μ M gemessen. Dieser Wert ist deutlich höher als die apparenten nanomolare Werte für die NgR/Nogo-A- Interaktion aus zellbiologischen Experimenten (Fournier *et al.* 2001). Bindungstests zwischen NgR, erhalten durch Ribosomal Display, und einem Fusionsprotein aus Alkalischer-Phosphatase und Nogo-66 lieferten jedoch einen ähnlichen K_D-Wert von 2 μ M (Schimmerle *et al.* 2005). Auch in anderen biochemischen Experimenten, wie der Koimmunpräzipitation mit der gereinigten Ligandenbindungsdomäne des NgR und einem Nogo66-AP Fusionsprotein (He *et al.*, 2003), schien die gegenseitige Affinität schwächer zu sein als die aus den zellbiologischen Experimenten berechneten nanomolaren Werte.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhobenen Daten lieferten keinen Hinweis auf eine Bindung zwischen dem NgR-Fragment TrxA-NgR Δ und der N-terminalen Nogo-A Domäne. Weder im Western Blot, im ELISA oder dem Peptid-Array konnte eine Wechselwirkung nachgewiesen werden. Eine Bindung des NgR an den N-terminalen Teil des Nogo-A wurde erst neulich beschrieben (Hu *et al.*, 2005). Die Autoren inkubierten Fusionsproteine aus verschiedenen N-terminalen Nogo-A-Fragmenten und Alkalischer Phosphatase mit COS-7 Zellen, die das native ngr-Gen überexprimierten. Sie fanden eine Region im N-terminalen Nogo-A (Nogo-A-24, AS 995-1018), die den NgR mit einer Affinität im nanomolarem Bereich band.

Nogo-A-24 liegt am äußersten C-Terminus der N-terminalen Region, spezifisch für die Spleißvariante

A des Nogo-Proteins, und ist in dem hier untersuchten rekombinanten hNogoAn5-Fragment nicht enthalten. Dies könnte die fehlende Bindungsaktivität des NgR Fusionsproteins im Western Blot und im ELISA erklären. In den Epitope Mapping Experimenten konnte jedoch ebenfalls keine Bindungsaktivität zwischen TrxA-NgR Δ und Peptiden, die der Nogo-A-24 Region entsprechen würden (Peptid Nr. 332, As 995-1009), gezeigt werden. Dies stellt eine stabile Wechselwirkung des NgR mit der Nogo-A-24-Region in Frage. Zellbiologische Experimente haben zudem die Unabhängigkeit der inhibitorischen Aktivität des N-terminalen Nogo-A von NgR gezeigt. (Hu *et al.*, 2005; Oertle *et al.*, 2003b). Die postulierte Interaktion von Nogo-A-24 und dem NgR bleibt somit unbestätigt.

Weiterhin gelang es hier nicht, ein lineares Epitope für das IN-1 Fab-Fragment bzw. seiner affinitätsmaturierte Variante II.I.8 in der N-terminalen Extramembranregion des Nogo-A mit Hilfe des Peptid-Arrays zu bestimmen. Das Peptid-Array ist wegen der hohen Dichte der auf der Membran chemisch-immobilisierten Peptide normalerweise eine sehr zuverlässige Methode um Epitope zu identifizieren (Reinecke *et al.*, 2001; Reinecke, 2004).

Andererseits gelang der Nachweis, dass das IN-1 Fab-Fragment die N-terminale Nogo-A spezifische Domäne hNogoAn5 auf dem Western Blot bindet. Während die Affinität des Fab-Fragments zu hNogoAn5 jedoch zu schwach war, um sie im ELISA nachzuweisen, wurde mit dem affinitätsmaturierten IN-III.1.8 Fab-Fragment ein deutliches Bindungssignal erhalten. Dies steht im Einklang mit der von M. Fiedler (2002) beschriebenen Bindung des IN-III.1.8 Fab-Fragments an das Rattenhomologe NiFr2. Da allerdings mit dem Peptid-Array kein definiertes Epitop im N-terminalen Nogo-A bestimmt werden konnte, handelt es sich wahrscheinlich um eine konformationsabhängige Antigen-Wechselwirkung mit dem neutralisierenden Antikörper. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Nogo-A in 8M Harnstoff auch seine inhibitorische Aktivität verliert (Oertle *et al.*, 2003b).

Nichtsdestotrotz könnten einzelne Interaktionen zwischen dem IN-1 Fab-Fragment und Nogo-A Peptiden, die zu schwachen Signalen im Peptidarray führten (Abb. 3.17), auf diskontinuierliche Abschnitte eines Epitops, das insgesamt abhängig von der Faltung des Proteins ist, hindeuten.

Während die Experimente mit den Peptid-Array Identifizierung der Aminosäuresequenz IKELRRL als potentielle NgR-Bindungsstelle führten, zeigte sich jedoch auch, dass diese Wechselwirkung mit Nogo66 nicht NgR-spezifisch war. Im Peptid-Array banden sowohl das partiell humanisierte Maus-Fab-Fragment IN-1 und seine affinitätsmaturierte Variante II.I.8 als auch das MOG-spezifische Fab-Fragment 8-18C5 an die Peptide Nr. 366-367, welche das Epitop IKELRRL beinhalten. Die Bindung dieser Fab-Fragmente an Nogo66 wurde zudem im Western Blot und ELISA nachgewiesen.

Die so gezeigte Affinität des IN-1 Fab-Fragments zu Nogo66 wirft die interessante Frage auf, ob IN-1 auch durch Blockade der NgR-Nogo66 Interaktion seine neutralisierende Wirkung auf Nogo-A ausübt. Allerdings spricht die ebenfalls beobachtete Bindung des Kontrollantikörpers 8-18C5 an Nogo66 gegen die Hypothese. Es ist hingegen erstaunlich, dass gerade dieses Peptid innerhalb der ausgedehnten Nogo-A Sequenz mehrfache Bindungsaktivität an den NgR und auch an beide Fab-Fragmente IN-1 und 8-18.C5 zeigt. Das deutet darauf hin, dass dieses Peptid, zumindest wenn es aus dem gefalteten Protein-Kontext entfernt wurde, zu unspezifischem Bindungsverhalten neigt.

In einer NMR Strukturanalyse der ersten 60 As von Nogo66 wurde gezeigt, dass IKELRRL in einer der vier positiv geladenen Regionen, welche möglicherweise an NgR binden könnten, liegt (Li *et al.*, 2006). Interessanterweise kommt das hier identifizierte Epitop noch in weiteren humanen Proteinen vor, wie dem Fibroblast Growth Factor 4 (FGF4). In der Krystalstruktur bildet eben diese Sequenz IKRLRRL eine an der Oberfläche exponierte Schleife am N-terminus der β -Kleeblatt-Struktur des Proteins und ist möglicherweise in die Bindung an den FGF Rezeptor involviert (Bellosta *et al.*, 2001).

Obwohl die biologische Funktion der Kreuzreaktivität des IKxLRRL-Motivs zum jetzigen Zeitpunkt nicht klar ist, lohnt es sich, die Interaktion des NgR bzw. des IN-1 Fab-Fragments mit diesem Peptid in Verbindung mit neuronaler Regeneration näher zu untersuchen.

4.4 Etablierung eines Testsystems für die molekulare und funktionelle Charakterisierung klonal expandierter B-Lymphozyten bei der Multiplen Sklerose (MS)

Oligoklonale Immunglobulinbanden (OKB) sind mit Hilfe von isoelektrischer Fokussierung im Liquor von über 95 % der MS-Patienten nachweisbar (Kabat *et al.*, 1950). Auch wenn die Bedeutung der klonal expandierten B-Zellen im Krankheitsverlauf der MS umstritten ist (Sospedra und Martin, 2005), gibt es jdennoch zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung von Immunglobulinen bei der Bildung demyelinisierender Läsionen bei der MS (Mead *et al.*, 2002; Goldenberg *et al.*, 1989; Genain *et al.*, 1999). Die Antigenpezifität dieser Antikörper ist allerdings noch nicht bestimmt worden.

Im Rahmen eines umfassenden Projekts, welches teilweise auch diese Doktorarbeit einschließt, sollten die Gensequenzen der variablen Domänen von Antikörpern klonal expandierter B-Zellpopulationen im Liquor von MS Patienten amplifiziert und auf einem Expressionsvektor zwecks weitergehender Analysen kloniert werden. Monika Hofbauer gelang es in ihrer Doktorarbeit, die Gensequenzen der variablen Ig-Domänen von 32 Plasmazellen im Liquor eines MS-Patienten zu amplifizieren. Sequenzierung dieser PCR-Produkte zeigte drei Paare von schwerer und leichter Kette, die wiederholt auftraten. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich hier in der Tat um klonal expandierte B-Zellpopulationen handelt.

Zwei Amplifikationsprodukte wurden bereits auf den Expressionsvektor pASK107 (Fiedler *et al.*, 2002) kloniert und die rekombinanten Fab-Fragmente erfolgreich produziert (M. Hofbauer, Doktorarbeit). Im nächsten Schritt sollte die mögliche Spezifität der aus den Plasmazellen gewonnenen Antikörper-Konstrukte für ZNS-spezifische Proteine zunächst an Kryostatschnitten von humanem ZNS-Gewebe überprüft werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck ein Testsystem mit Hilfe eines Maus-Hybridoms bekannter Spezifität und myelotischer Wirkung, dem Antikörper 8-18C5 (Lington, 1988), etabliert.

Dieser Antikörper wurde als rekombinantes Fab-Fragment mit dem Vektor pASK107 in *E. coli* in mg-Mengen hergestellt und zur Homogenität gereinigt. Das 8-18C5 Fab-Fragment erkannte sein Antigen MOG in Western Blot und an Gehirnschnitten der Ratte. Zudem wurden verschiedene Varianten des Fab-Fragments sowohl mit His₆-tag als auch mit *Strep*-tag II hergestellt. Die Version

mit dem *Strep*-tag II eignete sich dabei besonders für immunhistochemische Experimente. Das *Strep*-tag II kann ähnlich wie biotinylierte Antikörper durch Streptavidin-Enzym-Konjugate oder, noch spezifischer, durch StrepTactin-Enzym-Konjugate nachgewiesen werden (Schmidt und Skerra, 2007). Ein direkter Nachweis des MOG-Antigens war schließlich durch Kopplung von Fluoreszein an das Fab-Fragment möglich. Somit steht nun ein validiertes und flexibles Testsystem für die Spezifität klonierter Antikörper aus dem Liquor zur Verfügung.

Neben der Antigen-spezifität solcher Antikörper ist die Frage nach der demyelinisierenden Wirkung von entscheidender Bedeutung. Die pathogene Wirkung kann im Tierversuch getestet werden. Da Fab-Fragmente allein keine Effektormechanismen aktivieren und somit keine Zerstörung des Myelins einleiten können, musste zunächst eine Methode gefunden werden, um dies anderweitig zu erreichen. In der Tat gelang es, durch zusätzliche Gabe eines anti-*Strep*-tag Antiserums aus dem Kaninchen die Lyse von MOG-transfizierten Myelomzellen *in vitro* in einem Komplement-abhängigen Cytotoxizitätstest herbeizuführen.

4.5 Die Struktur des MOG/8-18C5-Fab-Komplexes

Das 8-18C5 Fab-Fragment wurde zur Herstellung und Untersuchung eines Komplexes mit dem rekombinanten MOG-Antigen verwendet. Die hier beschriebene Struktur des MOG^{IgD}/8-18C5-Fab-Komplexes ist die erste gelöste Struktur eines ZNS-Autoantigens mit einem Fab-Fragment. Das von 8-18C5 erkannte Epitop auf MOG^{IgD} ist diskontinuierlich und bei den verschiedenen MOG-Orthologen aus Maus, Ratte und Mensch zu 100 % konserviert. Die Struktur bestätigt frühere Beobachtungen von Piddlesden (1991), die zeigten, dass kein einzelnes von der MOG-Sequenz abgeleitetes Peptid von dem monoklonalen Antikörper 8-18C5 gebunden wird. Der monoklonale Antikörper 8-18C5 verhinderte zudem die Bindung durch 12 von insgesamt 15 unterschiedlichen MOG-spezifischen monoklonalen Antikörpern, was darauf hindeutet, dass das von 8-18C5 erkannte Epitop in einem immundominanten Bereich von MOG liegt. In Anbetracht der geringen Größe von MOG konnte jedoch zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass die anderen Antikörper eventuell benachbarte oder leicht überlappende Epitope erkennen und so aus sterischen Gründen nicht mehr binden konnten.

Nachdem die Struktur dieses Autoantigen-Fab-Komplexes gelöst war, konnte eine Substitutionsanalyse zur Immundominanz des 8-18C5-Epitops durchgeführt werden (Breithaupt, 2005). Die beiden zentralen Aminosäuren des Epitops His103 und Ser104 wurden dabei durch verschiedene As ausgetauscht, und zwei Doppelmutanten DM1 (His103Gly; Ser104Glu) und DM2 (His103Ala; Ser104Glu) wurden hergestellt. Sowohl der 8-18C5 als auch 8 von 9 anderen MOG-spezifischen monoklonalen Antikörpern erkannten diese Doppelmutanten nur schwach. Wenn man davon ausgeht, dass die zehn getesteten Antikörper eine repräsentative Auswahl der konformationsabhängigen pathogenen anti-MOG Antikörper in der Maus darstellen, dann muss sich die Antikörperantwort gegen MOG hauptsächlich auf dieses Epitop konzentrieren.

Eine pathogene MOG-spezifische Antwort in der EAE der Maus wird nur durch konformations-abhängige Antikörper, die diskontinuierliche Epitope erkennen, ausgelöst. Die Frage ist, ob bei MS im Menschen ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Epitopspezifität und Pathogenizität vorliegt. Wie in Abschnitt 4.4 beschrieben, ist die Bedeutung von konformationsabhängigen MOG-spezifischen Antikörpern in der MS unklar, wenngleich es Hinweise auf eine pathophysiologische

Rolle solcher Antikörper gibt. Fab-Fragmente gegen konformationelle Epitope von MOG können Antikörper aus dem Serum von MS-Patienten verdrängen (von Büdingen *et al.*, 2002). Der Zustand einer Patientin mit konformationsabhängigen MOG-spezifischen Antikörpern konnte durch Plasmapherese verbessert werden (Haase *et al.*, 2001); B-Zellen aus dem Blut dieser Patientin ließen sich zudem mit dem im Rahmen dieser Arbeit hergestellten MOG^{IgD}-*Strep* anfärben (persönliche Mitteilung N.Goebels, Daten nicht gezeigt). Schließlich lassen sich zu Beginn der Krankheit und während aktiver MS-Schübe im Serum von MS-Patienten erhöhte Antikörperkonzentrationen gegen das native, aber nicht gegen das denaturierte MOG^{IgD} nachweisen (Gaertner *et al.*, 2004).

Die Identifizierung des 8-18C5 Epitops lieferte eine strukturelle Grundlage für die Untersuchung der genetischen und umweltabhängigen Faktoren, die eine potenzielle MOG-spezifische Antikörperantwort *in vivo* auslösen oder beeinflussen können. Da das *mog*-Gen nur im ZNS exprimiert wird, ist es dem Immunsystem normalerweise nicht zugänglich und kann somit keine B-Zell-Toleranz induzieren. Im menschlichen Genom existieren jedoch viele MOG-ähnliche Gene, von denen einige auf der Proteinebene charakterisiert wurden. Beispiele sind das Erythroid Membrane Associated Protein (ERMAP) sowie eine Vielzahl von Butyrophilin-Isoformen (BTN). Diese Proteine werden außerhalb des ZNS exprimiert und können so immunologische Toleranz erzeugen. Sie zeigen eine Sequenzidentität von ca. 30-50 % zu MOG^{IgD}. Betrachtet man allerdings die Aminosäuren des 8-18C5-Epitops auf MOG, zeigt sich, dass gerade diese zwischen MOG und seinen strukturellen Verwandten nicht konserviert sind (Breithaupt, 2005). Das Fehlen dieses vermutlich auch im Menschen immundominanten Epitops auf den homologen, aber dem Immunsystem zugänglichen Proteinen, könnte eine Erklärung für die fehlende Toleranz gegenüber MOG und für die Bildung von Autoantikörpern bei MS-Patienten sein.

Obwohl das 8-18C5 Epitop diskontinuierlich ist, konnte eine dominante Rolle der Sequenz zwischen den As 101-108 (DHSYQEE) festgestellt werden (Breithaupt *et al.*, 2003). Bekanntermaßen werden als mögliche Auslöser für Autoimmunerkrankungen Immunreaktionen gegen Pathogenbestandteile diskutiert, die Teilen des daraufhin attackierten körpereigenen Proteins strukturell ähneln und so die Bildung kreuzreaktiver Antikörper induzieren (Molecular Mimicry). Eine BLAST-Suche zeigte, dass es kein anderes Säugerprotein gibt, welches der MOG-Sequenz AS101DHSYQEE101 ähnelt. Jedoch konnten der MOG-Epitop verwandte Sequenzen in Proteinen verschiedener Chlamydia Arten identifiziert werden (Breithaupt *et al.*, 2003). Interessanterweise wird gerade die Beteiligung von Chlamydia pneumonia an der Entstehung von MS diskutiert (Sriram *et al.*, 1998).

Es bleibt abzuwarten, welche Art von Epitopen von den im Liquor von MS-Patienten auftretenden oligoklonalen Antikörpern erkannt werden.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit proteinchemischen Aspekten von degenerativen und regenerativen Prozessen im adulten Zentralen Nervensystem (ZNS). Im ersten Teil wurden Mechanismen der Inhibition des axonalen Wachstums und der Regeneration untersucht, während der zweite Teil die Grundlagen neuronaler Degeneration durch Autoimmunprozesse behandelt. In beiden Teilen nimmt die biochemische Charakterisierung von Myelinproteinen und ihrer Bindungseigenschaften eine zentrale Rolle ein.

Nogo-A ist ein physiologisch relevanter Inhibitor des axonalen Wachstums und der Regeneration im adulten ZNS und somit ein Zielprotein für potentielle therapeutische Agenzien bei Verletzungen wie zum Beispiel der Querschnittslähmung. Um Einblicke in die strukturellen und funktionellen Besonderheiten von Nogo-A zu erlangen, wurde das Strukturgen für die vermutete extrazelluläre Domäne des humanen Nogo-A (Aminosäuren 334-966) mit einem C-terminalen *Strep*-tag kloniert, als lösliches Protein im Periplasma von *E. coli* hergestellt und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Das erhaltene Fragment hNogoAn5 war homogen und bot einen geeigneten Ausgangspunkt für die biochemische Charakterisierung. CD-Messungen zeigten, dass ein signifikanter Teil dieses Nogo-A-Fragments in einer Random-Coil-Konformation vorliegt, wohingegen die analytische Gleichgewichtszentrifugation auf eine monomere Konstitution hindeutete. Durch systematische Substitution aller sechs Cysteinreste gelang der Nachweis von zwei strukturell relevanten Disulfidbrücken im hNogoAn5. Dies deutet darauf hin, dass zumindest der C-terminale Teil der N-terminalen Nogo-A-Region eine gefaltete Konformation annimmt.

Zudem wurde das Nogo66-Fragment (Aminosäuren 1026-1092 in der Ratte), welches zwischen den beiden Transmembrandomänen von Nogo-A angeordnet ist, mit einem C-terminalen His₆-Tag kloniert, als Einschlusskörper in *E. coli* synthetisiert, unter denaturierenden Bedingungen durch Metallchelate-Chromatographie gereinigt und anschließend renaturiert. Schließlich wurde ein Fragment des humanen Nogo66-Rezeptors NgR (extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, Aminosäuren 26-310) als Fusionsprotein mit Thioredoxin (TrxA-NgR Δ) kloniert und in *E. coli* produziert. Aus den erhaltenen Einschlusskörpern konnte das Fusionsprotein zurückgefaltet und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt werden.

In den darauffolgenden Bindungsstudien wurde gezeigt, dass der regenerative Antikörper IN-1 – in Form seines rekombinanten Fab-Fragments – nicht jedoch NgR, sein Antigen Nogo-A in dem N-terminalen Abschnitt bindet. NgR-Bindung an Nogo-A wurde lediglich für den C-terminalen Abschnitt, Nogo66, beobachtet. Die Peptidsequenz der Bindungsstelle wurde anhand einer SPOT-Epitopanalyse bestimmt. Diese Ergebnisse stellen publizierte Resultate aus zellbiologischen Experimenten teilweise in Frage und werfen ein neues Licht auf die Wechselwirkung zwischen NgR und Nogo-A.

Das Major Oligodendrocyte Glycoprotein, MOG, spielt – neben anderen Faktoren – vermutlich eine ursächliche Rolle bei der Entstehung der Multiplen Sklerose (MS), einer chronischen Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems, die durch Entzündung, Demyelinisierung und

Zerstörung von Nervenfasern gekennzeichnet ist. Nachdem in den letzten Jahren das Augenmerk vor allem auf die Rolle der T-Zellen bei der Autoimmunreaktion gerichtet war, rücken nun wieder die B-Zellen in den Mittelpunkt des Interesses.

Um die immunologische Erkennung des MOG-Antigens auf molekularer Ebene zu verstehen und auch die methodischen Grundlagen für eine Charakterisierung oligoklonaler Autoantikörper aus dem Liquor von MS-Patienten zu schaffen, wurde zunächst ein rekombinantes Fab-Fragment des monoklonalen Maus-Antikörpers 8-18C5 in *E. coli* hergestellt. Mit Hilfe dieses Fab-Fragments wurde ein Zellkultur-Testsystem für potenziell demyelinisierende Antikörper aus dem Liquor von MS-Patienten etabliert.

Schließlich wurde anhand der Kristallisation des Komplexes aus MOG und dem 8-18C5-Fab-Fragment sowie dessen anschließender Röntgen-Strukturanalyse gezeigt, dass das 8-18C5 Epitop auf MOG diskontinuierlicher Art ist. Es ist innerhalb verschiedener MOG-Orthologe hoch konserviert, nicht jedoch bei MOG-Homologen außerhalb des ZNS, wie zum Beispiel Butyrophilin. Dieser Befund könnte die fehlende Toleranz gegenüber MOG in dem immunprivilegierten ZNS sowie die mögliche Produktion von Autoantikörpern infolge eines noch unbekanntem Stimulus bei der MS erklären.

6 Literatur

- Al-Lazikani, B., Lesk, A. und Chothia, C.** (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* **273**, 927-948.
- Bachmann, B. J.** (1972) Pedigrees in some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* **36**, 525-557.
- Bandtlow, C., Schiweck, W., Tai, H. H., Schwab, M. E. und Skerra, A.** (1996) The *Escherichia coli*-derived Fab fragment of the IgM/kappa antibody IN-1 recognizes and neutralizes myelin-associated inhibitors of neurite growth. *Eur J Biochem* **241**, 468-475.
- Barton, W. A., Liu, B. P., Tzvetkova, D., Jeffrey, P. D., Fournier, A. E., Sah, D., Cate, R., Strittmatter, S. M. und Nikolov, D. B.** (2003) Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *EMBO J* **22**, 3291-3302.
- Bellosta, P., Iwahori, A., Plotnikov, AN., Eliseenkova, AV., Basilico, C., Mohammadi, M.** (2001) Identification of receptor and heparin binding sites in fibroblast growth factor 4 by structure-based mutagenesis. *Mol Cell Biol* **21**, 3291-3302
- Baumann, N. und Pham-Dinh, D.** (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **81**, 871-927.
- Berger, T., Rubner, P., Schautzer, F., Egg, R. und Ulmer, H.** (2003) Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* **349**, 139-145.
- Birnboim, C. D.** (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. und Gotschlich, E. C.** (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* **136**, 175-179.
- Bourqin, C.** (2000) Vaccination with DNA encoding a myelin autoantigen exacerbates experimental autoimmune encephalitis. Dissertation. Neuroimmunologie, MPI Neurobiologie. LMU München
- Bregman, B. S., Kunkel-Bagden, E., Schnell, L., Dai, H. N., Gao, D. und Schwab, M. E.** (1995) Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* **378**, 498-501.
- Brehm, U., Piddlesden, S. J., Gardinier, M. V. und Linington, C.** (1999) Epitope specificity of demyelinating monoclonal autoantibodies directed against the human myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J Neuroimmunol* **97**, 9-15.

- Breithaupt, C.** (2005) Röntgenstrukturanalyse des Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein und seines Komplexes mit dem (8-18C5)-Fab und Röntgenstrukturanalyse der 12-Oxophytodiensäurereductasen 1 und 3. Dissertation. Fakultät für Chemie. Technische Universität München.
- Breithaupt, C., Schubart, A., Zander, H., Skerra, A., Huber, R., Linington, C. und Jacob, U.** (2003) Structural insights into the antigenicity of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9446-9451.
- Broesamle, C., Huber, A. B., Fiedler, M., Skerra, A. und Schwab, M. E.** (2000) Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J Neurosci* **20**, 8061-8068.
- Brook, G. A., Schmitt, A. B., Nacimiento, W., Weis, J., Schroder, J. M. und Noth, J.** (1998) Distribution of B-50(GAP-43) mRNA and protein in the normal adult human spinal cord. *Acta Neuropathol* **95**, 378-386.
- Brunner, C., Lassmann, H., Waehneltd, T. V., Matthieu, J. M. und Linington, C.** (1989) Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem* **52**, 296-304.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Echerichia coli strain with beta-galactosicase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.
- Bunge, R.** (1993) Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* **3**, 805-809.
- Caroni, P. und Schwab, M. E.** (1988a) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* **1**, 85-96.
- Caroni, P. und Schwab, M. E.** (1988b) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* **106**, 1281-1288.
- Chaisuksunt, V., Zhang, Y., Anderson, P. N., Campbell, G., Vaudano, E., Schachner, M. und Lieberman, A. R.** (2000) Axonal regeneration from CNS neurons in the cerebellum and brainstem of adult rats: correlation with the patterns of expression and distribution of messenger RNAs for L1, CHL1, c-jun and growth-associated protein-43. *Neuroscience* **100**, 87-108.
- Chen, D. F., Schneider, G. E., Martinou, J. C. und Tonegawa, S.** (1997) Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature* **385**, 434-439.
- Chen, M. S., Huber, A. B., van der Haar, M. E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A. A., Christ, F. und Schwab, M. E.** (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* **403**, 434-439.

Chien, A., Edgar, D. B. und Trela, J. M. (1976) Desoxiribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* **127**, 1550-1555.

Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.

Cocquerel, L., Op, D. B., Lambot, M., Roussel, J., Delagrang, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F. und Dubuisson, J. (2002) Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J* **21**, 2893-2902.

Cohen, S. N., Chang, A.C.Y. und Hsu, L. (1972) Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **69**, 2110-2114.

Creighton, T. E. (1986) Disulfide bonds as probes of protein folding pathways. *Methods Enzymol* **131**, 83-106.

Curtis, S. K. und Cowden, R. R. (1980) Demonstration of sulfhydryl and disulfide groups by a fluorescent maleimide procedure. *Histochemistry* **68**, 23-28.

David, S. und Aguayo, A. J. (1981) Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* **214**, 931-933.

Devereux, J., Haeberli, P. und Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**, 387-395.

Domeniconi, M., Cao, Z., Spencer, T., Sivasankaran, R., Wang, K., Nikulina, E., Kimura, N., Cai, H., Deng, K., Gao, Y., He, Z. und Filbin, M. (2002) Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* **35**, 283-290.

Fiedler, M. und Skerra, A. (2001) proBA complementation of an auxotrophic *E. coli* strain improves plasmid stability and expression yield during fermenter production of a recombinant antibody fragment. *Gene* **274**, 111-118.

Fiedler, M. (2002) Neutralisierung eines Inhibitors der neuronalen Regeneration im ZNS: Optimierung des anti-Nogo-A Antikörpers IN-1 durch Protein Engineering. Dissertation. Institut für Biologische Chemie. TU München München.

Fiedler, M., Horn, C., Bandtlow, C., Schwab, M. E. und Skerra, A. (2002) An engineered IN-1 F(ab) fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity. *Protein Eng* **15**, 931-941.

Fling, S. P. und Gregerson, D. S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* **155**, 83-88.

- Fontana, A., Polverino de Laureto, P., De Filippis, V., Scaramella, E., Zambonin, M.** (1999) Limited proteolysis in the study of protein conformation. In *Proteolytic Enzymes: Tools and Targets* (Sterchi, E.E. und Stocker, W.), pp.257-284. Springer, Heidelberg, Berlin.
- Fournier, A. E., GrandPre, T. und Strittmatter, S. M.** (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* **409**, 341-346.
- Fournier, A.E, Gould, G.C., Liu, B.P., Strittmatter, S.M.** (2002) Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *J Neurosci* **22**, 8876-8883.
- Frank, R. und Overwin, H.** (1996) SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol* **66**, 149-169.
- Frank, R.** (2002) The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane support--principles and applications. *J Immunol Methods* **267**, 13-26
- Frey, D., Laux, T., Xu, L., Schneider, C. und Caroni, P.** (2000) Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *J Cell Biol* **149**, 1443-1454
- Gaertner, S., de Graaf, K., Greve, B. und Weissert, R.** (2004) Antibodies against glycosylated native mog are elevated in patients with multiple sclerosis. *Neurology* **63**, 2381-2383
- Gardinier, M. V. und Matthieu, J. M.** (1993) Cloning and cDNA sequence analysis of myelin/oligodendrocyte glycoprotein: a novel member of the immunoglobulin gene superfamily. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* **144**, 201-207.
- Geisselsoder, J., Withney, F. und Yuckenberg, P.** (1987) Efficient site-directed in vitro mutagenesis. *BioTechniques* **5**, 786-791.
- Genain, C. P., Cannella, B., Hauser, S. L. und Raine, C. S.** (1999) Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* **5**, 170-175.
- Genain, C. P., Nguyen, M. H., Letvin, N. L., Pearl, R., Davis, R. L., Adelman, M., Lees, M. B., Linington, C. und Hauser, S. L.** (1995) Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J Clin Invest* **96**, 2966-2974.
- Gill, S. C. und Hippel, P. H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**, 319-326.
- Goder, V. und Spiess, M.** (2001) Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett* **504**, 87-93.
- Goldenberg, P. Z., Kwon, E. E., Benjamins, J. A., Whitaker, J. N., Quarles, R. und Prineas, J. W.** (1989) Opsonization of normal myelin by anti-myelin antibodies and normal serum. *J Neuroimmunol* **23**, 157-166.

- GrandPré, T., Li, S. und Strittmatter, S. M.** (2002) Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* **417**, 547-551.
- GrandPré, T., Nakamura, F., Vartanian, T. und Strittmatter, S. M.** (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* **403**, 439-444.
- Greiff, K.** (2003) Untersuchung zur Rolle der Cysteinreste in der Extramembrandomäne des neuronalen Inhibitorproteins Nogo-A. Bachelorarbeit. Technische Universität München
- Haase, C. G., Guggenmos, J., Brehm, U., Andersson, M., Olsson, T., Reindl, M., Schneidewind, J. M., Zettl, U. K., Heidenreich, F., Berger, T., Wekerle, H., Hohlfeld, R., und Linington, C.** (2001) The fine specificity of the myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody response in patients with multiple sclerosis and normal healthy controls. *J Neuroimmunol* **114**, 220-225.
- He, X. L., Bazan, J. F., McDermott, G., Park, J. B., Wang, K., Tessier-Lavigne, M., He, Z. und Garcia, K. C.** (2003) Structure of the Nogo receptor ectodomain: a recognition module implicated in myelin inhibition. *Neuron* **38**, 177-185.
- Hettich, E.** (2001) Struktur- und Funktionsanalyse an rekombinanten Fragmenten des Neuronalen Inhibitorproteins hNogo-A. Diplomarbeit. Technische Universität München
- Hochuli, E.** (1988) Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr* **444**, 293-302.
- Holmgren, A.** (1985) Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* **54**, 237-271.
- Horn, C.** (1998) Struktur- und Funktionsanalyse an rekombinanten Fragmenten des Neuronalen Inhibitorproteins 220. Diplomarbeit. Technische Universität Darmstadt
- Hu, F., Liu, B. P., Budel, S., Liao, J., Chin, J., Fournier, A. und Strittmatter, S. M.** (2005) Nogo-A interacts with the Nogo-66 receptor through multiple sites to create an isoform-selective subnanomolar agonist. *J Neurosci* **25**, 5298-5304.
- Huber, A. B. und Schwab, M. E.** (2000) Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol Chem* **381**, 407-419.
- Huber, A. B., Weinmann, O., Brosamle, C., Oertle, T. und Schwab, M. E.** (2002) Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci* **22**, 3553-3567.
- Hunt, D., Mason, M. R., Campbell, G., Coffin, R. und Anderson, P. N.** (2002) Nogo receptor mRNA expression in intact and regenerating CNS neurons. *Mol Cell Neurosci* **20**, 537-552.
- Iglesias, A., Bauer, J., Litzenburger, T., Schubart, A. und Linington, C.** (2001) T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* **36**, 220-234.

- Kabat, E. A., Freedman, D. A., Murray, J. P. und Knaub, V.** (1950) A study of crystalline albumin, gamma globulin and total protein in the cerebrospinal fluid of one hundred cases of multiple sclerosis and in other diseases. *Am J Med Sci* **219**, 55-64.
- Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B. und Rajewsky, K.** (1979) A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immunol* **123**, 1548-1550.
- Keegan, B. M. und Noseworthy, J. H.** (2002) Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* **53**, 285-302.
- Kroepfl, J. F., Viise, L. R., Charron, A. J., Linington, C. und Gardinier, M. V.** (1996) Investigation of myelin/oligodendrocyte glycoprotein membrane topology. *J Neurochem* **67**, 2219-2222.
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D. und Zakour, R. A.** (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol* **154**, 367-382.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lassmann, H., Raine, C. S., Antel, J. und Prineas, J. W.** (1998) Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *J Neuroimmunol* **86**, 213-217.
- Laue, T. M. und Stafford, W. F.** (1999) Modern applications of analytical ultracentrifugation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**, 75-100.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. und McCoy, J.M.** (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology* **11**, 187-552.
- Lebar, R., Lubetzki, C., Vincent, C., Lombrail, P. und Boutry, J. M.** (1986) The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clin Exp Immunol* **66**, 423-434.
- Lebar, R., Vincent, C. und Fischer-le Boubennec, E.** (1979) Studies on autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig--III. A comparative study of two autoantigens of central nervous system myelin. *J Neurochem* **32**, 1451-1460.
- Li, M., Shi, J., Wei, Z., Teng, F. Y., Tang, B. L. und Song, J.** (2004) Structural characterization of the human Nogo-A functional domains. Solution structure of Nogo-40, a Nogo-66 receptor antagonist enhancing injured spinal cord regeneration. *Eur J Biochem* **271**, 3512-3522.
- Li, M., Liu, B.P., Song, J.** (2006) Nogo goes in pure water: solution structure of Nogo-60 and design of the structured and buffer soluble Nogo-54 for enhancing CNS regeneration. *Protein Sci* **15**, 1835-1841

- Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J., Russell, R.B.** (2003) Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* **11**, 1453-1459
- Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C. und Vass, K.** (1988) Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* **130**, 443-454.
- Linington, C., Webb, M. und Woodhams, P. L.** (1984) A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol* **6**, 387-396.
- Liu, B. P., Fournier, A., GrandPre, T. und Strittmatter, S. M.** (2002) Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* **297**, 1190-1193.
- Livingston, R. B., Pfenniger, K., Moor, H. und Akert, K.** (1973) Specialized paranodal and interparanodal glial-axonal junctions in the peripheral and central nervous system: a freeze-etching study. *Brain Res* **58**, 1-24.
- Lowenthal, A., Vansande, M. und Karcher, D.** (1960) The differential diagnosis of neurological diseases by fractionating electrophoretically the CSF gamma-globulins. *J New Drugs* **6**, 51-56.
- Lu, Y., Xiong, X., Helm, A., Kimani, K., Bradgin, A. und Skatch, W. R.** (1998) Co- and posttranslational mechanisms direct cystic fibrosis transmembran conductance regulator N-terminus transmembrane assembly. *J Biol Chem* **273**, 568-576.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W., Short, J. M., Sorge, J. A. und Marthur, E. J.** (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6.
- Martin, A. C. R.** (1996) Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **25**, 130-133.
- Martin, R., McFarland, H. F. und McFarlin, D. E.** (1992) Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* **10**, 153-187.
- McGee, A. W. und Strittmatter, S. M.** (2003) The Nogo-66 receptor: focusing myelin inhibition of axon regeneration. *Trends Neurosci* **26**, 193-198.
- Mead, R. J., Singhrao, S. K., Neal, J. W., Lassmann, H. und Morgan, B. P.** (2002) The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol* **168**, 458-465.
- Meurer, S.** (1999) Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt
- Meerman, H. J. und Georgiou, G.** (1994) Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology (N Y)* **12**, 1107-1110.

- Movva, N. R., Nakamura, K. und Inouye, M.** (1980) Gene structure of the OmpA protein, a major surface protein of *Escherichia coli* required for cell-cell interaction. *J Mol Biol* **143**, 317-328.
- Nie, D. Y., Zhou, Z. H., Ang, B. T., Teng, F. Y., Xu, G., Xiang, T., Wang, C. Y., Zeng, L., Takeda, Y., Xu, T. L., Ng, Y. K., Faivre-Sarrailh, C., Popko, B., Ling, E. A., Schachner, M., Watanabe, K., Pallen, C. J., Tang, B. L. und Xiao, Z. C.** (2003) Nogo-A at CNS paranodes is a ligand of Caspr: possible regulation of K(+) channel localization. *EMBO J* **22**, 5666-5678.
- Niederöst, B., Oertle, T., Fritsche, J., McKinney, R. A. und Bandtlow, C. E.** (2002) Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* **22**, 10368-10376.
- Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M. und Weinshenker, B. G.** (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* **343**, 938-952.
- Oertle, T., Huber, C., van der Putten, H. und Schwab, M. E.** (2003a) Genomic structure and functional characterisation of the promoters of human and mouse nogo/rtn4. *J Mol Biol* **325**, 299-323.
- Oertle, T., van der Haar, M. E., Bandtlow, C. E., Robeva, A., Burfeind, P., Buss, A., Huber, A. B., Simonen, M., Schnell, L., Brosamle, C., Kaupmann, K., Vallon, R. und Schwab, M. E.** (2003b) Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci* **23**, 5393-5406.
- Pettinelli, C. B. und McFarlin, D. E.** (1981) Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt1+ 2-T lymphocytes. *J Immunol* **127**, 1420-1423.
- Pham-Dinh, D., Allinquant, B., Ruberg, M., Della Gaspera, B., Nussbaum, J. L. und Dautigny, A.** (1994) Characterization and expression of the cDNA coding for the human myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* **63**, 2353-2356.
- Pham-Dinh, D., Mattei, M. G., Nussbaum, J. L., Roussel, G., Pontarotti, P., Roedel, N., Mather, I. H., Artzt, K., Lindahl, K. F. und Dautigny, A.** (1993) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7990-7994.
- Piddlesden, S., Lassmann, H., Laffafian, I., Morgan, B. P. und Linington, C.** (1991) Antibody-mediated demyelination in experimental allergic encephalomyelitis is independent of complement membrane attack complex formation. *Clin Exp Immunol* **83**, 245-250.
- Pigiet, V. und Schuster, B. J.** (1986) Thioredoxin-Catalyzed Refolding of Disulfide-Containing Proteins **83**, 7643-7647.

- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.
- Prilusky, J., Felder, C.E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E.H, Man O, Beckmann, J.S., Silman, I., Sussman, J.L.**(2005) FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics* **21**, 3435-3438
- Prinjha, R., Moore, S. E., Vinson, M., Blake, S., Morrow, R., Christie, G., Michalovich, D., Simmons, D. L. und Walsh, F. S.** (2000) Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* **403**, 383-384.
- Quarles, R.** (2002) Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cell Moll Life Sci* **59**, 1851-1871.
- Raine, C. S.** (1984) On the association between perinodal astrocytic processes and the node of Ranvier in the C.N.S. *J Neurocytol* **13**, 21-27.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”, Cold Spring Harbor, NY.
- Schimmele, B., Grafe, N. und Pluckthun, A.** (2005) Ribosome display of mammalian receptor domains. *Protein Eng Des Sel* **18**, 285-294.
- Schiweck, W. und Skerra, A.** (1995) Fermenter production of an artificial fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling. *Proteins* **23**, 561-565.
- Schlapschy, M.** (2004) Konstruktion eines bispezifischen F(ab)₂-Fragmentes zur Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms. Dissertation. Institut für Biologische Chemie. Tu München
- Schlapschy, M., Gruber, H., Gresch, O., Schafer, C., Renner, C., Pfreundschuh, M. und Skerra, A.** (2004) Functional humanization of an anti-CD30 Fab fragment for the immunotherapy of Hodgkin's lymphoma using an in vitro evolution approach. *Protein Eng Des Sel* **17**, 847-860.
- Schmidt, T. G. und Skerra, A.** (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng* **6**, 109-122.
- Schmidt, T. G. und Skerra, A.** (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the “Strep tag” and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A* **676**, 337-345.

- Schmidt, T. G. and Skerra, A.** (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* **2**, 1528-1535
- Schnell, L. und Schwab, M. E.** (1990) Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* **343**, 269-272.
- Schoepfer, R.** (1993) The pRSET family of T7 promoter expression vectors for Escherichia coli. *Gene* **124**, 83-85.
- Schwab, M. E.** (2004) Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 118-124.
- Schwab, M. E. und Bartholdi, D.** (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* **76**, 319-370.
- Schwab, M. E. und Thoenen, H.** (1985) Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J Neurosci* **5**, 2415-2423.
- Simons, P. C. und Vander Jagt, D. L.** (1981) Purification of glutathione S -transferases by glutathione-affinity chromatography. *Methods Enzymol* **77**, 235.
- Skerra, A.** (1992) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res* **20**, 3551-3554.
- Skerra, A.** (1994a) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* **141**, 79-84.
- Skerra, A.** (1994b) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in Escherichia coli. *Gene* **151**, 131-135.
- Skerra, A., Pfitzinger, I. und Plückthun, A.** (1991) The functional expression of antibody Fv fragments in Escherichia coli: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Biotechnology (N Y)* **9**, 273-278.
- Skerra, A. und Plückthun, A.** (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. *Science* **240**, 1038-1041.
- Skerra, A. und Schmidt, T. G.** (2000) Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol* **326**, 271-304.
- Smith D.B. und Johnson K.S.** (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31
- Sospedra, M. und Martin, R.** (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* **23**, 683-747.

- Spillmann, A. A., Amberger, V. R. und Schwab, M. E.** (1997) High molecular weight protein of human central nervous system myelin inhibits neurite outgrowth: an effect which can be neutralized by the monoclonal antibody IN-1. *Eur J Neurosci* **9**, 549-555.
- Spillmann, A. A., Bandtlow, C. E., Lottspeich, F., Keller, F. und Schwab, M. E.** (1998) Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220). *J Biol Chem* **273**, 19283-19293.
- Sriram, S., Mitchell, W. und Stratton, P.** (1998) Multiple sclerosis associated with Chlamydia pneumoniae infection of the CNS. *Neurology* **50**, 571-572.
- Stromer, T., Fischer, E., Richter, K., Haslbeck, M. und Buchner, J.** (2004) Analysis of the regulation of the molecular chaperone Hsp26 by temperature-induced dissociation: the N-terminal domain is important for oligomer assembly and the binding of unfolding proteins. *J Biol Chem* **279**, 11222-11228.
- Sun, J., Link, H., Olsson, T., Xiao, B. G. und Andersson, G.** (1991) T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sklerosis. *J Immunol* **146**, 1490-1495.
- Sundberg, E. J. und Mariuzza, R. A.** (2002) Molecular recognition in antibody-antigen complexes. *Adv Protein Chem* **61**, 119-160.
- Thallmair, M., Metz, G. A., Z'Graggen, W. J., Raineteau, O., Kartje, G. L. und Schwab, M. E.** (1998) Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nat Neurosci* **1**, 124-131.
- Tourtellotte, W. W., Walsh, M. J., Baumhufner, R. W., Staugaitis, S. M. und Shapshak, P.** (1984) The current status of multiple sclerosis intra-blood-brain-barrier IgG synthesis. *Ann NY Acad Sci* **436**, 52-67.
- Tozaki, H., Kawasaki, T., Takagi, Y. und Hirata, T.** (2002) Expression of Nogo protein by growing axons in the developing nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* **104**, 111-119.
- Vallie, L. a., DiBlasio, E. R., Kovacic, E. A., Grant, K. L., Schendel, P. F. und McCoy, J. M.** (1992) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion bodies formation in *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N Y)* **11**,
- Vieira, J. und Messing, J.** (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* **153**, 3-11.
- Vogt, M. und Skerra, A.** (2001) Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H. *J Mol Recognit* **14**, 79-86.
- von Budingen, H. C., Hauser, S. L., Fuhrmann, A., Nabavi, C. B., Lee, J. I. und Genain, C. P.** (2002) Molecular characterization of antibody specificities against myelin/oligodendrocyte glycoprotein in autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8207-8212.

- von Heinje, G.** (1996) Principles of membrane protein assembly and structure. *Progr Biophys Mol Biol* **66**, 113-139.
- Voss, S. und Skerra, A.** (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* **10**, 975-982.
- Wall, J. G. und Plückthun, A.** (1995) Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 507-516.
- Wang, K. C., Koprivica, V., Kim, J. A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R. L. und He, Z.** (2002a) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* **417**, 941-944.
- Wang, X., Chun, S. J., Treloar, H., Vartanian, T., Greer, C. A. und Strittmatter, S. M.** (2002b) Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci* **22**, 5505-5515.
- Wong, S. T., Henley, J. R., Kanning, K. C., Huang, K. H., Bothwell, M. und Poo, M. M.** (2002) A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* **5**, 1302-1308.
- Woolf, C. J. und Bloechlinger, S.** (2002) Neuroscience. It takes more than two to Nogo. *Science* **297**, 1132-1134.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T. und Ishii, S.** (1995) Increase of Solubility of Foreign Proteins in *Escherichia coli* by Coproduction of the Bacterial Thioredoxin. *J Biol Chem* **270**, 25328-25331.
- Zamvil, S. S. und Steinman, L.** (1990) The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* **8**, 579-621.
- Zander, H., Hettich, E., Greiff, K., Chatwell, L. und Skerra, A.** (2007) Biochemical characterization of the recombinant human Nogo-A ectodomain *FEBS J* **274**, 2603-2613.

7 Abkürzungen

Ax	Absorption bei x nm
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
Atc	Anhydrotetrazyclin
bla	b-Lactamase
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
c	Konzentration
Cam ^r	Chloramphenicol-Resistenz
Cat	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CDR	Complementarity Determining Region
CH1	erste konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
CL	Konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
(k)Da	(kilo-)Dalton
Ex	Extinktion bei x nm
EAE	experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ε _x	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm Fab-Fragment antigenbindendes Fragment aus den variablen und ersten konstanten Domänen eines Antikörpers
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
Ig	Immunglobulin
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
k _{cat}	Enzymatische Wechselzahl
KD	Komplexdissoziationskonstante
KM	Michaelis-Menten-Konstante
MS	Multiple Sklerose
OD ₅₅₀	optische Dichte bei 550 nm
<i>OmpA</i>	Outer Membrane Protein A
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
<i>PhoA</i>	bakterielle Alkalische Phosphatase
PNS	peripheres Nervensystem
rpm	Rounds per Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
VH	variable Domäne der schweren Kette

VL	variable Domäne der leichten Kette
WT	Wildtyp
w/v	Weight per Volume
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Anhang

8.1 Berechnete molare Masse und vorhergesagter molarer Extinktionskoeffizient der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine

	M[kD] ^a	ε[cmM ⁻¹] ^b
hNogoAn5	70,6	28,1
Nogo66-Fragment	8,5	3,8
TrxA-NgRΔ	44,8	49,2
hMOG ^{IgD}	14,4	17,8
IN-1-Fab-Fragment	47,9	76,8
IN-1(II.I.8)-Fab-Fragment	47,9	76,5
8-18C5-Fab-Fragment	52,9	70,1

^a Berechnet mit PEPTIDESORT(ohne Berücksichtigung von Disulfidbrücken). ^b Berechnet mit PEPTIDESORT nach Gill und Hippel (1989).

8.2 Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten und neu konstruierten Plasmide

pASK75	<i>tet^{p/o}</i> ; <i>ompA</i> -PL-strep; <i>bla/tetR</i> als Transkriptionsfusion
pASK88	wie pASK75; mit <i>ompA</i> -VH-ChuH1-His ₆ , <i>phoA</i> -Vκ-Chuk
pASK90	wie pASK75; mit <i>ompA</i> -VH-strepII, <i>phoA</i> -Vκ-myc
pASK90abd	wie pASK75; mit <i>ompA</i> -VH-strepII, <i>phoA</i> -Vκ-ABD
pASK98	wie pASK75; mit <i>ompA</i> -VH-linker-Vκ-strepII
pASK99	wie pASK75; mit <i>ompA</i> -VH-CH1-strepII, <i>phoA</i> -Vκ-Cκ
pASK106	wie pASK75; mit <i>ompA</i> -VH-ChuH1-His ₆ , <i>phoA</i> -Vκ-Chuk-ABD
pASK106	wie pASK75; mit <i>ompA</i> -VH-ChuH1-His ₆ , <i>phoA</i> -Vκ-Chuk-ABD
pASK107	wie pASK75; mit <i>ompA</i> -VH-ChuH1-strepII, <i>phoA</i> -Vκ-Chuk
pASK109	wie pASK75; mit <i>ompA</i> -VH-ChuH1ΔC-strepII, <i>phoA</i> -Vκ-Chuk
pASK110	wie pASK75; mit <i>ompA</i> -VH-ChuH1ΔC-His ₆ , <i>phoA</i> -Vκ-Chuk
pASK111	<i>tet^{p/o}</i> ; <i>ompA</i> -PL-strep; <i>cam/tetR</i> als Transkriptionsfusion
pASK111-Trx	wie pASK111; ohne <i>ompA</i> mit Trx vor PL-strep
pASK112-Trx	wie pASK111; ohne <i>ompA</i> mit Trx vor PL-strepII
pASK112	wie pASK111; mit <i>ompA</i> -PL-strepII
pASK200	wie pASK75; mit VH-ChuH1-strepII, Vκ-Chuk

pASK207	wie pASK207; mit zusätzlicher <i>EcoRI</i> -Schnittstelle in <i>ChuH</i> und <i>NheI</i> -Schnittstelle in <i>Chuk</i>
pASK208	wie pASK207; mit humaner <i>Cλ</i> -Domäne
pMF1	wie pASK75; mit <i>cat(-)</i> vor <i>tet^{p/o}</i> , <i>tetR</i> unter direkter Kontrolle von <i>bla^p</i> , <i>proBA(-)</i> vor <i>bla^p</i>
pSA	φ10 ^p ; Streptavidin; <i>bla</i>
pGEX5X	<i>Ptac</i> ; GST-PL; <i>lac I^q</i> ; <i>bla</i>

8.3 Aminosäure- und DNA-Sequenz der humanen Nogo-A

atggaagacctggaccagtctcctctggtctcgtcctcggacagcccaccccgccgcag	60
MetGluAspLeuAspGlnSerProLeuValSerSerSerAspSerProProArgProGln	
ccgcggtccaagtaccagttcgtgagggagcccaggacgaggaggaagaagaggaggag	120
ProAlaPheLysTyrGlnPheValArgGluProGluAspGluGluGluGluGluGlu	
gaagaggaggacgaggacgaagacctggaggagctggaggtgctggagaggaagcccgcc	180
GluGluGluAspGluAspGluAspLeuGluGluLeuGluValLeuGluArgLysProAla	
gccgggctgtccgcggccccagtgcccaccgcccctgccgcggcgccccctgatggac	240
AlaGlyLeuSerAlaAlaProValProThrAlaProAlaAlaGlyAlaProLeuMetAsp	
ttcggaatgacttcgtgccgcccggcgccccggggaccctgccggccgctcccccgctc	300
PheGlyAsnAspPheValProProAlaProArgGlyProLeuProAlaAlaProProVal	
gccccggagcggcagccgtcttgggaccagcccgggtgctcgtcgaccgtgcccgccca	360
AlaProGluArgGlnProSerTrpAspProSerProValSerSerThrValProAlaPro	
tccccgctgtctgctgccgcagtctcgccctccaagctccctgaggacgacgagcctccg	420
SerProLeuSerAlaAlaAlaValSerProSerLysLeuProGluAspAspGluProPro	
gccccgcctccccctcctccccggccagcgtgagccccaggcagagcccgtgtggacc	480
AlaArgProProProProProAlaSerValSerProGlnAlaGluProValTrpThr	
ccgccagccccggctcccgcgcgccccctccacccggccgcgccaagcgcaggggc	540
ProProAlaProAlaProAlaAlaProProSerThrProAlaAlaProLysArgArgGly	
tcctcgggctcagtgatgagacccttttctcttctgctgcatctgagcctgtgata	600
SerSerGlySerValGluGlnThrLeuPheAlaLeuProAlaAlaSerGlnProValIle	
cgctcctctgcagaaaatattgacttgaaggagcagccaggtaacactatctcggtggt	660
ArgSerSerAlaGluAsnMetAspLeuLysGluGlnProGlyAsnThrIleSerAleGly	

caagaggatttcccatctgtcctgcttgaaactgctgcttctcttccttctctgtctcct 720
 GlnGluAspPheProSerValLeuLeuGluThrAlaAlaSerLeuProSerLeuSerPro
hN3
 ctctcagccgcttctttcaaagaacatgaataccttggttaattgtcaacagtattacc 780
 LeuSerAlaAlaSerPheLysGluHisGluTyrLeuGlyAsnLeuSerThrValLeuPro
 actgaaggaacacttcaagaaaatgtcagtgagcttctaagaggtctcagagaaggca 840
 ThrGluGlyThrLeuGlnGluAsnValSerGluAlaSerLysGluValSerGluLysAla
 aaaactctactcatagatagagatttaacagagttttcagaattagaatactcagaaatg 900
 LysThrLeuLeuIleAspArgAspLeuThrGluPheSerGluLeuGluTyrSerGluMet
 ggatcatcgttcagtgctctccaaaagcagaatctgccgtaatagtagcaaatcctagg 960
 GlySerSerPheSerValSerProLysAlaGluSerAlaValIleValAlaAsnProArg
hN5
 gaagaaataatcgtgaaaaataaagatgaagaagagaagtttagttaataacatcctt 1020
 GluGluIleIleValLysAsnLysAspGluGluGluLysLeuValSerAsnAsnIleLeu
 cataatcaacaagagttacctacagctcttactaaattggtaaagaggatgaagttgtg 1080
 HisAsnGlnGlnGluLeuProThrAlaLeuThrLysLeuValLysGluAspGluValVal
 tcttcagaaaaagcaaaagacagttttaatgaaaagagagttgcagtggaagctcctatg 1140
 SerSerGluLysAlaLysAspSerPheAsnGluLysArgValAlaValGluAlaProMet
 agggaggaatatgcagacttcaaaccatttgagcgagtatgggaagtgaagatagtaag 1200
 ArgGluGluTyrAlaAspPheLysProPheGluArgValTrpGluValLysAspSerLys
 gaagatagtgatgatgttgctgctggaggtaaaatcgagagcaacttggaaagtaaagtg 1260
 GluAspSerAspMetLeuAlaAlaGlyGlyLysIleGluSerAsnLeuGluSerLysVal
 gataaaaaatgttttgcagatagccttgagcaactaatcacgaaaaagatagtgagagt 1320
 AspLysLys**Cys**PheAlaAspSerLeuGluGlnThrAsnHisGluLysAspSerGluSer
424
 agtaatgatgatacttctttcccagtacgccagaaggtataaaggatcgtccaggagca 1380
 SerAsnAspAspThrSerPheProSerThrProGluGlyIleLysAspArgProGlyAla
 tatatcacatgtgctccctttaaccagcagcaactgagagcattgcaacaaacattttt 1440
 TyrIleThr**Cys**AlaProPheAsnProAlaAlaThrGluSerIleAlaThrAsnIlePhe
464
 cctttgttaggagatcctacttcagaaaataagaccgatgaaaaaaaaatagaagaaaag 1500
 ProLeuLeuGlyAspProThrSerGluAsnLysThrAspGluLysLysIleGluGluLys
 aaggcccaaatagtaacagagaagaatactagcaccaaaacatcaaacccttttcttgta 1560
 LysAlaGlnIleValThrGluLysAsnThrSerThrLysThrSerAsnProPheLeuVal

gcagcacaggattctgagacagattatgtcacaacagataatttaacaaaggtgactgag 1620
AlaAlaGlnAspSerGluThrAspTyrValThrThrAspAsnLeuThrLysValThrGlu

gaagtcgtggcaaacatgcctgaaggcctgactccagatttagtacaggaagcatgtgaa 1680
GluValValAlaAsnMetProGluGlyLeuThrProAspLeuValGlnGluAla**Cys**Glu
559

agtgaattgaatgaagttactggtacaaagattgcttatgaaacaaaaatggacttggtt 1740
SerGluLeuAsnGluValThrGlythrLysIleAlaTyrGluthrLysMetAspLeuVal

caaacatcagaagttatgcaagagtcactctatcctgcagcacagctttgccatcattt 1800
GlnThrSerGluValMetGlnGluSerLeuTyrProAlaAlaGlnLeu**Cys**ProSerPhe
597

gaagagtcagaagctactcctcaccagttttgcctgacattggttatggaagcaccattg 1860
GluGluSerGluAlaThrProSerProValLeuProAspIleValMetGluAlaProLeu

aattctgcagttcctagtgctggtgcttccgtgatacagcccagctcatcaccattagaa 1920
AsnSerAlaValProSerAlaGlyAlaSerValIleGlnProSerSerSerProLeuGlu

gcttcttcagttaattatgaaagcataaaacatgagcctgaaaacccccaccatagaa 1980
AlaSerSerValAsnTyrGluSerIleLysHisGluProGluAsnProProProTyrGlu

gaggccatgagtgatcactaaaaaagtatcaggaataaaggaagaaattaaagagcct 2040
GluAlaMetSerValSerLeuLysLysValSerGlyIleLysGluGluIleLysGluPro

gaaaatattaatgcagctcttcaagaaacagaagctccttatatatctattgcatgtgat 210
GluAsnIleAsnAlaAlaLeuGlnGluThrGluAlaProTyrIleSerIleAla**Cys**Asp
699

ttaattaaagaacaaagctttctgctgaaccagctccggatttctctgattattcagaa 2160
LeuIleLysGluThrLysLeuSerAlaGluProAlaProAspPheSerAspTyrSerGlu

atggcaaaagttgaacagccagtcctgatcattctgagctagttgaagattcctcacct 2220
MetAlaLysValGluGlnProValProAspHisSerGluLeuValGluAspSerSerPro

gattctgaaccagttgacttatttagtgatgattcaatacctgacgttccacaaaaacaa 2280
AspSerGluProValAspLeuPheSerAspAspSerIleProAspValProGlnLysGln

gatgaaactgtgatgcttgtaaagaaagtctcactgagacttcatttgagtcaatgata 2340
AspGluThrValMetLeuValLysGluSerLeuthrGluThrSerPheGluSerMetIle

gaatatgaaaataaggaaaaactcagtgctttgccacctgagggaggaaagccatatttg 2400
GluTyrGluAsnLysGluLysLeuSerAlaLeuProProGluGlyGlyLysProTyrLeu

gaatcttttaagctcagtttagataacacaaaagataccctgttacctgatgaagtttca 2460
GluSerPheLysLeuSerLeuAspAsnThrLysAspThrLeuLeuProAspGluValSer

acattgagcaaaaaggagaaaattcctttgcagatggaggagctcagtactgcagtttat	2520
ThrLeuSerLysLysGluLysIleProLeuGlnMetGluGluLeuSerThrAlaValTyr	
tcaaatgatgacttatttatttctaaggaagcacagataagagaaactgaaacgttttca	2580
SerAsnAspAspLeuPheIleSerLysGluAlaGlnIleArgGluThrGluThrPheSer	
gattcatctccaattgaaattatagatgagttcctacattgatcagttctaaaactgat	2640
AspSerSerProIleGluIleIleAspGluPheProThrLeuIleSerSerLysThrAsp	
tcattttctaaattagccaggaatatactgacctagaagtatcccacaaaagtgaaatt	2700
SerPheSerLysLeuAlaArgGluTyrThrAspLeuGluValSerHisLysSerGluIle	
gctaatgccccggatggagctgggtcattgccttgacagaaattgccccatgacctttct	2760
AlaAsnAlaProAspGlyAlaGlySerLeuPro Cys ThrGluLeuProHisAspLeuSer	
	912
ttgaagaacatacaacccaaagttgaagagaaaatcagtttctcagatgacttttctaaa	2820
LeuLysAsnIleGlnProLysValGluGluLysIleSerPheSerAspAspPheSerLys	
aatgggtctgctacatcaaaggtgctcttattgcctccagatgtttctgctttggccact	2880
AsnGlySerAlaThrSerLysValLeuLeuLeuProProAspValSerAlaLeuAlaThr	
	hN5
caagcagagatagagagcatagttaaacccaaagttcttgtaagaagctgagaaaaaa	2940
GlnAlaGluIleGluSerIleValLysProLysValLeuValLysGluAlaGluLysLys	
cttccttccgatacagaaaaagaggacagatcaccatctgctatattttcagcagagctg	3000
LeuProSerAspThrGluLysGluAspArgSerProSerAlaIlePheSerAlaGluLeu	
agtaaaacttcagttggtgacctcctgtactggagagacattaagaagactggagtgggtg	3060
SerLysThrSerValValAspLeuLeuTyrTrpArgAspIleLysLysThrGlyValVal	
	Nogo66
tttgggtgccagcctattcctgctgctttcattgacagtatcagcattgtgagcgtaca	3120
PheGlyAlaSerLeuPheLeuLeuLeuSerLeuThrValPheSerIleValSerValThr	
gcctacattgccttggccctgctctctgtgaccatcagcttaggatatacaaggggtgtg	3180
AlaTyrIleAlaLeuAlaLeuLeuSerValThrIleSerPheArgIleTyrLysGlyVal	
atccaagctatccagaaatcagatgaaggccaccattcagggcatatctggaatctgaa	3240
IleGlnAlaIleGlnLysSerAspGluGlyHisProPheArgAlaTyrLeuGluSerGlu	
gttgctatatctgaggagttggttcagaagtacagtaattctgctcttggtcatgtgaac	3300
ValAlaIleSerGluGluLeuValGlnLysTyrSerAsnSerAlaLeuGlyHisValAsn	
	Nogo66
tgcagataaaaggaactcaggcgcctcttcttagttgatgatttagttgattctctgaag	3360
CysThrIleLysGluLeuArgArgLeuPheLeuValAspAspLeuValAspSerLeuLys	

tttgcagtggtgatgtgggtatttacctatggttggccttggttaatggctctgacacta PheAlaValLeuMetTrpValPheThrTyrValGlyAlaLeuPheAsnGlyLeuThrLeu	3420
ctgattttggctctcatttcactcttcagtgttcctggttatttatgaacggcatcaggcg LeuIleLeuAlaLeuIleSerLeuPheSerValProValIleTyrGluArgHisGlnAla	3480
cagatagatcattatctaggacttgcaaataagaatgtaaagatgctatggctaaaatc GlnIleAspHisTyrLeuGlyLeuAlaAsnLysAsnValLysAspAlaMetAlaLysIle	3540
caagcaaaaatccctggattgaagcgcaaagctgaatga GlnAlaLysIleProGlyLeuLysArgLysAlaGluStop	3579

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Skerra, der mir als unmittelbarer Betreuer dieser Doktorarbeit und Doktorvater stets mit konstruktiver Kritik und Anregungen zur Seite stand,

Allen Mitarbeitern und Ehemaligen des Lehrstuhls für Biologische Chemie der Technischen Universität München sowie dem Institut für Neuroimmunologie, Klinikum Grosshadern und der Abteilung von Prof. Dr. R. Huber am Max-Panck Institut für Biochemie für ihre Kollegialität und Unterstützung,

Ingrid Dzubieli und Ina Theobald, die stets zur Stelle waren, wenn ich eine helfende Hand brauchte, Sepp Danzer und Irmgard Neumeier für die technische Unterstützung,

Eva Hettich, Christine Cirl, Susanne Moessner, Kathrin Greiff und Veronica Kuscha für die wissenschaftlichen Beiträge, die im Rahmen eines Praktikums, einer Bachelorarbeit oder einer Diplomarbeit zu dieser Arbeit geleistet wurden und Markus Fiedler für seine Vorarbeit.

Dr. Uwe Jacob, der mir als Kooperationspartner jedwede Unterstützung gewährte und Dr. Constanze Breithaupt, die mir ihre Daten bezüglich des MOG/8-18C5-Komplexes zur Verfügung stellte.

Mein besonderer Dank gilt natürlich meinen langjährigen Mitstreitern Zala Lazar, Daniel Breustedt, Gilbert Haug, Jan-Peter Meyer, Dagmer Hann, Hyun Jin Kim, Martin Schlapschy, Klaus Wachinger, Ingo Korndörfer, Christian Kirchner, Amber Nasreen, Andreas Eichinger und Sven Vopel für die gemeinsame Zeit inner- und außerhalb des Labors.

Zuguterletzt danke ich Jade, Moni, meinen Schwiegereltern, meiner Schwester Christine und natürlich meiner Mutter, ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Lebenslauf

Name: Hilke Zander
Geburtsdatum: 25 Juni 1975
Geburtsort: Braunschweig

Schulbildung:

1981-1986 Besuch der Grundschule und der Orientierungstufe Lehdorf/ Braunschweig
1986-1994 Gymnasium Martino-Katharineum Braunschweig
Abschluss: Abitur

Akademische Ausbildung und beruflicher Werdegang:

ab Oktober 1994 Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
August 1997- Praktikum am Institut Curie, Paris
Juni 1998 UMR144 CNRS/IC Arbeitsgruppe Bruno Gould
"Mécanisme moléculaire du transport intracellulaire"
bis Oktober 1999 Beendigung des Studiums, Diplomhauptprüfung in den Fächern Biochemie, Immunologie, Molekularbiologie und Diplomarbeit bei Prof. Tampé am Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried und am Institut für Physiologische Chemie, Marburg
Abschluss: Diplom-Humanbiologin
Oktober 1999- Beschäftigung im Rahmen des Graduiertenkollegs
Februar 2000 "Protein Function at Atomic Level" bei Prof. Tampé am Institut für Physiologische Chemie, Marburg
Februar 2000- Externe Doktorarbeit am Institut für Neuroimmunologie,
Mai 2001 Klinikum Grosshadern, unter der Betreuung von Prof. Skerra, Institut für Biologische Chemie, TU München, Weihenstephan
Mai 2001- Fortsetzung der Doktorarbeit am Institut für Biologische
Mai 2004 Chemie, TU München
Januar 2006- Departmental Technician am University College London,
Mai 2006 Institute of Neurology, Laboratory of Neurodegenerative Diseases, Arbeitsgruppe Elizabeth Fisher
ab Mai 2008 Wissenschaftliche Angestellte am Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Abteilung Allgemeine Chirurgie.

Publikationen:

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Breithaupt, C., Schubart, A., Zander, H., Skerra, A., Huber, R., Linington, C. und Jacob. U. (2003) Structural insights into the antigenicity of myelin oligodendrocyte glycoprotein *Proc Natl Acad Science* **100**, 9446-9451.

Zander, H., Hettich, E., Greiff, K., Chatwell, L. und Skerra, A. (2007) Biochemical characterization of the recombinant human Nogo-A ectodomain *FEBS J* **274**, 2603-2613.

Zander, H., Reineke, U., Schneider-Mergener, J. und Skerra, A. Epitope mapping of the neuronal growth inhibitor Nogo-A for the Nogo receptor and the cognate monoclonal antibody IN-1 by means of the SPOT technique. *J Mol Recognit* **20**, 185-96.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit am Institut für Neuroimmunologie, Klinikum Grosshadern, LMU München bzw. am Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. A. Skerra ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 (Promotionsordnung) angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Hilke Zander

Hamburg, 03. Juni 2008