

Charakterisierung der Eigenschaften des *Mycoplasma arthritidis* Superantigens

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen
Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Chemiker
Markus Diedershagen
aus Duisburg

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Lothar Rink
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Hanno Baumann

Tag der mündlichen Prüfung: 2. September 2005

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

Anfang der Weisheit ist die Gottesfurcht (Jesus Sirach, 1,14).

*Sie ist der Widerschein des ewigen Lichts,
der ungetrübte Spiegel von Gottes Kraft,
das Bild seiner Vollkommenheit (Das Buch der Weisheit, 7, 26).*

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 MYCOPLASMEN	1
1.1.1 <i>Mycoplasma arthritidis</i>	2
1.2 SUPERANTIGENE	3
1.2.1 Biologische und pathophysiologische Effekte	6
1.2.2 Struktur	8
1.2.3 Superantigenpräsentation durch MHC-Klasse-II-Moleküle	11
1.2.4 Superantigen-Interaktionen mit dem T-Zell-Rezeptor	12
1.3 DAS <i>MYCOPLASMA ARTHRITIDIS</i> SUPERANTIGEN	13
2 ZIELSETZUNG	17
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 MATERIAL	18
3.1.1 Geräte	18
3.1.2 Laborbedarf	20
3.1.3 Kulturmedien und –zusätze	21
3.1.4 Zelllinien, Bakterien und Plasmide	21
3.1.4.1 Zelllinien	21
3.1.4.2 Bakterien	21
3.1.4.3 Plasmide	22
3.1.5 Immunologische Reagenzien	22
3.1.6 Sonstige Reagenzien	23
3.1.7 Enzyme	24
3.1.8 Testkits	24
3.2 METHODEN	24
3.2.1 Molekularbiologische Arbeiten	25
3.2.1.1 Anzucht von Bakterien	25
3.2.1.2 Glycerinkulturen	25
3.2.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien	25
3.2.1.4 Transformation kompetenter Bakterien	25
3.2.1.4 Mini-Präparation von Plasmid-DNA	26
3.2.1.5 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	26
3.2.1.6 Fällung und Aufarbeitung der Plasmid-DNA	26
3.2.1.7 Bestimmung der DNA-Konzentration	26
3.2.1.8 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
3.2.1.9 Ligation	28
3.2.1.10 Agarose-Gelelektrophorese	28
3.2.1.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
3.2.1.12 Abtrennung kleiner DNA-Fragmente vom Vektor durch Mikrozentrifugation	30
3.2.1.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
3.2.1.14 Durchtesten der Bakterien (A Multiplex Polymerase Chain Reaction Colony Miniprep, Hawker und Billadello, 1993)	33
3.2.1.15 Konstruktion des MAM-GFP- (Grün-Fluoreszierendes Protein) Fusionsproteins durch Überlappungs-Extension bei Verwendung der PCR	34
3.2.1.16 Aufarbeitung der Produkte aus der gerichteten Mutagenese ..	34
3.2.1.17 Aufarbeitung der Produkte aus der Konstruktion des MAM- GFP- (Grün-Fluoreszierendes Protein) Fusionsproteins	35

3.2.1.18 PCR-Produkte des Kolonie-Screenings	35
3.2.1.19 Herstellung der rekombinanten MAM-Proteine (wt und Mutanten)	35
3.2.1.20 Klonierung in den Vektor pMALc2.....	35
3.2.1.21 Klonierung in den Vektor pGEX-4T-1	36
3.2.2 Biochemische / Immunchemische Methoden	36
3.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	36
3.2.2.2 Elektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.2.2.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	36
3.2.2.4 Western Blot	37
3.2.2.4.1 Elektrophoretischer Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen	38
3.2.2.4.2 Immunfärbung der geblotteten Proteine	38
3.2.3 Aufreinigung des rMAM	39
3.2.3.1 pMAL-Expression-and-Purification-System	39
3.2.3.1.1 Anzucht der Bakterien und Herstellung des Zell-Lysates .	39
3.2.3.1.2 Affinitätschromatographie	40
3.2.3.1.3 Proteolyse des Fusionsproteins	40
3.2.3.1.4 Gelfiltration.....	41
3.2.3.2 pGEX-4T-1	41
3.2.3.2.1 Anzucht der Bakterien und Herstellung des Zell-Lysates .	41
3.2.3.2.2 Affinitätschromatographie und Elution des rMAM.....	42
3.2.3.2.3 Elution des GST-MAM-Fusionsproteins	43
3.2.3.3 Gelfiltration.....	43
3.2.4 Arbeiten mit Zellen.....	43
3.2.4.1 Analyse der V β -Spezifität	43
3.2.4.2 Durchfluscytometrie.....	44
3.2.5 Präsentation von SEA und MAM durch CD-1-positive Zellen.....	46
3.2.6 Vitalitätstests.....	47
3.2.7 Test auf Protease-Aktivität von MAM	47
3.2.8 Test auf DNase-Aktivität von MAM	48
4 ERGEBNISSE	50
4.1 KLONIERUNG DES MAM-GENS.....	50
4.1.1 Klonierung des MAM-GENS in den Expressionsvektor pMalc2.....	51
4.1.2 Affinitätschromatographie	52
4.1.3 Gelfiltration von rMAM	52
4.1.4 Klonierung des MAM-GENS in den Expressionsvektor pGEX-4T-1	53
4.1.5 Transformation von <i>E. coli</i> - (DH5 α ; BL21; SG13009; M15) Stämmen mit dem rekombinanten Plasmid pGEX-4T-1	54
4.1.6 Expression und Reinigung des rekombinanten MAM.....	54
4.2 GERICHTETE MUTAGENESE.....	61
4.2.1 Herstellung der MAM-Mutanten	61
4.2.2 Expression der MAM-Mutanten in <i>E. coli</i> BL21	65
4.3 EINFLUSS DER MAM-EXPRESSION AUF DIE VITALITÄT VON <i>E. COLI</i>	67
4.4 ÜBERPRÜFUNG DER AKTIVITÄT DER MAM-MUTANTEN IM V β -ASSAY...	70
4.5 ÜBERPRÜFUNG DER BINDUNG VON MAM/MAM-MUTANTEN AN MHC-II-POSITIVE ZELLEN IM DURCHFLUSSCYTOMETER	73
4.6 GENERIERUNG DES MAM-GFP (GRÜN-FLUORESZIERENDES PROTEIN) – FUSIONSPROTEINS DURCH ÜBERLAPPUNGS-EXTENSION MIT HILFE DER PCR	77

4.7 SUPERANTIGEN-PRÄSENTATION DURCH CD1-MOLEKÜLE	81
4.8 TEST AUF PROTEASE-AKTIVITÄT VON MAM.....	83
4.9 TEST AUF DNASE-AKTIVITÄT VON MAM	84
5 DISKUSSION.....	86
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	97
7 ANHÄNGE	98
7.1 ANHANG I	98
7.1.1 Optimierte Nukleotidsequenz des <i>Mycoplasma arthritidis</i> Superantigens-Gens.....	98
7.2 ANHANG II.....	99
7.2.1 Gelfotos der Mutanten E28A/Q, E30A/Q, D31A/N, E39AQ, E40A/Q und E43A/Q	99
7.3 ANHANG III.....	102
7.3.1 Sequenzierungsdaten	102
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	110
9 LITERATURVERZEICHNIS.....	113
11 DANKSAGUNG.....	148
12 LEBENSLAUF.....	149

1 Einleitung

1.1 Mycoplasmen

Die Mycoplasmen sind die kleinsten, sich selbst replizierenden Organismen. Phänotypisch werden sie aufgrund ihrer geringen Größe und der fehlenden Zellwand von anderen Bakterien unterschieden (Razin 1978). Bedingt durch die geringe Anzahl von Genen für den Stoffwechsel sind Mycoplasmen äußerst schwer *in vitro* zu kultivieren. Bei *Mycoplasma genitalium* und *M. pneumoniae* fehlen z. B. die Gene für die Aminosäuresynthese (Himmelreich et al., 1997). So gelang 1898 erstmals Nocard und Roux die zellfreie Kultivierung des Erregers der Rinder-Pleuropneumoniae, heute als *Mycoplasma mycoides ssp. mycoides* bekannt (Nocard et al., 1898). Edward und Freundt führten 1956 die Ordnung der Mycoplasmatales, die Familie Mycoplasmataceae mit der einzigen Gattung *Mycoplasma* ein (Freundt et al., 1956). Seit 1967 werden die Mycoplasmen der Klasse Mollicutes (lat. Mollis = weich und Cutis = Haut) zugeordnet.

Heute sind ca.180 Mycoplasmenspezies bekannt. Mycoplasmen sind als Parasiten weit verbreitet und zu ihren Wirten zählen unterschiedliche Organismen wie Mensch, andere Säugetiere, Reptilien, Fische, Arthropoden und Pflanzen (Razin 1985). Zur physiologischen Schleimhautflora des Menschen gehören nichtpathogene Arten wie *M. salivarium* und *M. orale*.

Als Pathogen für den Menschen verursachen Mycoplasmen z. B. die Eatonsche Pneumonie, Urethritis, Prostatitis und Colpitis (Chanock et al., 1962; Mc Cormack et al., 1973).

Des Weiteren wird *M. hominis* mit Aborten in Verbindung gebracht. Ein Zusammenhang zwischen rheumatoider Arthritis und der Infektion mit *M. arthritidis*, *M. fermentans* und *M. hominis* wird von verschiedenen Arbeitsgruppen berichtet (Jansson et al., 1971; Mardh et al., 1973). Bei Vorliegen einer HIV-Infektion werden verschiedene Mycoplasmen wie *M. fermentans*, *M. penetrans* und *M. pirum* für die Ausbildung von AIDS diskutiert (Lo et al., 1991; Blanchard et al., 1994; Montagnier et al., 1993). Ergebnisse von Tsai et al., legen auch ein oncogenes Potential von *M. fermentans* und *M. penetrans* nahe (Tsai et al., 1995).

1.1.1 *Mycoplasma arthritidis*

Aufgrund von 16S-rRNA Analysen wird *Mycoplasma arthritidis* in die *hominis* Gruppe eingeordnet (Maniloff 1992).

Experimentell kann eine Polyarthrititis bei Ratten durch *M. arthritidis* ausgelöst werden. Die molekularen Mechanismen dienen als Modell für die rheumatoide Arthritis des Menschen (Cole et al., 1975). Auch bei wildlebenden Nagetieren konnte eine natürliche Infektion nachgewiesen werden (Koshimizu et al., 1993). Voraussetzung für die Virulenz ist ein intaktes Hauptoberflächenantigen P47, dessen spontane Mutation (P67) zu dem avirulenten Stamm 158-1 führt (Tu et al., 2005).

Auffallend ist der unterschiedliche Verlauf der Erkrankung in Mäusen, Ratten, und Kaninchen durch *M. arthritidis* (Cole et al., 1985 b). In Kaninchen reagieren die Lymphocyten nicht auf das *Mycoplasma arthritidis* Superantigen MAM (*Mycoplasma arthritidis*-derived Mitogen), sondern die Krankheit kann nur durch direkte Injektion lebender Organismen in die Gelenke erzeugt werden.

Die akute Arthritis in Mäusen ist ein infektiöser Prozess nach systemischer Injektion von virulenten *M. arthritidis*. Der Prozess hängt nicht vom Superantigen MAM ab. Während Ratten sich teilweise nach 6-8 Wochen erholen, zeigen Mäuse eine stärker chronische Phase der Krankheit. Die auftretenden Gelenkläsionen ähneln stark denen, die bei der humanen rheumatoiden Arthritis auftreten. Diese sind charakterisiert durch massive Infiltration von Lymphocyten und Plasmazellen ins Synovium. Die gleichzeitige Proliferation der synovialen Membran, mit der Produktion von vielen Villi und der Pannus-Ausbildung führen zur Zerstörung des Knorpels und der Knochen (Cole et al., 1971).

Der chronische Krankheitsverlauf kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, das MAM präexistierende autoreaktive T-Zellen aktiviert. Ein weiterer Erklärungsversuch baut auf der Fähigkeit von MAM auf, das dieses eine "Superantigenbrücke" zwischen T_H-Zellen und ruhenden B-Zellen bildet. Daraus resultiert eine polyklonale B-Zellaktivierung (Tumang et al., 1990). Es wurde postuliert, dass diese abnorme T/B-Zell-Kollaboration zu der Bildung von Autoantikörpern führen könnte, welche sich gegen repetitive Antigensequenzen oder gegen multivalente Oberflächenantigene richten. Einige Hinweise begründen den Verdacht, das *Mycoplasma arthritidis* und sein Superantigen auch für die humane rheumatoide Arthritis verantwortlich sind. So konnten Mycoplasmen aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis isoliert werden (March et al., 1973). Ebenso konnten in serologischen Untersuchungen von Patienten mit rheumatoider

Arthritis (RA) anti-*Mycoplasma arthritidis* Antikörper nachgewiesen werden (Jansson et al., 1975). Die Ergebnisse einer neueren Arbeit unterstützen diese Hypothese. Dort waren die Mengen an Antikörper gegen MAM in Seren von RA-Patienten deutlich erhöht gegenüber Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen oder im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen. Aus der selektiv erhöhten Antikörper-Menge lässt sich eine Beteiligung von MAM oder einem MAM-ähnlichen Molekül an der humanen rheumatoiden Arthritis schließen (Sawitzke et al., 2000).

1.2 Superantigene

Einige Viren und verschiedene gram-positive als auch gram-negative Bakterien produzieren eine Klasse von Protein-Toxinen, welche als Superantigene (SAG) bezeichnet werden. Diese Superantigene verursachen eine massive T-Zell-Aktivierung. Zuerst wurde ihr neuer Wirkmechanismus durch Pionierarbeiten von Fleischer und Schrezenmeier (1988) sowie White et al. 1989 aufgrund von Arbeiten mit Staphylokokken Enterotoxinen beschrieben. Der Name Superantigen (SAG) wurde ihnen dann von Marrack und Kappler verliehen (Marrack und Kappler 1990). Im Gegensatz zu konventionellen Antigenen werden die Superantigene nicht prozessiert, sondern binden als intakte Moleküle außerhalb der Antigenbindungsgrube am Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II-Molekül (engl.: major histocompatibility complex, MHC) (Florquin und Aaldering 1997). Zusätzlich binden die Superantigene über das V β -Element des T-Zell-Rezeptors (TCR) an die T-Zelle. Das Superantigen verbindet so den MHC-II-Komplex der antigenpräsentierenden Zelle mit dem T-Zell-Rezeptor der T-Zelle.

Hieraus resultiert eine massive (oligoklonale) Aktivierung von jeder T-Zelle, die das passende V β -Element im T-Zell-Rezeptors exprimiert. Die Anzahl von verschiedenen V β -Regionen im humanen T-Zell Repertoire ist auf ungefähr 50 beschränkt, diese Gruppe umfasst 24 Haupttypen von V β -Elementen. Superantigene können bis zu 20% aller T-Zellen aktivieren, während ein konventionelles Peptidantigen nur eine von 10^5 - 10^6 naiven T-Zellen aktiviert (Herman et. al 1991). Dies führt zu einer starken Freisetzung von pro-inflammatorischen Cytokinen wie dem Tumornekrosefaktor - α (TNF- α) und Interleukin (IL)-1 β , Interferon- γ (IFN- γ) und T-Zellmediatoren wie IL-2 (Jupin et al. 1988; Fast et al.1989). Ebenso wurde in humanen Monocyten eine Hochregulierung der Expression des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4) beobachtet (Hopkins et al., 2005). Ein weiteres Charakteristikum der Superantigene ist ihre Fähigkeit, die bei einem konventionellen Antigen vorherrschende Selbstrestriktion aufzuheben, und darüber hinaus die CD4/CD8-

Restriktion zu umgehen (Matthes et al. 1988; Hermann et al. 1990; Leder et al. 1998; Proft und Fraser 1998).

Die Ergebnisse zahlreicher Arbeiten weisen daraufhin, dass es neben den MHC-II-Molekülen noch andere Bindungspartner geben muss, da Superantigene auch in Abwesenheit von MHC-II-Molekülen in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren (Herrmann et al. 1991; Avery et al. 1994; Beharka et al. 1994; Lamphear et al. 1998). So beschreibt Häffner (Häffner et al., 1996) die Möglichkeit der Superantigen-Präsentation durch MHC-I-Moleküle. Ebenso soll die Vernetzung durch Staphylokokken Enterotoxin A, das an MHC-I gebunden ist, für die TNF- α Sekretion verantwortlich sein (Wright und Chaps 1999). Eine weitere Gruppe von Interaktionspartnern der Superantigene stellen CD1-Moleküle da (Gregory et al. 2000). Bei den CD1-Molekülen handelt es sich um Glykoproteine, die eine gewisse Ähnlichkeit mit den MHC-I-Molekülen besitzen. Ebenso wie MHC-I-Moleküle sind die CD1-Moleküle nicht-kovalent mit der β 2-Mikroglobulin-Kette verknüpft und haben die Aufgabe Lipid-Antigene zu präsentieren (Dutronec und Porcelli 2002).

Bisher wurden 46 Superantigene in der Literatur beschrieben (Proft und Fraser 2003; Omoe et al., 2003; Letertre et al., 2003). Den Prototyp der bakteriellen Superantigene aus gram-positiven Bakterien bilden die Toxine aus *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes*. Die ersten Superantigene wurden bereits in den frühen sechziger Jahren aus *Staphylococcus aureus* isoliert und als Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) bzw. B (SEB) bezeichnet (Casman 1958, Casman et al. 1963). Aus *S. aureus* wurden bisher die Enterotoxine A, B, C₁₋₃, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q und U charakterisiert. Zu dieser Gruppe zählt ebenfalls das von *S. aureus* produzierte Toxische Schock Syndrom-Toxin 1 (TSST-1) (Marrack et al., 1990; Fleischer 1994; Svensson et al., 1997; Munson et al., 1998; Monday und Bohach 1999; Ren et al., 1994; Su und Wong, 1995; Dinges et al., 2000; Orwin et al., 2001; McCormick et al., 2001; Yarwood et al., 2002; Jarraud et al., 2001, 2002; Omoe et al., 2003; Letertre et al., 2003).

Insgesamt 12 Superantigene wurden in *Streptococcus pyogenes* identifiziert. Zu ihnen zählen die Exotoxine SPE-A₁₋₅; SPE-C; SPE-G,-H,-J; SPE-L; SPE-M; die *Streptococcus pyogenes* mitogenen Exotoxine (SMEZ₁₋₂₄) und das *Streptococcus pyogenes* Superantigen (SSA) (Weeks et al., 1984; Goshom et al., 1989; Mollick et al., 1993; Reda et al., 1994; Kamezawa et al., 1997; Proft et al., 1999; Proft et al., 2000; Arcus et al., 2000; Ferretti et al., 2001; Smoot et al., 2002; Proft et al., 2004). Dagegen haben sich zwei der ursprünglich als Superantigene beschriebenen Proteine als Cystein-Protease (SPE-B, (Norgren und Eriksson 1997; Alouf et al., 1999) und als Streptokokken DNase erwiesen (SPE-F, auch als

Mitogener Faktor MF bezeichnet, Yutsudo et al., 1992; Norrby-Teglund et al., 1994). Die zuvor beschriebene Superantigenwirkung ist auf Kontaminationen mit kleinen Mengen verschiedener anderer Superantigene wie z. B. SMEZ oder SPE-C zurückzuführen (Gerlach et al., 2001). Gleichsam wurde die zuvor behauptete Superantigenwirkung der exfoliativen Toxine A und B (ETA, ETB) aus *S. aureus* widerlegt. Es handelt sich bei ihnen um Trypsin-Proteasen (Plano et al., 2000).

Aus *Clostridium perfringens* wurde das Superantigen *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPET) identifiziert (Bowness et al., 1992). In jüngster Zeit wurden weitere Superantigen-Produzenten gefunden, welche zu den sog. Nicht-Gruppe A Streptokokken Superantigenen gehören. Diese wurden in zwei unterschiedlichen Gruppe C Streptokokken gefunden. *Streptococcus equi* produziert die pyrogenen Exotoxine (SePE) H, I, L und M (Proft et al., 2003; Artiushin et al., 2003). Von *Streptococcus dysgalactiae* werden zwei weitere Superantigene produziert, welche als SDM (*Streptococcus dysgalactiae* derived mitogen) und als SPE-G^{dys} bezeichnet werden (Sachse et al., 2002; Miyoshi-Akiyama et al., 2003). Darüber hinaus wurden bisher zwei Superantigene in nicht-gram-positiven Bakterien entdeckt. Die von *Yersinia pseudotuberculosis* produzierten *Yersinia pseudotuberculosis* Mitogene a, b und c (YPMa, YPMb, YPMc), (Abe et al., 1993; Ito et al., 1995) und das von *Mycoplasma arthritidis* produzierte *Mycoplasma arthritidis* Mitogen (MAM) (Cole et al., 1982; Kirchner et al., 1984; Cole et al., 1986). Die molare Masse der Superantigene liegt im Bereich von 14,5 kD im Fall des *Yersinia pseudotuberculosis* Mitogens a (YPMa) (Ito et al. 1995) bis hin zu 28,5 kD bei dem Staphylokokken Enterotoxin J (SEJ). Das kleinste Superantigen, YPM, umfasst 119 Aminosäurereste (Donadini et al. 2004) und das größte, SEJ, 268 Reste (Zhang et al. 1998).

Sogar ein pflanzliches Superantigen wird in der Literatur beschrieben. So soll das *Urtica dioica* Agglutinin (UDA), ein Lektin aus einer Stechnessel, in der Lage sein, Maus-T-Zellen zu aktivieren (Saul et al., 2000). Eine weitere, sehr bedeutsame Gruppe von Superantigenproduzenten stellen die Viren da. Das erste aus einem Virus beschriebene Superantigen ist das des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV). Es wurde zuerst von Festenstein 1974 entdeckt und als Minor Lymphocyten stimulierendes (MIs) Antigen bezeichnet. Ebenso wie bei den bakteriellen SAG erfolgt die T-Zell Antwort nur bei bestimmten T-Zell-Rezeptor (TCR) -V β Elementen (Festenstein und Kimara 1988). Das kodierende Gen zeigt keinerlei Homologie zu Genen von bakteriellen Superantigenen. Beim Genprodukt handelt es sich um ein 45 kDa Typ II Transmembran-Protein (Acha und Mac Donald 1995).

Von Sutkowski et al., (1996) wurde auch dem Epstein-Barr Virus eine Superantigenaktivität zugeschrieben. Jedoch konnte trotz intensiver Suche kein EBV-Gen gefunden werden, welches ein Superantigen kodiert. Vielmehr zeigte die gleiche Arbeitsgruppe später, dass das Epstein-Bar Virus das humane endogene Retrovirus HERV-K18 aktiviert, welches ein Superantigen kodiert (Sutkowski et al., 2001; Sutkowski et al., 2004). Im Thymus bewirkt die Expression des HERV-K18 Superantigens die negative Selektion von V β 7 Thymocyten (Meylan et al., 2005). Die immunologischen Störungen während des Verlaufs einer HIV ("Human Immundeficiency Virus") Infektion legen den Verdacht nahe, dass auch HIV ein Superantigen kodiert (Laurence et al., 1992). Das entsprechende Superantigen muss jedoch noch identifiziert werden, da das zuvor beschriebene Nef (negative factor) ausscheidet (Lapatschick et al., 2001). Das Nukleokapsid Protein des Tollwut-Virus (Rabies Virus) wird ebenfalls aufgrund seiner V β -spezifischen T-Zell-Aktivierung als Superantigen diskutiert. (Lafon et al., 1992). Potentiell soll auch das Zytomegalievirus ein Superantigen kodieren (Dobrescu et al., 1995).

1.2.1 Biologische und pathophysiologische Effekte

Die exzessive Aktivierung des Immunsystems durch Superantigene beinhaltet akute Folgen und Langzeiteffekte. Zu den akuten Effekten gehören die Lebensmittelvergiftung und das Toxische Schock Syndrom.

Staphylokokken Lebensmittelvergiftung:

Die Staphylokokken Enterotoxine A-E und G-J sind potente Magen-Darm-Trakt Toxine und verantwortlich für eine Form der Lebensmittelvergiftung (Alber et al., 1990). Hier beträgt die Inkubationszeit 4h und neben Erbrechen treten weitere Symptome auf wie Bauchschmerzen und Durchfall. Bereits Mengen, die geringer sind als 1 μ g reichen aus, um die Symptome auszulösen (Balaban und Rasooly 2000).

Toxisches Schock-Syndrom:

Das durch *S. aureus* verursachte Toxische Schock-Syndrom wird durch folgende Symptome charakterisiert: Hohes Fieber, Hypotension, neurologische Fehlfunktionen, Multiorgan-Versagen und Schock. Ebenso wie der endotoxische Schock wird dieser durch TNF- α vermittelt (Mc Cormick et al., 2001).

Weitere Krankheiten, die in Verbindung mit Superantigenen genannt werden können, sind das Streptokokken Toxische Schock Syndrom (STSS) (Stevens et al., 1992), das Streptokokken Scharlachfieber (Reichard et al., 1992), und akutes rheumatisches Fieber (ARF) (Smoot et al., 2002).

Chronische Effekte und Autoimmunkrankheiten (AIK) durch Superantigene:

Kawasaki disease (KD)

Beim Kawasaki disease (KD) handelt es sich um eine systemische Vaskulitis, die meist vor dem 5. Lebensjahr auftritt. Eine Expansion von $V\beta 2$ -T-Zellen weist auf eine Superantigenbeteiligung hin (Leung et al., 1995; Yoshioka et al., 2003).

Multiple Sklerose (MS)

Multiple Sklerose (MS), eine Autoimmun-Erkrankung des Zentralnervensystems wird aufgrund von Ergebnissen aus Tierversuchen in Verbindung mit Superantigenen gebracht (Zamvil und Steinman 1990; Racke et al., 1994).

Rheumatoide Arthritis:

Neben anderen Versuchen belegen Studien mit $V\beta 14^+$ -T-Zellen aus Patienten mit rheumatoider Arthritis eine Verbindung zu Superantigenen (Paliard et al., 1991; Kraft et al., 1998).

Psoriasis:

Bei der Psoriasis handelt es sich um eine häufige Hautkrankheit mit multifaktorieller Auslösung. Es wird bei Patienten eine erhöhte Anzahl an $V\beta 2$ - und $V\beta 5.1$ -T-Zellen gefunden. Aus psoriatischen Läsionen wurden T-Zellen isoliert, welche spezifisch für Gruppe A- Streptokokken-Superantigene sind (Valdimarsson et al., 1995).

Diabetes:

Der insulin-abhängige Diabetes Mellitus (IDDM) ist eine Autoimmunerkrankung, in deren Verlauf pankreatische β -Zellen zerstört werden. Ein endogener Retrovirus scheint die $V\beta 7^+$ Zellen zu aktivieren, welche den Pankreas zerstören (Conrad et al., 1994; Conrad et al., 1997; Marguerat et al., 2004).

Atopische Dermatitis (AD):

Die Atopische Dermatitis ist eine chronisch wiederkehrende Hauterkrankung, die durch Juckreiz und Hautläsionen charakterisiert wird. Auffällig ist die Empfänglichkeit von Patienten mit AD für die Kolonisation und Infektion mit *Staphylococcus aureus*. In mehr als der Hälfte von AD-Patienten konnten Superantigene wie SEA; SEB; und TSST-1 aus isolierten *S. aureus* Stämmen nachgewiesen werden (Yarwood et al., 2000; Sohn et al., 2003).

Bemerkenswerterweise können zwei Superantigene, das TSST-1 und SEB, die Mucosa überwinden (Hamad et al., 1997; Schlievert et al., 2000). Ein wichtiger Aspekt liegt in der unterschiedlichen Empfänglichkeit der Individuen für bestimmte Superantigene, begründet in der Abhängigkeit von den HLA-Allelen (Thibodeu et al., 1994; Alvarez-Ossorio et al., 1997; Norrby-Teglund et al., 2002; Llewelyn et al., 2004). Darüber hinaus wird eine

Abhängigkeit der Superantigen-Expression vom Gewebe postuliert, welches von den verschiedenen Mikroben besiedelt wird (Banks et al., 2003). Aus den bisher gewonnenen Fakten ergibt sich die Frage nach dem Nutzen der SAG für die Pathogene. Das Ziel der Bakterien scheint darin zu liegen, die direkte Erkennung durch das Immunsystem zu vermeiden. Nach Stimulation von Mäusen mit SEB und der daraus resultierenden Expansion von V β 8-T-Zellen werden anschließend in der Peripherie V β 8⁺-T-Zellen deletiert. Die deletierten T-Zellen können dann nicht mehr die B-Zellen im Kampf gegen die Bakterien unterstützen (Kawabe et al., 1991). Darüber hinaus werden naive T-Zellen nach massiver Aktivierung durch Superantigene anerg und fehlen so dem Immunsystem (Kawabe et al., 1990; Watson et al., 2003). Zellen, die über MHC Klasse II-Moleküle Staphylokokken Enterotoxine an T-Zellen präsentieren, werden schnell und selektiv durch cytotoxische T-Zellen eliminiert (Dohlsten et al., 1991; Goodyear und Silverman 2003, 2005).

1.2.2 Struktur

Bis heute wurden 14 Kristallstrukturen von Superantigenen veröffentlicht. Die erste Kristallstruktur die veröffentlicht wurde, war die von **SEB** (Swaminathan et al., 1992). Aus *Staphylococcus aureus* gelang dann später die Kristallisation weiterer Superantigene: **SEA** (Schad et al., 1995; Sundström et al., 1996), **SEB** (Papagerogiou et al., 1998); **SEC2** (Papageorgiou et al., 1995; Kumaran et al., 2001); **SEC3** (Fields et al., 1996); **SED** (Sundström et al., 1996); **SEH** (Hakansson et al., 2000), **TSST-1** (Prasad et al., 1993; Acharya et al., 1994; Papagerogiou et al., 1996). Auch von Superantigenen aus *Streptococcus pyogenes* konnten Kristallstrukturen veröffentlicht werden: **SPE-C** (Roussel et al., 1997); **SPE-A** (Papagerogiou et al., 1999; Baker et al., 2001; Baker et al., 2004); **SSA** (Sundberg und Jardetzky 1999); **SPE-H** und **SMEZ-2** (Arcus et al., 2000); **SPE-J** (Proft et al., 2004). Ferner konnten in jüngster Zeit auch Superantigene aus nicht-gram-positiven Bakterien kristallisiert werden. So wurde aus *Yersinia pseudotuberculosis* **YPMa** (Donadini et al., 2004) dargestellt und aus *Mycoplasma arthritidis* das **MAM** (Zhao et al., 2004) kristallisiert.

Aufgrund von Strukturuntersuchungen lassen sich die Superantigene in Familien und Gruppen einteilen. Die Superantigene aus Staphylokokken und Streptokokken bilden z. B. eine große Familie. Diese lässt sich nach dem Grad der Homologie in Untergruppen einteilen: Zur Gruppe A gehören SPE-C, SPE-G, SPE-J und SMEZ. In der Gruppe B befinden sich SEB, SEC₁₋₃, SEG, SPE-A und SSA. Diese zeigen 50-70% Sequenzhomologie. Mit einer Sequenzhomologie von 80-90% bilden SEA, SED, SEE,

SEH und SEJ die Gruppe C. Dagegen zeigen z. B. SEB und SEK nur 16% Homologie. Gruppe D besteht aus SEI, SPE-I und SePE-I. Die Superantigene SPE-H und SePE-H rechnet man zur Gruppe E. Außerhalb dieser Gruppen befindet sich das TSST-1, welches nur 28% Homologie zu den anderen Superantigenen zeigt. TSST-1 besitzt die größte Ähnlichkeit mit SPE-C (Papageorgiou und Acharya 2000; Proft et al., 2003). Die Superantigene aus *Streptococcus equi* sind ihren Gegenstücken aus *Streptococcus pyogenes* noch stärker ähnlich. Bei ihnen sind die Sequenzen zu mehr als 98% homolog (Proft et al., 2003). Auch die Superantigene aus *S. dysgalactiae* SDM und SPE-G^{dys} sind zu SPE-M bzw. SPE-G aus *S. pyogenes* am stärksten homolog (Sachse et al., 2002).

YPMa aus *Yersinia pseudotuberculosis* unterscheidet sich von den bisher bekannten Superantigenen. Strukturell ist es zu den viralen Kapsid-Proteinen und zu den Mitgliedern der Tumor Nekrose Faktor–Superfamilie verwandt (Donadini et al., 2004). Auch das *Mycoplasma arthritidis* Superantigen zeigt keine bedeutende Homologie zu den bisher charakterisierten Superantigenen (Cole et al., 1996). MAM besitzt die sieben Reste umfassende Hülsenfrüchte-Lektin β -Konsensus-Sequenz (Cole et al., 1996). In der N-terminalen Domäne besitzt MAM das vier- α -helicale Bündel, das ähnlich zu anderen vier-helicalen Proteinen ist. Größte Ähnlichkeit teilt das vier-helicale Bündel aus MAM mit dem Bakterienrhodopsin und mit der L-Aspartat-Ammonium-Lyase aus *E.coli* (Zhao et al., 2004). Strukturvergleiche zeigen, dass alle bisher aus gram-positiven Bakterien isolierten Superantigene eine konservierte zwei Domänen Architektur besitzen. Die amino-terminale Domäne besteht aus einem konkaven β -barrel. Diese Domäne ist durch verschiedene hydrophobe Reste charakterisiert, die dem Lösungsmittel zugewandt sind. Sie besitzt beträchtliche Ähnlichkeit mit dem sog. Oligosaccharide/Oligonucleotide-binding fold (OB-fold). Im Zentrum befindet sich eine lange α -Helix, die ebenfalls dem Lösungsmittel zugänglich ist. Durch ein viersträngiges β -Faltblatt wird die C-terminale Domäne gebildet. Von den Strukturmerkmalen ähnelt diese dem β -grasp-Motiv (Papageorgiou und Acharya 1997).

Viele der klassischen Superantigene aus *S. aureus* wie die Staphylokokken Enterotoxine A,B,C₁₋₃, D, E und die Enterotoxine G-Q sowie die Superantigene aus *S. pyogenes* SPE-A und SSA besitzen in der N-terminalen Domäne eine flexible Schleife aus einer Disulfidbrücke (Ren et al., 1994; Yarwood et al., 1994; Lu und Wong 1995; Svensson et al., 1997; Munson et al., 1998; Monday und Bohach 1999; Dinges et al., 2000; Orwin et al., 2001; MC Cormick et al., 2001 a,b). Dagegen benötigen SEI, TSST-1, SMEZ, und SPE-C keine Disulfidbrücke zum Aufbau der intakten Domäne (Lavoie et al., 1999). SPE-H aus *S. pyogenes* bildet trotz vorhandener Cysteinreste keine Disulfidbrücke (Arcus et al., 2000).

Auch das jüngst entdeckte SDM aus *S. dysgalactiae* besitzt zwar Cysteinreste, bildet aber keine intramolekulare Disulfidbrücke aus (Miyoshi-Akiyama et al., 2003). Die beiden Vertreter nicht-gram-positiver Bakterien MAM und YPM unterscheiden sich auch in Bezug auf Disulfidbrücken von den anderen Superantigenen. Da dem MAM Cysteinreste fehlen, kann es keine Disulfidbrücken bilden und aufgrund des hohen Anteils an α -Helices besitzt es auch eine andere Proteinfaltung (Cole et al., 1996; Zhao et al., 2004). Zwar besitzt das YPMa Cysteinreste, diese befinden sich jedoch am C-Terminus und die Disulfidbrücke wird dort gebildet. Auch die Proteinfaltung unterscheidet sich bei YPM grundsätzlich von den anderen Superantigenen. YPMa nimmt eine „jelly-roll“-Faltung ein, welche zwei β -Faltblätter umfasst, die jeweils vier antiparallele Stränge enthalten (Donadini et al., 2004).

Es konnte durch biochemische Untersuchungen und aufgrund der erhaltenen Kristallstrukturen gezeigt werden, dass einige Superantigene Zink benötigen, um funktionell zu sein und richtig an den MHC-II-Komplex binden zu können (Fraser et al., 1992; Driessen et al., 1995; Schad et al., 1995; Bernatchez et al., 1997; Tripp et al., 2003). Zusätzlich stabilisiert das Zink-Ion bei einigen Superantigenen die dreidimensionale Struktur des Proteins selbst (Cavallin et al., 2000; Cavallin et al., 2003). Dagegen binden einige Superantigene wie z. B. SEB, SSA, und TSST-1 keine Zink-Ionen (Swaminathan et al., 1992; Sundberg et al., 1999; Prasad et al., 1993). Abhängig vom Superantigen wird das Zink auf unterschiedliche Weise vom Protein gebunden. Bei SEA, SED, SEE, SEH, SPE-C, SPE-H, SPE-L, SPE-M, SMEZ und SMEZ-2 wird Zink durch konservierte Reste im konkaven β -Faltblatt der C-terminalen Domäne gebunden (Fraser et al., 1992; Sundström et al., 1996; Roussel et al., 1997; Arcus et al., 2000; a; Hakansson et al., 2000; Proft et al., 2003). Von SEC und SPE-A dagegen wird das Zink-Ion in der Spalte zwischen den beiden Domänen gebunden (Sundström et al., 1996 a; Baker et al., 2001). Außerdem können Superantigene mit Hilfe von Zink-Ionen dimerisieren. SEC, SED und SPE-C bilden Homodimere und besitzen eine zweite Zinkbindungsstelle (Roussel et al., 1997, Li et al., 1997; Chi et al., 2002; Papageorgiou et al., 2004). Auch für das jüngst entdeckte SDM wurde eine Zinkbindung vorhergesagt, da es über die entsprechenden Liganden verfügt (Miyoshi-Akiyama et al., 2003).

Obwohl auch für MAM eine Zinkabhängigkeit gezeigt wurde, (Driessen et al., 1995; Bernatchez et al., 1997) und zuvor auch eine Beteiligung von Zink bei der Dimerbildung berichtet wurde (Etongue-Mayer et al., 2002; Langlois et al., 2003), konnten jedoch die neueren Kristallstrukturen die Zinkbindung nicht belegen (Zhao et al., 2004). Deshalb muss die wirkliche Bedeutung des Zinks für die MAM-Funktion noch geklärt werden.

Bei fast allen Superantigenen konnten die an der Zinkbindung beteiligten Liganden auch identifiziert werden. Beim SEA sind folgende N-terminale Reste beteiligt: His 187; His 225 und Asp 227 (Sundström et al., 1996). Das SEC2 koordiniert Zink über folgende Aminosäurereste: His 118; His 122 und Asp 83 und zusätzlich mit Asp 9 von einem benachbarten Molekül (Schad et al., 1997).

Eine zweite Zinkbindungsstelle konnte beim SEC2 durch neuere Kristallstrukturen identifiziert werden und umfasst die Reste His 47 und Glu 71 beim ersten Molekül und die Reste Glu 119 und Glu 80 beim zweiten Molekül (Papageorgiou et al., 2004). Beim SDM sind die Reste Asp 173, His 20 und Asp 202 für die Bindung des Zinks verantwortlich (Miyoshi-Akiyama et al., 2003). Kristallstrukturen von dem SED Homodimer zeigen die Beteiligung von Asp 182, His 220 und Asp 222 vom ersten Molekül und His 218 vom zweiten Molekül an der Schnittstelle des Dimers. Darüber hinaus wurde eine zweite Bindungsstelle ähnlich der ersten des SEC-2 gefunden (Sundström et al., 1996). Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass an der Zinkbindung ein bis zwei Histidinreste beteiligt sind und dass es sich bei dem dritten Rest um Glutamat bzw. Aspartat handelt. Das SEH stellt jedoch nur zwei Liganden zur Verfügung, His 206, Asp 208. Statt eines weiteren Restes wird ein Wassermolekül am Zink gebunden (Hakansson et al., 2000; Petersson et al., 2001).

1.2.3 Superantigenpräsentation durch MHC-Klasse-II-Moleküle

Entsprechend der Art der Bindung am MHC-Klasse-II-Molekül lassen sich die Superantigene in drei Klassen einteilen:

Die erste Gruppe, die nur an die α -Kette des MHC-Klasse-II bindet z. B. SEB, TSST-1, SSA (Jardetzky et al., 1994; Kim et al., 1994; Sundberg et al., 1999). Ein wichtiger Aminosäurerest des HLA-DR-Komplexes ist Lysin 39. Denn die Mutation von Lysin 39 zu Alanin verhindert die Bindung von TSST-1 an den HLA-DR-Komplex (Panina-Bordignon et al., 1992). Auch bei der Interaktion von SEB mit dem DR1-Molekül spielt Lysin 39 eine entscheidende Rolle (Thibodeau et al., 1994). Kristallstrukturen von einem MHC-Klasse-II-Molekül mit SEB zeigen, dass das Lysin 39 mit einer polaren Tasche des Superantigens interagiert. Dabei formt das Lysin eine Salzbrücke mit dem Rest Glu 67 aus und bildet zusätzlich Wasserstoffbrücken mit den Tyrosinresten 89 und 115 (Jardetzky et al., 1994). Diese Reste sind auch im SSA konserviert (Glutamat 67, Tyrosinreste 89 und 110) und zeigen eine ähnliche Konformation zum SEB. Zusätzlich bindet ein hydrophober Abschnitt der Superantigene zwischen zwei Schleifen des β -Faltblattes vom MHC-Klasse-II-Molekül

(Sundberg und Jardetzky 1999). Während SEB und SEC3 am äußeren Bereich des MHC-II-Moleküls binden, überlappt das TSST-1 die Hälfte der T-Zell-Rezeptor Bindungsstelle des MHC und bildet so Kontakte zu den flankierenden α -Helices als auch zum gebundenen Peptid aus (Kim et al., 1994).

Die zweite wichtige Gruppe der Superantigene bindet ausschließlich an die β -Kette des MHC-Klasse-II-Moleküls. Zu dieser Gruppe gehören SPE-C und SEH (Li et al., 2001; Petersson et al., 2001). Histidin 81 der HLA-DR β -Kette ist wichtig für die Zink-vermittelte Superantigenbindung (Herman et al., 1991; Karp et al., 1992; Hakansson et al., 2000). Folgt man den Daten aus der Sequenzanalyse und den Strukturuntersuchungen, so scheinen SPE-G, SPE-H, SPE-I, SPE-J, SPE-L, SPE-M, SMEZ und auch SMEZ2 nur über die β -Kette an den MHC-Klasse-II-Komplex zu binden (Li et al., 1997; Zhang et al., 1998; Li et al., 2001; Petersson et al., 2001; Proft et al., 2001; Proft et al., 2003;).

Zu der dritten Gruppe gehören Superantigene, die sowohl die Bindungsstelle an der α -Kette, als auch die Zink-abhängige Bindungsstelle an der β -Kette des MHC-II-Komplexes besitzen. SEA-Moleküle, bei denen entweder die α -Ketten Bindungsstelle oder die β -Ketten Bindungsstelle mutiert wurde, zeigten eine Abnahme der Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren. Diese Abnahme der T-Zell-Aktivierung konnte auch nicht durch Mischung von SEA Molekülen, welche nur eine Mutation in der entsprechenden Kette trugen rückgängig gemacht werden. Daraus folgt, dass ein SEA Molekül zwei MHC-II-Moleküle verbrücken muss. Diese Verbrückung der MHC-II-Moleküle ist für die Induktion der Cytokin- Gen Expression in B-Zellen und Monocyten notwendig (Mehindate et al., 1995; Tiedemann et al., 1996). Ähnlich zu SEA scheinen auch SED, SEE und MAM über den gleichen Mechanismus an den MHC-II-Komplex zu binden (Rink et al., 1994; Al-Daccak et al., 1998; Munson et al., 1998; Proft et al., 2001). Auch das MAM verfügt über die α - und β -Ketten Bindungsstelle zur Bindung am MHC-II-Komplex. Eine Zink-abhängige Dimerisierung wird noch kontrovers diskutiert (Etongue-Mayer et al., 2002; Langlois et al., 2003; Zhao et al., 2004).

1.2.4 Superantigen-Interaktionen mit dem T-Zell-Rezeptor

Fast alle Superantigene interagieren ausschließlich mit der V β -Region des T-Zell-Rezeptors. Dies führt zu der beschriebenen Stimulation der T-Zellen (White et al., 1989). Für die Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor besitzen die verschiedenen Toxine einen gemeinsamen Bereich von Resten mit der entsprechenden Spezifität für die einzelnen V β -

Elemente. Unterstützt wird diese Wechselwirkung durch weitere Reste, die charakteristisch für jedes Toxin sind. Daher bestimmen Sequenzunterschiede innerhalb der T-Zell-Rezeptor-Bindungsstelle das charakteristische V β -Repertoire für jedes Superantigen. Bisher wurden fünf Kristallstrukturen von Superantigenen im Komplex mit verschiedenen T-Zell-Rezeptor β -Ketten beschrieben. SEB, SEC2, SEC3 und SPE-A wurden mit einem Maus T-Zell-Rezeptor (V β 8.2) kristallisiert. Das SPE-C wurde mit dem humanen T-Zell-Rezeptor (V β 2.1) kristallisiert (Fields et al., 1996; Li et al., 1998; Sundberg et al., 2002). Diese Kristallstrukturen zeigen, dass sich die T-Zell-Rezeptor-Bindungsstelle in einem flachen Hohlraum zwischen den zwei Domänen des Toxins befindet. Die Hauptwechselwirkungen erfolgen zwischen den Atomen der Seitenkette des Superantigens und der komplementaritätsbestimmenden Region 1 und 2 (CDR1, CDR2) und der hypervariablen Region 4 (HV4) der V β -Kette des T-Zell-Rezeptors. Bei der Bindung von SEC3 ist auch die dritte Gerüstregion (framework region 3 FR3) des T-Zell-Rezeptors beteiligt (Leder et al., 1998). Zusätzlich zu den CDR1- und CDR2-Resten wird bei der Bindung von SPE-C die hypervariable CDR3-Region im SPE-C/ V β 2.1-Komplex beteiligt (Sundberg et al., 2002).

In SEA wurden die Reste Ser 206, Asn 207 und Thr 21 als die spezifitätsbestimmenden Reste identifiziert (Swaminathan et al., 1992). Substituiert man die Reste 206 und 207 in SEA durch die homologen Reste in SEE, so verschiebt sich das V β -Profil der reagierenden T-Zelle zu dem von SEE (Hudson et al., 1993). Die Anordnung der T-Zell-Rezeptor-Bindungsstelle im TSST-1 unterscheidet sich von der der anderen Superantigene. Sie ist in der C-terminalen Domäne auf der langen α 2-Helix und zwischen den β 7- β 8- und α 2- β 9-Schleifen als Teil der α 1-Helix untergebracht (Prasad et al., 1993; Acharya et al., 1994). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Superantigenen zeigt eine neuere Veröffentlichung von Petersson die Beteiligung der V α -Domäne des T-Zell-Rezeptors bei der Bindung von SEH. SEH stimuliert humane T-Zellen in V α -spezifischer Weise durch direkte Wechselwirkung mit der V α 10-Domäne des T-Zell-Rezeptors. Jedoch wurde keine V β -spezifische T-Zell Proliferation beobachtet (Petersson et al., 2003).

1.3 Das *Mycoplasma arthritidis* Superantigen

Mycoplasma arthritidis ist ein Pathogen für Nagetiere und löst in Ratten und Mäusen eine entzündliche Infektion aus (Cole et al., 1969; Cole und Ward 1973). In Mäusen ist die

Entzündung der Gelenke durch einen chronischen Verlauf gekennzeichnet (Cole et al., 1971). Zuerst konnten Cole und Mitarbeiter in den Jahren 1981 bis 1982 zeigen, dass der zellfreie Überstand von *M. arthritidis* immunmodulatorische Eigenschaften besitzt (Cole et al., 1981a, 1981b, 1982). Dass das aus *Mycoplasma arthritidis* erhaltene Superantigen auch T-Zell-stimulatorische Effekte besitzt, konnte auch von Kirchner et al., 1984 belegt werden. Da das Gen aus *M. arthritidis* welches das Superantigen kodiert als *mam* bezeichnet wurde, wird hier im weiteren die Bezeichnung MAM (*Mycoplasma arthritidis* Mitogen) für das Superantigen verwendet. Durch Giebler und Kirchner wurde das Superantigen 1986 intensiv biochemisch untersucht. Diese konnten zeigen, dass es sich um ein hitze- und proteaselabiles Protein handelt. Dagegen ist es gegenüber pH-Wertänderungen stabil. Auffallend hoch ist die Affinität von MAM gegenüber Glas und Plastikoberflächen und gegenüber Proteinen mit hoher molarer Masse (Atkin et al., 1986; Kirchner et al., 1986). Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 25,2 kD. Der hohe Isoelektrische Punkt (pI kalk. 10,2) zeigt, dass es sich um ein stark basisches Protein handelt. Im Jahre 1996 konnte schließlich die komplette Nukleotid- und Aminosäuresequenz veröffentlicht werden. Die drei UGA Tripletts bedeuten im universalen genetischen Code ein Stop-Codon, kodieren jedoch in Mycoplasmen einen Tryptophanrest (Yamao et al., 1985). Zu den bisher beschriebenen Superantigenen zeigt MAM nur eine sehr geringe phylogenetische Verwandtschaft. Die größte Ähnlichkeit besitzt MAM zu dem M5 Protein aus *Streptococcus pyogenes* (24%). Erwähnenswert ist auch die Ähnlichkeit zu einer konservierten Sequenz des murinen Mamma Tumorvirus 7. Das Protein setzt sich aus zwei Domänen zusammen, von denen die eine eine gewisse Homologie zu Concanavalin A zeigt (Cole et al., 1996). Es gelang Knudtson et al., 1997 zum ersten Mal das MAM rekombinant herzustellen. Das rekombinante Protein (rMAM) besitzt die ursprünglichen physikalischen Eigenschaften und behält unverändert seine biologische Aktivität (Knudtson et al., 1997).

In humanen und in murinen Lymphocyten induziert MAM die Produktion von Interferon-gamma (IFN- γ) (Cole et al., 1983; Kirchner et al., 1984; Rink et al., 1992 b). Darüber hinaus setzt MAM in murinen Lymphocyten IL-6 frei und induziert in humanen Lymphocyten zusätzlich die Ausschüttung von IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 (Homfeld et al., 1990; Rink et al., 1992). Dabei werden die proinflammatorischen Cytokine IL-1, IL-6 und IL-8 von MAM in der gleichen Weise induziert wie auch durch SEE und Lipopolysaccharid (LPS). Im Gegensatz zum LPS werden durch MAM jedoch die anti-inflammatorischen Cytokine IL-10 und IL-1RA in geringerem Maße freigesetzt (Rink et al., 1997). Das Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen ist

wahrscheinlich mitverantwortlich für die Entstehung von chronischen Krankheiten wie z. B. der rheumatoiden Arthritis (Rink et al., 1996), da die ausgelöste Immunantwort nicht herunterreguliert wird.

Damit MAM T-Zellen aktivieren kann, ist das Vorhandensein von MHC-II tragenden Zellen unabdingbar (Lynch et al., 1983). Auch das *M. arthritidis* Superantigen muss nicht durch die antigenpräsentierende Zelle prozessiert werden und bindet an die äußere Seite des MHC-II-Komplexes (Cole et al., 1982). Die Arbeitsgruppe von Kirchner konnte 1986 zeigen, dass MAM die Lymphocyten polykonal und unspezifisch aktiviert (Kirchner et al., 1986). Nachdem Marrack und Kappler (Marrack und Kappler 1990) MAM zu der Gruppe der *Staphylococcus* Enterotoxin ähnlichen Toxine zählten, wurde MAM in den folgenden Jahren als Superantigen betrachtet. Cole fand heraus, dass MAM nur mit bestimmten Mausstämmen reagiert. Diese Reaktion erfolgt in Abhängigkeit vom H2 (MHC-II-Komplex der Maus) Haplotyp. Nur Mäuse mit Haplotyp a, d, j, k, p, r, u und v reagierten nach Stimulation mit MAM (Cole et al., 1981). MAM aktiviert die T-Lymphocyten in der Maus nur, wenn diese im H2-Komplex ein intaktes I-E- α -Molekül auf der Zelloberfläche exprimieren (Kirchner et al., 1984; Cole et al., 1986). Nach Stimulation mit MAM sezernieren Knochenmarksmakrophagen von I-E- α positiven Mäusen Interleukin 6 (Homfeld et al., 1990). Darüber hinaus belegte Cole, dass die Aktivierung der T-Lymphocyten abhängig ist von der Expression von Produkten der V β 8-Genfamilie des $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors (Cole et al., 1989). Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen wiesen nach, dass die T-Zell-Aktivierung durch MAM nicht CD4/CD8 restringiert ist (Matthes et al. 1988; Cole et al., 1981 b; Lynch et al., 1986). Durch Analyse von humanen T-Zellen nach Stimulation mit MAM zeigte Matthes, dass MAM sowohl T-Lymphocyten mit $\alpha\beta$ - als auch mit $\gamma\delta$ -Rezeptor aktiviert. Verschiedene Organismen zeigen auch eine unterschiedliche Suszeptibilität für MAM. Leukocytenkulturen von Mensch, Maus und Ratte zeigen eine Reaktion nach Stimulation mit MAM, dagegen reagieren Leukocyten aus Kaninchen, Meerschweinchen, Schaf und Rind überhaupt nicht (Cole et al., 1982).

In der Maus, im Menschen und in der Ratte liegt eine V β -Restriktion vor. Zu den MAM-reaktiven T-Zellen gehören in der Maus jene, die V β 6, V β 8.1, V β 8.2, V β 8.3 und V β 5.1 exprimieren. Bei der Ratte sind V β 5.1, V β 6, V β 8.1, V β 8.2, beteiligt, jedoch nicht V β 8.3. Im humanen Organismus sind die V β -Subtypen V β 19.1 (alternativ als V β 17.1 bezeichnet) und in geringerem Umfang V β 3.1, V β 11.1, V β 12.1 und V β 13.1 involviert (Baccala et al., 1992). Zusätzlich werden die Subtypen V β 5.1, V β 7, V β 8 und V β 20 durch Fleischer und Bhardway als reaktiv beim Menschen beschrieben (Fleischer et al., 1991; Bhardway et al.,

1994). In beiden Arbeiten wird der V β 19-Subtyp als der reaktivste beim Menschen gefunden. Dass das MAM über den N-Terminus am MHC-II-Komplex bindet und der C-Terminus für die T-Zell-Aktivierung erforderlich ist, konnte durch Langlois gezeigt werden (Langlois et al., 2000).

Neuere Ergebnisse legen nahe, dass MAM mit dem Lipopolysaccharid-Signalweg interagiert, aber die Induktion der Stickstoffmonoxid-Produktion in Makrophagen vom Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) unabhängig ist (Mu et al., 2001; Ribeiro-Dias et al., 2003). Jedoch läßt eine aktuelle Studie erkennen, dass MAM mit dem Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) und dem Toll-like Rezeptor 4 interagiert. Die Wechselwirkung von MAM und TLR4 reguliert sogar die inflammatorische Antwort von MAM/TLR2 herunter (Mu et al., 2005). Durch Kompetitions-Versuche mit MAM-Wildtyp und MAM-Peptidkonstrukten, die jeweils die Reste 14-31 bzw. 76-90 umfassten, konnte Etongue-Mayer die Bedeutung des N-Terminus für die erfolgreiche Bindung von MAM am MHC-II-Komplex unterstreichen. Zugleich stellte diese Arbeitsgruppe die These auf, dass MAM zwar in Abhängigkeit von Zink mit dem MHC-II interagiert, Histidin 81 des HLA-DR1-Komplexes aber nicht erforderlich ist, damit MAM binden kann (Etongue-Mayer et al., 2002). Langlois et al., (2003) veröffentlichten Daten, die zeigen, dass MAM in Abhängigkeit von Zink dimerisiert. Aufgrund von Ergebnissen aus Versuchen mit einer MAM-Mutante, bei der Histidin 14 und Aspartat 31 durch Alanin ersetzt wurden, folgerte Langlois, dass diese beiden Reste für die Dimerbildung mitverantwortlich sind. Die von Zhao et al. (Zhao 2004) veröffentlichten Kristallstrukturen können diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen. Vielmehr sind die Reste Aspartat 197, Histidin 58 und Arginin 154 an der Dimerbildung beteiligt. In den aktuellen Kristallstrukturen konnte kein Zink-Ion lokalisiert werden (Zhao et al., 2004).

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Struktur-funktions-Beziehung des *Mycoplasma arthritidis* Superantigens mit dem MHC-Klasse-II-Molekül untersucht werden. Da aus Circular-Dichroismus (CD)-Spektren bekannt war, dass MAM über eine andere Proteinfaltung verfügen mußte, als die bisher bekannten Superantigene, sollte parallel die Struktur von MAM mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Dazu sollte das Protein rekombinant in *E. coli* hergestellt werden. Das Mycoplasmen-Genom hat einen charakteristisch geringen G/C-Gehalt. Abgesehen von einigen Ausnahmen liegt der G/C-Gehalt im Mycoplasmen-Genom bei 24 bis 33 mol%. Daher sollte vor den eigentlichen Versuchen der G/C-Gehalt in der kodierenden Sequenz auf 47% erhöht werden. Um das MAM für die weiteren Versuche erfolgreich und in der benötigten Menge in *E. coli* exprimieren zu können, sollten anhand eines Codon-usage-Vergleiches die passenden Basen-Triplets zusammengestellt werden.

Für einige Superantigene konnte eine Zink-vermittelte Bindung an den MHC-II-Komplex gezeigt werden. In Vorarbeiten konnte auch für MAM eine Zinkabhängigkeit nachgewiesen werden. MAM sollte deshalb über ein ähnliches Zinkbindemotiv wie die anderen Superantigene verfügen. Das Zinkbindemotiv wird durch ein bis zwei Histidinreste gebildet. Dies entspricht beim MAM den Resten His 14 und His 58. Den dritten Liganden bildet entweder ein Aspartat- oder Glutamatrest. Mit Hilfe gerichteter Mutagenese sollten die genannten Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht werden, bzw. durch Asparagin oder Glutamin ersetzt werden. Danach sollte die Überprüfung der Funktionalität der Mutanten mit HLA-DR transfizierten L-Zellen oder B-Zellen und V β -transfizierten T-Zellen erfolgen.

Mit Hilfe von CD1-transfizierten THP-1-Zellen sollte überprüft werden, ob MAM an CD1-Moleküle binden kann und so in der Lage wäre, auch beim Fehlen vom MHC-II-Komplex Thymocyten zu aktivieren. Aufgrund seiner besonderen Eigenschaften könnte MAM ein alternatives Modell für die Verknüpfung von MHC-II und TCR darstellen.

Die geringe Ausbeute an rekombinant hergestelltem Protein im Vergleich zu anderen Superantigenen, spricht dafür, dass das Protein für *E. coli* toxisch ist. Dies sollte durch Vitalitätsteste im Vergleich mit anderen Superantigenen belegt werden. Um die biologische Bedeutung von MAM weiter zu charakterisieren sollte untersucht werden, ob MAM über Protease bzw. DNase-Aktivität verfügt und so das Wachstum der Bakterien inhibiert. Die Daten tragen zur Aufklärung des Krankheitsbildes der Rheumatoiden Arthritis bei und helfen bei der Suche nach weiteren Proteinen mit Superantigenfunktion.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Bench 35700 (Kojair Vilppula, Finnland)
Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg)
Brutschrank WB 60 (Mytron, Heiligenstadt)
Brutschüttler ES-20 (LAB 4 YOU, Berlin)
Cell counter Casy-1 TT (Schärfe System, Reutlingen)
Centrifuge 5417 C/R (Eppendorf, Hamburg)
CO₂ Incubator (Sanyo, Loughborough, UK)
Concentrator (Eppendorf, Hamburg)
Dampf-Groß-Sterilisator Hydromat E14 (Webeco, Lübeck)
DNA/RNA UV-Cleaner, UVC/T (LAB 4 YOU, Berlin)
DNA-Sequenzier ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Weiterstadt),
Durchfluscytometer Coulter XL (Coulter Electronics, Krefeld)
ELISA-Reader (Anthos Labtec Instruments, Salzburg/A)
ELISA-Washer (Biotest, Dreieich)
FACS-CALIBUR E2996 (Becton Dickinson, Heidelberg)
FilmRemover (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
FPLC-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
FPLC-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Gefriertrocknungsanlage Alpha-2 (Osterode am Harz)
Gefriertruhe, -80 °C (Nuaire, Plymouth, MN/USA)
Gefrierschränke MDF-U71V (Sanyo Electric Ora-Gun, Gunma Japan)
Gel Doc. Station 1708126 (BIO-RAD, München)
Gelelektrophoresekkammer GNA-100, horizontal (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Gelelektrophoresekkammern GT Sub-Cell Systems (BIO-RAD, München)
Gene Power Supply GPS 200/400 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Hoefer Automated Gel Stainer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Kühlschränke (Bosch, Fürth)
Laborwaage 12116 MP (Sartorius, Göttingen)
Laborwaage LC 6200S (Sartorius, Göttingen)

Magnetrührer (Heidolph, Kelheim)
 Microplate Washer (Atlantis, Eugendorf, Österreich)
 Mikrowelle NN-A850WB (Panasonic/Technics, Hamburg)
 Mikroplatten Reader ULTRA 384 (TECAN, Crailsheim)
 Netzgerät 3000/150 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
 NovaBlot Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
 Peristaltikpumpe P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler (Applied Biosystems, Weiterstadt)
 Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Weiterstadt)
 Pharmacia PhastSystem Elektrophoresesystem (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
 pH-Meter HI 9321 (Hanna, Kehl am Rhein)
 Pipetus Akku (Hirschmann, Eberstadt)
 Photoanlage CCD Imaging System (Appligene, Heidelberg)
 Pipetten Research: 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
 Pipette Combi-Pipette Typ 3180L (Eppendorf, Hamburg)
 Pipetten Multikanal, 5-50 µl / 40-200 µl (Titertek, ICN, Meckenheim)
 Power Pac 300 (BIO-RAD, München)
 QIArack (QIAGEN, Hilden)
 Reax Control (Heidolph, Schwabach)
 Refrigerated Orbital Incubator IOC 400.XX2.C (Sanyo, Loughborough, UK)
 Roller (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
 Rüttler Reax 2000 (Heidolph, Kelheim)
 Rüttler Sample Mixer, rotatorisch (Dyna, Hamburg)
 Rüttler Titrmix 100 (Heidolph, Kelheim)
 Speed Vac Concentrator (Bachofner, Reutlingen)
 Sunrise Remote Control Reader (TECAN, Crailsheim)
 Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
 Transilluminator TI2 (Biometra, a Whatman Company, Göttingen)
 Trockenschrank (Heraeus Christ GmbH, Osterode)
 Vibra Cell Sonics (Sonics & Materials Inc., Danbury Con. USA)
 Video Graphic Printer (Sony, Köln)
 Wasserbad, klein und groß (GFL Labortechnik, Burgwedel)
 Zentrifuge Kühlzentrifuge Centrikon T324 (Kontron, Offenbach)
 Zentrifuge minifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg)
 Zentrifuge Z 400K, Z 233 MK-2 (Hermle Labortechnik, Wehingen)

Zentrifuge Sorvall RC 50 Plus (Kendro, Düsseldorf)

Zentrifuge Varifuge K; Varifuge 3.0 RS (Heraeus, Osterode am Harz)

3.1.2 Laborbedarf

Bakterienfilter 0,2 µm, steril, rund (Schleicher & Schüll, Dassel)

Centri-Sep spin columns (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Econo Column® (BIO-RAD, München)

Einmalspritzen, steril, 2 ml, 5 ml, 10 ml (Becton Dickinson, Heidelberg)

Filterpapier 3MM (Whatman, Maidstone/GB)

Gewebekulturflaschen, beschichtet, 50 ml, 260 ml, 800 ml (Nunc, Roskilde/DK)

Gewebekulturplatten 24 Loch (Falcon, Heidelberg)

Kulturschalen, unbeschichtet, Durchmesser 100 mm (Greiner, Nürtingen)

Kunststoffröhrchen, steril, mit Schraubverschluß, 15 ml, 50 ml (Greiner, Nürtingen)

Latex-Einmalhandschuhe (Ansell, München)

Microcon-10, -30, -100 Filter (Amicon, Witten)

Micropure-Separatoren (Amicon, Witten)

Microtiterplatten 96 Loch, Flach- und Rundboden (Falcon, Heidelberg)

Nitrocellulosemembran, 0,45 µm (Bio-Rad, München)

PCR-Reaktionsgefäß, GenAmp Reaction Tubes (Eppendorf, Hamburg)

Pipettenspitzen, 1-10 µl, 10-100 µl, 200-1000 µl (Greiner, Nürtingen)

Pipettenspitzen, Combitips steril, 0,5 ml, 1,25 ml, 2,5 ml, 5 ml, 12,5 ml (Eppendorf, Hamburg)

Pipettenspitzen, Comfortips, 40-200 µl (Eppendorf, Hamburg)

Pipettenspitzen, Sterilfiltertips, gestopft, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 200-1000 µl (Biozym Diagnostik, Oldendorf)

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt, Nürmbrecht)

Reaktionsgefäße 1,5 ml mit Schraubdeckel (Sarstedt, Nürmbrecht)

Stericup™ Filter Units (Stericup-GV, 150, 250, 500; Millipore-Amicon, Witten)

Stabpipetten, steril, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Greiner, Nürtingen)

Zellschaber, 18 cm (Falcon, Heidelberg)

3.1.3 Kulturmedien und –zusätze

Ampicillin (Boehringer Mannheim, Mannheim)

Ampicillin (Roche, Penzberg)

Bacto-Agar (Difco Laboratories, USA)

Bakterienkulturmedium LB-Broth (Gibco, Karlsruhe)

Fetales Kälberserum, Myoklone plus Qualität (Gibco, Karlsruhe)

Isopropyl- β -thiogalactosid (Boehringer Mannheim, Mannheim)

Isopropyl- β -thiogalactosid (bts, St. Leon-Rot)

Kulturmedium DMEM (BioWhittaker, Heidelberg)

Kulturmedium Iscoves DMEM (BioWhittaker, Heidelberg)

Kulturmedium RPMI 1640 (BioWhittaker, Heidelberg)

L-Glutamin (BioWhittaker, Heidelberg)

PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (BioWhittaker, Heidelberg)

Penicillin 10000 E/ml (BioWhittaker, Heidelberg)

Streptomycin 10000 $\mu\text{g/ml}$ (BioWhittaker, Heidelberg)

Trypsin-Versene (BioWhittaker)

3.1.4 Zelllinien, Bakterien und Plasmide

3.1.4.1 Zelllinien

Zellen, die nicht frei erhältlich sind, sondern von anderen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt wurden, werden als solche im Text kenntlich gemacht und hier nicht aufgeführt.

Raji, lymphoblastoide B-Zelllinie (American Type Culture Collection, USA)

3.1.4.2 Bakterien

Bakterien, die nicht frei erhältlich sind, sondern von anderen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt wurden, werden als solche im Text kenntlich gemacht und hier nicht aufgeführt.

Escherichia coli DH5 α (Gibco, Karlsruhe) mit dem Genotyp:

F⁻, *endA1*, *hsdR17*, (*r_k*⁻, *m_k*⁺), *supE44*, *thi-1*, λ ⁻, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Φ 80*dlacZ* Δ *M15*

Escherichia coli BL21(Amersham Biosciences, Freiburg) mit dem Genotyp:

F⁻, *omp T*, *hsdS* (*r_B*⁻, *m_B*⁻) *gal*, *dcm*

Escherichia coli SG 13009 (QIAGEN, Hilden) mit dem Genotyp:

F⁻, *his* *pyrD* Δ *Ion*-100 *rpsL*

Escherichia coli M15 (QIAGEN, Hilden) mit dem Genotyp:

F⁻, *nalS*, *strS*, *rifS*, *thi*⁻, *lac*⁻, *ara*⁻, *gal*⁻, *mtl*⁻, *recA*, *uvr*, *Ion*

3.1.4.3 Plasmide

pBluescript II KS mit dem neuen MAM-Gen (GenExpress,Berlin)

pMALc2 (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus)

pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

3.1.5 Immunologische Reagenzien

Kaninchen anti-Maus-IgG-FITC-konjugiert (Jackson Immuno Research, USA)

Kaninchen anti-Schaf-IgG alkalische Phosphatase konjugiert (Jackson Immuno Research, USA)

Kaninchen anti-Ziege-IgG alkalische Phosphatase konjugiert (Jackson Immuno Research, USA)

Kaninchen anti-Ziege-IgG-FITC-konjugiert(Jackson Immuno Research, USA)

Lipopolysaccharid aus *E. coli* Serotyp 0111:B4 (Sigma, Deisenhofen)

Maus anti-Maltose bindendes Protein (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus)

Maus anti-Ziege-IgG alkalische Phosphatase konjugiert (Jackson Immuno Research, USA)

Phytohämagglutinin aus *Phaseolus vulgaris* HA 16/17 (Wellcome, Dartfort/GB)

Schaf anti-Rind-Thrombin-IgG (Accurate Chemical & Scientific Corporation, U.S.A.)

Schaf anti-Maus-IgG-FITC-konjugiert (Roche Molecular Biochemicals,)
Superantigene (Toxin Technology, Heidelberg; Prof. M. Dohlsten, Lund/S)
Ziege anti-GST (Amersham pharmacia biotech, Freiburg)

3.1.6 Sonstige Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) (Bio-Rad, München)
Agarose NA (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Aldrich, Steinheim)
Amylose Resin (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus)
Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen)
Bromphenolblau (Bio-Rad, München)
Execel Gel SDS 12,5 Polyacrylamid Gele und Pufferstreifen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
GeneRuler™ 1kb DNA Leiter (Fermentas, St. Leon-Rot)
Glutathion Sepharose™ 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Harnstoff (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Maltose bindendes Protein (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus)
Molekulargewichtsmarker DALTON MARK VII-L for SDS (Sigma, Schnellendorf)
Nujol-Öl (Applied Biosystems, Weiterstadt)
Oligonukleotidprimer (TibMolBiol, Berlin)
O' Range Ruler™ 100bp; 200bp; 100bp + 500bp DNA Leiter (Fermentas, St. Leon-Rot)
PCR Nucleotide Mix (Promega, Mannheim)
Pefabloc SC/ Pefabloc SC Plus (Roche, Penzberg)
PhastGel® Blue R (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Propidiumiodid (Orpegen Pharma, Heidelberg)
Protein Assay (Bio-Rad, München)
Reduziertes Glutathion (Sigma, Schnellendorf)
Tetramethyldiamin (TEMED) (Bio-Rad, München)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in pro analysis Qualität bei der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

3.1.7 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm und Inkubationspuffer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Benzonase (Merck, Darmstadt)

Faktor Xa (Roche Molecular Biochemicals)

Glutathion S-Transferase (GST) (Sigma, Schnelldorf)

Lysozym (Sigma, Schnelldorf)

ProofStart™ DNA Polymerase, *Taq* DNA Polymerase (QIAGEN, Hilden)

Restriktionsendonukleasen und Inkubationspuffer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; New England Biolabs, Schwalbach/Taunus; Promega, Mannheim)

T4 DNA Ligase und Ligase Puffer (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus)

Thrombin Protease (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

3.1.8 Testkits

PRISM BigDye™Primer CS + Cycle Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt)

QIAGEN® Plasmid Mini/ Maxi Kits (QIAGEN, Hilden)

QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden)

Cytokin-ELISA (Bender MedSystems, Heidelberg; Biosource, Ratingen)

OptEIA™ Mouse IL-2 Set (BD PharMingen, Heidelberg)

Vector® BCIP/ NBT Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV (Alexis, Grünberg)

3.2 Methoden

Die etablierten Methoden werden wie in der Literatur beschrieben, durchgeführt. Es wird auf die entsprechende Veröffentlichung verwiesen und falls die Durchführung abwich, wird sie im Text näher erläutert. Methoden, die bei käuflichen Testkits bzw. Geräten zur Anwendung kommen, werden nur beschrieben, sofern die Durchführung von der beigefügten Anleitung abwich. Ansonsten wird auf diese verwiesen (s. 3.1.8 Testkits).

3.2.1 Molekularbiologische Arbeiten

Nährmedien, Lösungen und Puffer bzw. deren Komponenten werden zur Sterilisation, steril-filtrierte, oder 20 min bei 121 °C und einem Druck von 2050 hPa autoklaviert und bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C gelagert. Lösungen mit Ethanol, β -Mercaptoethanol oder SDS (Natrium-dodecylsulfat) werden nicht autoklaviert.

3.2.1.1 Anzucht von Bakterien

Die Flüssig- und Festnährmedien werden bei Bedarf mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt. Wie bei Sambrook et al. (1989) beschrieben, erfolgt die Anzucht der Bakterien.

3.2.1.2 Glycerinkulturen

Bakterien können über einen Zeitraum von 2-3 Jahren in Glycerinkulturen bei einer Temperatur von -80 °C gelagert werden. Die Herstellung von Glycerinkulturen erfolgt wie bei Sambrook et al. (1989) beschrieben.

3.2.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien werden entsprechend der Anleitung von Sambrook et al. (1989) hergestellt.

3.2.1.4 Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation wird nach Hanahan (1983) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienen Plasmide ohne Insert bzw. Produkte einer Ligation(3.2.1.9).

Die Plasmide werden in *E. coli* transformiert.

3.2.1.4 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Nach Erreichen einer Zelldichte von ca. 3×10^8 Zellen pro ml (entsprechend einer optischen Dichte bei $A_{600\text{nm}}$ von 2,5) werden die Bakterien geerntet und entsprechend der Arbeitsvorschrift von QIAGEN (QIAGEN Plasmid Mini Handbook for Plasmid Mini Kit) weiter behandelt.

3.2.1.5 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Nach Erreichen einer Zelldichte von ca. 3×10^8 Zellen pro ml (entsprechend einer optischen Dichte bei $A_{600\text{nm}}$ von 2,5) werden die Bakterien geerntet und entsprechend der Arbeitsvorschrift von QIAGEN (QIAGEN Plasmid Purification Handbook for QIAGEN Plasmid Maxi Kits) weiter behandelt.

3.2.1.6 Fällung und Aufarbeitung der Plasmid-DNA

Durch Isopropanolfällung der DNA bei Raumtemperatur wird die Ko-Präzipitation von Salzen minimiert. Daher wird das Eluat mit der Plasmid-DNA mit $0,7 \times$ Volumen an Isopropanol versetzt und sofort bei 15 000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Anschließend wird das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wird die DNA in 10mM Tris-Cl Puffer, pH-Wert 8,5 resuspendiert.

3.2.1.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wird die Absorption von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ und von Proteinen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ genutzt.

Durchführung:

- DNA-Lösung mit ddH₂O verdünnen
- der Nullabgleich erfolgt gegen Tris-Cl Puffer, pH-Wert 8,5
- die DNA-Konzentration kann wie folgt berechnet werden:

$$1 A_{260 \text{ nm}} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml Doppelstrang-DNA}$$

$$\text{Konz. (}\mu\text{g/ml)} = V \times 50 \times \text{WLA}$$

V = Verdünnungsfaktor

WLA = Extinktion bei $\lambda = 260 \text{ nm}$

Liegt der Extinktions-Quotient $260 \text{ nm}/280 \text{ nm}$ unter 1,8, enthält die Lösung noch zu viele Proteine, liegt der Quotient über 2,0, liegen noch zu viele Salze vor, oder die Lösung ist mit Phenol von der Aufreinigung kontaminiert. Diese Verunreinigungen können nachfolgende Reaktionen beeinträchtigen.

3.2.1.8 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die DNA-Restriktionen wurden mit Restriktionsendonukleasen des Typ II durchgeführt. Diese Enzyme schneiden den DNA-Doppelstrang innerhalb einer spezifischen Sequenz von 4-6 Basenpaaren.

Bei der Hydrolyse unterscheidet man zwischen einem analytischen und einem präparativen Ansatz, die sich in der Menge der eingesetzten DNA unterscheiden: Für analytische Restriktionen wird etwa $1 \mu\text{g}$ und für präparative Restriktionen werden etwa $10 \mu\text{g}$ DNA eingesetzt.

Lösungen:

- Restriktionsendonuklease (= Restriktionsenzym)
- 10x Reaktionspuffer
- Auftragungspuffer (für Agarosegele)

Durchführung:

- $x \mu\text{g}$ DNA in ddH_2O
- Zugabe von 1/10 Volumen 10fach Reaktionspuffer (bezogen auf das Endvolumen des Ansatzes)
- 3-5 U Restriktionsenzym pro μg DNA zugeben und gut mischen (Das Volumen des zugegebenen Enzyms sollte 1/5 des Endvolumens nicht übersteigen.)
- 2 h bei 30°C bzw. bei 37°C inkubieren
- eine Menge entnehmen, die $1 \mu\text{g}$ DNA enthält, 1/6 des Gesamtvolumens an Auftragungspuffer zugeben, gut mischen und auf ein Agarosegel (3.2.1.10) auftragen

- falls die Hydrolyse unvollständig ist, den verbleibenden Restriktionsansatz noch 1 h bei 37 °C inkubieren

Wenn die DNA zur Ligation eingesetzt werden soll, werden die Restriktionsenzyme durch Hitze inaktiviert (15min bei 60°C, im Fall von *EcoRI* und *BamHI*). Die Temperatur und die Inkubationszeit sind von dem verwendeten Restriktionsenzym abhängig. Wird ein Plasmid mit zwei oder mehr Restriktionsenzymen geschnitten, muß das herausgeschnittene Stück aus dem Ansatz entfernt werden, indem der Reaktionsansatz in einer Gel-Elektrophorese aufgetrennt und die Bande des linearisierten Plasmides aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten wird. Abschließend muss dann die DNA aus der Agarose extrahiert werden. Dies erfolgt mit dem QIAquick™ Gel Extraction Kit (siehe 3.2.1.11).

3.2.1.9 Ligation

Mit diesem Verfahren können DNA-Fragmente *in vitro* neu kombiniert werden.

Lösungen:

- T4 DNA Ligase
- 10x Reaktionspuffer

Durchführung:

- 0,25-0,5 µg Plasmid-DNA und 1 µg DNA-Fragment (Insert immer im Überschuß zugeben) mit ddH₂O verdünnen
- Zugabe von 1/10 Volumen 10fach Reaktionspuffer (bezogen auf das Endvolumen 20µl)
- Zugabe von 3 U T4 DNA Ligase
- Inkubation für 16 h bei 16 °C oder alternativ 10 min bei Raumtemperatur
- Abschließend erfolgt die Hitze-Inaktivierung: Inkubation für 10 min bei 65°C
- Transformation (3.2.1.4)

3.2.1.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur analytischen Trennung von DNA-Fragmenten im Molekulargewichtsbereich von 0,1—25 kbp eingesetzt. Im elektrischen Feld wird die

Migration der Nukleinsäure-Moleküle durch Größe und Konformation bestimmt. Die Wanderungstrecke eines DNA-Fragmentes verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichts. Primär hängt die Konzentration der eingesetzten Agarose von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente ab. Agarose in geringer Konzentration wird verwendet um große DNA-Fragmente zu trennen, dagegen wird bei kleinen DNA-Fragmenten Agarose in hoher Konzentration eingesetzt. Um die Größe unbekannter DNA-Fragmente zu bestimmen, werden DNA-Molekulargewichtsmarker mit Fragmenten definierter Größe verwendet.

Lösungen:

- 10x TBE (Tris-borate)-Puffer (108 g Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) und 55 g Borsäure in 900 ml H₂O lösen; hinzufügen von 40 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH-Wert 8,0) und mit H₂O auf einen Liter auffüllen)
- 50x TAE (Tris-acetate)-Puffer (242 g Tris in 500 ml H₂O; hinzufügen von 100 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH-Wert 8,0) und 57,1 ml konz. Essigsäure; mit H₂O auf einen Liter auffüllen)
- Ethidiumbromid (10 mg/ml aqua bidest), lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C

Durchführung:

Die Durchführung erfolgt wie bei Sambrook et al. (1989) beschrieben.

3.2.1.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Rückgewinnung der DNA mit dem QIAquick™ Gel Extraction Kit:

Ausgenutzt wird bei dieser Technik der Umstand, dass Nukleinsäuren in der Gegenwart von chaotropen Salzen in hoher Konzentration, an Silica-Geloberflächen binden. Verunreinigungen werden aufgrund der selektiven Bindeeigenschaften der Silica-Membran durch wiederholtes waschen mit Puffer entfernt. Die einzelnen Arbeitsschritte werden entsprechend der Vorschrift durchgeführt.

3.2.1.12 Abtrennung kleiner DNA-Fragmente vom Vektor durch Mikrozentrifugation

Das Verfahren wird mit Micropure-Separatoren der Firma Amicon durchgeführt. Die Methode eignet sich für DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe, entsprechend des gewählten Filtertyps.

Durchführung:

- s. Vorschrift Fa. Amicon

3.2.1.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die gerichtete Mutagenese (Ho et al., 1989) und die spätere Überprüfung der transformierten Bakterien (Hawker und Billadello, 1993) wurden die PCRs nach folgendem Schema durchgeführt.

Lösungen:

- dNTP-Mix (10 mM/Nukleotid)
- 10x ProofStart PCR Puffer
- ProofStart DNA Polymerase
- Template-DNA
- 5'- und 3'-Primer (je 50 pmol)
- *Taq* PCR Master Mix
- Bakterien-Lösungen der verschiedenen Mutanten

Durchführung:

- 50-100 ng Template
- 50 pmol 5'-Primer
- 50 pmol 3'-Primer
- 1,5 µl dNTP-Mix
- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- ad 50 µl ddH₂O

- 1 µl Proofstart DNA Polymerase
- den Reaktionsansatz 5 min bei 95 °C inkubieren, um die ProofStart DNA Polymerase zu aktivieren und um die DNA zu denaturieren

PCR-Programm:

Zu Beginn: 5 min 95 °C

35 Zyklen: Denaturierung: 50 sec 94 °C

Annealing: 50 sec 65 °C / 71 °C

Elongation: 1 min 72 °C

Abschließend: 10 min 72 °C

Ende: 4 °C halten

Site-directed mutagenesis by overlap extension:

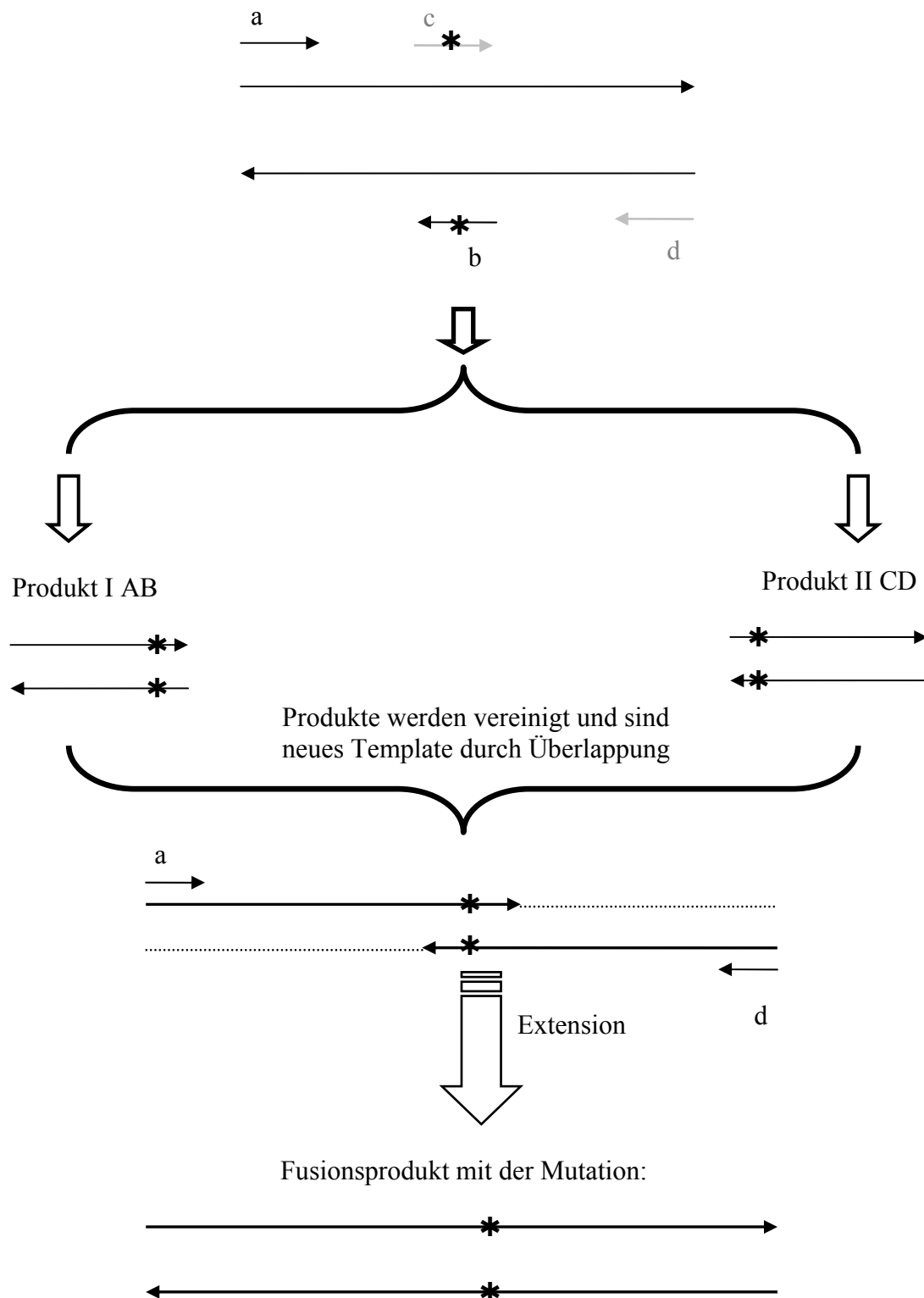


Abbildung 1: Schematischer Ablauf der gerichteten Mutagenese

In separaten PCRs werden je zwei Zielsequenzen amplifiziert. Jeder Reaktionsansatz enthält einen flankierenden Primer der an einem Ende der Zielsequenz hybridisiert (Primer a oder d) und einen internen Primer, der an der Mutationsstelle hybridisiert und die Fehlpaarung enthält (Primer b oder c). Die so erhaltenen Produkte werden in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA aus der Agarose isoliert (siehe 3.2.1.10). Da die verwendeten internen Primer eine Überlappung besitzen, können die Produkte im letzten PCR-Ansatz fusioniert werden. Die Überlappung eines Stranges mit einem anderen Fragment ermöglicht ihm so als Primer bei dem anderen zu wirken. Durch verwenden der äußeren Primer (a und d) wird dann so durch Extension der Überlappung das Endprodukt erhalten.

3.2.1.14 Durchtesten der Bakterien (A Multiplex Polymerase Chain Reaction Colony Miniprep, Hawker und Billadello, 1993)

Für die Identifizierung der transformierten Bakterien sind zuvor einige Schritte notwendig:

Es werden jeweils 200 µl steriles Wasser mit jeweils 2 µl einer Übernachtskultur der entsprechenden Mutante angeimpft. Das Aliquott wird dann 1 min auf 95 °C erhitzt und sofort auf Eis gebracht. Von diesem Ansatz werden 50 µl für die PCR entnommen.

Durchführung:

- 50 µl Bakterien-Lösung
- 50 pmol 5'-Primer
- 50 pmol 3'-Primer
- 50 µl *Taq* PCR Master Mix (QIAGEN)

PCR-Programm:

Siehe oben.

3.2.1.15 Konstruktion des MAM-GFP- (Grün-Fluoreszierendes Protein) Fusionsproteins durch Überlappungs-Extension bei Verwendung der PCR

Die Überlappung erfolgt hier über die Faktor Xa-Schnittstelle.

Lösungen:

- dNTP-Mix (10 mM/Nukleotid)
- 10x ProofStart PCR Puffer
- ProofStart DNA Polymerase
- Template-DNA (GFP bzw. MAM)
- 5'- und 3'-Primer (je 50 pmol)

Durchführung:

- 50-100 ng Template (GFP bzw. MAM)
- 50 pmol 5'-Primer (**Bam**HI-MAM; **FXa**-GFP)
- 50 pmol 3'-Primer (**MAM**-**FXa**; **GFP**-**Eco**RI)
- 1,5 µl dNTP-Mix
- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- ad 50 µl ddH₂O
- 1 µl Proofstart DNA Polymerase
- den Reaktionsansatz 5 min bei 95 °C inkubieren, um die ProofStart DNA Polymerase zu aktivieren und um die DNA zu denaturieren

PCR-Programm und Schema siehe oben (Abbildung 1) gerichtete Mutagenese.

3.2.1.16 Aufarbeitung der Produkte aus der gerichteten Mutagenese

- 2×25 µl des PCR-Ansatzes werden mit je 5 µl Auftragungspuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen
- die PCR-Zwischenprodukte werden präparativ über ein Agarosegel aufgereinigt (3.2.1.11) und in der finalen PCR fusioniert

- die PCR-Endprodukte werden ebenfalls über ein Agarosegel aufgereinigt und anschließend mit *Bam*HI / *Eco*RI restringiert und mit pGEX-4T-1 ligiert (3.2.1.9)
- Abschließend werden die Ligationansätze in *E.coli* transformiert.

3.2.1.17 Aufarbeitung der Produkte aus der Konstruktion des MAM-GFP- (Grün-Fluoreszierendes Protein) Fusionsproteins

Die erhaltenen Produkte werden analog denen aus der gerichteten Mutagenese behandelt.

3.2.1.18 PCR-Produkte des Kolonie-Screenings

- 10 µl des PCR-Ansatzes werden mit je 2 µl Auftragungspuffer versetzt und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen

3.2.1.19 Herstellung der rekombinanten MAM-Proteine (wt und Mutanten)

Das neue MAM-Gen lag im Vektor pBluescript II KS vor (GenExpress). Die Klonierung erfolgte über die 5' *Bam*H I- und 3' *Eco*RI -Schnittstelle. Über diese Schnittstellen wird das MAM-Gen in die verschiedenen Vektoren kloniert.

3.2.1.20 Klonierung in den Vektor pMALc2

Die Klonierung von MAMwt und Mutanten in den Vektor pMALc2 erfolgte über das 5' *Bam*HI- und über die 3'-*Eco*RI-Schnittstelle. Der pBluescript Vektor und der Vektor pMALc2 wurden mit *Bam*HI / *Eco*RI hydrolysiert und die Fragmente über ein Agarosegel (3.2.1.10) aufgetrennt und daraus isoliert (3.2.1.11). Nach der Ligation des Inserts (mit dem MAM-Gen) in pMALc2 (3.2.1.9) und der nachfolgenden Transformation (3.2.1.4) in *E. coli* wurden zur Identifizierung rekombinanter Klone einzelne Klone abgeimpft und die Plasmid-DNA durch eine Mini-Präparation isoliert. Anschließend wurde wieder mit *Bam*HI / *Eco*RI restringiert und der Ansatz über ein Agarosegel analysiert.

3.2.1.21 Klonierung in den Vektor pGEX-4T-1

Die Klonierung von *MAM* in den Vektor pGEX-4T-1 erfolgte über eine 5'-*Bam*HI- und eine 3'-*Eco*RI-Schnittstelle. Wieder wurden zuvor die Vektoren pBluescript II KS / pGEX-4T-1 mit *Bam*HI/*Eco*RI hydrolysiert. Die weitere Vorgehensweise ist mit der unter 3.2.1.20 identisch. Für die spätere Sequenzierung wurde von den verschiedenen Mutanten eine Maxi-Präparation angefertigt.

3.2.2 Biochemische / Immunchemische Methoden

3.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Colorimetrische Bestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einem Kit der Firma Bio-Rad mit BSA als Standard entsprechend der Vorschrift.

Spektroskopische Methode

Spektroskopisch wurde die Proteinkonzentration nach folgender Formel bestimmt (Layne, 1957):

$$\text{Protein (mg/ml)} = [(1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.2.2.2 Elektrophorese (SDS-PAGE)

- 12,5 %ige Fertiggele der Firma Amersham Pharmacia wurden mit den zu analysierenden Proteinen beladen
- Die Elektrophorese wurde mit dem Multiphor II Elektrophoresesystem gemäß der Anleitung durchgeführt

3.2.2.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die Coomassie-Färbung dient der schnellen Färbung von Proteinen.

Lösungen:

- Fixierungslösung: Ethanol 400ml; Eisessig 100ml; mit destilliertem Wasser auf 1,0 l auffüllen
- Färbelösung: 1 Tablette PhastGel® Blue R , in 400 ml Entfärberlösung unter Rühren bei 60 °C suspendieren, vor dem Verwenden wird die Lösung filtriert
- Entfärberlösung: Ethanol 250 ml; Eisessig 80ml; mit destilliertem Wasser auf 1,0 l auffüllen
- Preservinglösung: Glycerin (87 % w/v) 25 ml; mit Entfärberlösung auf 250 ml auffüllen

Durchführung:

- Gel 30 min in Fixierungslösung tauchen
- Gel 10 min in der Färbelösung belassen
- Färbelösung abgießen und überschüssigen Farbstoff durch waschen mit destilliertem Wasser entfernen
- Gel wird solange mit Entfärberlösung entfärbt, bis der Hintergrund klar wird und die Banden deutlich zu erkennen sind
- Gel 30 min in Preservinglösung geben
- Gel mit Folie verschließen und bei Raumtemperatur trocknen lassen, evtl. überschüssiges Glycerin mit Ethanol entfernen
- Gel für spätere Dokumentation fotografieren

3.2.2.4 Western Blot

Unter Blotten versteht man die Übertragung von großen Molekülen auf eine immobilisierende Membran. So können z. B. Proteine in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran quantitativ unter Beibehalten der Auflösung transferiert werden. Danach können die Proteine auf der Oberfläche der Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

3.2.2.4.1 Elektrophoretischer Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen

Die Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgt mit dem NovaBlot Kit der Firma Amersham Pharmacia.

Lösungen:

- Anoden-Puffer I : (36,3 g Tris-Base, 200 ml Methanol ad 1000 ml ddH₂O) (pH-Wert 10,4)
- Anoden-Puffer II : (3,03 g Tris-Base, 200 ml Methanol ad 1000 ml ddH₂O) (pH-Wert 10,4)
- Kathoden-Puffer : (5,2 g Aminohexansäure, 0,1 g SDS, 200 ml Methanol ad 1000 ml ddH₂O) (pH-Wert 7,6)

Durchführung:

- s. Vorschrift MultiPhor II Elektrophoresesystem/ NovaBlot der Firma Amersham Pharmacia

3.2.2.4.2 Immunfärbung der geblotteten Proteine

Die geblotteten Proteine werden mit einem spezifischen Antikörper detektiert und dieser Primärantikörper mit einem enzymgekoppelten (Alkalische Phosphatase konjugierten) sekundären Antikörper nachgewiesen. Mit dem Vector Substrat wird der Blot entwickelt. Eine enzymatische Reaktion erzeugt dabei ein dunkelviolettes Produkt, das die Banden spezifisch färbt.

Lösungen:

- Blockingpuffer (3 % BSA in PBS)
- Primärantikörper
- Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelter Sekundärantikörper

- Vector® BCIP/ NBT Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV
- TBST (Tris Buffered Saline Tween) (8,76 g NaCl; 1,21 g Tris-Base; 0,5 ml Tween-20; pH-Wert 8,0 ad 1000 ml ddH₂O)
- Alkalische Phosphatase-Puffer (12,10 g Tris-Base; 5,84 g NaCl; 1 g MgCl₂; pH-Wert 9,5 ad 1000 ml ddH₂O)

Durchführung:

- Nitrocellulosemembran 3-4 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im Blockingpuffer inkubieren, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen
- danach dreimal jeweils 15 min in PBS waschen
- bei 4 °C über Nacht im Hybridisierungsbeutel mit dem spezifischen Primärantikörper inkubieren (auf dem Schüttler)
- am nächsten Tag dreimal jeweils 15 min mit TBST-Puffer waschen
- 2 h mit AP-gekoppeltem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubieren
- dreimal jeweils 10 min mit AP-Puffer waschen
- Nitrocellulosemembran in Substrat-Lösung (Dosierung gemäß Anleitung Vector Färbekit) inkubieren, bis Banden sichtbar werden
- Reaktion mit ddH₂O stoppen
- Membran in Folie einschweißen und zur Dokumentation fotografieren

3.2.3 Aufreinigung des rMAM

3.2.3.1 pMAL-Expression-and-Purification-System

3.2.3.1.1 Anzucht der Bakterien und Herstellung des Zell-Lysates

Lösungen:

- LB-Medium
- IPTG (1 mM Endkonzentration)
- Column-Puffer (20 mM Tris-HCl pH-Wert 7,6, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, Lagerung bei 4 °C)

- Lysozym (50 mg/ml in ddH₂O, Lagerung bei 4 °C)

Durchführung:

- 1000 ml LB-Medium mit 10 ml einer Übernachtskultur animpfen
- bei 37 °C in einer Schüttelkultur bis zu einer optischen Dichte bei A_{600nm} von 0,5 wachsen lassen
- Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration)
- bei Raumtemperatur über Nacht in einer Schüttelkultur inkubieren
- Bakterien 10 min bei 3000 g und 4 °C pelettieren
- Zugabe von 5 ml Lyse-Puffer auf 1 g Bakterien-Pellet und resuspendieren
- Zugabe von 40 µl Lysozym pro Milliliter Lösung
- Suspension bei Raumtemperatur solange schütteln, bis die Lösung viskos wird
- zentrifugieren (20 min, 8000 g, 4 °C)
- Überstände abnehmen und bei 4 °C lagern

3.2.3.1.2 Affinitätschromatographie

Lösungen:

- Wasch-Puffer: Column-Puffer (20 mM Tris-HCl pH-Wert 7,6, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, Lagerung bei 4 °C)
- Elutions-Puffer: 10 mM Maltose in Column-Puffer

Durchführung:

Die Affinitätschromatographie über Amylose Resin erfolgt nach Herstellerangaben (New England Biolabs) bei 4 °C.

3.2.3.1.3 Proteolyse des Fusionsproteins

Lösungen:

- Faktor Xa (1mg/ml mit ddH₂O)
- eluiertes MBP-MAM-Fusionsprotein

Durchführung:

- Das Fusionsprotein wird mit der Protease Faktor Xa (5 % /mg Fusionsprotein) bei Raumtemperatur 4 h gespalten
- Die Lagerung des Spaltansatzes erfolgt bei 4 °C.

3.2.3.1.4 Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex G75 (16/60, Amersham Pharmacia) durchgeführt. Ausgangsmaterial waren rMAM-enthaltende Spaltansätze.

Lösungen:

- Lauf-Puffer: Column-Puffer (20 mM Tris-HCl pH-Wert 7,6, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, Lagerung bei Raumtemperatur)

Durchführung:

- Material auf die equilibrierte Gelfiltrationssäule auftragen
- mit Column-Puffer eluieren, Laufgeschwindigkeit 1 ml/min
- 10 µl Aliquots der Fraktionen auf 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel auftragen (3.2.2.2)
- Bestimmung der Proteinkonzentration (3.2.2.1)

3.2.3.2 pGEX-4T-1

3.2.3.2.1 Anzucht der Bakterien und Herstellung des Zell-Lysates

Lösungen:

- LB-Medium
- Ampicillin
- 1 M IPTG
- Lyse-Puffer (50mM NaCl; 50mM Tris-Cl pH-Wert 8,0 ; 1mM EDTA; 1mM Pefablock; 15µl Benzonase; 1% Triton x-100)

Durchführung:

- 500 ml LB-Medium, mit Ampicillin, werden mit 25 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 250 rpm im Schüttler bis zu einer optischen Dichte von 0,6-1,0 (bei λ = 600nm) inkubiert
- Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration)
- Inkubation für 3 h bei 30 °C
- 20 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugieren
- Pellet in 10-15 ml Überstand resuspendieren, in kleine Tubes überführen
- 20 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugieren
- Pellet über Nacht bei -20 °C einfrieren
- Pellet in eiskaltem Lyse-Puffer resuspendieren
- Zellen im Ultraschallbad auf Eis (10 x 10 sec und jeweils 1min Pause) lysieren
- 20 min bei 43000 g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand durch Steri-Cup (Millipore-Amicon) filtrieren und bei -20 °C lagern

3.2.3.2.2 Affinitätschromatographie und Elution des rMAM

Die Affinitätschromatographie erfolgt über eine Glutathion Sepharose™ 4 Fast Flow Gel-Matrix der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Säulen (Econo Column®) werden entsprechend der Arbeitsvorschrift mit dem Gel beschickt. Das an das immobilisierte Glutathion gebundene GST-MAM-Fusionsprotein wird mit Thrombin gespalten, und das rMAM wird direkt von der Säule mit PBS eluiert.

Lösungen:

- PBS
- Elutionspuffer für komplettes GST-MAM-Fusionsprotein: 50mM Tris-Cl pH-Wert 8,0; 10mM reduziertes Glutathion
- Thrombin

Durchführung:

- Die Vorbereitung und Beladung der Säule erfolgt nach der entsprechenden Vorschrift der Firma Amersham Pharmacia Biotech.
- das Bettvolumen beträgt 3-6 ml

- nach dem Auftragen des Zell-Lysates wird mit dem 5-10 fachen Säulenvolumen an PBS gewaschen
- für die Proteolyse wird 1 ml PBS mit 50 U Thrombin pro Bettvolumen auf die Säule gegeben
- die Inkubation erfolgt 3 h bei RT
- das rMAM wird mit PBS eluiert und Fraktionen von 1-3 ml aufgefangen
- die erhaltenen Fraktionen werden sofort in einem Eisbad gekühlt

3.2.3.2.3 Elution des GST-MAM-Fusionsproteins

- nach dem Auftragen des Zell-Lysates wird mit dem 5-10 fachen Säulenvolumen an PBS gewaschen
- das komplette GST-MAM-Fusionsprotein wird mit dem 5-10 fachen Säulenvolumen an Elutionspuffer (reduziertes Glutathion) eluiert
- die erhaltenen Fraktionen werden sofort in einem Eisbad gekühlt

3.2.3.3 Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex G75 (16/60, Amersham Pharmacia) durchgeführt. Ausgangsmaterial waren rMAM-enhaltende Spaltansätze.

Lösungen:

- Lauf-Puffer: Puffer I (10 mM Tris-HCl pH-Wert 8,0; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA, Lagerung bei Raumtemperatur)

Durchführung:

- Material auf die equilibrierte Gelfiltrationssäule auftragen
- mit Puffer I eluieren, Laufgeschwindigkeit 1 ml/min

3.2.4 Arbeiten mit Zellen

3.2.4.1 Analyse der V β -Spezifität

Zur Analyse der V β -Spezifität wurden V β -transfizierte Zelllinien (Prof. Fleischer, Hamburg) verwendet. Gemessen wird die V β -spezifische Aktivierung der T-Lymphocyten

anhand der IL-2 Sekretion. Diese wurde im enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) ermittelt. Als superantigenpräsentierende Zellen (SAGPZ) dienten HLA-transfizierte Zellen oder lymphoblastoide B-Zellen.

Lösungen:

- Kulturmedium (Iscoves DMEM mit 10 % FCS (30 min bei 56 °C inaktiviert), 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin)

Durchführung:

- V β -Transfektanten und SAGPZ der Stammkultur entnehmen
- Zellen separat bei 300 g für 10 min zentrifugieren
- V β -Transfektanten in Kulturmedium aufnehmen und Zellzahl auf 2×10^5 Zellen/ml einstellen
- SAGPZ in Kulturmedium aufnehmen und Zellzahl auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml einstellen
- jeweils 500 μ l einer V β -Transfektanten und einer SAGPZ in eine Vertiefung einer 24-Loch Zellkulturplatte geben
- 250 ng/ml; 500 ng/ml; oder 1000 ng/ml Stimulans zugeben und für 60 h (-66h) bei 37 °C , 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubieren
- Überstände abnehmen und bis zur ELISA-Messung bei -20 °C lagern

3.2.4.2 Durchfluscytometrie

Mittels der Durchfluscytometrie kann spezifisch und sensitiv die Ausprägung zellulärer Oberflächenrezeptoren untersucht werden. Die Zellen werden dazu mit monoklonalen, zuvor mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) markierten Antikörpern gegen die zu untersuchenden Rezeptoren inkubiert. Im Durchfluscytometer kann dann der Anteil rezeptorpositiver Zellen in der Kultur anhand der von den Farbstoffen ausgesendeten Fluoreszenz-Lichtimpulsen ermittelt werden.

Mit dieser Methode wurde die Bindung von MAM und dessen Mutanten an MHC-II-exprimierende Zellen ermittelt. Da es gegen MAM noch keine monoklonalen Antikörper

gibt, wurden die Bindungsstudien mit dem GST-MAM-Fusionsprotein durchgeführt. Dies ist möglich, da der Fusionspartner von MAM nicht an die Zellen bindet. Das Fusionsprotein wurde mit einem unkonjugierten Primärantikörper markiert (anti-GST), der anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert wurde. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der alle Reagenzien, aber kein Fusionsprotein enthielt.

Lösungen:

- 1 % FCS in PBS, pH-Wert 7,4
- unkonjugierter Primärantikörper
- markierter Sekundärantikörper
- MHC-II exprimierende Zellen
- Propidiumiodid

Durchführung:

- Zellkonzentration auf 1×10^6 Zellen einstellen
- Zellen mit 1% FCS waschen
- 1×10^6 Zellen, z. B. Raji in 100 μ l 1 % FCS in PBS mit GST-MAM-Fusionsprotein mischen
- Primärantikörper zugeben
- 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Zellen mit 1% FCS in PBS waschen
- Sekundärantikörper zugeben
- 20min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubieren
- Zellen mit 1% FCS in PBS waschen
- Sediment in 300 μ l 1% FCS in PBS aufnehmen und anschließend auf 400 μ l FCS geben
- Zellen bei 300 g 10 min zentrifugieren und Sediment in 200 μ l Propidiumiodid aufnehmen
- 10 min bei 4°C in der Dunkelheit inkubieren
- mit 1% FCS in PBS gut durchmischen und anschließend durchfluscytometrisch messen

3.2.5 Präsentation von SEA und MAM durch CD-1-positive Zellen

Zur Überprüfung der Superantigen-Präsentation durch CD-1-positive Zellen wurden THP-1- Zellen verwendet, welche mit CD1a, b, c transfiziert waren (Dr. Steffen Stenger Erlangen/ Nürnberg). Zum Vergleich wurden nicht-transfizierte Zellen eingesetzt. Nach der Inkubation wurde die V β -spezifische Aktivierung der T-Lymphocyten anhand der IL-2 Sekretion gemessen.

Lösungen:

- Kulturmedium
- Interferon- γ (IFN- γ)
- SEA wt
- MAM wt
- nicht-transfizierte THP-1-Zellen
- THP-1-Zellen, die CD1a, b und c transfiziert sind
- V β 6.5 exprimierende T-Zellen
- V β 19 exprimierende T-Zellen
- Phytohämagglutinin (PHA)

Durchführung:

- V β -Transfektanten und SAGPZ der Stammkultur entnehmen
- Zellen separat bei 300 g für 10 min zentrifugieren
- V β -Transfektanten in Kulturmedium aufnehmen und Zellzahl auf 1×10^6 Zellen/ml einstellen
- THP-1-Zellen in Kulturmedium aufnehmen und Zellzahl auf 1×10^6 Zellen/ml einstellen
- eine Charge von THP-1-Zellen mit Interferon- γ (IFN- γ) vorstimulieren
- jeweils 500 μ l einer V β -Transfektanten und der entsprechenden THP-1-Transfektanten in eine Vertiefung einer 24-Loch Zellkulturplatte geben
- Stimulans in benötigter Menge zugeben und für 62 h bei 37 °C , 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubieren
- Überstände abnehmen und bis zur ELISA-Messung bei -20 °C lagern

3.2.6 Vitalitätstests

Aufnahme der Wachstumskurven von *E. coli*, welche verschiedene Superantigene exprimieren

Lösungen:

- LB-Medium
- Ampicillin (Amp.)
- LB-Amp.-Platten

Durchführung:

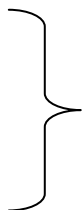
- 80 ml LB-Medium + Ampicillin werden mit 1 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Klones angeimpft
- es werden drei Superantigene, TSST-1, MAMwt, SEAwT und als Kontrolle der Leervektor eingesetzt
- die OD-Werte der Kulturansätze werden auf einen einheitlichen Wert eingestellt
- die Ansätze werden bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert
- nach 2,5 h wird mit IPTG induziert
- alle 30 min wird die optische Dichte im Photometer gemessen
- alle 60 min werden jeweils 100 µl Kultur-Lösung entnommen und seriell verdünnt
- mehrere Verdünnungsstufen werden parallel auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert
- die Messreihe wird 8 h durchgeführt
- abschließend werden die erhaltenen Kolonien ausgezählt und mit den OD-Werten korreliert

3.2.7 Test auf Protease-Aktivität von MAM

Lösungen:

- PBS
- BSA-Lösung (1 mg / ml BSA in PBS)

Durchführung:

- 25 µl BSA-Lösung werden mit je: 250 ng
500 ng
1000 ng
2000 ng
- 

MAM bei 37 °C und
parallel bei
Raumtemperatur für 3h
inkubiert
- jeweils ein Kontrollansatz ohne MAM wird ebenfalls inkubiert
 - abschließend wird mit Laemmli-Puffer versetzt und bei 4 °C gelagert
 - zur Kontrolle werden die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt

3.2.8 Test auf DNase-Aktivität von MAM

Material:

- genomische DNA: BJAB
- Aqua ad injectabilia (Braun, Melsung)
- Puffer RDD (QIAGEN, Hilden)
- NY-5 (natürliches SPEA im Komplex mit Streptodornase (DNase))
- MAMwt
- TSST-1

Durchführung:

- für 3 h werden insgesamt 28 × 1,5 ml Reaktionsgefäße vorbereitet
- 3 µg genomische DNA (BJAB) werden jeweils mit 5 ng NY-5; 250 und 500 ng MAMwt, 250 und 500 ng TSST-1, pro Ansatz versetzt
- pro Ansatz werden 8 µl Puffer RDD hinzu pipettiert
- mit Wasser wird auf 35 µl aufgefüllt
- ein Kontrollansatz ohne Protein wird mitgeführt

- bei 37 °C wird inkubiert und nach jeweils 30 min. wird je ein Probenansatz entnommen, mit Gel-Auftragungspuffer versetzt und bei 4 °C oder -20 °C gelagert
- zur Kontrolle werden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt
- abschließend werden die Gele fotografiert

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung des MAM-Gens

Für die vorgesehene NMR-Spektroskopie und alle weiteren strukturellen Untersuchungen wurde eine ausreichende Menge an Protein benötigt.

Da MAM in *E. coli* effizient exprimiert werden sollte, war eine Anpassung der Codons an die Codon-Auswahl dieses Wirtes erforderlich. Diese Anpassung erfolgte mit Hilfe einer Tabelle (T. A. Brown 1989). Gleichzeitig wurde der G/C-Gehalt in der kodierenden Sequenz auf 47 % erhöht (vgl. Abbildung 2). Dabei wurde die natürliche Proteinsequenz nicht verändert. Das neue MAM-Gen, mit der durch die eigene Adaption optimierten Sequenz wurde in Kooperation mit GenExpress in den Vektor pBluescript II KS kloniert (siehe Anhang I, 7.1.1). Nach dem Sequenzalignment mit der eigenen Vorlage und der kompletten Homologie beider Sequenzen wurde das Gen in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Es wurden neben verschiedenen Vektoren auch unterschiedliche *E. coli*-Stämme eingesetzt, um die geeigneten Bedingungen für eine effiziente Expression zu schaffen.

ATG	AAA	CTT	AGA	GTT	GAA	AAT	CCT	AAA	AAA	GCT	CAA	AAG	CAT	TTT	GTG	CAA	AAT	TTA	AAT	AAT	GTT
ATG	AAA	CTG	CGT	GTG	GAA	AAC	CCG	AAA	AAA	GCG	CAG	AAA	CAC	TTC	GTG	CAG	AAC	CTG	AAC	AAC	GTG
m	k	l	r	v	e	n	p	k	k	a	q	k	h	f	v	q	n	l	n	n	v
GTA	TTT	ACT	AAT	AAA	GAG	CTT	GAA	GAT	ATC	TAC	AAT	TTA	AGT	AAT	AAA	GAA	GAA	ACA	AAA	GAA	GTA
GTG	TTC	ACC	AAC	AAA	GAA	CTG	GAA	GAC	ATC	TAC	AAC	CTG	TCC	AAC	AAA	GAA	GAA	ACC	AAA	GAA	GTG
v	f	t	n	k	e	l	e	d	i	y	n	l	s	n	k	e	e	t	k	e	v
TTA	AAA	TTG	TTT	AAA	TTG	AAG	GTC	AAC	CAA	TTT	TAT	AGA	CAT	GCT	TTT	GGT	ATA	GTG	AAT	GAC	TAC
CTG	AAA	CTG	TTC	AAA	CTG	AAA	GTG	AAC	CAG	TTC	TAC	CGT	CAC	GCG	TTC	GGT	ATC	GTG	AAC	GAC	TAC
l	k	l	f	k	l	k	v	n	q	f	y	r	h	a	f	g	i	v	n	d	y
AAT	GGA	CTT	CTT	GAA	TAC	AAA	GAA	ATT	TTT	AAT	ATG	ATG	TTT	TTA	AAA	TTA	AGC	GTT	GTG	TTT	GAC
AAC	GGT	CTG	CTG	GAA	TAC	AAA	GAA	ATC	TTC	AAC	ATG	ATG	TTC	CTG	AAA	CTG	TCC	GTG	GTG	TTC	GAC
n	g	l	l	e	y	k	e	i	f	n	m	m	f	l	k	l	s	v	v	f	d
ACA	CAA	CGT	AAA	GAG	GCA	AAT	AAC	GTC	GAA	CAA	ATC	AAA	AGA	AAT	ATC	GCT	ATT	TTA	GAT	GAA	ATA
ACC	CAG	CGT	AAA	GAA	GCG	AAC	AAC	GTG	GAA	CAG	ATC	AAA	CGT	AAC	ATC	GCG	ATC	CTG	GAC	GAA	ATC
t	q	r	k	e	a	n	n	v	e	q	i	k	r	n	i	a	i	l	d	e	i
ATG	GCA	AAA	GCA	GAT	AAC	GAT	TTA	TCT	TAC	TTT	ATA	TCT	CAG	AAT	AAG	AAT	TTT	CAA	GAG	TTA	TGA
ATG	GCG	AAA	GCG	GAC	AAC	GAC	CTG	TCC	TAC	TTC	ATC	TCC	CAG	AAC	AAA	AAC	TTC	CAG	GAA	CTG	TGG
m	a	k	a	d	n	d	l	s	y	f	i	s	q	n	k	n	f	q	e	l	w
GAT	AAA	GCT	GTC	AAA	CTA	ACT	AAA	GAA	ATG	AAA	ATA	AAA	CTT	AAA	GGC	CAA	AAA	CTA	GAT	CTT	CGT
GAC	AAA	GCG	GTG	AAA	CTG	ACC	AAA	GAA	ATG	AAA	ATC	AAA	CTG	AAA	GGT	CAG	AAA	CTG	GAC	CTG	CGT
d	k	a	v	k	l	t	k	e	m	k	i	k	l	k	g	q	k	l	d	l	r
GAT	GGT	GAA	GTT	GCA	ATA	AAC	AAA	GTA	AGA	GAA	TTA	TTT	GGC	AGC	GAC	AAA	AAT	GTA	AAA	GAG	CTT
GAC	GGT	GAA	GTG	GCG	ATC	AAC	AAA	GTG	CGT	GAA	CTG	TTT	GGT	TCC	GAC	AAA	AAC	GTG	AAA	GAA	CTG
d	g	e	v	a	i	n	k	v	r	e	l	f	g	s	d	k	n	v	k	e	l
TGA	TGA	TTT	AGA	TCT	CTT	CTA	GTA	AAA	GGT	GTT	TAC	CTT	ATA	AAA	CGC	TAT	TAC	GAA	GGT	GAT	ATT
TGG	TGG	TTC	CGT	TCC	CTG	CTG	GTG	AAA	GGT	GTG	TAC	CTG	ATC	AAA	CGT	TAC	TAC	GAA	GGT	GAC	ATC
w	w	f	r	s	l	l	v	k	g	v	y	l	i	k	r	y	y	e	g	d	i
GAA	CTT	AAA	ACG	ACA	TCG	GAT	TTT	GCA	AAA	GCT	GTT	TTT	GAA	GAT	TAA						
GAA	CTG	AAA	ACC	ACC	TCC	GAC	TTC	GCG	AAA	GCG	GTG	TTC	GAA	GAC	TAA						
e	l	k	t	t	s	d	f	a	k	a	v	f	e	d							

Abbildung 2: Gegenüberstellung der natürlichen (oben) und optimierten (unten) Gensequenz des *Mycoplasma arthritidis* Superantigens MAM. Veränderte Triplets sind grau unterlegt.

4.1.1 Klonierung des MAM-Gens in den Expressionsvektor pMalc2

Das neue MAM-Gen wurde zunächst in den pMalc2-Vektor kloniert, da dieses Expressionssystem erfolgreich in der Arbeitsgruppe etabliert war (Abbildung 3). Schon 1997 beschrieben Knudtson et al. die rekombinante Herstellung von MAM durch den Expressionsvektor pMalc2 als Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein (MBP) (Knudtson et al., 1997). Das Fusionsprotein kann aufgrund der Bindung von MBP (aus *E. coli*) an Amylose affinitätschromatographisch gereinigt werden. Nach der Reinigung des Fusionsproteins kann die MBP-Domäne durch den Faktor Xa abgespalten werden. Im Gegensatz zu Knudtson (Knudtson et al., 1997), sollte MAM ohne zusätzliche Aminosäuren am N- bzw. C-Terminus exprimiert werden. Daher wurde das MAM-Gen in den Polylinker über die Erkennungssequenzen für *Eco* RI und *Bam* HI direkt hinter die Schnittstelle des Faktor Xa kloniert. Um eine Vergleichsmöglichkeit zu besitzen, wurde zunächst das MAM mit der alten Basensequenz im pMalc2-Vektor exprimiert (vgl. Abbildung 4).

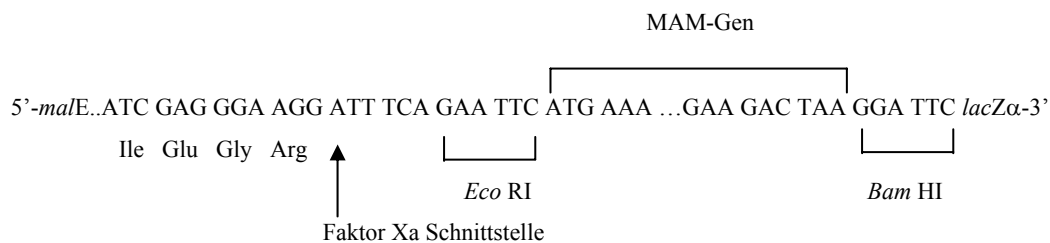


Abbildung 3: Klonierung des neuen MAM-Gens in den Expressionsvektor pMalc2

4.1.2 Affinitätschromatographie

Nach der Lyse der Bakterien wurde das Zell-Lysat auf eine Amylose-Säule aufgetragen, und so das rekombinante MBP-MAM aufgereinigt. Im Anschluss an das Waschen wurde das MBP-MAM-Fusionsprotein mit Maltose eluiert.



Abbildung 4: Eluierte Fraktionen des MBP-MAM-Fusions-Proteins (alte Basensequenz)

In einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel wurden die Fraktionen aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung dargestellt. Spur 1: leer; Spur 2: Molekulargewichtsmarker; Spur 3-11: eluierte Fraktionen mit dem MBP-MAM-Fusionsprotein (freies MBP befand sich ebenfalls im Eluat).

4.1.3 Gelfiltration von rMAM

Durch Inkubation des MBP-MAM-Fusionsproteins mit dem Faktor Xa bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 4h konnte MBP vom MAM getrennt werden.

Nach dem Abspalten des MBP durch den Faktor Xa vom MAM wurde der Spaltansatz zur Aufreinigung des MAM auf FPLC-Gelfiltrationssäulen (Amersham) aufgetragen.

Den Erfolg der Aufreinigung und die qualitative Ausbeute an rekombinantem Protein zeigt die Abbildung 5.

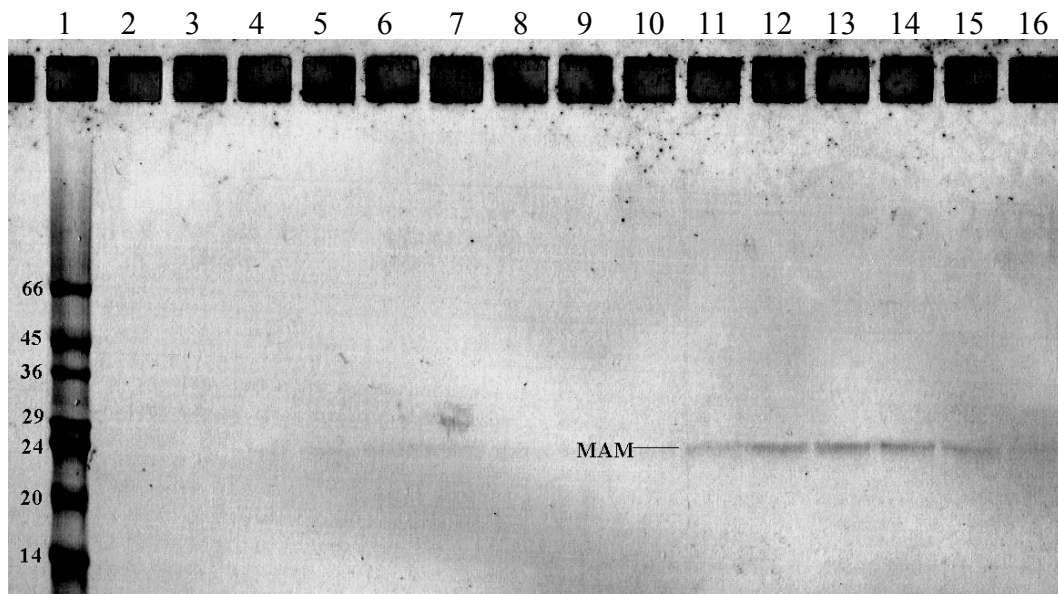


Abbildung 5: Aufgereinigtes rMAM nach Spaltung durch den Faktor Xa

Nach elektrophoretischer Trennung wurden die Banden der Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Spur 1: Molekulargewichtsmarker; Spur 2-16: eluierte Fraktionen (ab Spur 11 rekombinantes Protein zu erkennen)

4.1.4 Klonierung des MAM-Gens in den Expressionsvektor pGEX-4T-1

Die rekombinante Expression von MAM als GST-Fusionsprotein (Glutathion-S-Transferase, aus *Schistosoma japonicum*) wurde in der Arbeitsgruppe neu eingerichtet (Galuschka, 2000).

Da sich die Überexpression mit dem GST-Fusionssystem als ökonomisch sinnvolle Alternative erwiesen hatte, wurde das neue MAM-Gen parallel in das pGEX-Plasmid kloniert. Aufgrund der gesammelten Daten wurde MAM nur noch in dem pGEX-System exprimiert. Der Ligand für die Affinitätsreinigung ist hier immobilisiertes Glutathion. Nach der Reinigung kann der GST-Fusionspartner mit Thrombin bei Raumtemperatur abgespalten werden. Das MAM-Gen wurde auch in diesen Expressionsvektor über die *Bam* HI- (am 5'-Ende) und die *Eco* RI- (am 3'-Ende) Schnittstellen einkloniert. Daher befindet sich die Thrombinschnittstelle zwischen dem C-Terminus der Glutathion-S-Transferase und dem N-Terminus von MAM. Das rekombinante MAM besaß nach Spaltung mit Thrombin zwei zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus: Glycin und Serin (Abbildung 6).

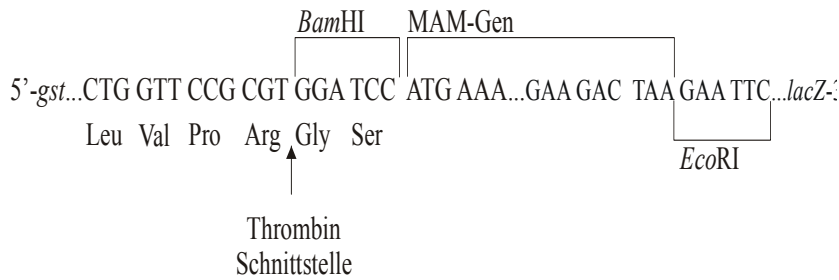


Abbildung 6: Klonierung von mam in den Vektor pGEX-4T-1

4.1.5 Transformation von *E. coli*- (DH5 α ; BL21; SG13009; M15) Stämmen mit dem rekombinanten Plasmid pGEX-4T-1

Zunächst wurde der *E. coli* Stamm DH5 α transformiert. Darüber hinaus wurde der Protease-defiziente *E. coli* Stamm BL21 eingesetzt, um eine effiziente Transformation und eine hohe Expression zu erzielen.

Das Zellwachstum der Wirtszellen kann durch die Expression von heterologen Proteinen herabgesetzt werden. Genprodukte, die in geringer Konzentration die Wachstumsrate der Wirtszellen beeinflussen, mit der DNA interagieren, oder den Elektronentransport stören, werden als toxisch angesehen. Besonders Proteine mit hydrophoben Regionen haben oft einen toxischen Effekt auf die Wirtszellen, da diese mit dem vitalen Membransystem des Wirtes interagieren. Die geringe Expression des MAM in *E. coli* sprach dafür, dass das MAM-Protein toxisch für die Wirtszellen ist. Daher wurde der pGEX-Vektor zusätzlich in die *E. coli* Stämme SG13009 und M15 transformiert, da diese für die Expression hydrophober und toxischer Proteine besonders geeignet sind.

4.1.6 Expression und Reinigung des rekombinanten MAM

Nach Anzucht und Induktion wurden die Bakterien lysiert. Zur Aufreinigung wurde das Zell-Lysat auf Säulen mit einer Glutathion Sepharose™ 4 Fast Flow Gel-Matrix aufgetragen.

Das gereinigte Fusionsprotein wurde als komplettes GST-MAM-Fusionsprotein mit reduziertem Glutathion eluiert oder auf der Säule mit Thrombin gespalten und das rekombinante MAM dann mit PBS eluiert. Zur Analyse wurden die einzelnen Fraktionen auf ein 12,5% Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe Abbildung 7, Abbildung 8 und

Abbildung 9). Das rekombinante MAM besitzt ein Molekulargewicht von 25,1 kD und das der Glutathion S-Transferase liegt bei 26 kD. Für das komplette GST-MAM-Fusionsprotein ergibt sich daher ein Molekulargewicht von 51,1 kD. Darüber hinaus kann GST ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 58,5 kD bilden.

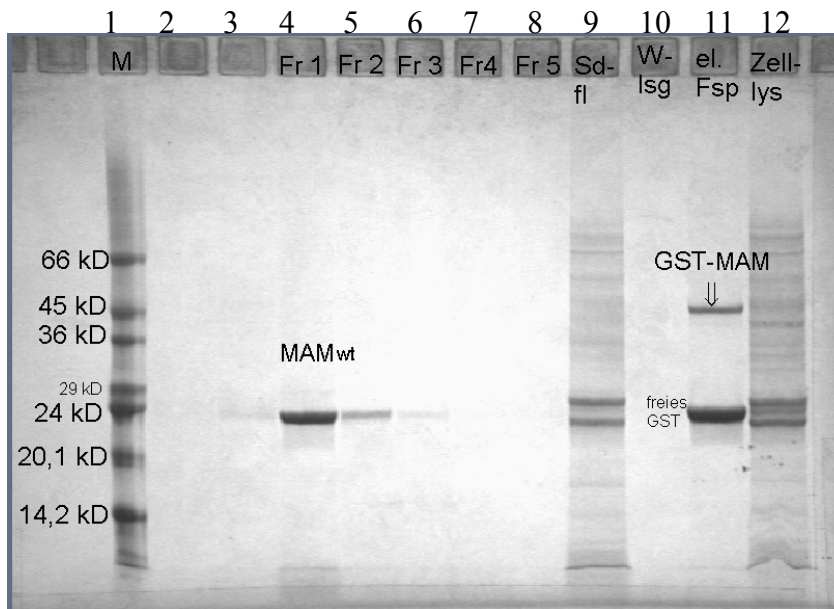


Abbildung 7: Aufgereinigtes MAM, in *E. coli* DH5 α exprimiert

Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden in einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung nachgewiesen. Spur 1: Molekulargewichtsmarker; Spur 3: Vorlauf; Spur 4-8 eluiertes MAM nach Spaltung mit Thrombin; Spur 9: Säulendurchlauf nach dem Auftragen der Proben; Spur 10: Fraktion nach dem Waschen mit PBS; Spur 11: mit red. Glutathion eluiertes GST-MAM-Fusionsprotein; Spur 12: aufgetragenes Zell-Lysat

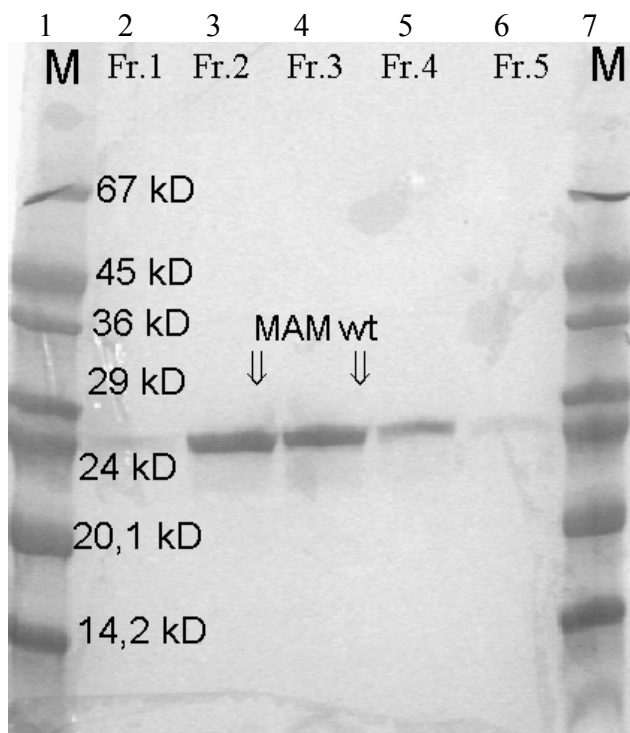


Abbildung 8: Aufgereinigtes MAM, in *E. coli* BL21 exprimiert

Die eluierten Fraktionen wurden zur Kontrolle auf ein 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Coomassie-Färbung wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Spur 1 und 7 Molekulargewichtsmarker; Spur 2-6 eluierte Fraktionen, nachdem mit Thrombin gespalten wurde

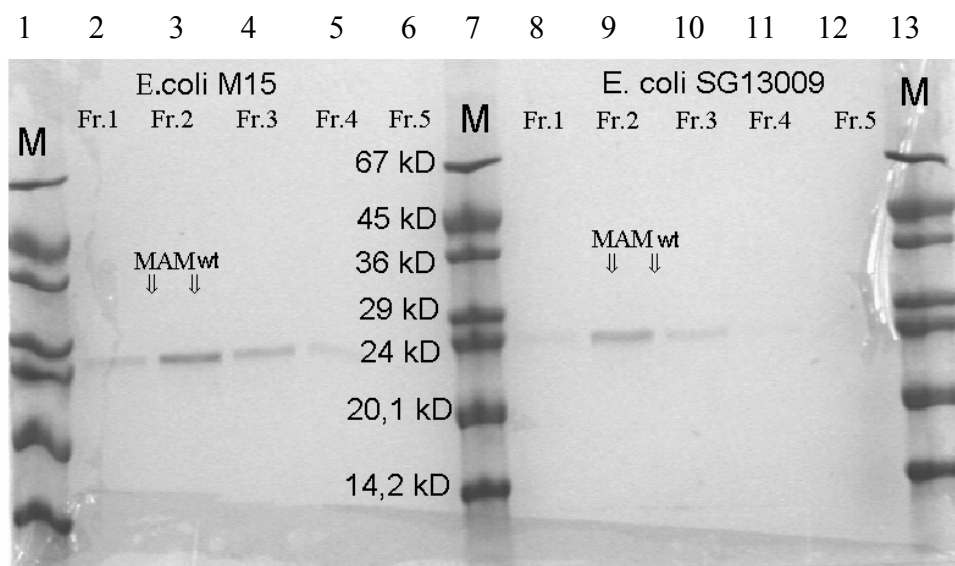


Abbildung 9: Aufgereinigtes MAM, in *E. coli* M15 und SG 13009 exprimiert

Die einzelnen Fraktionen wurden in einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie gefärbt. Spur 1, 7 und 13: Molekulargewichtsmarker; Spur 2-6: eluiertes MAM aus M15; Spur 8-12: eluiertes MAM aus SG 13009

Das rekombinante MAM besitzt ein Molekulargewicht von 25,1 kD und das der Glutathion S-Transferase liegt bei 26 kD (je nach Modifikation kann es auch bei 29 kD liegen), (Abbildung 7, Abbildung 8 und Abbildung 9). Aus den Zahlenwerten ist ersichtlich, dass beide Proteine ein ähnliches Molekulargewicht besitzen. Daher sollte in einem Western-Blot verifiziert werden, ob es sich bei dem eluierten Protein auch wirklich um rekombinantes MAM handelt. Bisher gibt es keinen Primärantikörper gegen MAM, deshalb wurde der Western-Blot mit einem anti-GST Antikörper durchgeführt. Zur Kontrolle wurde kommerzielles- und eluiertes GST mit auf das Gel aufgetragen. Da der Western-Blot negativ ausfiel, konnte so gezeigt werden, dass es sich bei dem eluierten Protein tatsächlich um MAM handelt (vgl. Abbildung 10).

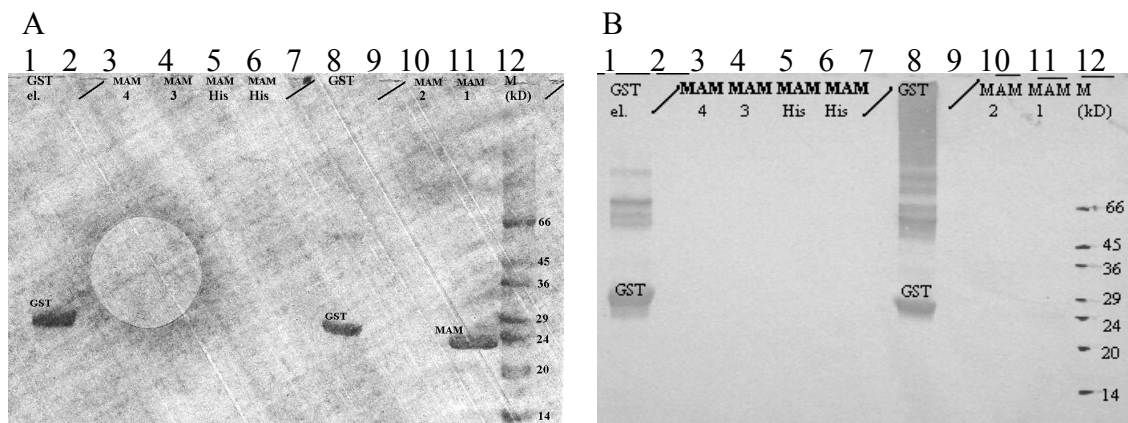


Abbildung 10: Western-Blot der Proteine, welche in *E.coli* DH5α exprimiert wurden

- (A) Ponceau-Färbung der Proteine nach dem Blotten.
 Spur 1: eluiertes GST; Spur 2, 7, 9: leer;
 Spur 3, 4, 5, 6, 10, 11: rMAM; Spur 8: GST;
 Spur 12: Molekulargewichtsmarker
- (B) Entwickelter Blot nach Inkubation mit Antikörper
 Spur 1: eluiertes GST; Spur 2, 7, 9: leer;
 Spur 3, 4, 5, 6, 10, 11: rMAM; Spur 8: GST;
 Spur 12: Molekulargewichtsmarker

Der Antikörper gegen GST detektierte dieses nur in den Spuren 1 und 8 (Abbildung 10). Dagegen handelte es sich bei der Probe in Spur 11 eindeutig um rekombinantes MAM, da die Bande in der Ponceau-Färbung sichtbar war, aber der Antikörper hier nicht reagierte. Das in *E. coli* BL21 exprimierte Protein wurde ebenfalls überprüft. Als Kontrolle wurde wieder kommerzielles GST eingesetzt.

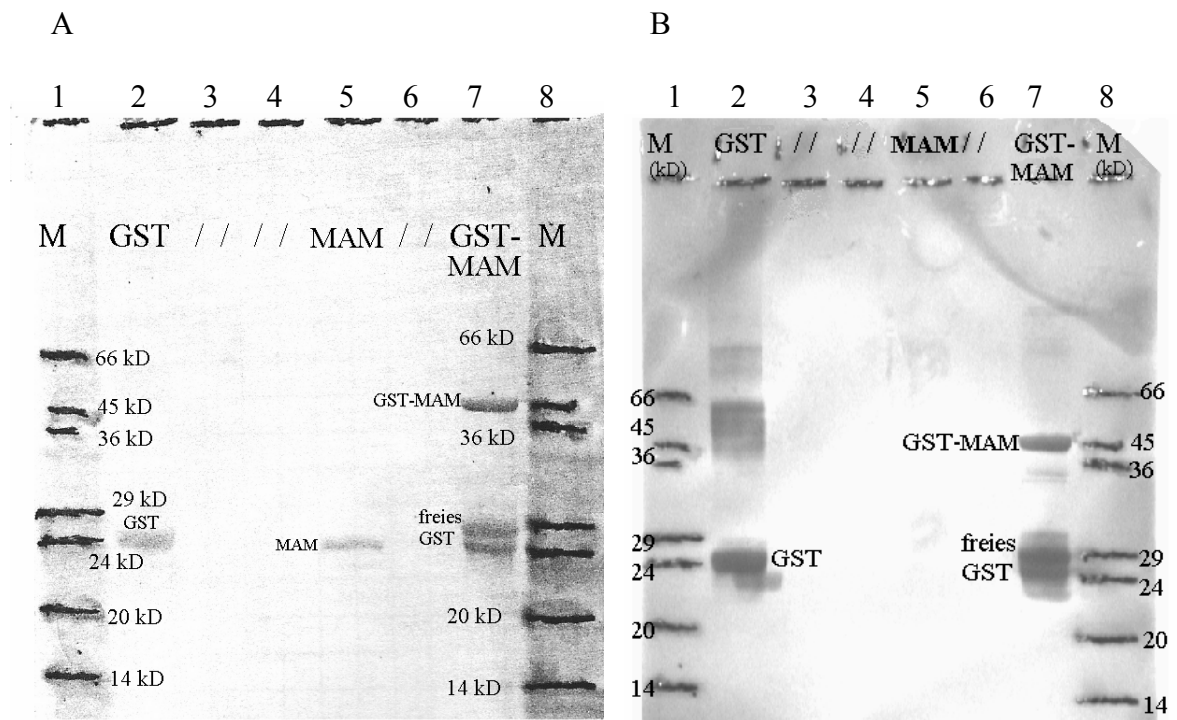


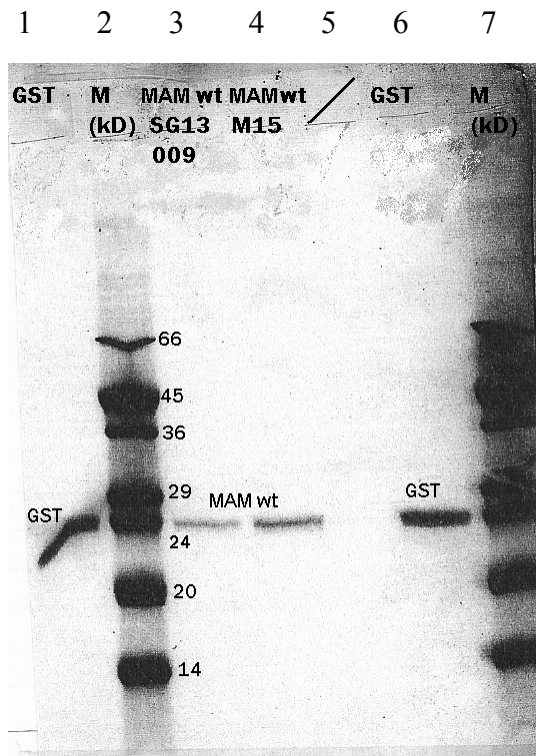
Abbildung 11: Western-Blot von rMAM-Proben, welche in *E. coli* BL21 exprimiert wurden

- (A) Ponceau-Färbung der Proteine nach dem Blotten.
 Spur 1 und 8: Molekulargewichtsmarker;
 Spur 2: GST; Spur 3, 4, 6: leer; Spur 5: MAM;
 Spur 7: GST-MAM
- (B) Entwickelter Blot nach Inkubation mit Antikörper.
 Spur 1 und 8: Molekulargewichtsmarker;
 Spur 2: GST; Spur 3, 4, 6: leer; Spur 5: MAM;
 Spur 7: GST-MAM

Durch den Blot konnte auch hier die erfolgreiche Expression von MAM in dem Stamm BL21 belegt werden. Es wurde durch den Antikörper nur das GST detektiert, so dass es sich bei der Fraktion in Spur 5 (Abbildung 11) um rekombinantes MAM handelt. Durch die Expression in BL21 konnte die Ausbeute an rekombinanten Protein gesteigert werden. So lag die Konzentration nach der Aufarbeitung bei der Probe aus dem *E. coli* Stamm BL21 bei 141 µg/ml, während die Konzentration bei der Probe aus *E. coli* DH5α nur 101 µg/ml betrug. Insgesamt konnten bei der Expression in *E. coli* BL21 aus 2 l Bakterienkultur 760 µg rekombinantes Protein isoliert werden.

Schließlich wurden die in den *E. coli* Stämmen M15 und 13009 exprimierten Proteine im Western-Blot analysiert.

A



B



Abbildung 12: Western-Blot von Proteinproben, welche in den *E. coli* Stämmen M15 und 13009 exprimiert wurden

(A) Ponceau-Färbung der Proteine nach dem Blotten.
 Spur 1 und 6: Kontrolle mit GST;
 Spur 2 und 7: Molekulargewichtsmarker;
 Spur 3: rMAM in SG 13009;
 Spur 4: rMAM in M15; Spur 5: leer

(B) Entwickelter Blot nach Inkubation mit Antikörper.
 Spur 1 und 6: Kontrolle mit GST;
 Spur 2 und 7: Molekulargewichtsmarker;
 Spur 3: rMAM in SG 13009;
 Spur 4: rMAM in M15; Spur 5: leer

Auch in diesen Stämmen konnte die erfolgreiche Expression von MAM nachgewiesen werden. Der Blot zeigt leichte Kontaminationen durch freies GST in den Spuren 3 und 4. Den Hauptbestandteil bildet jedoch rekombinantes MAM. Die Kontrollen durch kommerzielles GST wurden vom Antikörper wieder eindeutig erkannt (Abbildung 12). Trotz dieser Maßnahmen konnte bei weiteren Kulturansätzen die Expression von GST-MAM unter gleichen Bedingungen nicht erhöht werden.

Aufgrund der erhaltenen Daten wurde das MAM für die weiteren Versuche ausschließlich in *E. coli* BL21 exprimiert. Bei der Aufreinigung des MAM über FPLC-Gelfiltrationssäulen (Amersham) traten stets hohe Verluste an rekombinantem Protein auf. Um bei der Aufreinigung den Verlust an rekombinantem Protein zu minimieren, sollte das exprimierte MAM im weiteren Verlauf nur durch Affinitätschromatographie isoliert werden. Der zusätzliche Schritt über die Gelfiltration sollte unterbleiben.

Daher sollte qualitativ in einem Western-Blot untersucht werden, ob Thrombinreste nach dem Spalten auf der Säule in größerem Umfang die eluierten Fraktionen kontaminieren.

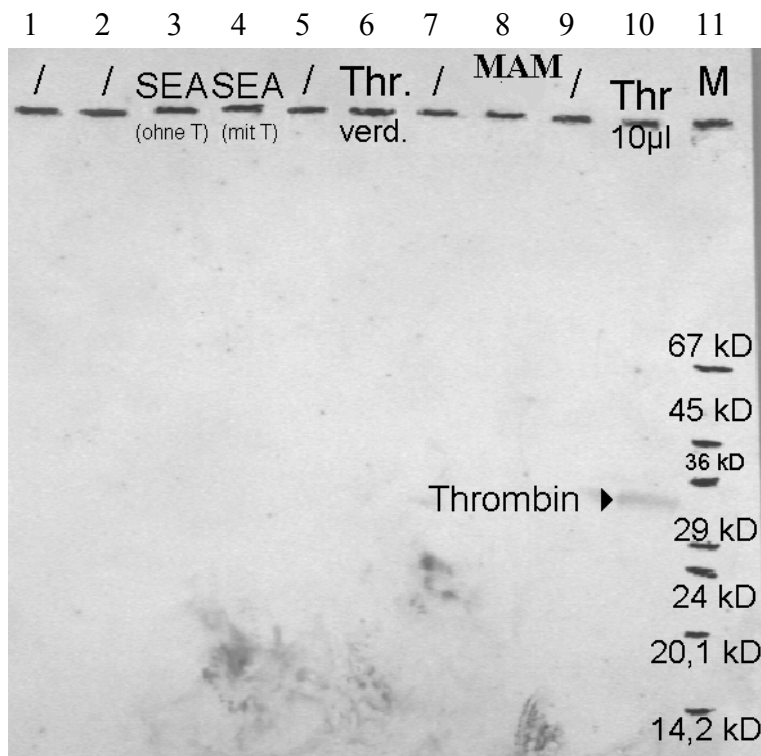


Abbildung 13: Western-Blot mit spezifischem Antikörper gegen Rinder-Thrombin

Entwickelter Blot nach Inkubation mit spezifischem Antikörper gegen Thrombin.

Spur 1, 2, 5, 7 und 9: leer; Spur 3 und 4: zwei SEA-Fractionen wurden zur Kontrolle mitaufgetragen;

Spur 6 und 10: enthalten als Positiv-Kontrolle Thrombin;

Spur 8: MAM-Fraktion nach Proteaseverdau des GST-MAM-Fusionsproteins;

Spur 11: Molekulargewichtsmarker

Das Molekulargewicht der Thrombinprotease aus dem Rind liegt angenähert bei 37 kD.

Der Antikörper reagierte nur in der Spur 10, in der sich konzentriertes Thrombin zur Kontrolle befand (Abbildung 13). Die Menge an Thrombin in den eluierten MAM-Fractionen und in den Kontrollansätzen mit geschnittenem SEA und komplettem GST-SEA fällt unter die Nachweisgrenze, so dass der Antikörper hier kein Thrombin detektierte. Der verbleibende Rest an Thrombin konnte daher in den weiteren Untersuchungen vernachlässigt werden.

4.2 Gerichtete Mutagenese

Insgesamt wurden 14 Mutationen durchgeführt.

Nachfolgend sind die Teil-Aminosäuresequenzen des MAM aufgeführt, welche die zu mutierenden Reste enthalten (Abbildung 14).

14 28 30 31 39 40 43 58
 NH₂...QKHFVQNLNNVFTNKLEEDIYNLSNKEETKEVLKLFKLKVNQFYRHAFAF...-COOH
 H14A A
 E28A A
 E28Q Q
 E30A A
 E30Q Q
 D31A A
 D31N N
 E39A A
 E39Q Q
 E40A A
 E40Q Q
 E43A A
 E43Q Q
 H58A A

Abbildung 14: Sequenz mit den zu mutierenden Stellen.

Die Positionen an denen die Aminosäuren substituiert wurden, sind grau unterlegt.

Für MAM wurde wie schon bei einigen anderen Superantigenen eine zinkabhängige Bindungsstelle an der HLA-DR- β -Kette postuliert (Driessen et al., 1995b; Bernatchez et al. 1997). MAM sollte deshalb über ein ähnliches Zinkbindemotiv wie die anderen Superantigene verfügen. Das Zinkbindemotiv wird durch ein bis zwei Histidinreste gebildet. Dies entspricht beim MAM den Resten His 14 und His 58. Den dritten Liganden bildet entweder ein Aspartat- oder Glutamatrest. Die dritte Aminosäure befindet sich den bisherigen Ergebnissen folgend zwischen den beiden Histidinresten. Dafür kommen die Glutamatreste 28, 30, 39, 40 und 43 oder der Aspartatrest 31 in Frage. Daher wurden diese potentiellen Bindungsstellen wie folgt mutiert: H14A; H58A; D31A; E28A; E30A; E39A; E40A; E43A. Um weitere Interaktionen zu charakterisieren, wurden der Aspartatrest und die Glutamatreste zusätzlich zu Asparagin bzw. Glutamin mutiert.

4.2.1 Herstellung der MAM-Mutanten

Zur Herstellung der Mutanten wurde auf die Methode von Ho et al. (1989) zurückgegriffen.

Diese ist in Abbildung 1 (Seite 35) schematisch dargestellt.

Um die Mutation innerhalb der Amplikons einzuführen, wurde zunächst in zwei getrennten PCRs das Template so amplifiziert, dass die zwei inneren Primer, welche die Mutation tragen, die Überlappung erzeugten. Die Produkte wurden dann in einem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Fragmente aus der Agarose isoliert (vgl. 3.2.1.11). Für den finalen Lauf wurden die Produkte vereinigt und mit den beiden äußeren Primern amplifiziert. Durch die komplementären Enden konnten die PCR-Produkte assoziieren und wurden durch die so gebildete Überlappung zum Endprodukt verlängert. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und mit den beiden Restriktionsenzymen *Eco* RI und *Bam* HI hydrolysiert. Danach wurden die Produkte in den vorbereiteten Vektor pGEX-4T-1 über die kohäsiven Enden kloniert. Alle erhaltenen Mutanten wurden dann in *E. coli* BL21 transformiert. Potentiell positive Klone wurden über eine PCR identifiziert (vgl. 3.2.1.14). Die positiven Klone wurden einer weiteren Kontrolle unterzogen. Dazu wurde durch eine Mini-Präparation die Plasmid-DNA isoliert und nach einer Restriktion mit zwei Endonukleasen wurde die Größe des Inserts mit Hilfe eines Agarosegels überprüft. Um ausreichend Material für die Sequenzierung bereit zu stellen, wurden die positiven Klone erneut angezüchtet und die Plasmid-DNA durch eine Maxi-Präparation isoliert. Abschließend wurde die DNA der erhaltenen Mutanten sequenziert und durch Alignment auf Richtigkeit überprüft (Sequenzierungsdaten siehe Anhang III, 7.3.1). Stellvertretend für die übrigen Mutationen werden hier die Produkte H14A und H58A gezeigt. In den beiden ersten PCR-Läufen (siehe 3.2.1.13) wurde die Überlappung erzeugt (vgl. Abbildung 15).

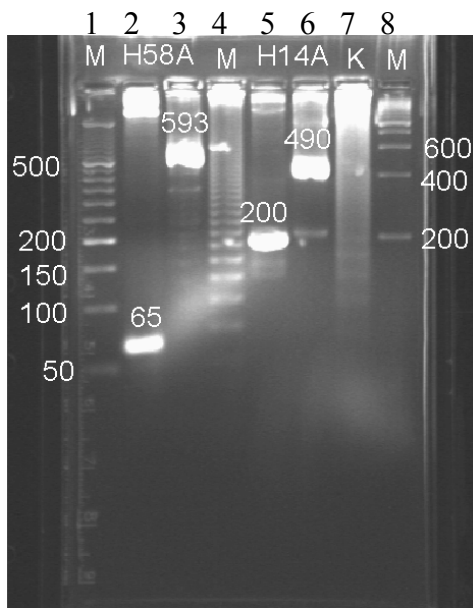


Abbildung 15: Produkte aus den beiden ersten PCRs

Die PCR-Produkte wurden über ein 1% Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1: Molekulargewichtsmarker 50 bp;

Spur 2: Produkt AB H58A;

Spur 3: Produkt CD H58A;

Spur 4: Molekulargewichtsmarker;

Spur 5: Produkt AB H14A;

Spur 6: CD H14A;

Spur 7: Negativ- Kontrolle;

Spur 8: Molekulargewichtsmarker 200 bp

Nach erfolgter PCR wurden die erhaltenen Produkte auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Produkte wurden aus dem Gel isoliert und durch eine weitere PCR zum Endprodukt fusioniert (vgl. Abbildung 16).

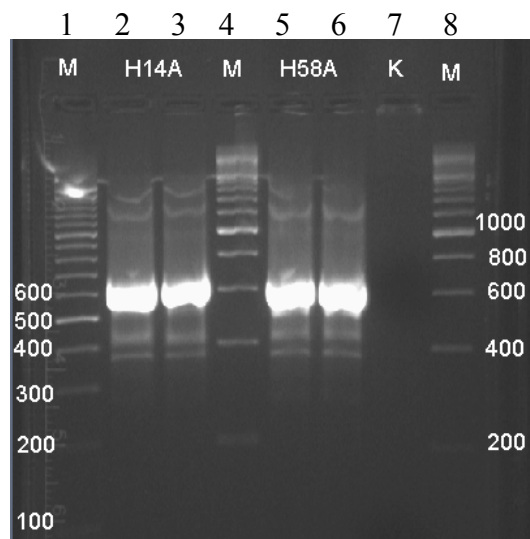


Abbildung 16: Produkte des finalen PCR-Laufes.

Spur 1: Molekulargewichtsmarker 100bp;

Spur 2 und 3: Endprodukt H14A; Spur 4:

Molekulargewichtsmarker 200 bp; Spur 5

und 6: Endprodukt H58A; Spur 7: Negativ-

Kontrolle; Spur 8: Molekulargewichtsmarker

200 bp

In der Abbildung 16 erkennt man, dass die Bande der Endprodukte im richtigen Bereich von 642 bp liegt. Die Vorprodukte konnten also erfolgreich fusioniert werden. Nach der Isolierung aus dem Gel erfolgte die Restriktion der Endprodukte und anschließend die Ligation in den Vektor pGEX-4T-1. Die Plasmide wurden in *E. coli* BL21 transformiert. Je 10 Klone wurden von den entsprechenden Platten abgeimpft und nach erneuter Anzucht (vgl. 3.2.1.1) in einer PCR (Hawker und Billadello, 1993) mit den äußeren Primern überprüft (Abbildung 17).

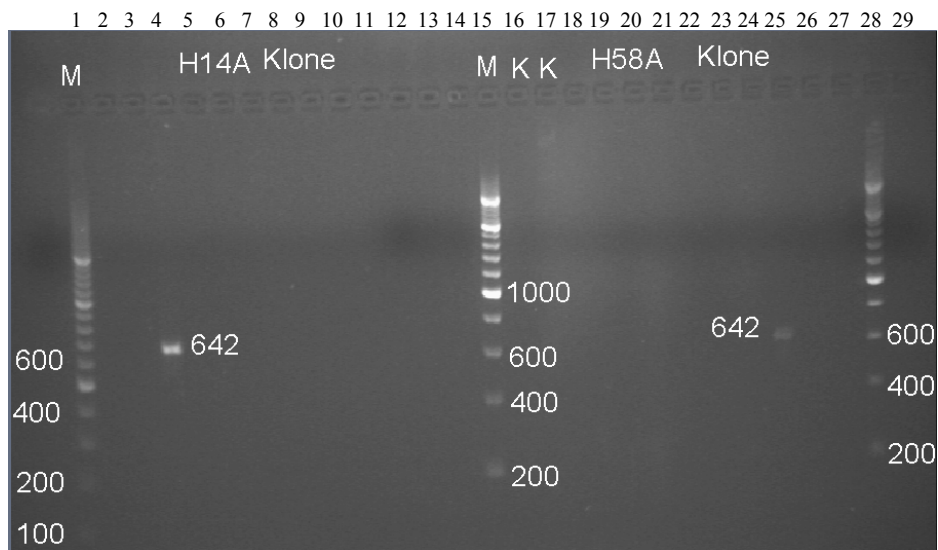


Abbildung 17: Austesten der einzelnen Klone durch PCR.

Nach dem Durchmustern wurden die PCR-Produkte über ein 1% Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1: Marker 100 bp; Spur 2-10: Klon H14A; Spur 11-14: leer; Spur 15: Marker 200bp; Spur 16 und 17: Negativ-Kontrolle; Spur 18-27: Klon H58A; Spur 28: Marker 200bp; Spur 29: leer

Der Abbildung 17 ist zu entnehmen, dass bei der Mutante H14A nur der Klon Nr. 3 das richtige Insert besitzt und dass bei der Mutante H58A nur der Klon Nr. 8 das gesuchte Produkt enthält. Um die Aussage zu belegen, wurde die Plasmid-DNA durch eine Mini-Präparation isoliert und mit Endonukleasen geschnitten. Zur Kontrolle wurden die DNA-Fragmente dann in einem Agarosegel getrennt.

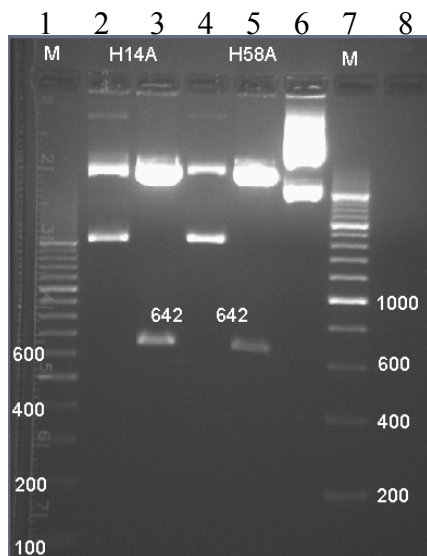


Abbildung 18 : Kontrolle der potentiell positiven Klone durch Restriktion

Nach der Restriktion wurden die DNA-Fragmente in einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1: Molekulargewichtsmarker 100 bp; Spur 2 und 3: Klon H14A; Spur 4, 5 und 6: Klon H58A; Spur 7: Marker 200 bp; Spur 8: leer

Das Gel beweist (Abbildung 18), dass bei der Mutante H14A nur der Klon Nr. 3 das gewünschte Produkt enthält und dass bei der Mutante H58A nur der Klon Nr. 8 wirklich positiv ist. Bei den übrigen Klonen fehlt das entsprechende Insert im richtigen Längenbereich von 642 bp.

Mit den übrigen Mutanten wurde auf analoge Weise verfahren (siehe Anhang II, 7.2.1).

4.2.2 Expression der MAM-Mutanten in *E. coli* BL21

Für die Untersuchung der Bindungsstellen wurden ausschließlich die Proteine mit der Mutation zu Alanin exprimiert.

Die Anzucht der Bakterien, die Induktion der Expression mit IPTG und die Aufreinigung der exprimierten Proteine aus dem Zell-Lysat erfolgte wie für den Wildtyp des rekombinanten Proteins beschrieben (vgl. 3.2.3.2.1) Exemplarisch für alle übrigen Mutanten wird hier das Ergebnis der Expression von H14A und H58A gezeigt.

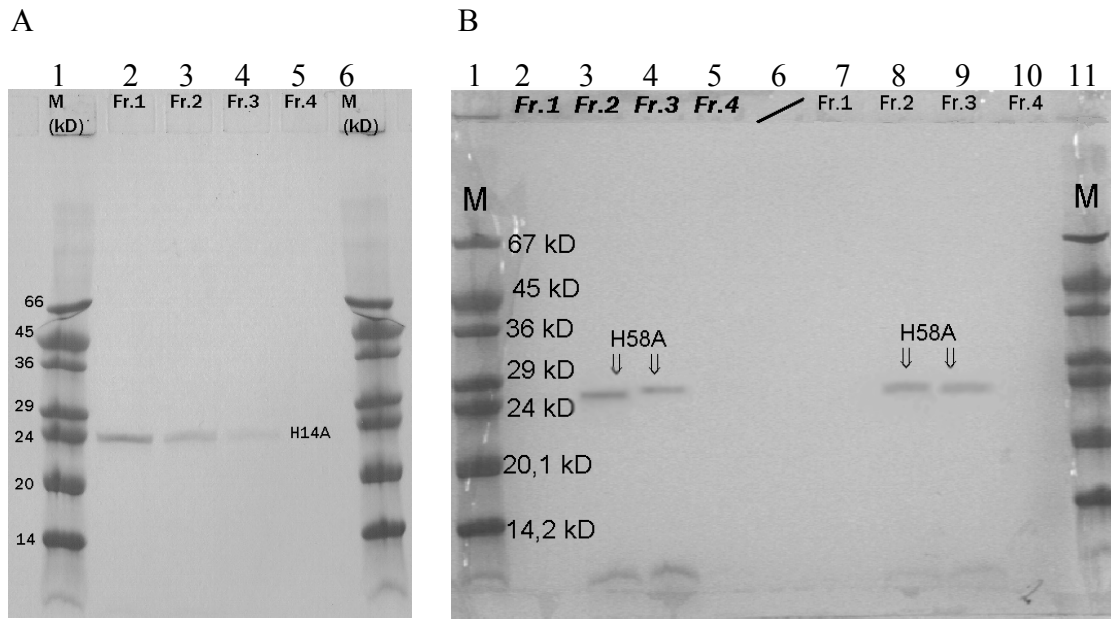


Abbildung 19: Exprimierte Mutanten in *E. coli* BL21

(A) Die eluierten Fraktionen wurden zur Kontrolle auf ein 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Coomassie-Färbung wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht.
 Spur 1: Molekulargewichtsmarker;
 Spur 2-5: mit PBS eluierte Fraktionen H14A; Spur 6: Molekulargewichtsmarker

(B) Die einzelnen Fraktionen aus zwei Aufreinigungen wurden in einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie gefärbt.
 Spur 1: Molekulargewichtsmarker;
 Spur 2-5: H58A-Fractionen aus der ersten Aufreinigung;
 Spur 6: leer;
 Spur 7-10: H58A-Fractionen aus der zweiten Aufreinigung;
 Spur 11: Molekulargewichtsmarker

Vergleicht man die Expression der verschiedenen Mutanten miteinander, so ist eine unterschiedlich hohe Rate zu beobachten (vgl. Tab. 1). Im Gegensatz zu den übrigen Mutanten ist die Expression bei der Mutante E28A niedrig und bei der Mutante H58A sogar extrem niedrig. Dagegen verlief die Expression der Mutante H14A ohne Probleme (vgl. Abbildung 19 A und B). Daher mussten von der Mutante H58A mehrere Ansätze gepoolt werden, um eine brauchbare Menge an Protein zu erhalten. Zum Vergleich sind daher exemplarisch die Ausbeuten einer Präparation in der Tabelle 1 gegenübergestellt. Der Austausch einer einzigen Aminosäure hat unter Umständen also einen gravierenden Einfluss auf Konformation und Stabilität des Proteins.

Tabelle1:
Ausbeute an Protein nach Aufkonzentrierung

Exprimiertes Protein	Ausbeute in μg (aus 2l Kultur)
H14A	299
H58A	< 20 (unter Nachweisgrenze)
E28A	< 20 (unter Nachweisgrenze)
E30A	190
D31A	265,5
E39A	193,5
E40A	135
E43A	235

4.3 Einfluss der MAM-Expression auf die Vitalität von *E. coli*

Die bisher aufgetretenen Schwierigkeiten bei der Expression des MAM in *E. coli* deuteten auf dessen potentiell toxische Wirkung auf seinen Wirt hin. Vergleichsweise problemlos gestaltet sich die Expression des SEA im gleichen Bakterium und unter gleichen Bedingungen. Aus diesem Grund wurden Wachstumskurven von *E. coli* während der Expression von verschiedenen Superantigenen aufgenommen. Zur Kontrolle wurde der Leer-Vektor pGEX-4T-1 mitgeführt. Dadurch, dass verschiedene Superantigene parallel in *E. coli* exprimiert wurden, ist ein direkter Vergleich der Auswirkung von MAM auf das Wachstum von *E. coli* möglich. Um das Wachstum zu dokumentieren, wurde alle 30 min ein Aliquot der Bakterienkulturen entnommen und die optische Dichte (OD) im Photometer gemessen. In der Abbildung 20 sind die Wachstumskurven von Superantigen-produzierenden *E. coli* dargestellt.

Zusätzlich wurde die Mutante H58A eingesetzt, da diese sich sehr schwer exprimieren ließ. Die Induktion der Expression erfolgte nach 2,5 h durch Zugabe von IPTG.

Bereits ca. 30 min nach der Induktion begannen die Kurven zu divergieren (Abbildung 20). Während die Bakterien mit dem Leervektor und den Superantigenen TSST-1 und SEAwT kontinuierlich weiter wuchsen, fiel die optische Dichte bei den Bakterien welche MAMwT und die Mutante H58A exprimierten stark ab.

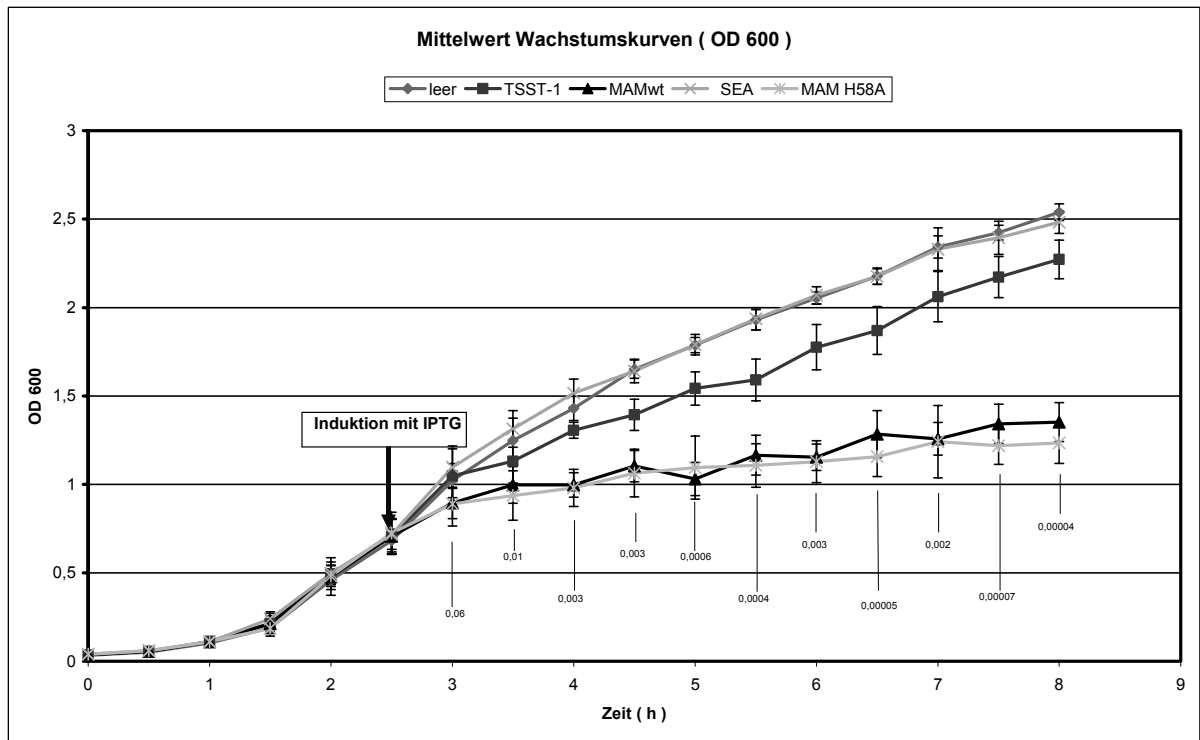


Abbildung 20: Wachstumskurven von Superantigen-produzierenden *E. coli*

Expression verschiedener Superantigene in *E. coli* BL21. Nach jeweils 30 min wurde die optische Dichte im Photometer bei 600 nm gemessen. Die Induktion der Expression erfolgte nach 2,5 h. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. Die Angabe der p-Werte zeigt eine signifikante Reduktion im Vergleich zu TSST-1, wie durch den t-Test bewiesen wurde.

Da die optische Dichte nicht immer mit der Anzahl der Bakterien korreliert, wurden zusätzlich die koloniebildenden Einheiten (KBE, engl. colony-forming units CFU) pro Milliliter bestimmt (Abbildung 21). Hier ist ebenfalls nach der Induktion mit IPTG ein auseinanderstreben der Kurven zu beobachten. Die Bakterien welche MAM exprimierten wurden eindeutig in ihrem Wachstum eingeschränkt. Dagegen verlief das Wachstum bei den Bakterien mit dem Leervektor und den Superantigenen TSST-1 und SEAwT kontinuierlich weiter. Die Ergebnisse lieferten eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Methoden.

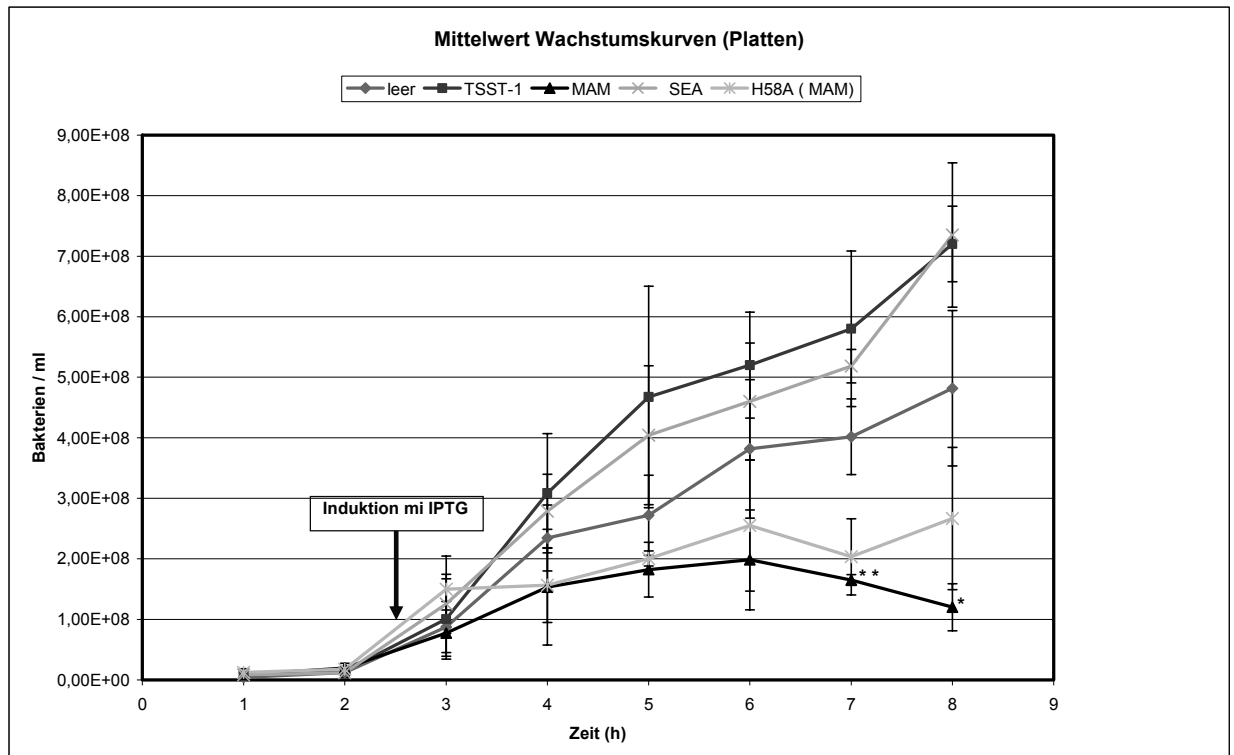


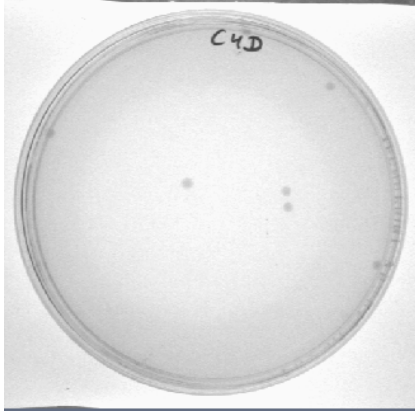
Abbildung 21: Bestimmung der koloniebildenden Einheiten von *E. coli* Kulturen

In *E. coli* BL21 wurden verschiedene Superantigene exprimiert. Nach je 60 min wurden 100 µl Bakterienkultur entnommen und nach serieller Verdünnung ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Kolonien der Platten ausgezählt (exemplarisch aus n = 3). Die Sterne markieren eine signifikante Reduktion im Vergleich zum Leervektor, was durch den t-Test bewiesen wurde (* p < 0,05 ** p < 0,03).

Die Signifikanz von MAM im Vergleich mit den anderen Superantigenen ist höher als die hier angegebenen.

Um das unterschiedliche Wachstumsverhalten zu demonstrieren werden in der Abbildung 22 exemplarisch zwei Platten gezeigt. Während auf der Platte mit der MAM-Expression nur wenige Kolonien zu sehen sind, findet man dagegen auf der Platte mit der SEA-Expression erheblich mehr Kolonien.

A: Klon der MAMwt exprimiert



B: Klon der SEAwT exprimiert

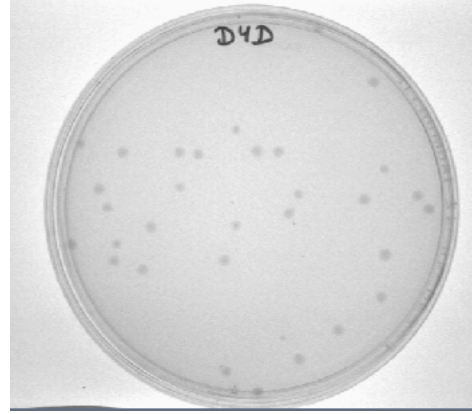


Abbildung 22: Anzahl der Kolonien nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C

Nach 4h Inkubation wurden 100 µl Bakterienlösung entnommen und $1:10^6$ verdünnt. Diese verdünnte Lösung wurde dann ausplattiert und im Brutschrank inkubiert (exemplarisch aus $n = 3$).

Die Abbildung 20 und die Abbildung 21 führen zu der Schlussfolgerung, dass MAM zwar nicht letal auf das Wirtsbakterium *E. coli* wirkt, aber doch einen stark inhibierenden Effekt auf dessen Wachstum ausübt. Immer war die Expression von MAM durch eine starke Abnahme der Vitalität gekennzeichnet, während die anderen Kulturen nach Induktion kontinuierlich weiter wuchsen.

Daher sollte die Ursache für diesen Effekt durch eine Prüfung auf Protease- und DNase-Aktivität ergründet werden, da für diese Enzyme ein Einfluss auf das Wachstum bekannt ist. Zunächst sollte aber die biologische Aktivität von MAM überprüft werden, um auszuschließen, dass falsch gefaltete MAM-Moleküle die Ursache für den Effekt sind.

4.4 Überprüfung der Aktivität der MAM-Mutanten im V β -Assay

Damit MAM biologisch aktiv ist, muss es sowohl am MHC-II-Komplex als auch am T-Zell-Rezeptor binden und so beide vernetzen. Die erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen kann dann anhand ihrer IL-2 Sekretion bestimmt werden. In den Versuchen wurden bestimmte T-Zell-Hybridome eingesetzt. Es ist bekannt, dass MAM eine hohe Spezifität für V β 8.1 und V β 19 positive T-Lymphocyten besitzt (Bhardwaj et al., 1994). In den Experimenten wurden murine T-Lymphocyten eingesetzt, die mit humanen V β 8.1- bzw. V β 19-Elementen transfiziert worden sind (Fleischer et al., 1996). Diese Zellen bieten den Vorteil, dass hier definierte Rezeptoren vorliegen und nicht ein Gemisch verschiedener Rezeptoren.

Zum Testen der Funktionsfähigkeit der T-Lymphocyten wurde das starke T-Zell-Mitogen Phytohämagglutinin verwendet. Um zu überprüfen, ob die MHC-II exprimierenden Zellen Superantigene präsentieren können, wurden diese mit den Superantigenen SPEC und TSST-1 getestet.

Als superantigenpräsentierende Zellen dienten Raji-Zellen, sowie L-Zellen die mit DR1-Molekülen transfiziert worden sind, die in der α -Kette in Position 39 Lysin zu Serin (DR1 α_{K39S} , von Dr. David Karp, Dallas USA) mutiert sind. Darüber hinaus wurden L-Zellen benutzt, die mit HLA-Dw53 (von Professor Dr. Thomas Herrmann, Würzburg) transfiziert worden sind. Es handelt sich bei diesen Zellen um den einzigen natürlichen HLA-Haplotyp, dem Histidin 81 in der β -Kette des DR-Moleküls fehlt. Durch Ermittlung der IL-2-Konzentration im ELISA wurde der Grad der Aktivierung der T-Lymphocyten gemessen. Hier sollte der Einfluss der Mutationen der einzelnen Aminosäurereste von MAM auf die Bindung an HLA-D-Moleküle untersucht werden. Die Bindung von MAM an der HLA-DR- β -Kette ist zinkabhängig (Driessen et al., 1995b; Bernatchez et al. 1997). Deshalb wurden die Reste substituiert, welche potentiell für das Zinkbindemotiv verantwortlich sind.

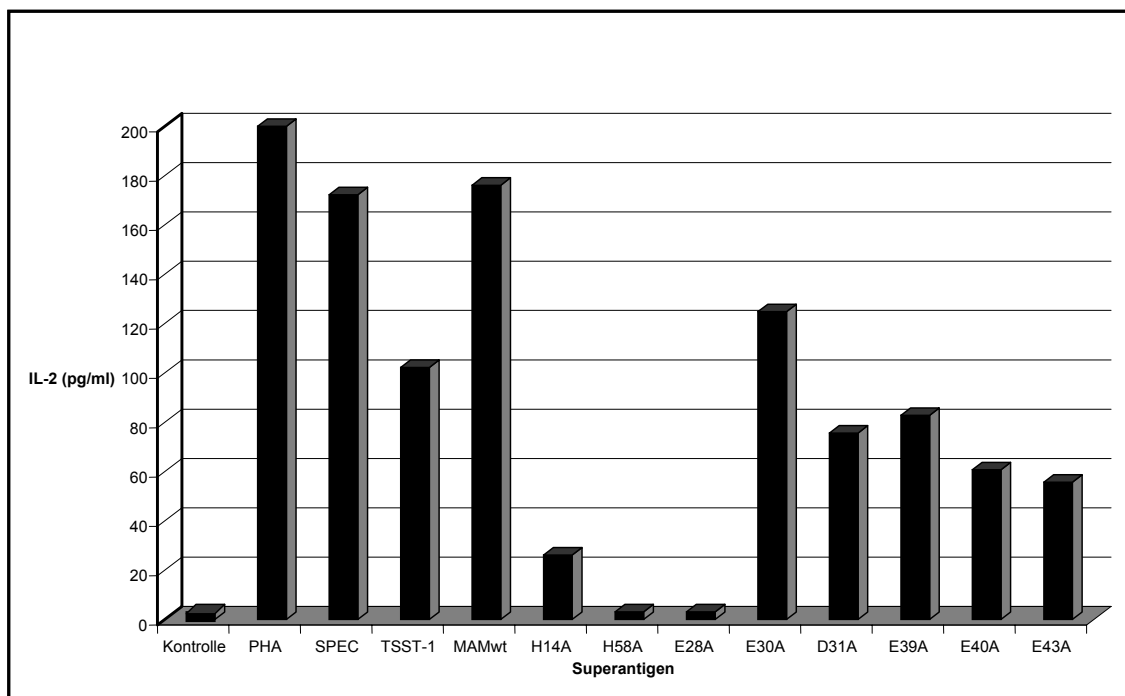


Abbildung 23: Präsentation von MAMwt und MAM-Mutanten durch Raji-Zellen

Rekombinantes MAM und die jeweiligen Mutanten wurden von Raji-Zellen an murine T-Lymphocyten präsentiert, die mit humanen V β 19-Elementen transfiziert worden sind. Die MAM-Mutanten wurden in einer Konzentration von 500 ng/ml eingesetzt. Neben der Negativ-Kontrolle wurden zur Überprüfung der Zell-Vitalität PHA (Mitogen), SPEC (V β 2) und TSST-1 (V β 2) eingesetzt. In den Überständen der stimulierten T-Lymphocyten wurde die IL-2 Konzentration im ELISA ermittelt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus mindestens n = 3.

Der Versuch zeigt, dass die Substitution der Aminosäurereste Histidin 58 und Glutamat 28 durch Alanin eine Aktivierung der T-Zellen verhinderte (Abbildung 23). Dagegen erlaubten die anderen Aminosäure-Austausche nach wie vor eine erfolgreiche Präsentation von MAM an die T-Zellen. Die einzelnen Substitutionen hatten einen unterschiedlichen Einfluss auf die Interaktion des MHC-II-Komplexes mit gebundenem MAM und der T-Zelle.

Im nächsten Versuch wurde überprüft, ob die Mutante DR1 α_{K39S} , bei der die α -Ketten Bindungsstelle der Staphylokokken- und Streptokokken-Superantigene ausgeschaltet ist, noch fähig ist, die einzelnen MAM-Mutanten zu präsentieren.

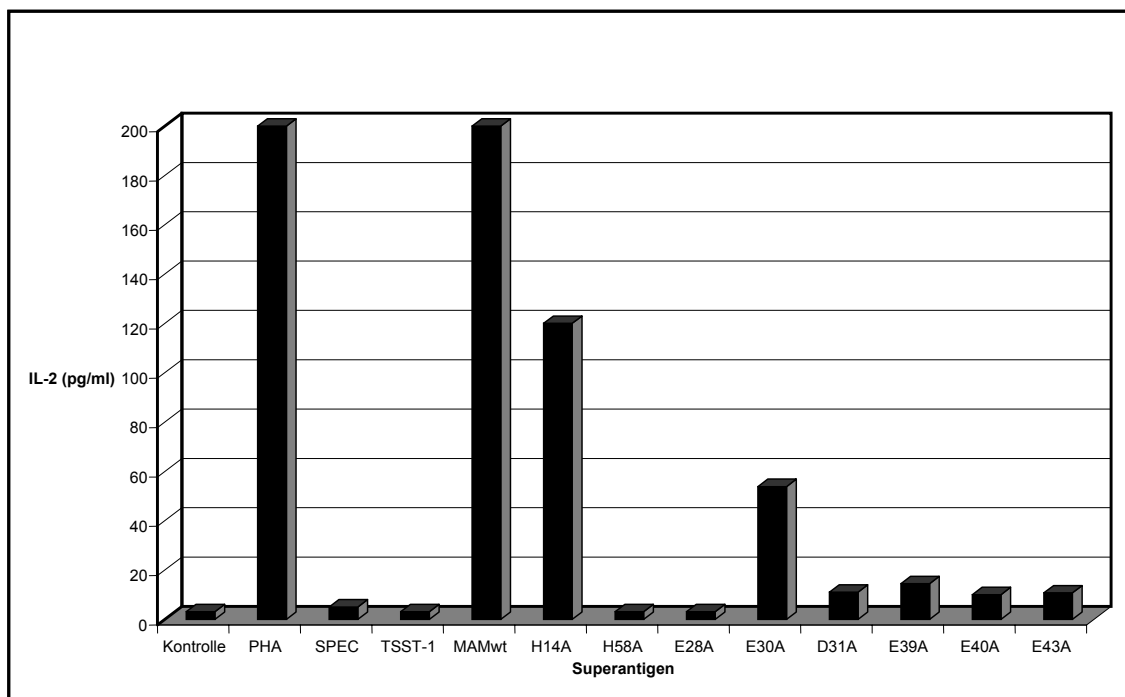


Abbildung 24: Präsentation von MAMwt und MAM-Mutanten durch die HLA Mutante DR1 α_{K39S}

Hier wurde rekombinantes MAM und die jeweiligen MAM-Mutanten durch die HLA Mutante DR1 α_{K39S} an murine T-Lymphocyten präsentiert, die mit humanen V β 19-Elementen transfiziert worden sind. Die MAM-Mutanten wurden in einer Konzentration von 500 ng/ml eingesetzt. Neben der Negativ-Kontrolle wurde wieder zur Überprüfung der Vitalität der Zellen PHA (Mitogen), SPEC (V β 2) und TSST-1 (V β 2) zum Vergleich eingesetzt. In den Überständen der stimulierten T-Lymphocyten wurde die IL-2 Konzentration im ELISA ermittelt (exemplarisches Experiment aus mindestens n = 3).

Aufgrund der Mutation in der HLA-DR1- α -Kette bzw. einer abweichenden α -Ketten-Bindungsstelle kann die Bindung von MAM hier nur über die zinkabhängige β -Kette erfolgen. Die gezielte Mutation von Histidin 58 und Glutamat 28 verhinderte eine erfolgreiche Interaktion von MAM mit dem MHC-II-Komplex und der T-Zelle (Abbildung 24). Alle anderen Mutanten interagierten erfolgreich mit der HLA-DR1- β -Kette und

konnten so die T-Zellen nach Bindung am T-Zell-Rezeptor aktivieren. Auch hier zeigten die Mutanten einen unterschiedlichen Grad der T-Zell-Aktivierung.

4.5 Überprüfung der Bindung von MAM/MAM-Mutanten an MHC-II-positive Zellen im Durchflusscytometer

Um zu sehen, ob das Ausbleiben der T-Zell-Aktivierung allein auf die Bindungseigenschaften von MAM-Mutanten an MHC-II-exprimierende Zellen zurückzuführen war, wurden MAM und die jeweiligen Mutanten mittels Durchflusscytometrie untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Bindung von MAM und den Mutanten H58A; H14A und E28A an Raji-Zellen getestet. Da bisher kein monoklonaler Antikörper gegen MAM frei verfügbar war, wurden die Bindungsstudien mit dem GST-MAM-Fusionsprotein aus dem pGEX-4T-1-Expressionssystem durchgeführt. Zur Kontrolle wurde zunächst überprüft, ob GST bzw. der GST-Antikörper an Raji-Zellen binden. Dazu wurden die Raji-Zellen mit GST bzw. dem GST-Antikörper jedoch ohne MAM inkubiert. Mit Hilfe eines FITC-konjugierten Sekundärantikörpers wurde dann der GST-Antikörper detektiert. Die Markierung der Zellen wurde dann nach Inkubation im Durchflusscytometer gemessen. Durch die Kontrolle konnte bewiesen werden, dass durch anti-GST keine unspezifische Bindung an die Raji-Zellen erfolgte (Abbildung 25).

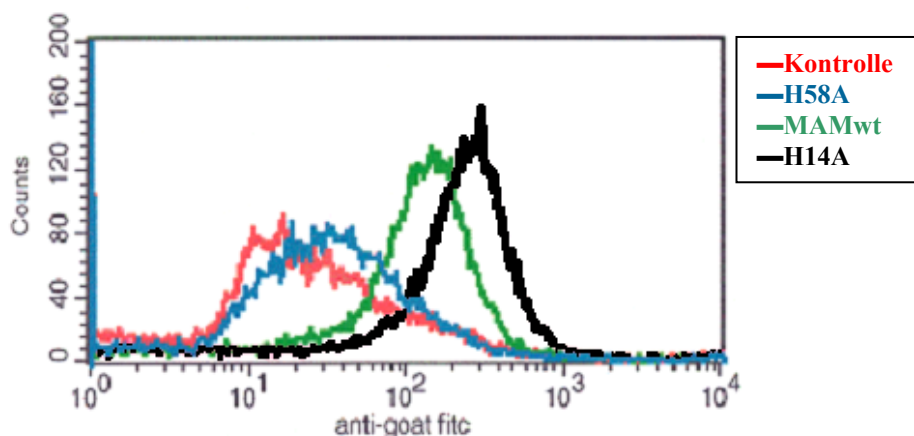


Abbildung 25: Bindungstest von den Mutanten H58A und H14A im Vergleich mit MAMwt

1×10^6 Raji-Zellen wurden mit 500 ng/ MAMwt bzw. der entsprechenden Mutante inkubiert. Das gebundene Fusionsprotein wurde mit einem anti-GST Antikörper und einem FITC-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Als Kontrolle diente der anti-GST-Antikörper zusammen mit dem FITC-markierten Sekundär-Antikörper. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus $n=3$.

Die Abbildung 25 bestätigt die Aussage des V β -Assays. Allein die Substitution von Histidin in Position 58 durch Alanin verhinderte die Bindung von MAM an MHC-II-exprimierende Zellen. Im Gegensatz dazu verhinderte der Austausch von Histidin in Position 14 gegen Alanin nicht die Bindung, sondern schien diese im Vergleich zum Wildtyp noch zu verbessern.

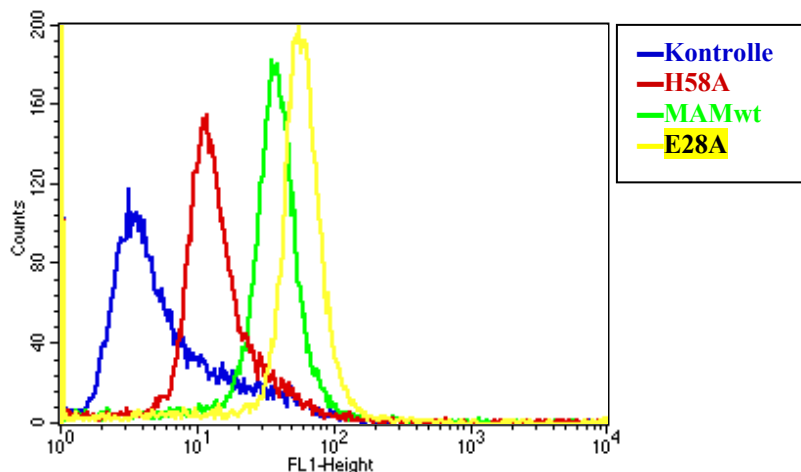


Abbildung 26: Bindungstest der Mutante E28A im Vergleich mit MAMwt und der Mutante H58A

1×10^6 Raji-Zellen wurden mit 500 ng/ MAMwt bzw. der entsprechenden Mutante inkubiert. Das gebundene Fusionsprotein wurde mit einem anti-GST Antikörper und einem FITC-markierten Sekundärantikörper detektiert. Als Kontrolle diente wieder der anti-GST-Antikörper zusammen mit dem FITC-markierten Sekundär-Antikörper. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$.

Die Substitution von Glutamat in der Position 28 durch Alanin verhinderte nicht die Bindung an den MHC-II-Komplex (Abbildung 26). Auch diese Substitution schien die Bindung eher zu unterstützen, denn im Vergleich zum Wildtyp war eine Signalverstärkung zu beobachten. Dagegen wurde die Beobachtung wieder bestätigt, dass der Austausch von Histidin in der Position 58 gegen Alanin die Bindung von MAM massiv beeinträchtigte. Auch eine Erhöhung der Konzentration der einzelnen Proteine veränderte deren Bindungseigenschaften nicht (Abbildung 27).

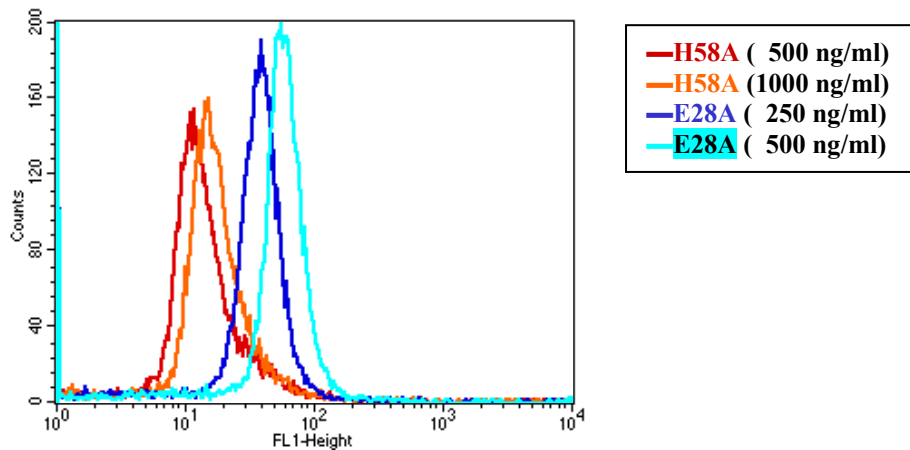


Abbildung 27: Bindungstest der Mutanten H58A und E28A in Abhängigkeit von deren Konzentration

1×10^6 Raji-Zellen wurden mit 500 ng/MAMwt bzw. der entsprechenden Mutante inkubiert. Das gebundene Fusionsprotein wurde mit einem anti-GST Antikörper und einem FITC-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Die Kontrolle erfolgte wie in Abb. 24 beschrieben, und ist hier nicht mit aufgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$.

Selbst eine Verdoppelung der Konzentration bei der Mutante H58A von 500 ng/ml auf 1000 ng/ml konnte nicht zu einer Signalverstärkung beitragen. Dagegen band die Mutante E28A wieder erfolgreich am MHC-II-Komplex. Bei der Mutante E28A wurde nach Verdoppelung der Konzentration ebenfalls die Bindung nicht wesentlich verstärkt (Abbildung 27).

Im nächsten Experiment sollte der Modus der Bindung von MAM am MHC-II-Komplex weiter charakterisiert werden. Aus diesem Grund wurden hier L-Zellen eingesetzt, die mit DR1-Molekülen transfiziert worden sind. Diese DR1-Moleküle besitzen eine veränderte α -Kette. In der α -Kette wurde in der Position 39 Lysin zu Serin ($DR1\alpha_{K39S}$) mutiert. Ziel des Versuches war hier zu sehen, ob H58A an die Mutante $DR1\alpha_{K39S}$ noch binden kann. Eine Bindung konnte hier nur über die zinkabhängige HLA-DR- β -Kette erfolgen.

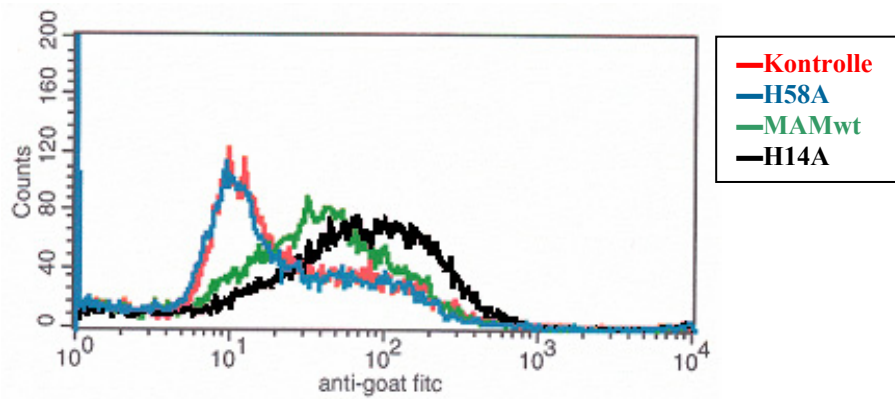


Abbildung 28: Bindungstest der Mutanten H58A, H14A und MAMwt mit L-Zellen DR1 α _{K39S}

1×10^6 DR1-transfizierte L-Zellen wurden mit 500 ng/ml MAMwt bzw. der entsprechenden Mutante inkubiert. Das gebundene Fusionsprotein wurde mit einem anti-GST Antikörper und einem FITC-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Wiederum wurde als Kontrolle der anti-GST-Antikörper zusammen mit dem FITC-markierten Sekundär-Antikörper eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$.

Durch das Ergebnis aus dem Versuch mit der HLA-Mutante DR1 α _{K39S} wurden die bisherigen Resultate verifiziert (Abbildung 28). Während die Mutante H14A wieder zur Bindung fähig war, fiel der Bindungstest der Mutante H58A negativ aus. Im direkten Vergleich mit dem Wildtyp von MAM steigerte der Austausch von Histidin in der Position 14 gegen Alanin die Bindung am MHC-II-Molekül deutlich. Da bei den hier verwendeten L-Zellen die α -Ketten-Bindungsstelle fehlte, war die Bindung nur über die HLA-DR1- β -Kette möglich. Die Interpretation der erhaltenen Daten führt zu dem Schluß, dass nur Histidin 58 des MAM eine unabdingbare Voraussetzung zur Bindung am MHC-II-Komplex bildet. Alle anderen getesteten Mutationen der Aminosäurereste des MAM zerstörten nicht die Bindungsfähigkeit des Proteins und daher scheiden diese Reste als Bindungsstellen aus. Abschließend werden die Daten aller Funktionstests in Tabelle 2 zusammengefasst:

Tabelle 2: Einfluss der Mutation auf Superantigen-Aktivität

MAM / MAM-Mutante	Superantigen-Aktivität	
	MHC-II-Bindung	T-Zell-Aktivierung
Wt	+++	+++
H14A	+++	++
H58A	+ / - DR1/DR1 α K39S	-
E28A	+++	-
E30A	+++	++
D31A	+++	++
E39A	+++	++
E40A	+++	++
E43A	+++	++

+++ = stark, ++ = mittel, + = schwach, - = nicht nachweisbar

4.6 Generierung des MAM-GFP (Grün-Fluoreszierendes Protein) – Fusionsproteins durch Überlappungs-Extension mit Hilfe der PCR

Der Ablauf der PCRs kann der Abbildung 1 (Seite 35) entnommen werden, einziger Unterschied lag hier in der Art der Überlappung. Die Überlappung erfolgte durch die kodierende Sequenz für die Faktor Xa Schnittstelle. Daher wurden in den beiden ersten PCRs durch die inneren Primer an das MAM-Gen und an das GFP-Gen die entsprechenden Basentriplets angehängt. Wie in 3.2.1.11 beschrieben, wurden die PCR-Zwischenprodukte über ein Agarosegel getrennt und aus diesem isoliert (Abbildung 29).

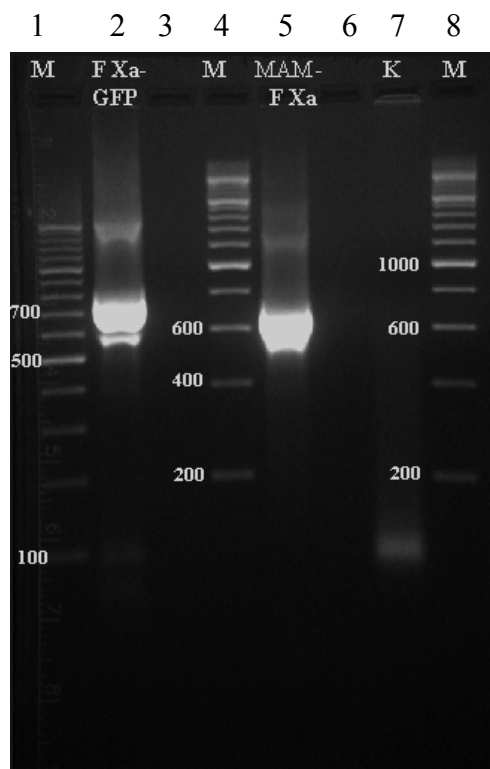


Abbildung 29: PCR-Produkte aus den ersten Läufen zur Erzeugung der Überlappung

Die PCR-Produkte wurden über ein 1,5%

Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1: Molekulargewichtsmarker 100 bp;

Spur 2: Produkt F Xa-GFP; Spur 3: leer;

Spur 4:

Molekulargewichtsmarker 200 bp;

Spur 5: Produkt MAM-F Xa; Spur 6: leer;

Spur 7: Negativ-Kontrolle;

Spur 8: Molekulargewichtsmarker 200 bp

Abschließend wurden die Produkte vereinigt und mit den äußeren Primern amplifiziert (Abbildung 30).

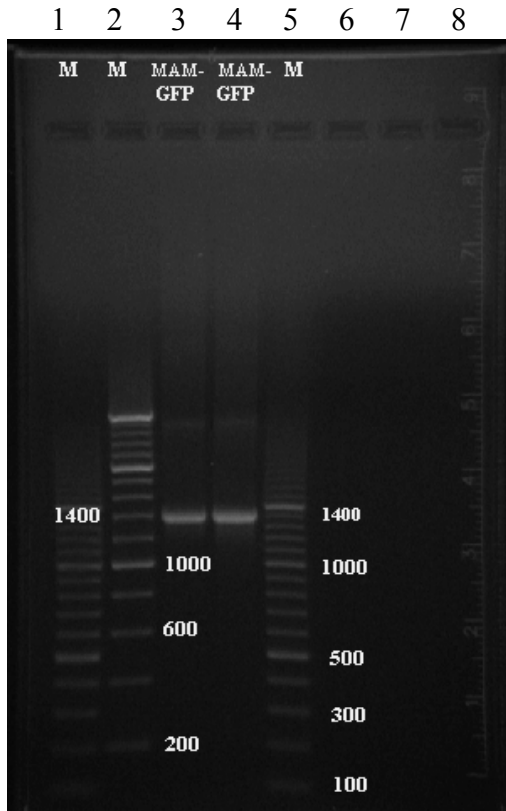


Abbildung 30: PCR-Endprodukt MAM-GFP

Die PCR-Produkte wurden über ein 1,5% Agarosegel aufgetrennt.
 Spur 1 und 5: Molekulargewichtsmarker 100 bp;
 Spur 2: Molekulargewichtsmarker 200 bp
 Spur 3 und 4: Produkt MAM-GFP;
 Spur 6-8: leer

Im finalen PCR-Lauf konnten die Fragmente erfolgreich zum Endprodukt fusioniert werden (siehe Abbildung 30).

Die Endprodukte wurden dann wie zuvor beschrieben in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert und die Plasmide in *E. coli* BL21 transformiert. Mit Hilfe des grün-fluoreszierenden Proteins kann die Bindung von MAM direkt ohne primären und sekundären Antikörper gezeigt werden (Abbildung 31).

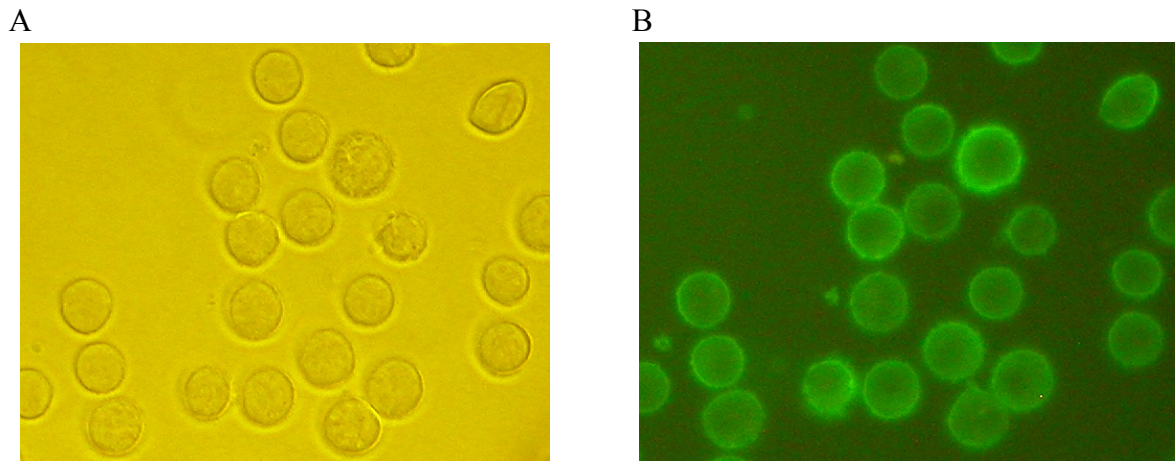
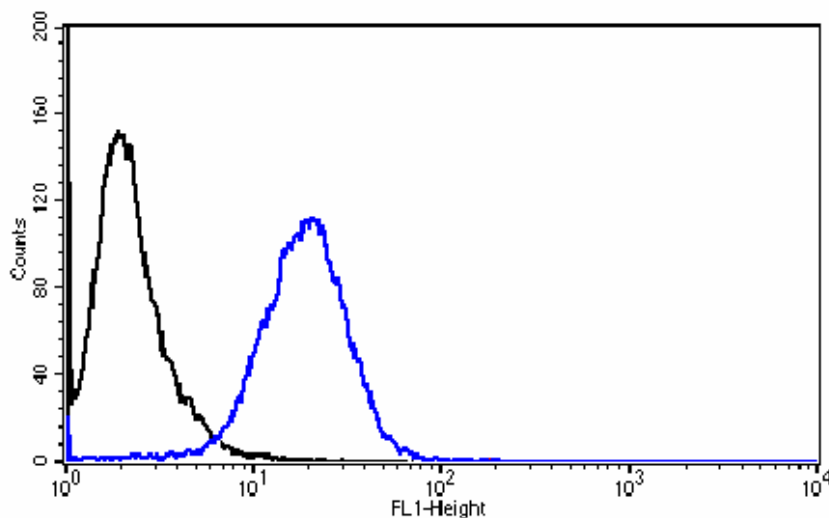


Abbildung 31: Markierung von Raji-Zellen mit MAM-GFP

Nach Inkubation mit MAM-GFP wurden die Raji-Zellen im Lichtmikroskop untersucht. (A) Betrachtung im Durchlicht; (B) Betrachtung im Fluoreszenzlicht

Bei Betrachtung im Fluoreszenzlicht wird deutlich, dass nur die Zelloberfläche spezifisch durch die Bindung von MAM-GFP markiert wurde. Zur Kontrolle wurde die Bindung von MAM-GFP im Durchflussscytometer überprüft (Abbildung 32).



Kontrolle

MAM-GFP

Abbildung 32: Bindungstest von MAM-GFP an Raji-Zellen

Zur Kontrolle wurden Raji-Zellen ohne MAM eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit MAM-GFP inkubiert.

Die Interaktion von MAM mit dem MHC-II-Komplex der Zelle wurde durch das GFP nicht beeinträchtigt. Eine sterische Hinderung durch GFP als Fusionspartner kann daher ausgeschlossen werden.

4.7 Superantigen-Präsentation durch CD1-Moleküle

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass bakterielle Superantigene trotz fehlender MHC-II-Expression T-Zellen aktivieren (Avery et al., 1994; Beharka et al., 1994). Gregory et al. vermuteten die Beteiligung von CD1a-Molekülen bei der Aktivierung von humanen, MHC-II-negativen Thymocyten (Gregory et al., 2000). Die CD1-Moleküle gehören zu einer Familie von Zelloberflächen-Glykoproteinen und besitzen eine gewisse Ähnlichkeit mit MHC-Klasse-I (Dutronec und Porcelli 2002). Um die direkte Interaktion von Superantigenen und CD1-Molekülen zu zeigen, wurden THP-1-Zellen und THP-1-Zellen, die mit CD1a, b, c transfiziert worden sind, mit Superantigenen inkubiert. Bei den THP-1-Zellen handelt es sich um eine monocytäre Zell-Linie, die durch Interferon- γ (IFN- γ) Stimulation zur Expression von HLA-DR-(MHC-II-Komplex beim Menschen) Molekülen induziert werden kann.

Da die nicht-induzierten THP-1-Zellen keine MHC-II-Moleküle exprimieren, können diese auch keine Superantigene binden. Bei den mit CD1-Molekülen transfizierten THP-1-Zellen sollte jedoch die Bindung der Superantigene erfolgen. So können die Superantigene dann den T-Zellen präsentiert werden. Im ELISA wurde die erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen dann anhand ihrer IL-2 Sekretion bestimmt.

Im Versuch der Abbildung 33 wurde die SEA-Präsentation durch CD1b-transfizierte THP-1-Zellen überprüft.

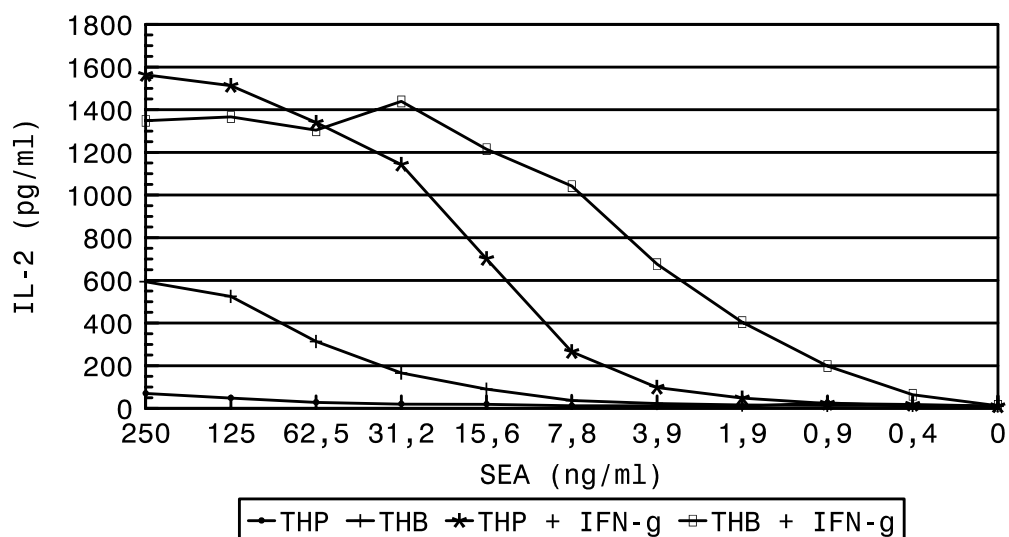


Abbildung 33 : SEA-Präsentation durch CD1b

Das SEA wurde in verschiedenen Konzentrationen mit nicht-transfizierten THP-1-Zellen und CD1-transfizierten THP-1-Zellen inkubiert. Präsentiert werden sollte das Superantigen an V β 6.5 transfizierte T-Zell-Hybridome. Zum Vergleich wurden einige THP-1-Zellen mit Interferon- γ (IFN- γ) vorstimuliert. Der Grad der T-Zell-Aktivierung wurde im ELISA ermittelt. Es wird ein repräsentatives Ergebnis von mindestens n= 3 gezeigt.

Die nicht-transfizierten THP-1-Zellen konnten erst nach Stimulation mit Interferon- γ (IFN- γ) SEA an T-Zellen präsentieren (Abbildung 33). Dagegen waren die Zellen, welche mit CD1b transfiziert worden waren dazu schon vor der Stimulation mit Interferon- γ (IFN- γ) in der Lage. Von den CD1b-positiven Zellen konnte SEA bereits in sehr viel niedrigeren Konzentrationen an T-Zellen präsentiert werden. Da MAM ähnliche funktionelle Eigenschaften bezüglich der Bindung an MHC-II-Moleküle besitzt wie das bivalente SEA wurde auch die Fähigkeit der Präsentation von MAM durch CD1-Moleküle untersucht. MAM wurde am besten von CD1c-transfizierten THP-1-Zellen präsentiert (Abbildung 34). Ebenfalls wurde MAM von CD1b positiven THP-1-Zellen präsentiert. Auch die CD1a-transfizierten Zellen konnten MAM präsentieren, jedoch in einem sehr viel geringerem Umfang als die anderen CD1-Moleküle. Im Gegensatz dazu waren die nicht-transfizierten THP-Zellen nicht in der Lage MAM an T-Zellen zu präsentieren.

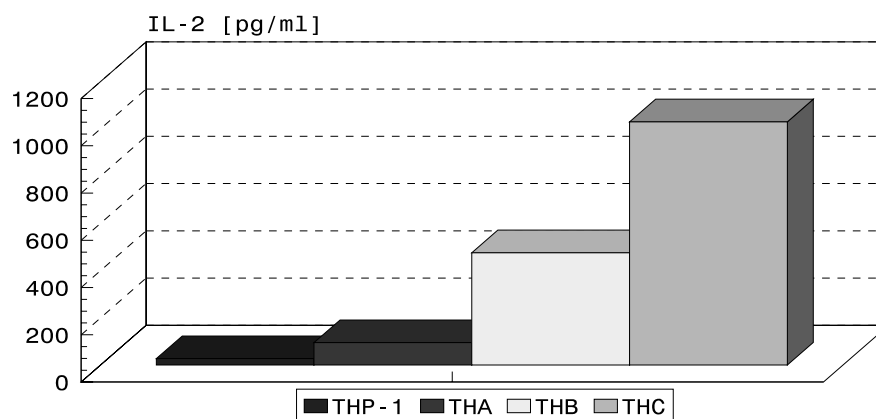


Abbildung 34: MAM-Präsentation durch CD1-transfizierte THP-1-Zellen

Rekombinantes MAM wurde mit nicht-transfizierten THP-1-Zellen und CD1-transfizierten THP-1-Zellen inkubiert. Präsentiert werden sollte das Superantigen an V β 19 transfigierte T-Zell-Hybridome. In den Überständen der inkubierten T-Lymphocyten wurde die IL-2-Konzentration im ELISA ermittelt. Es wird ein repräsentatives Ergebnis von mindestens n= 3 gezeigt.

Die Resultate zeigen, dass Superantigene auch in Abwesenheit von MHC-II-Molekülen an T-Zellen präsentiert werden können. Diese Aufgabe kann erfolgreich von den CD1-Molekülen übernommen werden. In den Versuchen erfolgte der direkte Nachweis der Bindung der Superantigene an CD1-positive Zellen durch die erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen.

4.8 Test auf Protease-Aktivität von MAM

Da das rekombinante MAM nur in geringer Ausbeute nach der Aufreinigung erhalten wurde und in der elektrophoretischen Auftrennung der Proben immer noch freies GST zu sehen war, sollte in einem Versuch überprüft werden, ob MAM vielleicht eine proteolytische Aktivität besitzt und sich so autoproteolytisch degradiert. Zu diesem Zweck wurden je 25 µl einer BSA-Lösung mit MAM in verschiedenen Konzentrationen bei 37 °C und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 h Inkubation wurden die Proben in einem SDS-Gel aufgetrennt (Abbildung 35).

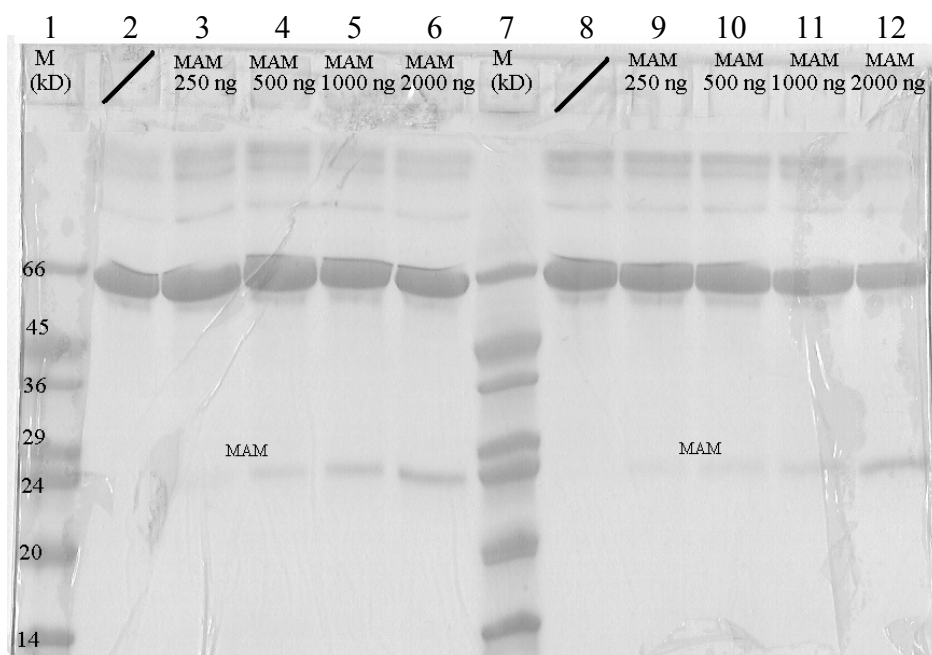


Abbildung 35: Test auf Protease-Aktivität von MAM

Nach der Inkubation wurden die einzelnen Proben in einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie gefärbt. Spur 1 und 7: Molekulargewichtsmarker; Spur 2 und 8: leer; Spur 3-6: BSA inkubiert mit MAM in steigender Konzentration (Inkubation bei 37 °C); Spur 9-12: BSA inkubiert mit MAM in steigender Konzentration (Inkubation bei Raumtemperatur)

Der Abbildung 35 kann man entnehmen, dass das Rinderalbumin weder bei 37 °C noch bei Raumtemperatur von MAM degradiert wurde. Auch das MAM selbst lag unverändert vor. Eine Konzentrationserhöhung des MAM hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Stabilität der Proteine. Daher muss davon ausgegangen werden, dass das MAM keine Protease-Aktivität besitzt.

4.9 Test auf DNase-Aktivität von MAM

Um die biologischen Eigenschaften von MAM weiter aufzuklären, wurde untersucht, ob MAM DNase-Aktivität besitzt. Der durchgeführte Sequenzvergleich hatte bereits eine Ähnlichkeit zu der DNase SPEF gezeigt. Deshalb wurde der Grad der DNA-Fragmentierung bzw. deren Abbau durch MAM in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Als Positiv-Kontrolle wurde NY-5 eingesetzt (eine natürliche SPEA Präparation, die mit Streptodornase kontaminiert ist). Zusätzlich wurde ein weiteres Superantigen (TSST-1) zur Kontrolle mitgeführt, das in dem selben Expressionssystem hergestellt wurde (Abbildung 36).

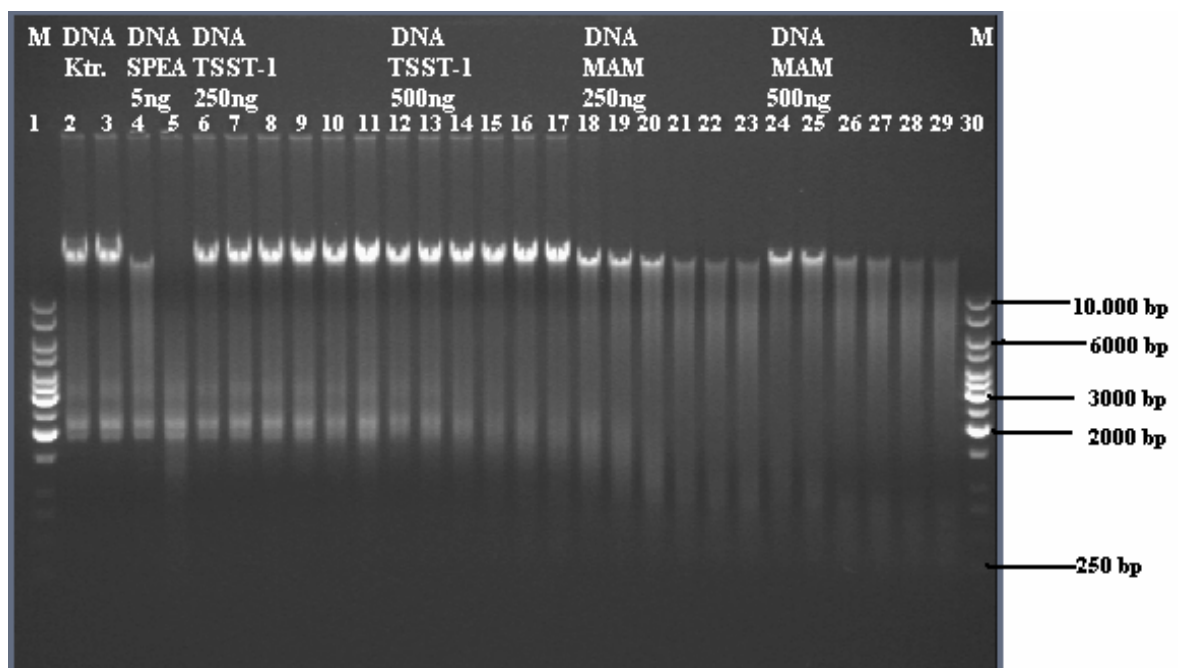


Abbildung 36: DNase-Aktivität von MAM

Spur 1 und 30: Molekulargewichtsmarker 1 kbp; Spur 2: Kontroll-DNA nach 5 min Inkubation; Spur 3: Kontroll-DNA nach 180 min Inkubation; Spur 4 und 5: DNA + SPEA-NY-5 (5 ng), nach 5 und 30 min Inkubation; Spur 6-11: DNA + TSST-1 (250 ng) Inkubation 30-180 min; Spur 12-17: DNA + TSST-1 (500 ng) Inkubation 30-180 min; Spur 18-23: DNA + MAM (250 ng) Inkubation 30-180 min; Spur 24-29: DNA + MAM (500 ng) Inkubation 30-180 min. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens n = 3.

Die Ergebnisse des Versuches zeigen klar, dass MAM DNase-Aktivität besitzt. Bei einer eingesetzten Menge von 250 ng MAM war bereits nach einer Inkubationszeit von 120 min eine Degradierung der genomischen DNA zu beobachten. Wurde die eingesetzte Menge an MAM auf 500 ng erhöht, so konnte schon nach 90 min der Abbau der genomischen DNA festgestellt werden. Eine stärkere DNase-Aktivität wurde nur bei natürlichem SPEA aus

dem Stamm NY-5 beobachtet, das mit Streptodornase kontaminiert war. Bereits 5 ng SPEA mit Spuren von Streptodornase reichten aus, um die DNA schon nach 30 min Inkubationszeit komplett zu degradieren. Zwar ist die DNase-Aktivität von MAM schwächer als die der Streptodornase, aber eindeutig festzustellen. Im direkten Vergleich zu MAM zeigt das Superantigen TSST-1 keine DNase-Aktivität. Auch eine Erhöhung der eingesetzten Menge an TSST-1 auf 500 ng führte nicht zum Abbau der genomischen DNA (Abbildung 36). Beide Proteine wurden unter gleichen Bedingungen synthetisiert, so dass eine Kontamination der MAM-Proben ausgeschlossen werden kann. Daher ist die DNase-Aktivität allein dem MAM-Protein zu zuschreiben.

5 Diskussion

Das Superantigen MAM aus *Mycoplasma arthritidis* ist bisher das einzige Superantigen, das aus Mycoplasmen isoliert werden konnte. In suszeptiblen Stämmen von Nagetieren erzeugt MAM die Entstehung der chronischen Polyarthritis (Cole und Griffiths 1993). Aufgrund seiner Eigenschaften wird MAM auch als möglicher Auslöser der humanen rheumatoiden Arthritis diskutiert. So konnte Jansson et al., *Mycoplasma arthritidis* neben *M. fermentans* und *M. hominis* aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis isolieren (Jansson et al., 1975). Ferner konnte gezeigt werden, dass MAM die Freisetzung verschiedener Cytokine induziert (Cole et al., 1983; Rink et al., 1992). Die inflammatorischen Cytokine konnten auch in Synovialsekreten von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden (Bhardwaj et al., 1989). Jedoch bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um die Rolle des Superantigens bei der Entstehung der rheumatoiden Arthritis genau zu erklären.

Die Genomgröße der Mycoplasmen liegt bei 5×10^8 D (Bak et al., 1969). Der G/C-Gehalt des MAM-Gens liegt mit 28 % unter dem durchschnittlicher *E. coli* Gene (50 %). Um die heterologe Expression in *E. coli* zu verbessern, wurde daher der G/C-Gehalt auf 47 % erhöht. Der Begriff Codon Usage bezeichnet die Häufigkeit der Verwendung bestimmter Codons im entsprechenden Wirt. Aus der Expression eines Gens mit anderer Codon-Auswahl in der Wirtszelle resultiert eine nur geringe Bildung des rekombinanten Proteins (Makrides 1996). Durch den Codon Usage-Vergleich und die nachfolgende Anpassung der Codons sollte die Expression von MAM in *E. coli* weiter gesteigert werden. Die veränderte Codon-Usage verbesserte zwar nicht die Expression von MAM, aber die Entstehung ungewollter Mutationen, wie von Galuschka (Galuschka 2002) beschrieben, konnte sehr stark reduziert werden (vgl. Anhang III, 7.3.1).

Zusätzlich wurden zur Expression von MAM verschiedene *E. coli* Stämme eingesetzt. Aus ökonomischen Gesichtspunkten wurde MAM nur noch in dem pGEX-4T-1 Vektor als GST-Fusionsprotein exprimiert. Trotz dieser Maßnahmen blieb die Ausbeute an rekombinantem Protein hinter den Erwartungen zurück. Auch die Verwendung des proteasedefizienten *E. coli* Stammes BL21 konnte die Produktionsrate nicht entscheidend erhöhen. Wurde die Temperatur während der Induktion mit IPTG auf 37 °C erhöht, so konnte später im Zell-Lysat der Bakterien kein Fusionsprotein nachgewiesen werden. Deshalb wurde die Temperatur während der Induktion auf 30 °C gesenkt. Die hohe Überexpression von hydrophoben Proteinen führt oft zur Aggregatbildung. Diese Aggregate werden auch als *Inclusion Bodies* bezeichnet. *Inclusion Bodies* bestehen zwar

vorwiegend aus dem rekombinanten Protein, dieses liegt aber nicht in seiner natürlichen Konformation vor. Durch intramolekulare Assoziation von hydrophoben Domänen während der Faltung werden diese Aggregate gebildet. Um die Bildung dieser *Inclusion Bodies* zu minimieren, wurden die Wachstumsbedingungen der Bakterien variiert. Daher wurde nicht nur die Temperatur während der Induktion gesenkt, sondern es wurde auch erst bei einer höheren Zelldichte induziert.

Nach der Elution des GST-MAM-Fusionsproteins von der Glutathion-Säule war im Eluat auch immer noch freies GST zu finden. Als Ursache für die Degradierung des Fusionsproteins bzw. von MAM können bakterielle Proteasen ausgeschlossen werden, da ein proteasedefizienter Stamm eingesetzt wurde und darüber hinaus ein Proteasehemmer dem Lysepuffer zugesetzt wurde. Dies führte zu der Hypothese, dass das Protein MAM über autoproteolytische oder proteolytische Eigenschaften verfügt und so die Spaltung des Fusionsproteins und die eigene Proteolyse katalysiert. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde MAM mit Rinderalbumin bei Raumtemperatur bzw. bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung der Ansätze hat jedoch gezeigt, dass das Rinderalbumin nicht abgebaut wurde. Auch das MAM selbst wurde nicht degradiert. Eine proteolytische Aktivität von MAM kann daher unter diesen Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden. Daher weist die geringe Ausbeute an rekombinantem MAM auf andere Effekte hin.

Die Expression von heterologen Proteinen kann das Wachstum der Wirtszellen verlangsamen, wenn die Genprodukte für den Wirt selbst toxisch sind (Makrides 1996). Oft haben Proteine mit hydrophoben Regionen einen toxischen Effekt auf die Wirtszellen. Das Superantigen MAM ist ein sehr hydrophobes Protein (Rink und Kirchner 1992). Daher können die schlechte Expression des MAM-Wildtyps und der Mutanten in *E. coli* auf toxische Wirkungen des Proteins auf den Wirt zurückgeführt werden. Um den Einfluss von MAM auf den Wirt *E. coli* eingehender zu charakterisieren, wurden Wachstumskurven von dem Bakterium während der Expression verschiedener Superantigene wie TSST-1, SEAw_t, MAMw_t und der Mutante H58A aufgenommen. Als Kontrolle wurde der Leer-Vektor pGEX-4T-1 mitgeführt. Nach 2,5 h erfolgte die Induktion mit IPTG. Bereits 30 min nach erfolgter Induktion mit IPTG war ein Unterschied im Wachstumsverhalten der verschiedenen Bakterienkulturen zu beobachten. Ein Divergieren der Wachstumskurven war deutlich erkennbar. Während die Expression der anderen Superantigene das Bakterienwachstum nicht beeinflusst, wird das Wachstum von *E. coli* durch die Expression von MAM und der Mutante H58A deutlich herabgesetzt. Wie die Wachstumskurven zeigen ist der Effekt von MAM zwar nicht letal für die Bakterien, aber inhibiert deren

Wachstum erheblich. Der Wechsel zu den *E. coli* Stämmen SG 13009 und M15 führte nicht zu einer merklichen Steigerung der Expression.

Um die biologische Bedeutung von MAM weiter zu entschlüsseln, wurde untersucht, ob das Protein vielleicht DNase-Aktivität besitzt und so nach Translation intrazellulär den Zellzyklus der Wirtszelle stört. Daher wurde humane, genomische DNA mit MAM in verschiedenen Konzentrationen bei 37 °C inkubiert. Zum Vergleich wurde parallel genomische DNA mit NY-5 (natürliches SPEA im Komplex mit Streptodornase (DNase)) und TSST-1 inkubiert. In den Versuchen wurde die genomische DNA von MAM degradiert. Zwar liegt die Aktivität von MAM weit unter der des NY-5, sie ist aber nach 90-120 min, abhängig von der eingesetzten Konzentration, deutlich zu erkennen. Nach einer Inkubationszeit von 150 min wurde die genomische DNA durch MAM vollständig abgebaut. Der Versuch zeigt also, dass MAM DNase-Aktivität besitzt. Einige Proteine wurden in der Vergangenheit als Superantigene beschrieben. Weitere Untersuchungen widerlegten dies jedoch (Plano et al. , 2000). Zum Beispiel ist das SPEB kein Superantigen wie Gerlach und Mitarbeiter zeigen konnten (Gerlach et al. , 1994). Dieses Protein ist identisch mit der Cystein Protease Streptopain (Ohara-Nemoto et al. , 1994). Auch das ursprünglich als Superantigen beschriebene SPEF (oder auch als MF bezeichnet) ist in Wirklichkeit eine DNase (Sriskandan et al. , 2000). Die beobachtete Superantigenaktivität war durch andere Streptokokken Superantigene wie SMEZ oder SPEC verursacht worden (Gerlach et al. , 2001). Im Fall von TSST-1 waren die Präparationen des natürlichen Superantigens mit Staphylokokken Lipase verunreinigt. Daher zeigten diese Präparationen einige Effekte, welche beim rekombinanten TSST-1 nicht auftraten (Kum et al. , 1993). Wird das reale Superantigen SPEA aus dem Kulturüberstand gewonnen, so zeigt das erhaltene Protein DNase-Aktivität. Wiederum handelte es sich um eine Kontamination und zwar mit Streptodornase wie durch Fagin et al. , (1997) demonstriert wurde.

Denn durch die rekombinante Expression des SPEA wurde diese Kontamination verhindert und folglich besaß das Protein keine DNase-Aktivität mehr. Dass es sich bei MAM um ein echtes Superantigen handelt, wurde in zahlreichen Arbeiten bewiesen. Die rekombinante Expression des MAM in *E. coli* und die anschließende Säulenaufreinigung schlossen Kontaminationen aus. Daher sind die Ergebnisse dieser Arbeit das erste Beispiel eines wirklichen Superantigens mit bestimmter enzymatischer Aktivität (vgl. Tab. 3).

Tabelle 3: Superantigene und Enzymaktivität

Protein	Superantigen-Aktivität	DNase-Aktivität	Protease-Aktivität	Lipase-Aktivität	Referenz
rekombinantes MAM	+	+	-	nicht getestet	Rink et al., 1994; Knudtson et al., 1997
gereinigtes MAM	+	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet	
rekombinantes SPEA	+	-	-	nicht getestet	Fast et al., 1989; Fagin et al., 1997
gereinigtes SPEA	+	+	+	nicht getestet	
rekombinantes SPEB	-	nicht getestet	+	nicht getestet	Gerlach et al., 1994; Ohara-Nemoto et al., 1994; Fagin et al., 1997
gereinigtes SPEB	+	nicht getestet	+	nicht getestet	
rekombinantes SPEF	-	+	nicht getestet	nicht getestet	Srisikandan et al., 2000; Gerlach et al., 2001
gereinigtes SPEF	+	+	nicht getestet	nicht getestet	
rekombinantes TSST-1	+	-	nicht getestet	-	Schlievert et al., 1981; Kreiwirth et al., 1987; Kum et al., 1993
gereinigtes TSST-1	+	nicht getestet	nicht getestet	+	

+ = positiv, - = negativ

Der Vorteil liegt hier in einem bifunktionellen Molekül, so dass zwei verschiedene Aufgaben mit einem Protein erledigt werden können. Es scheint so, dass diese Strategie mit der geringen Genomgröße der Mycoplasmen korrespondiert (Razin et al., 1985). Aus einer kleinen Menge an genetischer Information wird der größtmögliche Nutzen gezogen.

Um verwandtschaftliche Beziehungen zu MAM zu finden, wurde ein Abgleich zwischen der MAM-Sequenz und den Sequenzen von SPEA und einer DNase (extrazelluläre Streptodornase D) durchgeführt (Abbildung 37).

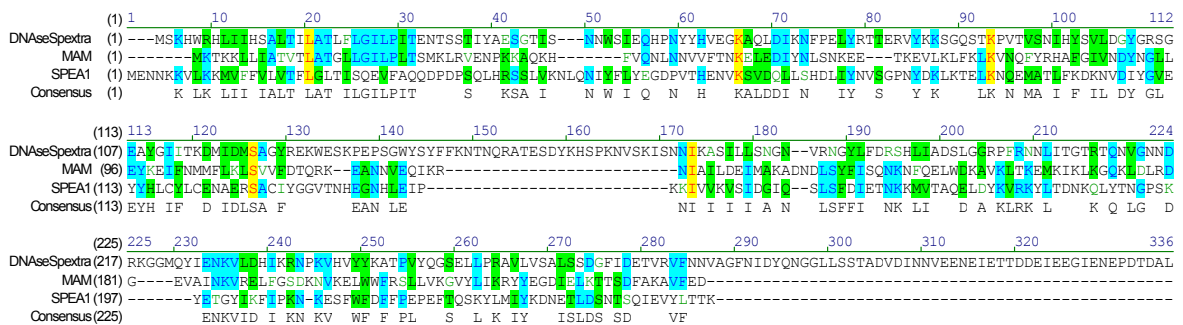


Abbildung 37: Aminosäuresequenz Alignment von DNase (Streptodornase D), MAM und SPEA
Identische Reste sind durch blaue Balken markiert.

Pubmed

Accession: AAU29460; Definition: extracellular streptodornase D [Streptococcus pyogenens phage phiRamid]

Accession: AAC43976; Definition: superantigen precursor

Accession: S29659 ; Definition: exotoxin type A precursor (allele 1)- Streptococcus pyogenes phage T12

Der Vergleich der Sequenzen zeigt eine geringe Homologie zwischen MAM und der DNase am N-Terminus. Dagegen ist die Verwandtschaft von MAM zu SPEA noch geringer. Diese Tatsache überrascht nicht, da MAM unter den bisherigen Superantigenen eine neue Proteinarchitektur einnimmt (Zhao et al. , 2004). Die Ähnlichkeit zwischen der DNase und SPEA ist ebenso schwach ausgeprägt. Der geringe Grad an Homologie von MAM und der DNase ist nicht ungewöhnlich, da zum Beispiel bei den Acholeplasmen untersuchte Stämme verschiedene DNasen enthielten und keine der Nukleasen war allen Stämmen gemeinsam (Roganti und Rosenthal 1983). Ein Stammbaum hebt deutlich hervor, das MAM mehr den DNasen zugeordnet ist als den übrigen Superantigenen (Abbildung 38).



Abbildung 38: Stammbaum der DNasen im Vergleich mit verschiedenen Superantigenen

Der Stammbaum kann in drei Gruppen eingeteilt werden:

Gruppe A besteht aus den DNasen.

Zur Gruppe B gehören die DNase SPEF und das Superantigen MAM.

Die Gruppe C beinhaltet die Staphylokokken / Streptokokken Superantigene

Pubmed

Accession: NP_853500; Definition: TatD [Mycoplasma gallisepticum R]

Accession: AAT28049; Definition: Mg-dependent DNase [Mycoplasma mobile163K]

Accession: YP_042576; Definition: putative TatD related DNase [Staphylococcus aureus subsp. aureus MSSA476]

Accession: AAU29460; Definition: extracellular streptodornase D [Streptococcus pyogenens phage phiRamid]

Accession: AAM80352; Definition: mitogenic factor 25 K precursor [Streptococcus pyogenes MGAS315]

Accession: AAC43976; Definition: superantigen precursor

Accession: P13163 ; Definition: Enterotoxin type A precursor (SEA)

Accession: S29659 ; Definition: exotoxin type A precursor (allele 1)- Streptococcus pyogenes phage T12

Accession: P06886 ; Definition: Toxic shock syndrome toxin-1 precursor (TSST-1)

Die Daten aus dem Alignment unterstreichen die DNase-Aktivität des MAM.

Hauptziel der Arbeit war die Struktur-funktions-Beziehung von MAM und dem MHC-II-Komplex weiter zu erhellen. Bereits die von MAM aufgenommenen CD-(Circular-Dichroismus) Spektren in Kooperation mit Herrn PD Dr. Grötzinger (Kiel) zeigten im Vergleich mit anderen Superantigenen einen exorbitant hohen Anteil an α -Helices (Galuschka 2002). Dieses Ergebnis wurde durch die veröffentlichte Kristallstruktur des MAM bestätigt (Zhao et al., 2004). Laut dieser Veröffentlichung zeigt MAM eine komplette α -helicale Struktur und besteht aus zehn α -Helices. Dabei besitzt das MAM-Monomer eine L-förmige Gestalt und ist aus zwei Domänen aufgebaut. Hauptmerkmal der N-terminalen Domäne ist ein vier-helicales Bündel (Reste 1-125). Jenseits dieses Bündels bildet der N-Terminus eine lange Schleife aus 25 Resten, die sich um das Bündel wickelt. Die C-terminale Domäne umfasst sechs Helices (Reste 126-213). Obwohl MAM eine Zwei-Domänen Struktur besitzt, ist jede Domäne dicht gegen die andere gepackt. Die Helix $\alpha 5$ faltet sich zurück zum N-terminalen helicalen Bündel, so dass $\alpha 5$ fast senkrecht zu $\alpha 4$ liegt. Am Domänen-Grenzgebiet werden zwölf Wasserstoffbrückenbindungen einschließlich zwei Salzbrücken ausgebildet. Dies weist darauf hin, dass MAM eine genau

festgelegte Struktur einnimmt (Zhao et al., 2004). Im Gegensatz dazu zeigen alle anderen bisher aus gram-positiven Bakterien isolierten Superantigene ein anderes Strukturmotiv. Zwar besitzen die pyrogenen Superantigene auch eine Zwei-Domänen Architektur aus einer großen und einer kleinen Domäne, aber diesen liegt eine völlig andere Struktur zugrunde. Bei diesen Superantigenen besteht die große Domäne aus einer zentralen Helix, die gegen ein viersträngiges β -Faltblatt lehnt.

Dieser Aufbau ähnelt dem β -grasp-Motiv. Die kleine Domäne umfasst ein fünfsträngiges β -barrel, das an den Oligosaccharide/Oligonucleotide-binding fold (OB-fold) erinnert (Papageorgiou und Acharya 1997). Dagegen präsentiert MAM neben YPMa eine neue Superantigenfaltung (Zhao et al., 2004; Donadini et al., 2004). Durch seine neue Kristallstruktur unterstreicht MAM, dass das β -grasp Motiv kein zwingendes Kriterium für die Superantigenfunktion eines Proteins ist. Das Homologie nicht das ausschlagsgebende Merkmal für die Superantigenfunktion von Proteinen ist, zeigt auch die Entdeckung einer neuen Gruppe von Proteinen (Williams et al., 2000). Diese Proteine werden von *Staphylococcus aureus* produziert und aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den bisher charakterisierten Superantigenen als *Staphylococcal Superantigen-Like Proteins* (SSLs) bezeichnet. Diese haben die Gesamtarchitektur der Superantigenfamilie beibehalten und besitzen das β -grasp Motiv sowie den OB-fold (Arcus et al., 2002). Dagegen weisen sie signifikante Unterschiede in der Struktur zu den bisher isolierten Superantigenen, wie z. B. den Verlust der MHC-II-Komplex Bindungsstelle auf. Darüber hinaus zeigen sie nicht die Kennzeichen die für die Superantigene typisch sind, wie T-Zell-Aktivierung, Verstärkung des Endotoxinschocks und sind keine Pyrogene (Al-Shangiti et al., 2004). Auch das extrazelluläre Adhärenz-Protein (Eap) aus *Staphylococcus aureus* weist eine überraschende Homologie zum C-Terminus der bakteriellen Superantigene auf (Geisbrecht et al., 2005). Das bis dahin für die Superantigenfunktion eines Proteins als notwendig angenommene β -grasp-Motiv ist also entbehrlich. Viele der klassischen Superantigene besitzen eine Disulfidbrücke um ihre Struktur zu stabilisieren. Dagegen verfügt MAM über keine Cystein-Reste um eine solche Brücke auszubilden. Während sich einige Superantigene zu Gruppen zusammenfassen lassen, zeigt MAM nur geringe Sequenzhomologie zu anderen Superantigenen (Cole et al., 1996).

Mit Hilfe von Zink-Ionen können Superantigene dimerisieren. Die Superantigene SEC, SED und SPE-C bilden Homodimere und besitzen darüber hinaus eine zweite Zinkbindungsstelle (Li et al., 1997; Roussel et al., 1997; Chi et al., 2002; Papagerorgiou et al., 2004). Das SPE-A ist bisher das einzig bekannte kovalente Homodimer (Fagin 1998). Die Quervernetzung von MHC-II-Molekülen durch SEA ist für die Induktion der Cytokin-

Gen Expression in B-Zellen und Monocyten notwendig (Mehindate et al., 1995; Tiedemann et al., 1996). Auch für MAM konnte diese direkte Signaltransduktion ohne Beteiligung von T-Zellen nachgewiesen werden (Rink et al., 1994). Eine Zinkabhängigkeit von MAM bei der Dimerisierung wurde im Jahr 2003 von Langlois et al. postuliert. Dabei sollten die MAM-Reste Histidin 14 und Aspartat 31 eine entscheidende Rolle spielen (Langlois et al., 2003).

In der aktuellen Kristallstruktur konnte aber kein Zink lokalisiert werden (Zhao et al., 2004). Vielmehr deuten die Ergebnisse auf eine Zink-unabhängige Dimerisierung des MAM hin. Laut dem verbesserten Endmodell formen dabei zwei MAM/HA/HLA-DR1 Komplexe ein asymmetrisches Dimer (HA = Haemagglutinin Peptid, 306-318). Zwei MAM-Moleküle bilden über ihre C-terminalen Domänen ein asymmetrisches Dimer. Dieses MAM-Dimer vernetzt dann zwei MHC-II-Moleküle miteinander. Im Detail betrachtet treten dann folgende Wechselwirkungen auf: Die C-terminale Domäne von MAM-1 interagiert sowohl mit der N- als auch mit der C-terminalen Domäne von MAM-2. Dagegen bildet die C-terminale Domäne von MAM-2 nur Kontakte zur C-terminalen Domäne von MAM-1 aus. Im Grenzgebiet der beiden Domänen, fügt sich die C-terminale Domäne von MAM-1 in eine V-förmige Tasche zwischen den beiden Domänen von MAM-2. Am Dimer-Interface sind 24 Reste von beiden Molekülen beteiligt. Jedoch wird nur der Aspartat 197 von beiden Molekülen benutzt und dass in unterschiedlicher Weise. Aspartat 197 von MAM-1 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Histidinrest 58 von MAM-2 aus. Dagegen bildet Aspartat 197 von MAM-2 van der Waals Kontakte zu Arginin 154 von MAM-1 aus (Zhao et al., 2004).

Die immense Bedeutung von dem Rest Histidin 58 für die Funktionalität des MAM konnte auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden und wird weiter unten näher erörtert. Bereits frühere Experimente hatten gezeigt, dass MAM in Bezug auf die Bindung an MHC-II-Moleküle ähnliche funktionelle Eigenschaften wie das bivalente SEA besitzt (Bernatchez et al., 1997). Das SEA hat zusätzlich zur α -Ketten-Bindungsstelle mit geringer Affinität eine Zink-abhängige β -Kettenbindungsstelle mit hoher Affinität (Schad et al., 1995). Dabei koordiniert das SEA das Zink über die Reste Histidin 187, Histidin 225 und Aspartat 227 (Abrahmsen et al., 1995). An dem Zinkmotiv sind ein bis zwei Histidinreste und als dritter Ligand entweder Glutamat oder Aspartat beteiligt. Daher wurde in den Versuchen überprüft, ob MAM über ein ähnliches Zinkbindemotiv verfügt. Zunächst wurden die Histidinreste 14 und 58 von MAM gegen Alanin durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht. Der V β -Test zeigte, dass bei der Mutante H58A der trimere Komplex aus MHC-II-Molekül/ Superantigen/ T-Zelle nicht mehr gebildet werden konnte.

Dies resultierte im Ausbleiben der T-Zell-Aktivierung. Die Ergebnisse der Versuche mit dem Durchfluscytometer standen im Einklang mit den funktionellen Überprüfungen des V β -Tests. Ausschließlich Histidin 58 spielt eine zentrale Rolle für die Funktionalität des MAM. Während der Austausch von Histidin 14 gegen Alanin die Bindung an MHC-II-positive Zellen noch forcierte, wurde die Bindung bei der Mutante H58A stark herabgesetzt. Dieses Ergebnis ist umso aussagekräftiger, da es sich hier um eine einzelne Mutation handelt. Langlois et al. benutzte für seine Studien eine Doppelmutante, welche in den Positionen H14 und D31 zu Alanin mutiert worden war (Langlois et al., 2003). Bei einer solchen Mutation müssen starke Einflüsse auf die Proteinfaltung angenommen werden, so dass hier nicht mehr einzelne Aminosäurereste für die Funktion verantwortlich gemacht werden können. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen diametral zu den Aussagen von Langlois. Als weitere potentielle Bindungsstellen waren die Aminosäuren Glutamat 28, 30, 39, 40 und 43 sowie Aspartat 31 untersucht worden. Die Substitutionen von Glutamat in den Positionen 30, 39, 40 und 43 durch Alanin ermöglichten weiterhin eine Bindung an MHC-II-Moleküle. Auch der Austausch von Aspartat 31 gegen Alanin verhinderte nicht die Bindung am MHC-II-Komplex. Der V β -Test belegte eine erfolgreiche Präsentation der Mutante an die T-Zellen. Die signifikante Beeinflussung der T-Zell-Aktivierung, wie bei Langlois für die Doppelmutante H14A/ D31A beschrieben, konnte durch die gewonnenen Daten dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu den Resultaten von Langlois interagierte die Mutante H14A noch besser mit dem MHC-II-Komplex als der Wildtyp von MAM, wie die Untersuchungen im Durchfluscytometer beweisen.

Anders verhielt sich die Mutante E28A. Der Austausch von Glutamat gegen Alanin hatte laut den Daten aus dem Durchfluscytometer keinen negativen Einfluss auf die Bindung an den MHC-II-Komplex. Ähnlich wie bei der Mutante H14A verbesserte hier der Austausch gegen Alanin die Bindungseigenschaften von MAM. Jedoch zeigte der V β -Assay, dass die T-Zellen durch diese Mutante nicht mehr aktiviert werden konnten. Den aktuellen Modellen folgend, bildet der T-Zell-Rezeptor sowohl Kontakte zur N-terminalen als auch zur C-terminalen Domäne des MAM aus. Die fehlende T-Zell-Aktivierung durch E28A spricht dafür, dass zwar die Bindung am MHC-II-Molekül nicht unterbunden wird, aber die Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor empfindlich gestört wird. Nach dem Austausch der Reste Histidin 58 und Glutamat 28 ergeben sich vermutlich konformationelle Änderungen des Proteins, die die Superantigenfunktion von MAM beeinflussen. Der Einfluss der Konformation auf die Superantigenfunktion wurde schon durch frühere Arbeiten erkannt (Schad et al., 1997). Der bisher für die Zinkkoordination auf der Seite

der HLA-DR1 β -Kette als essentiell erachtete Aminosäurerest Histidin 81 ist den Ergebnissen von Etongue-Mayer folgend entbehrlich (Etongue-Mayer et al., 2002). Bereits im Jahr 2000 konnte Cavallin et al. demonstrieren, dass Superantigene wie SEA und SEE durch die Gegenwart von Zink-Ionen thermisch stabilisiert werden. So konnte beispielsweise der Schmelzpunkt bei SEA durch Zugabe von Zink um 6 °C erhöht werden (Cavallin et al., 2000). Die genaue Rolle des Zink für die Stabilität und Interaktion des MAM-Moleküls mit dem MHC-II-Komplex muss also noch geklärt werden. Eine Involvierung der Reste Histidin 14 und Aspartat 31 am Aufbau des Zink-Bindemotivs wie bei Langlois et al. beschrieben, konnte durch die eigenen Versuche nicht bestätigt werden. Das Ergebnis aus dem Versuch mit der HLA-Mutante DR1 α_{K39S} spricht dafür, dass H14 nicht für die Bindung an die β -Kette des MHC-II-Komplexes verantwortlich ist, denn die Mutante H14A war wieder zur Bindung fähig. Ebenso wurde die Interaktion von D31 mit der β -Kette des MHC-II-Komplexes nicht verhindert.

Eine weitere Besonderheit bildet die Abhängigkeit des MAM vom gebundenen Antigen des MHC-II-Komplexes (Etongue-Mayer et al., 2002; Zhao et al., 2004).

Ferner gelang in den eigenen Versuchen eine erfolgreiche Bindung von MAM an CD1-positive Zellen nachzuweisen. Damit existiert ein weiterer Interaktionspartner für MAM neben den MHC-II-Molekülen. Die Ergebnisse weisen eine MHC-II-unabhängige Aktivierung der T-Zellen nach. Daher ergibt sich die Möglichkeit einer CD1 initiierten Signaltransduktion im Verlauf einer durch Superantigene ausgelösten Erkrankung. Es bleibt zu klären, welchen Einfluss die CD1-restringierten T-Zellen dann auf das Gleichgewicht zwischen Toleranz und Autoimmunität nehmen und so während der Erkrankung die Zerstörung körpereigenen Gewebes durch Autoantikörper und autoreaktive T-Zellen vermitteln.

Die Tatsache, dass neben den bakteriellen auch virale Produzenten von Superantigenen existieren, und die Variation von Strukturmerkmalen lassen die Entdeckung vieler neuer Superantigene in der Zukunft erwarten. Spannend wird auch die Aufklärung der genauen Bindungsstellen von MAM am MHC-II-Komplex und T-Zell-Rezeptor bleiben. Einen Beitrag dazu kann die direkte Verknüpfung von MAM mit dem Grün-Fluoreszierenden Protein leisten. Das Fusionsprotein konnte mit Hilfe der PCR erfolgreich generiert werden. Durch die eigene Fluoreszenz muss das Molekül nicht noch mit einem konjugierten Antikörper markiert werden. Es können so sterische Hinderungen minimiert werden. Mit Hilfe der Strukturaufklärung lässt sich Licht in das Rätsel bringen, welchen Nutzen die Pathogene durch die Produktion der Superantigene erhalten. Der Umstand das MAM toxisch auf *E. coli* wirkt, zeigt, dass Superantigene nicht nur das Immunsystem des Wirtes

ablenken können sondern darüber hinaus potentielle Konkurrenten inhibieren. Durch Erforschung der Superantigene kann zukünftig die Ätiologie weiterer Erkrankungen aufgeklärt und diese dann gezielt therapiert werden.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen die Produktionsrate von MAM in *E.coli* weiter zu erhöhen. Trotz des Wechsels zu verschiedenen *E. coli* Stämmen konnte das gesteckte Ziel, mit einem Kulturansatz in den Milligramm Bereich an rekombinantem Protein vorzustoßen, nicht erreicht werden.

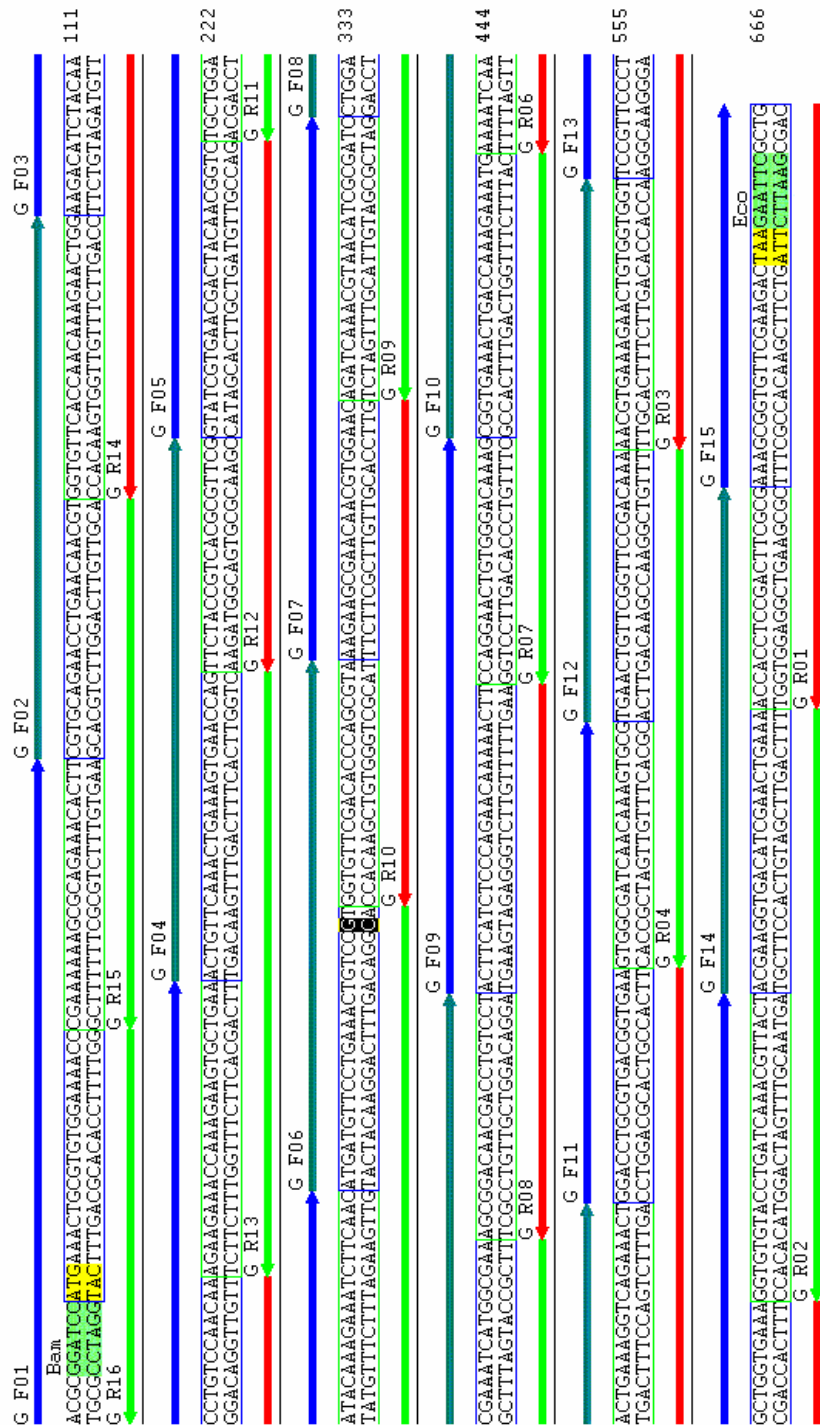
Es konnte gezeigt werden, dass weder der Histidinrest 14 noch Aspartat 31 an einer zink-vermittelten Bindung von MAM am MHC-II-Komplex beteiligt sind. Dagegen konnte die Bedeutung des Restes Histidin 58 für die Funktionalität des MAM und die Notwendigkeit für die Bindung am MHC-II-Molekül bewiesen werden. Die Glutamatreste 28, 30, 39, 40 und 43 sind für eine erfolgreiche Bindung des MAM am MHC-II-Komplex nicht essentiell. Der Glutamatrest 28 hat nur Bedeutung für die Wechselwirkung mit dem T-Zell-Rezeptor. Denn nach der Substitution von E28 durch Alanin erfolgt keine T-Zell-Aktivierung mehr.

In der Zukunft wird die genaue Rolle des Zinks für die Dimerisierung und Bindung von MAM am MHC-II-Komplex noch zu klären sein. Als weiterer Interaktionspartner des Immunsystems mit MAM konnten durch die Versuche CD1-positive Zellen identifiziert werden. Hier konnte eine eindeutige Bindung an CD1a, b und c gezeigt werden. Dabei erfolgte die beste Interaktion mit CD1c. Ferner konnte aufgrund der Daten aus den Vitalitätstests die Toxizität von MAM bewiesen werden. Im direkten Vergleich mit SEA und TSST-1 inhibierte MAM das Wachstum von *E. coli* erheblich. Das MAM zeigte in den Versuchen keine Proteaseaktivität, aber eine DNase-Aktivität konnte in den Versuchen eindeutig nachgewiesen werden. Dies erklärt den inhibierenden Effekt von MAM nach Expression auf das Wirtsbakterium. Die Ergebnisse zeigen, dass es bifunktionelle Proteine mit Superantigeneigenschaft gibt. Diese Proteine sind nicht nur potente Stimulatoren des Immunsystems, sondern nehmen eine enzymatische Aufgabe des Pathogens wahr. Zukünftig wird man durch den direkten Sequenzvergleich der Proteine sicherlich noch weitere Superantigene mit interessanten Eigenschaften finden. Durch seine besonderen strukturellen Eigenschaften weist MAM daraufhin, dass es noch mehr Proteine mit Superantigenaktivität gibt, die dem klassischen Strukturmotiv nicht entsprechen. Die molekulare Charakterisierung der Superantigene erlaubt die Bildung von Strategien zur Prävention von Krankheiten (Vakzinierung) und deren erfolgreiche Therapie. Darüber hinaus ermöglicht die genaue Kenntnis der funktionellen Regionen der Proteine, zukünftig deren kontrollierten Einsatz als Therapeutikum.

7 Anhänge

7.1 Anhang I

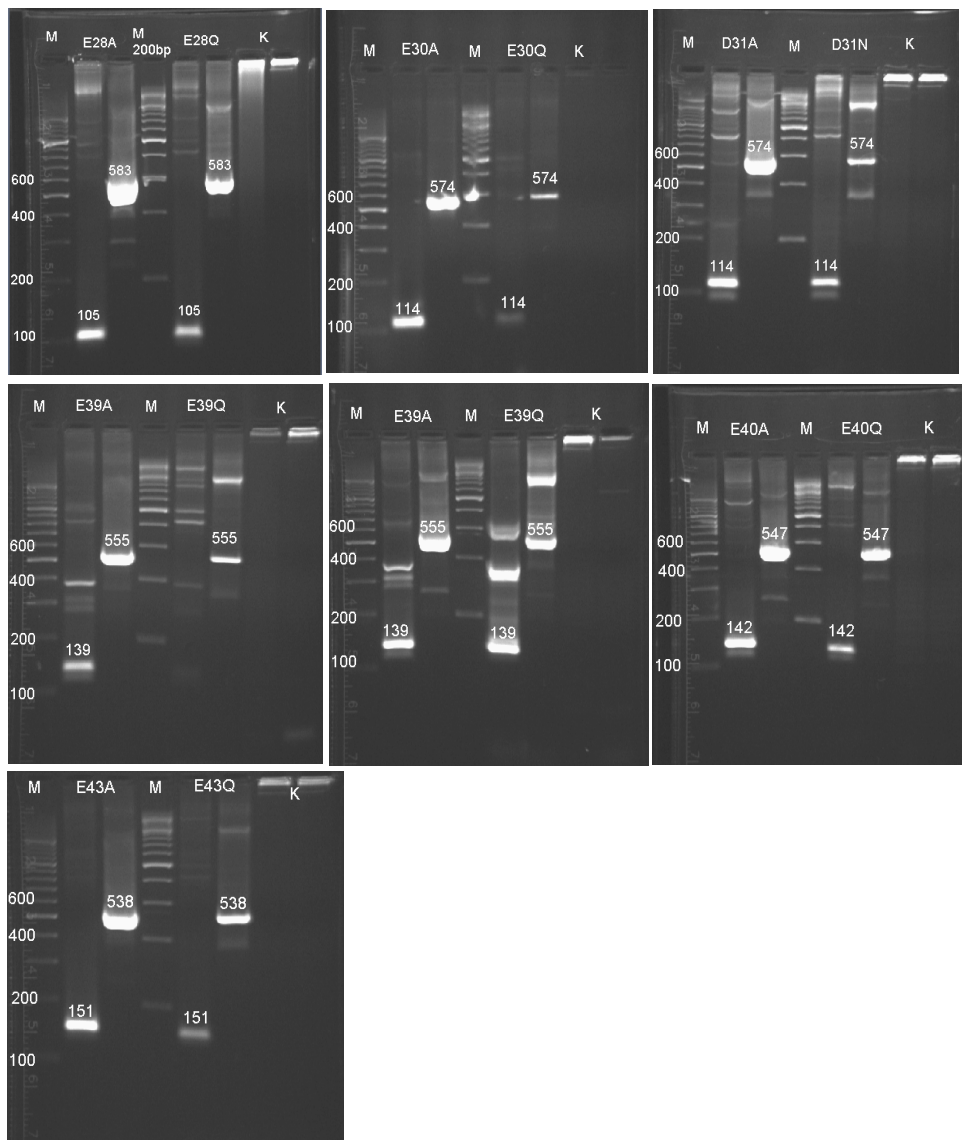
7.1.1 Optimierte Nukleotidsequenz des *Mycoplasma arthritidis* Superantigens-Gens



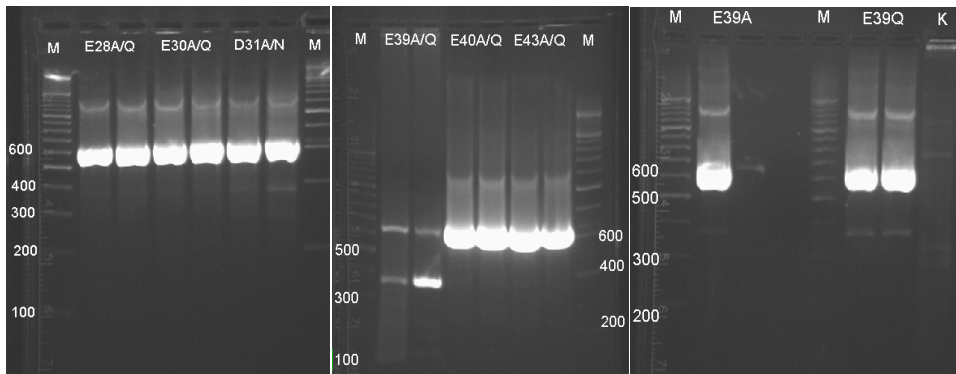
7.2 Anhang II

7.2.1 Gelfotos der Mutanten E28A/Q, E30A/Q, D31A/N, E39A/Q, E40A/Q und E43A/Q

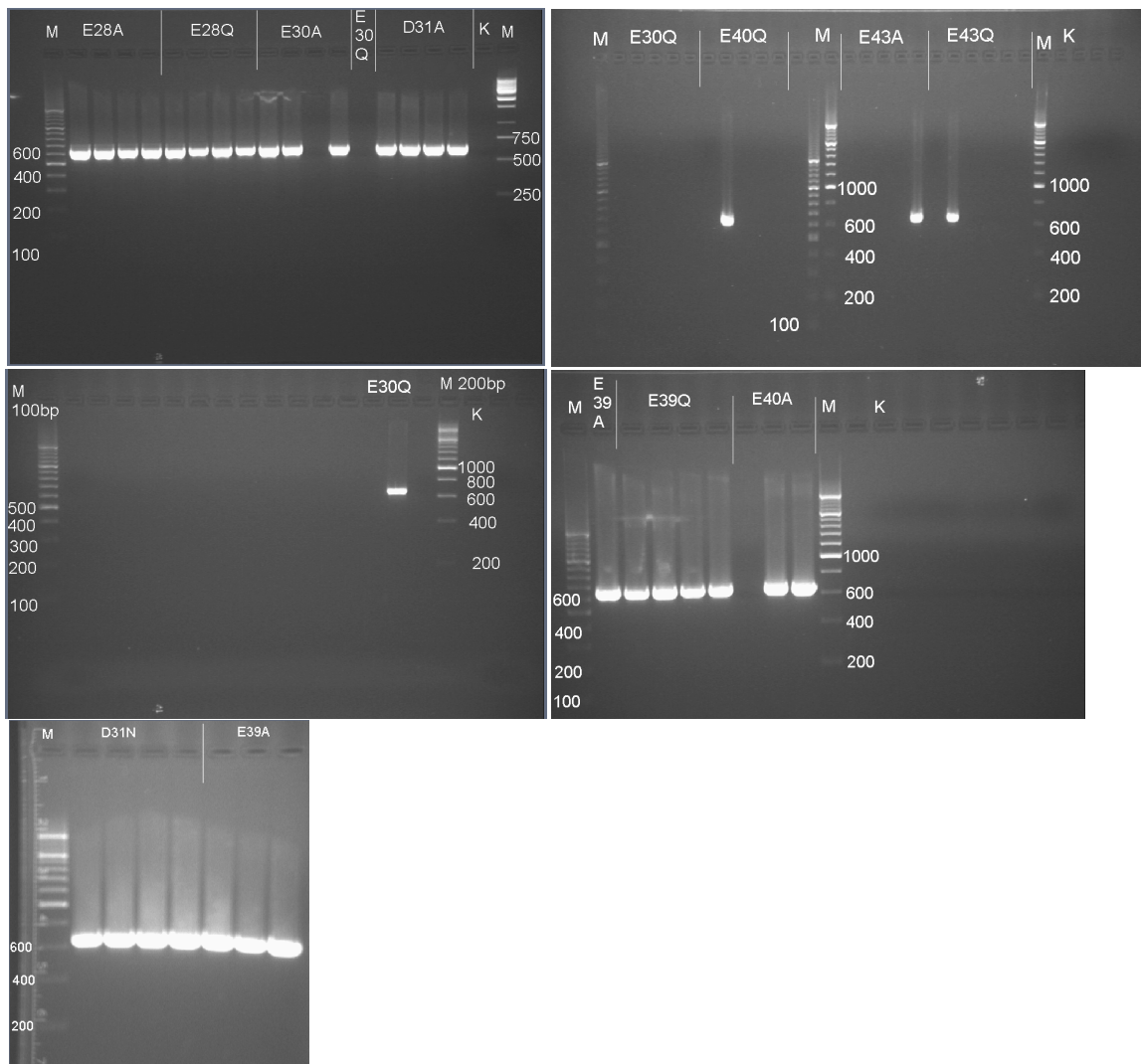
Produkte aus den jeweils beiden ersten PCRs:



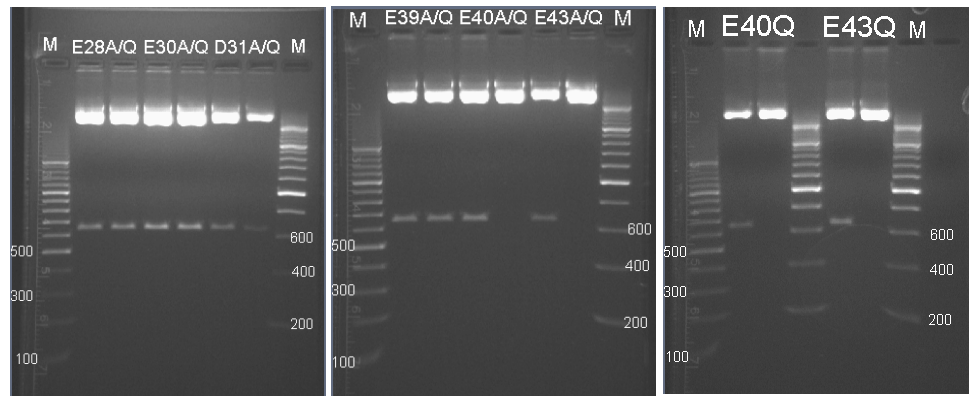
Endprodukte der finalen PCRs:



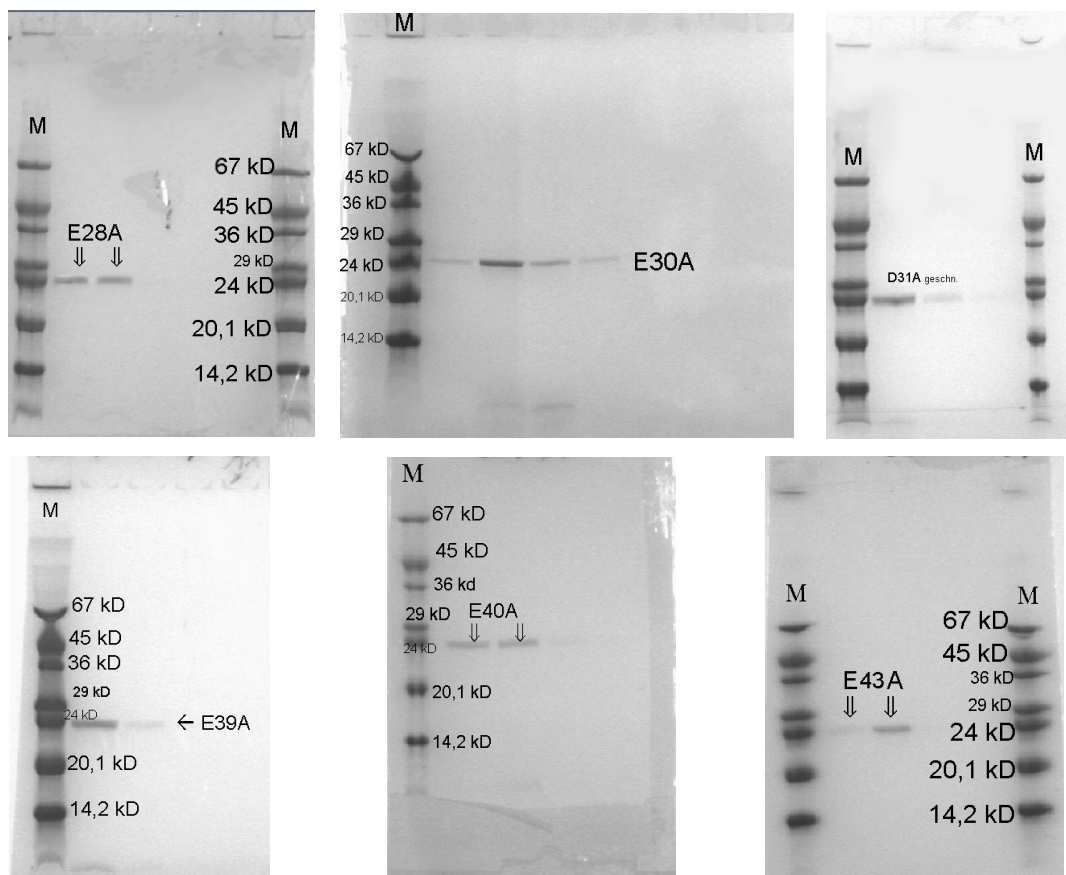
PCR-Screening der einzelnen Klone:



Kontrolle der potentiell positiven Klone durch Restriktion



Exprimierte Mutanten in *E. coli* BL21



7.3 Anhang III

7.3.1 Sequenzierungsdaten:

>3468_D31A_pGEX3.ab1 940 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCG
GAGGTGGTTTTTCAGTTCGATGTCACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTA
CACACCTTTCACCAGCAGGGAACGGAACCACCACAGTTCCTTTCACGTTTT
TGTCGGAACCGAACAGTTCACGCACTTTGTTGATCGCCACTTCACCGTCA
CGCAGGTCCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAG
TTTCACCGCTTTGTCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGA
AGTAGGACAGGTCGTTGTCCGCTTTCGCCATGATTTTCGTCCAGGATCGCG
ATGTTACGTTTGATCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTC
GAACACCACGGACAGTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTTCTTTGTATT
CCAGCAGACCGTTGTAGTCGTTACGATACCGAACGCGTGACGGTAGAAC
TGGTTCACTTTCAGTTTGAACAGTTTCAGCACTTCTTTGGTTTCTTCTTT
GTTGGACAGGTTGTAGATCGCTTCCAGTTCCTTTGTTGGTGAACACCACGT
TGTTTCAGGTTCTGCACGAAGTGTTTCTGCGCTTTTTTCGGGGTTTTTACA
CGCAGTTTCAT

>3468_D31A_pGEX5.ab1 946 ATGAAACTGCGTGTGGA
AAACCCGAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGG
TGTTACCAACAAGAAGTGGAAAGCGATCTACAACCTGTCCAACAAAGAA
GAAACCAAGAAGTGCTGAAACTGTTCAAACCTGAAAGTGAACCAAGTTCTA
CCGTCACGCGTTTCGGTATCGTGAACGACTACAACGGTCTGCTGGAATACA
AAGAAATCTTCAACATGATGTTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACC
CAGCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAACATCGCGAT
CCTGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCCTACTTCATCT
CCCAGAACAAAACTTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACC
AAAGAAATGAAATCAAACCTGAAAGGTCAGAACTGGACCTGCGTGACGG
TGAAGTGGCGATCAACAAAGTGCCTGAACTGTTTCGGTTCGACAAAAACG
TGAAAGAACCTGTGGTGGTTCCGTTCCTGCTGGTGAAGGTGTGTACCTG
ATCAAACGTTACTACGAANGTGACATCGAACTGAAAACCACTCCGACTT
CGCGAAAGCGGTGTTTGAAGACTAA

>3468_D31N_pGEX3.ab1 936 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCG
GAGGTGGTTTTTCAGTTCGATGTCACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTA
CACACCTTTCACCAGCAGGGAACGGAACCACCACAGTTCCTTTCACGTTTT
TGTCGGAACCGAACAGTTCACGCACTTTGTTGATCGCCACTTCACCGTCA
CGCAGGTCCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAG
TTTCACCGCTTTGTCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGA
AGTAGGACAGGTCGTTGTCCGCTTTCGCCATGATTTTCGTCCAGGATCGCG
ATGTTACGTTTGATCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTC
GAACACCACGGACAGTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTTCTTTGTATT
CCAGCAGACCGTTGTAGTCGTTACGATACCGAACGCGTGACGGTAGAAC
TGGTTCACTTTCAGTTTGAACAGTTTCAGCACTTCTTTGGTTTCTTCTTT
GTTGGACAGGTTGTAGATGTTTTCCAGTTCCTTTGTTGGTGAACACCACGT
TGTTTCAGGTTCTGCACGAAGTGTTTCTGCGCTTTTTTCGGGGTTTTTACA
CGCAGTTTCAT

>3468_D31N_pGEX5.ab1 939 ATGAAACTGCGTGTGGA
AAACCCGAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGG
TGTTACCAACAAAGAACTGGAAAACATCTACAACCTGTCCAACAAAGAA
GAAACCAAGAAAGTGCTGAAACTGTTCAAACCTGAAAGTGAACCAGTTCTA
CCGTCACGCGTTCCGGTATCGTGAACGACTACAACGGTCTGCTGGAATACA
AAGAAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACC
CAGCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAACATCGCGAT
CCTGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCTACTTCATCT
CCCAGAACAAAACTTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACC
AAAGAAATGAAAAATCAAACCTGAAAGGTCAGAAACTGGACCTGCGTGACGG
TGAAGTGCGGATCAACAAAGTGCGTGAACCTGTTCCGGTCCGACAAAAACG
TGAAAGAACTGTGGTGGTTCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTG
ATCAAACGTTACTACGAAGGTGACATCGAACTGAAAACCACTCCGACTT
CGCGAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

>3468_E28A_pGEX3.ab1 944 11 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCG
GAGGTGGTTTTTCAGTTCGATGTCACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTA
CACACCTTTCACCAGCAGGGAACGGAACCAACAGTTCTTTCACGTTTT
TGTCGGAACCGAACAGTTCACGCACTTGTGATCGCCACTTCACCGTCA
CGCAGGTCCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAG
TTTACCGCTTTGTCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGA
AGTAGGACAGGTTCGTTGTCCGCTTTCGCCATGATTTTCGTCCAGGATCGCG
ATGTTACGTTTGATCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTC
GAACACCACGGACAGTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTTCTTTGTATT
CCAGCAGACCGTTGTAGTCGTTACGATACCGAACGCGTGACGGTAGAAC
TGGTTCACTTTCAGTTTGAACAGTTTCAGCACTTCTTTGGTTTCTTCTTT
GTTGGACAGGTTGTAGATGTCTTCCAGCGCTTTGTTGGTGAACACCACGT
TGTTACAGGTTCTGCACGAAGTGTTTCTGCGCTTTTTTCGGGTTTTCCAC
GCAGTTTCAT

>3468_E28A_pGEX5.ATGAAACTGCGTGTGGAAA
ACCCGAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGGTG
TTCACCAACAAAGCGCTGGAAGACATCTACAACCTGTCCAACAAAGAA
AACCAAAGAAAGTGCTGAAACTGTTCAAACCTGAAAGTGAACCAGTTCTACC
GTCACGCGTTCCGGTATCGTGAACGACTACAACGGTCTGCTGGAATACAAA
GAAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACCCA
GCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAACATCGCGATCC
TGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCTACTTCATCTCC
CAGAACAAAACTTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACCAA
AGAAATGAAAAATCAAACCTGAAAGGTCAGAAACTGGACCTGCGTGACGGTG
AAGTGCGGATCAACAAAGTGCGTGAACCTGTTCCGGTCCGACAAAAACGTG
AAAGAACTGTGGTGGTTCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTGAT
CAAACGTTACTACGAANGTGACATCGAACTGAAAACCACTCCGACTTCG
CGAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

>3468_E28Q_pGEX3.ab1 938 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCG
GAGGTGGTTTTTCAGTTCGATGTCACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTA
CACACCTTTCACCAGCAGGGAACGGAACCAACAGTTCTTTCACGTTTT
TGTCGGAACCGAACAGTTCACGCACTTGTGATCGCCACTTCACCGTCA
CGCAGGTCCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAG
TTTACCGCTTTGTCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGA
AGTAGGACAGGTTCGTTGTCCGCTTTCGCCATGATTTTCGTCCAGGATCGCG
ATGTTACGTTTGATCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTC
GAACACCACGGACAGTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTTCTTTGTATT
CCAGCAGACCGTTGTAGTCGTTACGATACCGAACGCGTGACGGTAGAAC
TGGTTCACTTTCAGTTTGAACAGTTTCAGCACTTCTTTGGTTTCTTCTTT
GTTGGACAGGTTGTAGATGTCTTCCAGCTGTTTGTGGTGAACACCACGT
TGTTACAGGTTCTGCACGAAGTGTTTCTGCGCTTTTTTCGGGTTTTCCACA
CGCAGTTTCAT

>3468_E28Q_pGEX5.ab1 937 ATGAAACTGCGTGTGGAAA
ACCCGAAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGGTG
TTCACCAACAAACAGCTGGAAGACATCTACAACCTGTCCAACAAAGAAGA
AACCAAAGAAGTGCTGAAACTGTTCAAACCTGAAAGTGAACCAAGTTCTACC
GTCACGCGTTCCGGTATCGTGAACGACTACAACGGTCTGCTGGAATACAAA
GAAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACCCA
GCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAACATCGCGATCC
TGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCTACTTCATCTCC
CAGAACAAAAAATTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACCAA
AGAAATGAAAAATCAAACCTGAAAGGTCAGAACTGGACCTGCGTGACGGTG
AAGTGGCGATCAACAAAGTGCGTGAACCTGTTCCGGTCCGACAAAAACGTG
AAAGAAGTGTGGTGGTTCGGTTCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTGAT
CAAACGTTACTACGAAGGTGACATCGAACTGAAAACCACTCCGACTTCG
CGAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

>3468_E30A_pGEX3.ab1 937 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCGGAGGTGGTTTTCA
GTTTCGATGTCACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTACACACCTTTCACC
AGCAGGGAACCGAACCACCACAGTTCTTTCACGTTTTTGTTCGGAACCGAA
CAGTTCACGCACTTTGTTGATCGCCACTTCACCGTCACGCAGGTCCAGTT
TCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAGTTTCACCGCTTTG
TCCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGAAGTAGGACAGGTG
GTTGTCCGCTTTCGCCATGATTTCTGTCAGGATCGCGATGTTACGTTTGA
TCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTCGAACACCACGGAC
AGTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTCTTTGTATTCCAGCAGACCGTT
GTAGTCGTTCCAGTACCGAACCAGCGTGACGGTAGAACTGGTTCACTTTCA
GTTTGAACAGTTTCAGCACTTCTTTGGTTTCTTCTTTGTTGGACAGGTTG
TAGATGTCCGCCAGTTCTTTGTTGGTGAACACCACGTTGTTACAGTTCTG
CACGAAGTGTCTGCGCTTTTTTCGGGTTTTCCACACGCAGTTTCAT

>3468_E30A_pGEX5.ab1 943 ATGAAACTGCGTGTGGAAA
CCCGAAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGGTGT
TCACCAACAAAGAAGCTGGCGGACATCTACAACCTGTCCAACAAAGAAGAA
ACCAAAGAAGTGCTGAAACTGTTCAAACCTGAAAGTGAACCAAGTTCTACCG
TCACGCGTTCCGGTATCGTGAACGACTACAACGGTCTGCTGGAATACAAAG
AAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACCCAG
CGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAACATCGCGATCCT
GGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCTACTTCATCTCCC
AGAACAAAAAATTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACCAAA
GAAATGAAAAATCAAACCTGAAAGGTCAGAACTGGACCTGCGTGACGGTGA
AGTGGCGATCAACAAAGTGCGTGAACCTGTTCCGGTCCGACAAAAACGTGA
AAGAAGTGTGGTGGTTCGGTTCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTGATC
AAACGTTACTACGAAGGTGACATCGAACTGAAAACCACTCCGACTTCGC
GAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

>3468_E30Q_pGEX3.ab1 924 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCG
GAGGTGGTTTTTCAGTTTCGATGTACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGTA
CACACCTTTCACCAGCAGGGAACGGAACCACCACAGTTCTTTCACGTTTT
TGTCGGAACCGAACAGTTCACGCACTTTGTTGATCGCCACTTCACCGTCA
CGCAGGTCCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAG
TTTACCGCTTTGTCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGA
AGTAGGACAGGTGCTTGTCCGCTTTCGCCATGATTTCTGTCAGGATCGCG
ATGTTACGTTTGATCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTC
GAACACCACGGACAGTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTCTTTGTATT
CCAGCAGACCGTTGTAGTCGTTACGATACCGAACGCGTGACGGTAGAAC
TGGTTCACTTTTCAGTTTGAACAGTTTCAGCACTTCTTTGGTTTCTTCTTT
GTTGGACAGGTTGTAGATGTCCTGCAGTTCTTTGTTGGTGAACACCACGT
TGTTACAGTTTCTGCACGAAGTGTCTGCGCTTTTTTCGGGTTTTCCACA
CGCAGTTTCAT

>3468_E30Q_pGEX5.ab1 929 ATGAAACTGCGTGTGGAAA
 ACCCGAAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGGTG
 TTCACCAACAAAGAAGTGCAGGACATCTACAACCTGTCCAACAAAGAAGA
 AACCAAGAAGTGCTGAAACTGTTCAAAGTGAACCAAGTTCTACC
 GTCACGCGTTCCGGTATCGTGAACGACTACNACGGTCTGCTGGAATACAAA
 GAAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACCCA
 GCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAACATCGCGATCC
 TGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCTACTTCATCTCC
 CAGAACAAAAACTTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACCAA
 AGAAATGAAAAATCAAAGTGAAGGTGAGAACTGGACCTGCGTGACGGTG
 AAGTGGCGATCAACAAAGTGCCTGAACTGTTCCGGTCCGACAAAAACGTG
 AAAGAAGTGTGGTGGTTCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTGAT
 CAAACGTTACTACGAAGGTGACATCGAACTGAAAACCACTCCGACTTCG
 CGAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

>3468_E39A_pGEX3.ab1 933 23 630 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCG
 GAGGTGGTTTTTCAGTTCGATGTCACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTA
 CACACCTTTCACCAGCAGGGAACGGAACCAACACAGTTCTTTCACGTTTT
 TGTCGGAACCGAACAGTTCACGCACTTTGTTGATCGCCACTTCACCGTCA
 CGCAGGTCCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAG
 TTTACCGCTTTGTCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGA
 AGTAGGACAGGTGCTGTGTCGCTTTCGCCATGATTTTCGTCCAGGATCGCG
 ATGTTACGTTTGATCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTC
 GAACACCACGGACAGTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTTCTTTGTATT
 CCAGCAGACCGTTGTAGTCGTTACGATACCGAACGCGTGACGGTAGAAC
 TGGTTCACTTTCAGTTTGAACAGTTTCAGCACTTCTTTGGTTTCCGCTTT
 GTTGGACAGGTTGTAGATGTCTTCCAGTTCCTTTGTTGGTGAACACCACGT
 TGTTACAGTTCTGCACGAAGTGTCTGCGCTTTTTTCGGGTTTTCCACA
 CGCAGTTTCAT

>3468_E39A_pGEX5.ab1 943 ATGAAACTGCGTGTGGAAA
 ACCCGAAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGGTG
 TTCACCAACAAAGAAGTGAAGACATCTACAACCTGTCCAACAAAGCGGA
 AACCAAGAAGTGCTGAAACTGTTCAAAGTGAACCAAGTTCTACC
 GTCACGCGTTCCGGTATCGTGAACGACTACAACGGTCTGCTGGAATACAAA
 GAAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACCCA
 GCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAACATCGCGATCC
 TGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCTACTTCATCTCC
 CAGAACAAAAACTTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACCAA
 AGAAATGAAAAATCAAAGTGAAGGTGAGAACTGGACCTGCGTGACGGTG
 AAGTGGCGATCAACAAAGTGCCTGAACTGTTCCGGTCCGACAAAAACGTG
 AAAGAAGTGTGGTGGTTCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTGAT
 CAAACGTTACTACGAAGGTGACATCGAACTGAAAACCACTCCGACTTCG
 CGAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

>3468_E39Q_pGEX3.ab1 939 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCG
 GAGGTGGTTTTTCAGTTCGATGTCACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTA
 CACACCTTTCACCAGCAGGGAACGGAACCAACACAGTTCTTTCACGTTTT
 TGTCGGAACCGAACAGTTCACGCACTTTGTTGATCGCCACTTCACTGTCA
 CGCAGGTCCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAG
 TTTACCGCTTTGTCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGA
 AGTAGGACAGGTGCTGTGTCGCTTTCGCCATGATTTTCGTCCAGGATCGCG
 ATGTTACGTTTGATCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTC
 GAACACCACGGACAGTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTTCTTTGTATT
 CCAGCAGACCGTTGTAGTCGTTACGATACCGAACGCGTGACGGTAGAAC
 TGGTTCACTTTCAGTTTGAACAGTTTCAGCACTTCTTTGGTTTCCCTGTTT
 GTTGGACAGGTTGTAGATGTCTTCCAGTTCCTTTGTTGGTGAACACCACGT
 TGTTACAGTTCTGCACGAAGTGTCTGCGCTTTTTTCGGGTTTTCCACA
 CGCAGTTTCAT

>3468_E39Q_pGEX5.ab1 930 ATGAAACTGCGTGTGGAA
AACC CGAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGGT
GTTCAACCAACAAAGAACTGGAAGACATCTACAACCTGTCCAACAAACAGG
AAACCAAAAGAAAGTGCTGAAACTGTTCAAACCTGAAAGTGAACCAGTTCTAC
CGTCACGCGTTCGGTATCGTGAACGACTACAACGGTCTGCTGGAATACAA
AGAAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACCC
AGCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAAACATCGCGATC
CTGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCCCTACTTCATCTC
CCAGAACAAAACTTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACCA
AAGAAATGAAATCAAACCTGAAAGGTCAGAACTGGACCTGCGTGACAGT
GAAGTGGCGATCAACAAAGTGCGTGAACCTGTTCTGGTTCCGACAAAAACGT
GAAAGAAGTGTGGTGGTTCCGTTCCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTGA
TCAAACGTTACTACGAAGGTGACATCGAACTGAAAACACCTCCGACTTC
CGCAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

>3468_E40A_pGEX3.ab1 916 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCG
GAGGTGGTGTTCAGTTCGATGTACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTA
CACACCTTTCACAGCAGGGAACGGAACCAACACAGTTCTTTCACGTTTT
TGTCGGAACCGAACAGTTCACGCACTTTGTTGATCGCCACTTCACCGTCA
CGCAGGTCCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAG
TTTACCGCTTTGTCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGA
AGTAGGACAGGTTCGTTGTCCGCTTTCGCCATGATTTTCGTCCAGGATCGCG
ATGTTACGTTTGATCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTC
GAACACCACGGACAGTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTTCTTTGTATT
CCAGCAGACCTTGTAGTCGTTACGATAACCGAACGCGTGACGGTAGAAC
TGGTTCACCTTTCAGTTTGAACAGTTTCAGCACTTCTTTGGTCGCTTCTTT
GTTGGACAGGTTGTAGATGTCTTCCAGTTCTTTGTTGGTGAACACCACGT
TGTTACAGTTCTGCACGAAGTGTTTCTGCGCTTTTTTCGGGTTTTCCACA
CGCAGTTTCAT

>3468_E40A_pGEX5.ab1 918 ATGAAACTGCGTGTGGA
AAACCCGAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGG
TGTTCAACCAACAAAGAACTGGAAGACATCTACAACCTGTCCAACAAAGAA
GCGACCAAAAGAAAGTGCTGAAACTGTTCAAACCTGAAAGTGAACCAGTTCTA
CCGTCACGCGTTCGGTATCGTGAACGACTACAACGGTCTGCTGGAATACA
AAGAAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACC
CAGCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAAACATCGCGAT
CCTGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCCCTACTTCATCT
CCGAGAACAAAACTTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACC
AAAGAAATGAAATCAAACCTGAAAGGTCAGAACTGGACCTGCGTGACGG
TGAAGTGGCGATCAACAAAGTGCGTGAACCTGTTCCGTTCCGACAAAAACG
TGAAAGAAGTGTGGTGGTTCCGTTCCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTG
ATCAAACGTTACTACGAAGGTGACATCGAACTGAAAACACCTCCGACTT
CGCGAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

>3468_E40Q_pGEX3.ab1 927 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCGGAGGTGG
TTTTCAGTTCGATGTACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTACACACCT
TTCACCAGCAGGGAACGGAACCAACACAGTTCTTTCACGTTTTTGTTCGGA
ACCGAACAGTTCACGCACTTTGTTGATCGCCACTTCACCGTCACGCAGGT
CCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAGTTTCACC
GCTTTGTCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGAAGTAGGA
CAGGTCTGTTGTCGCTTTCGCCATGATTTTCGTCCAGGATCGCGATGTTAC
GTTTGATCTGTTCCAGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTCGAACACC
ACGGACAGTTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTTCTTTGTATTCCAGCAG
ACCGTTGTAGTCGTTACGATAACCGAACGCGTGACGGTAGAACTGGTTCA
CTTTCAGTTTGAACAGTTTTCAGCACTTCTTTGGTCTGTTCTTTGTTGGAC
AGGTTGTAGATGTCTTCCAGTTCTTTGTTGGTGAACACCACGTTGTTTCAG
GTTCTGCACGAAGTGTTTCTGCGCTTTTTTCGGGTTTTCCACACGCAGTT
TCAT

>3468_E40Q_pGEX5.ab1 937 ATGAAACTGCGTGTGGAAA
ACCCGAAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGGTG
TTCACCAACAAAGAAGTGAAGACATCTACAACCTGTCCAACAAAGAACA
GACCAAGAAGTGCTGAAACTGTTCAAAGTGAAGTGAACAGTTCTACC
GTCACGCGTTCCGGTATCGTGAACGACTACAACGGTCTGCTGGAATACAAA
GAAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACCCA
GCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAACATCGCGATCC
TGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCTACTTTCATCTCC
CAGAACAAAAACTTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACCAA
AGAAATGAAAAATCAAAGTGAAGGTGAGAACTGGACCTGCGTGACGGTG
AAGTGGCGATCAACAAAGTGCCTGAACTGTTCCGGTCCGACAAAAACGTG
AAAGAAGTGTGGTGGTTCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTGAT
CAAACGTTACTACGAAGGTGACATCGAACTGAAAACACCTCCGACTTCG
CGAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

>3468_E43A_pGEX3.ab1 906 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCG
GAGGTGGTTTTTCAGTTCGATGTACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTA
CACACCTTTCACCAGCAGGGAACGGAACCAACAGTTCTTTCACGTTTT
TGTCGGAACCGAACAGTTCACGCACTTTGTTGATCGCCACTTCACCGTCA
CGCAGGTCCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAG
TTTACCGCTTTGTCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGA
AGTAGGACAGGTGCTGTTCGCTTTCGCCATGATTTTCGTCCAGGATCGCG
ATGTTACGTTTGATCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTC
GAACACCACGGACAGTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTTCTTTGTATT
CCAGCAGACCGTTGTAGTCGTTACGATACCGAACGCGTGACGGTAGAAC
TGGTTCACTTTCAGTTTGAACAGTTTCAGCACCGCTTTGGTTTCTTCTTT
GTTGGACAGGTTGTAGATGTCTTCCAGTTCCTTTGTTGGTGAACACCACGT
TGTTACAGTTTCTGCACGAAGTGTTCCTGCGCTTTTTTCGGGTTTTCCACA
CGCAGTTTCAT

>3468_E43A_pGEX5.ab1 904 ATGAAACTGCGTGTGGAA
AACCCGAAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGGT
GTTACCAACAAAGAAGTGAAGACATCTACAACCTGTCCAACAAAGAAG
AAACCAAAGCGGTGCTGAAACTGTTCAAAGTGAAGTGAACAGTTCTAC
CGTCACGCGTTCCGGTATCGTGAACGACTACNACGGTCTGCTGGAATACAA
AGAAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACCC
AGCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAACATCGCGATC
CTGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCTACTTTCATCTC
CCAGAACAAAAACTTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACCA
AAGAAATGAAAAATCAAAGTGAAGGTGAGAACTGGACCTGCGTGACGGT
GAAGTGGCGATCAACAAAGTGCCTGAACTGTTCCGGTCCGACAAAAACGT
GAAAGAAGTGTGGTGGTTCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTGA
TCAAACGTTACTACGAAGGTGACATCGAACTGAAAACACCTCCGACTTC
CGGAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

>3468_E43Q_pGEX3.ab1 934 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCG
GAGGTGGTTTTTCAGTTCGATGTACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTA
CACACCTTTCACCAGCAGGGAACGGAACCAACAGTTCTTTCACGTTTT
TGTCGGAACCGAACAGTTCACGCACTTTGTTGATCGCCACTTCACCGTCA
CGCAGGTCCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAG
TTTACCGCTTTGTCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGA
AGTAGGACAGGTGCTGTTCGCTTTCGCCATGATTTTCGTCCAGGATCGCG
ATGTTACGTTTGATCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTC
GAACACCACGGACAGTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTTCTTTGTATT
CCAGCAGACCGTTGTAGTCGTTACGATACCGAACGCGTGACGGTAGAAC
TGGTTCACTTTCAGTTTGAACAGTTTCAGCACCTGTTTGGTTTCTTCTTT
GTTGGACAGGTTGTAGATGTCTTCCAGTTCCTTTGTTGGTGAACACCACGT
TGTTACAGTTTCTGCACGAAGTGTTCCTGCGCTTTTTTCGGGTTTTCCACA
CGCAGTTTCAT

>3468_E43Q_pGEX5.ab1 934 ATGAAACTGCGTGTGGAAA
 ACCCGAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGGTG
 TTCACCAACAAAGAACTGGAAGACATCTACAACCTGTCCAACAAAGAAGA
 AACCAACAGGTGCTGAAACTGTTCAAACCTGAAAGTGAACCAAGTTCTACC
 GTCACGCGTTCCGGTATCGTGAACGACTACAACGGTCTGCTGGAATACAAA
 GAAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACCCA
 GCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAACATCGCGATCC
 TGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCTACTTTCATCTCC
 CAGAACAAAAACTTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACCAA
 AGAAATGAAAAATCAAACCTGAAAGGTCAGAAACTGGACCTGCGTGACGGTG
 AAGTGGCGATCAACAAAGTGCCTGAACTGTTCCGGTCCGACAAAAACGTG
 AAAGAAGTGTGGTGGTTCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTGAT
 CAAACGTTACTACGAAGGTGACATCGAACTGAAAACCACTCCGACTTCG
 CGAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

>3468_H14A_pGEX3.ab1 899 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTCGGA
 GGTGGTTTTTCAGTTCGATGTCACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTACA
 CACCTTTCACCAGCAGGGAACGGAACCAACACAGTTCTTTCACGTTTTTG
 TCGGAACCGAACAGTTTCACGCACTTTGTTGATCGCCACTTCACCGTCACG
 CAGGTCCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAGTT
 TCACCGCTTTGTCCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGAAG
 TAGGACAGGTGCTTGTCCGCTTTCGCCATGATTTTCGTCCAGGATCGCGAT
 GTTACGTTTGATCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTCGA
 ACACCACGGAGCTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTTCTTTGTATTCC
 AGCAGACCGTTGTAGTCGTTACGATACCGAACGCGTGACGGTAGAACTG
 GTTCACTTTCAGTTTGAACAGTTTCAGCACTTCTTTGGTTTCTTCTTTGT
 TGGACAGGTTGTAGATGTCTTCCAGTTCTTTGTTGGTGAACACCAGTTG
 TTCAGGTTCTGCACGAACGCTTCTGCGCTTTTTTCGGGTTTTTCACACGC
 AGTTTCAT

>3468_H14A_pGEX5.ab1 911 ATGAAACTGCGTGTGGA
 AAACCCGAAAAAGCGCAGAAAGCGTTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGG
 TGTTACCAACAAAGAACTGGAAGACATCTACAACCTGTCCAACAAAGAA
 GAAACCAAGAAGTGCTGAAACTGTTCAAACCTGAAAGTGAACCAAGTTCTA
 CCGTCACGCGTTCCGGTATCGTGAACGACTACNACGGTCTGCTGGAATACA
 AAGAAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACC
 CAGCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAACATCGCGAT
 CCTGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCTACTTTCATCT
 CCCAGAACAAAAACTTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACC
 AAAGAAATGAAAAATCAAACCTGAAAGGTCAGAAACTGGACCTGCGTGACGG
 TGAAGTGGCGATCAACAAAGTGCCTGAACTGTTCCGGTCCGACAAAAACG
 TGAAAGAAGTGTGGTGGTTCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTG
 ATCAAACGTTACTACGAAGGTGACATCGAACTGAAAACCACTCCGACTT
 CGCGAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

>3468_H58A_pGEX3.ab1 922 TTAGTCTTCGAACACCGCTTTCGCGAAGTC
 GGAGGTGGTTTTTCAGTTCGATGTCACCTTCGTAGTAACGTTTGATCAGGTA
 CACACCTTTCACCAGCAGGGAACGGAACCAACACAGTTCTTTCACGTTTTTG
 TCGGAACCGAACAGTTTCACGCACTTTGTTGATCGCCACTTCACCGTCACGCA
 GGTCCAGTTTCTGACCTTTCAGTTTGATTTTCATTTCTTTGGTCAGTTTACC
 GCTTTGTCCCACAGTTCCTGGAAGTTTTTGTCTGGGAGATGAAGTAGGACA
 GGTCTGTTCCGCTTTCGCCATGATTTTCGTCCAGGATCGCGATGTTACGTTT
 GATCTGTTCCACGTTGTTTCGCTTCTTTACGCTGGGTGTCGAACACCACGG
 ACAGTTTCAGGAACATCATGTTGAAGATTTCTTTGTATTCCAGCAGACCGT
 TGTAAGTCGTTACGATACCGAACGCCGCACGGTAGAACTGGTTCACTTTCA
 GTTTGAACAGTTTTCAGCACTTCTTTGGTTTCTTCTTTGTTGGACAGGTTGTA
 GATGTCTTCCAGTTCTTTGTTGGTGAACACCACGTTGTTTCAGGTTCTGCA
 CGAAGTGTCTGCGCTTTTTTCGGGTTTTCCACACGCAGTTTCAT

>3468_H58A_pGEX5.ab1 942 ATGAAACTGCGTGTGGAAA
ACCCGAAAAAAGCGCAGAAACACTTCGTGCAGAACCTGAACAACGTGGTG
TTCACCAACAAAGAAGTGAAGACATCTACAACCTGTCCAACAAAGAAGA
AACCAAGAAGTGCTGAAACTGTTCAAAGTGAACCAAGTTCTACC
GTGCGGCGTTTCGGTATCGTGAACGACTACAACGGTCTGCTGGAATACAAA
GAAATCTTCAACATGATGTTCTGAAACTGTCCGTGGTGTTCGACACCCA
GCGTAAAGAAGCGAACAACGTGGAACAGATCAAACGTAACATCGCGATCC
TGGACGAAATCATGGCGAAAGCGGACAACGACCTGTCCTACTTCATCTCC
CAGAACAAAAACTTCCAGGAACTGTGGGACAAAGCGGTGAAACTGACCAA
AGAAATGAAAATCAAAGTGAAGGTCAGAACTGGACCTGCGTGACGGTG
AAGTGGCGATCAACAAAGTGCCTGAACTGTTTCGGTTCGACAAAAACGTG
AAAGAACTGTGGTGGTTCCTGCTGGTGAAAGGTGTGTACCTGAT
CAAACGTTACTACGAAGGTGACATCGAACTGAAAACCACTCCGACTTCG
CGAAAGCGGTGTTCTGAAGACTAA

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
A _{600nm}	Absorption (Extinktion)
AD	Atopische Dermatitis
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome, (erworbenes Immunschwächesyndrom)
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	akutes rheumatisches Fieber
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
BamHI	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus amylolique-faciens</i> , Stamm H, I = erstes isoliertes Restriktionsenzym
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CD	Circulardichroismus
CD4, CD8	cluster of differentiation
CDR	complementarity determining region
CFU	colony-forming unit
CPET	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
D	Aspartat
DMEM	Dulbecco' s-modified Eagle' s medium
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
E	Glutamat
Eap	extrazelluläres Adhärenz-Protein
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EcoRI	Restriktionsenzym aus Resistenzfaktor (R) aus <i>Escherichia Coli</i> - Stamm RY13, I = erstes isoliertes Restriktionsenzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ETA	exfoliatives Toxin A
ETB	exfoliatives Toxin B
FACS	fluorescence-activated cell sorter, Durchflussscytometer
FCS	foetal calf serum, Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	fast performance liquid chromatography
FR3	framework region 3
G	Guanin
GFP	Grün-Fluoreszierendes Protein
Glu	Glutamat

GST	Glutathion-S-Transferase
HERV-K18	humanes endogenes Retrovirus K18
His	Histidin
HIV	human immunodeficiency virus, menschliches Immunschwächevirus
HLA	humanes Leukocytenantigen (Untergruppen A, B, C und DQ, DP, DR)
hPa	Hektopascal
HA	Haemagglutinin
Ig	Immunglobulin (Subklassen A, D, E, G und M)
IL	Interleukin (Subtypen 1 α , β , 2-27)
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
IDDM	Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
K	Kontrolle
KBE	koloniebildende Einheiten
kbp	kilobasenpaar
KD	Kawasaki disease
kD	Kilodalton
LB	Luria broth
LPS	Lipopolysaccharid
M	Marker
MAM	<i>Mycoplasma arthritidis</i> -derived Mitogen
MBP	Maltose-Bindungsprotein
MF	Mitogener Faktor
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MI _s	minor lymphocyte stimulating, Minor- Lymphocyten stimulierend
mM	Millimolar
MMTV	Maus Mamma Tumor Virus
MS	Multiple Sklerose
N	Asparagin
Nef	negative factor
NMR	nuclear magnetic resonance, Kernmagnetische Resonanz
OB	Oligosaccharide/Oligonucleotide-binding
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
P47/ 67	Protein 47 / 67
Q	Glutamin

r	rekombinant
RA	rheumatoide Arthritis
RNA	ribonucleic acid, Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	S = Svedberg; Einheit des Sedimentationskoeffizienten (s)
SAG	Superantigen
SAGPZ	superantigenpräsentierende Zellen
SDM	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> derived mitogen
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SE	Staphylokokken Enterotoxin (Subtypen A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q und U)
SePE	<i>Streptococcus equi</i> pyrogene Exotoxine (Subtypen H, I, L und M)
Ser	Serin
SMEZ	<i>Streptococcus pyogenes</i> mitogenes Exotoxin (Subtypen Z ₁₋₂₄)
SPE	<i>Streptococcus pyogenes</i> erythrogenes Toxin (Subtypen A ₁₋₅ , C, G, H, I, J, L und M)
SSLs	Staphylococcal Superantigen-Like Proteins
SSA	<i>Streptococcus pyogenes</i> Superantigen
ssp.	Subspezies
STSS	Streptokokken Toxisches Schock Syndrom
TAE	Tris-acetate- EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borate- EDTA
TBST	Tris Buffered Saline Tween
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
TH-Zellen	T-Helferzellen
TLR2/4	Toll-like-Rezeptor 2 , Toll-like-Rezeptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor - α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSST-1	Toxische Schock Syndrom-Toxin 1
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
UDA	<i>Urtica dioica</i> Agglutinin
V β	variabler Teil der β -Kette des TCR
wt	Wildtyp
YPM	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> Mitogene (Subtypen a, b und c)

9 Literaturverzeichnis

Literatur

1. **Abe J**, Takeda T, Watanabe Y, Nakao H, Kobayashi N, Leung DY, Kohsaka T. 1993.
Evidence for superantigen production by *Yersinia pseudotuberculosis*.
J. Immunol. 151:4183-4188.
2. **Abrahmsen L**, Dohlsten M, Segren S, Bjork P, Jonsson E, Kalland T. 1995.
Characterization of two distinct MHC class II binding sites in the superantigen staphylococcal enterotoxin A
EMBO J. 14:2978-2986.
3. **Acha-Orbea H**, MacDonald HR. 1995.
Superantigens of mouse mammary tumor virus.
Annu. Rev. Immunol. 13:459-486.
4. **Acharya KR**, Passalacqua EF, Jones EY, Harlos K, Stuart DI, Brehm RD, Tranter HS. 1994.
Structural basis of superantigen action inferred from crystal structure of toxic-shock syndrome toxin-1.
Nature 367:94-97.
5. **Alber G**, Hammer DK, Fleischer B. 1990.
Relationship between enterotoxic- and T lymphocyte-stimulating activity of staphylococcal enterotoxin B.
J. Immunol. 144:4501-4506.
6. **Al-Daccak R**, Mehindate K, Damdoui F, Etongue-Mayer P, Nilsson H, Antonsson P, Sundstrom M, Dohlsten M, Sekaly RP, Mourad W. 1998.
Staphylococcal enterotoxin D is a promiscuous superantigen offering multiple modes of interactions with the MHC class II receptors.
J. Immunol. 160:225-232.

7. **Alouf JE**, Müller-Alouf H, Köhler W. 1999.
Superantigenic *Streptococcus pyogenes* erythrogenic pyrogenic exotoxins.
In: The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins.
Academic Press, London. 567-588.
8. **Al-Shangiti AM**, Naylor CE, Nair SP, Briggs DC, Henderson B, Chain BM. 2004.
Structural relationships and cellular tropism of staphylococcal superantigen-like proteins.
Infect. Immun. 72:4261-4270.
9. **Alvarez-Ossorio L**, Johannsen M, Russlies M, Kirchner H, Rink L. 1997.
HLA-dependent heterogeneous T cell response to *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen (MAS).
Med. Microbiol. Immunol. (Berl). 185:245-251.
10. **Alvarez-Ossorio L**, Johannsen M, Alvarez-Ossorio R, Nicklas W, Kirchner H, Rink L. 1998.
Cytokine induction by *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen (MAS), but not by TSST-1 or SEC-3, is correlated to certain HLA-DR types.
Scand. J. Immunol. 47:43-47.
11. **Arcus VL**, Proft T, Sigrell JA, Baker HM, Fraser JD, Baker EN. 2000.
Conservation and variation in superantigen structure and activity highlighted by the three-dimensional structures of two new superantigens from *Streptococcus pyogenes*.
J. Mol. Biol. 299:157-168.
12. **Arcus VL**, Langley R, Proft T, Fraser JD, Baker EN. 2002.
The Three-dimensional structure of a superantigen-like protein, SET3, from a pathogenicity island of the *Staphylococcus aureus* genome.
J. Biol. Chem. 277:32274-32281.
13. **Artiushin SC**, Timoney JF, Sheoran AS, Muthupalani SK. 2002.
Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-H and SePE-I of *Streptococcus equi*.
Microb. Pathog. 32:71-85.

14. **Atkin CL**, Cole BC, Sullivan GJ, Washburn LR, Wiley BB. 1986.
Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis*.
V. A small basic protein from culture supernatants is a potent T cell mitogen.
J. Immunol. 137:1581-1589.
15. **Avery AC**, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH, Cantor H. 1994.
Activation of T cells by superantigen in class II-negative mice.
J. Immunol. 153:4853-4861.
16. **Baccala R**, Smith LR, Vestberg M, Peterson PA, Cole BC, Theofilopoulos AN. 1992.
Mycoplasma arthritidis mitogen. V beta engaged in mice, rats, and humans, and
requirement of HLA-DR alpha for presentation.
Arthritis Rheum. 35:434-442.
17. **Bak AL**, Black FT, Christiansen C, Freundt EA. 1969.
Genome size of mycoplasmal DNA.
Nature 224:1209-1210.
18. **Baker HM**, Proft T, Webb PD, Arcus VL, Fraser JD, Baker EN. 2004.
Crystallographic and mutational data show that the *streptococcal pyrogenic* exotoxin J
can use a common binding surface for T-cell receptor binding and dimerization.
J. Biol. Chem. 279:38571-38576.
19. **Baker M**, Gutman DM, Papageorgiou AC, Collins CM, Acharya KR. 2001.
Structural features of a zinc binding site in the superantigen *streptococcal pyrogenic*
exotoxin A (SpeA1): implications for MHC class II recognition.
Protein Sci. 10:1268-1273.
20. **Baker MD**, Gendlina I, Collins CM, Acharya KR. 2004.
Crystal structure of a dimeric form of *streptococcal pyrogenic* exotoxin A (SpeA1).
Protein Sci. 13:2285-2290.
21. **Balaban N**, Rasooly A. 2000.
Staphylococcal enterotoxins.
Int. J. Food Microbiol. 61:1-10.

22. **Banks MC**, Kamel NS, Zabriskie JB, Larone DH, Ursea D, Posnett DN. 2003.
Staphylococcus aureus express unique superantigens depending on the tissue source.
J. Infect. Dis. 187:77-86.
23. **Beharka AA**, Armstrong JW, Iandolo JJ, Chapes SK. 1994.
Binding and activation of major histocompatibility complex class II-deficient macrophages by *staphylococcal* exotoxins.
Infect. Immun. 62:3907-3915.
24. **Bernatchez C**, Al-Daccak R, Mayer PE, Mehindate K, Rink L, Mecheri S, Mourad W. 1997.
Functional analysis of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen interactions with class II molecules.
Infect. Immun. 65:2000-2005.
25. **Bhardwaj N**, Santhanam U, Lau LL, Tatter SB, Ghrayeb J, Rivelis M, Steinman RM, Sehgal PB, May LT. 1989.
IL-6/IFN-beta 2 in synovial effusions of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. Identification of several isoforms and studies of cellular sources.
J. Immunol. 143:2153-2159.
26. **Bhardwaj N**, Hodssev AS, Nisanian A, Kabak S, Friedman SM, Cole BC, Posnett DN. 1994.
Human T-cell responses to *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen.
Infect. Immun. 62:135-144.
27. **Blanchard A**, Montagnier L. 1994.
AIDS-associated mycoplasmas.
Annu. Rev. Microbiol. 48:687-712.
28. **Bowness P**, Moss PA, Tranter H, Bell JI, McMichael AJ. 1992.
Clostridium perfringens enterotoxin is a superantigen reactive with human T cell receptors V beta 6.9 and V beta 22.
J. Exp. Med. 176:893-896.

29. **Brown T A.** 1989.
In: Molecular Biology; *LABFAX. Bios Scientific Publishers, Academic Press.*
30. **Casman EP.** 1958.
Serologic studies of *staphylococcal* enterotoxin.
Public Health Rep. 73:599-609.
31. **Casman EP,** Bennett RW. 1963.
Culture medium for the production of *staphylococcal* enterotoxin A.
J. Bacteriol. 86:18-23.
32. **Cavallin A,** Arozenius H, Kristensson K, Antonsson P, Otzen DE, Bjork P, Forsberg G. 2000.
The spectral and thermodynamic properties of *staphylococcal* enterotoxin A, E, and variants suggest that structural modifications are important to control their function.
J. Biol. Chem. 275:1665-1672.
33. **Cavallin A,** Petersson K, Forsberg G. 2003.
Spectrophotometric methods for the determination of superantigen structure and stability.
Methods Mol. Biol. 214:55-63.
34. **Chi YI,** Sadler I, Jablonski LM, Callantine SD, Deobald CF, Stauffacher CV, Bohach GA. 2002.
Zinc-mediated dimerization and its effect on activity and conformation of *staphylococcal* enterotoxin type C.
J. Biol. Chem. 277:22839-22846.
35. **Choi YW,** Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J. 1989.
Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 86:8941-8945.
36. **Cole BC,** Cahill JF, Wiley BB, Ward JR. 1969.
Immunological responses of the rat to *Mycoplasma arthritidis*.
J. Bacteriol. 98:930-937.

37. **Cole BC**, Ward JR, Jones RS, Cahill JF. 1971.
Chronic proliferative arthritis of mice induced by *Mycoplasma arthritidis*. I. Induction of disease and histopathological characteristics.
Infect. Immun. 4:344-355.
38. **Cole BC**, Ward JR. 1973.
Fate of intravenously injected *Mycoplasma arthritidis* in rodents and effect of vaccines.
Infect. Immun. 7:416-425.
39. **Cole BC**, Overall JC Jr, Lombardi PS, Glasgow LA. 1975.
Mycoplasma-mediated hyporeactivity to various interferon inducers.
Infect. Immun. 12:1349-1354.
40. **Cole BC**, Daynes RA, Ward JR. 1981.
Mycoplasma-mediated activation of normal mouse lymphocytes: induction of cytotoxic lymphocytes and lymphocyte transformation by *Mycoplasma arthritidis* are under Ir gene control.
J. Immunol. 126:922-927.
41. **Cole BC**, Daynes RA, Ward JR. 1981.
Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis*. I. Transformation is associated with an H-2-linked gene that maps to the I-E/I-C subregion.
J. Immunol. 127:1931-1936.
42. **Cole BC**, Sullivan GJ, Daynes RA, Sayed IA, Ward JR. 1982.
Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis*. II. Cellular requirements for T cell transformation mediated by a soluble Mycoplasma mitogen.
J. Immunol. 128:2013-2018.
43. **Cole BC**, Washburn LR, Sullivan GJ, Ward JR. 1982.
Specificity of a mycoplasma mitogen for lymphocytes from human and various animal hosts.
Infect. Immun. 36:662-666.

44. **Cole BC**, Thorpe RN. 1983.
Induction of human gamma interferons by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis* and by Phytohemagglutinin: differential inhibition with monoclonal anti-HLA.DR antibodies.
J. Immunol. 131:2392-2396.
45. **Cole BC**, Washburn LR, Taylor-Robinson D. 1985.
Mycoplasma induced arthritis.
In: Razin S, Barile MF (eds) *The Mycoplasmas*.
Academic press, New York. 4:107-160.
46. **Cole BC**, Araneo BA, Sullivan GJ. 1986.
Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis*.
IV. Murine T hybridoma cells exhibit differential accessory cell requirements for activation by *M. arthritidis* T cell mitogen, concanavalin A, or hen egg-white lysozyme.
J. Immunol. 136:3572-3578.
47. **Cole BC**, Kartchner DR, Wells DJ. 1989.
Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis*.
VII. Responsiveness is associated with expression of a product(s) of the V beta 8 gene family present on the T cell receptor alpha/beta for antigen.
J. Immunol. 142:4131-4137.
48. **Cole BC**, Griffiths MM. 1993.
Triggering and exacerbation of autoimmune arthritis by the *Mycoplasma arthritidis* superantigen MAM.
Arthritis Rheum. 36:994-1002.
49. **Cole BC**, Knudtson KL, Oliphant A, Sawitzke AD, Pole A, Manohar M, Benson LS, Ahmed E, Atkin CL. 1996.
The sequence of the *Mycoplasma arthritidis* superantigen, MAM: identification of functional domains and comparison with microbial superantigens and plant lectin mitogens.
J. Exp. Med. 183:1105-1110.

50. **Conrad B**, Trucco M. 1994.
Superantigens as etiopathogenetic factors in the development of insulin-dependent *diabetes mellitus*.
Diabetes Metab. Rev. 10:309-338.
51. **Conrad B**, Weissmahr RN, Boni J, Arcari R, Schupbach J, Mach B. 1997.
A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes.
Cell 90:303-313.
52. **Dinges MM**, Orwin PM, Schlievert PM. 2000.
Exotoxins of *Staphylococcus aureus*.
Clin. Microbiol. Rev. 13:16-34.
53. **Dobrescu D**, Ursea B, Pope M, Asch AS, Posnett DN. 1995.
Enhanced HIV-1 replication in V beta 12 T cells due to human *cytomegalovirus* in monocytes: evidence for a putative *herpesvirus* superantigen.
Cell 82:753-763.
54. **Dohlsten M**, Hedlund G, Kalland T. 1991.
Staphylococcal-enterotoxin-dependent cell-mediated cytotoxicity.
Immunol. Today. 12:147-150.
55. **Donadini R**, Liew CW, Kwan AH, Mackay JP, Fields BA. 2004.
Crystal and solution structures of a superantigen from *Yersinia pseudotuberculosis* reveal a jelly-roll fold.
Structure (Camb). 12:145-156.
56. **Driessen C**, Hirv K, Kirchner H, Rink L. 1995.
Zinc regulates cytokine induction by superantigens and lipopolysaccharide.
Immunology 84:272-277.
57. **Driessen C**, Hirv K, Kirchner H, Rink L. 1995.
Divergent effects of zinc on different bacterial pathogenic agents.
J. Infect. Dis. 171:486-489.

58. **Dutronic Y**, Porcelli SA. 2002.
The CD1 family and T cell recognition of lipid antigens.
Tissue Antigens 60:337-353.
59. **Edward DG**, FREUNDT EA. 1956.
The classification and nomenclature of organisms of the *pleuropneumonia* group.
J.Gen. Microbiol. 14:197-207.
60. **Etongue-Mayer P**, Langlois MA, Ouellette M, Li H, Younes S, Al-Daccak R, Mourad W. 2002.
Involvement of zinc in the binding of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen to the proximity of the HLA-DR binding groove regardless of histidine 81 of the beta chain.
Eur. J. Immunol. 32:50-58.
61. **Fagin U**, Hahn U, Grotzinger J, Fleischer B, Gerlach D, Buck F, Wollmer A, Kirchner H, Rink L. 1997.
Exclusion of bioactive contaminations in *Streptococcus pyogenes* erythrogenic toxin A preparations by recombinant expression in *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 65:4725-4733.
62. **Fagin U**. 1998.
Struktur-Funktions-Beziehungen des pyrogenen Exotoxins A aus *Streptococcus pyogenes*. *Dissertation*; Medizinische Universität zu Lübeck.
63. **Fast DJ**, Schlievert PM, Nelson RD. 1989.
Toxic shock syndrome-associated staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins are potent inducers of tumor necrosis factor production.
Infect. Immun. 57:291-294.
64. **Ferretti JJ**, McShan WM, Ajdic D, Savic DJ, Savic G, Lyon K, Primeaux C, Sezate S, Suvorov AN, Kenton S, Lai HS, Lin SP, Qian Y, Jia HG, Najjar FZ, Ren Q, Zhu H, Song L, White J, Yuan X, Clifton SW, Roe BA, McLaughlin R. 2001.
Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98:4658-4663.

65. **Festenstein H.** 1974.
Pertinent features of M locus determinants including revised nomenclature and strain distribution.
Transplantation 18:555-557.
66. **Festenstein H,** Kimura S. 1988.
The Mls system: past and present.
J. Immunogenet. 15:183-196.
67. **Fields BA,** Malchiodi EL, Li H, Ysern X, Stauffacher CV, Schlievert PM, Karjalainen K, Mariuzza RA. 1996.
Crystal structure of a T-cell receptor beta-chain complexed with a superantigen.
Nature 384:188-192.
68. **Fleischer B,** Schrezenmeier H. 1988.
T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells.
J. Exp. Med. 167:1697-1707.
69. **Fleischer B,** Gerardy-Schahn R, Metzroth B, Carrel S, Gerlach D, Kohler W. 1991.
An evolutionary conserved mechanism of T cell activation by microbial toxins.
Evidence for different affinities of T cell receptor-toxin interaction.
J. Immunol. 146:11-17.
70. **Fleischer B.** 1994.
Superantigens produced by infectious pathogens: molecular mechanism of action and biological significance.
Int. J. Clin. Lab. Res. 24:193-197.
71. **Fleischer B,** Necker A, Leget C, Malissen B, Romagne F. 1996.
Reactivity of mouse T-cell hybridomas expressing human Vbeta gene segments with staphylococcal and streptococcal superantigens.
Infect. Immun. 64:987-994.

72. **Florquin S**, Aaldering L. 1997.
Superantigens: a tool to gain new insight into cellular immunity.
Res. Immunol. 148:373-386.
73. **Fraser JD**, Urban RG, Strominger JL, Robinson H. 1992.
Zinc regulates the function of two superantigens.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 89:5507-5511.
74. **Fraser JD**. 1992.
Superantigen data.
Nature 360:423.
75. **Galuschka, A.** 2002.
Struktur-Funktions-Beziehungen des *Mycoplasma arthritidis* Superantigens
Dissertation; Medizinische Universität zu Lübeck.
76. **Geisbrecht BV**, Hamaoka BY, Perman B, Zemla A, Leahy DJ. 2005.
The crystal structures of EAP domains from *Staphylococcus aureus* reveal an unexpected homology to bacterial superantigens. The Structure of *Staphylococcus aureus* EAP Domains.
J. Biol. Chem. [Epub ahead of print, Vorabveröffentlichung]
77. **Gerlach D**, Reichardt W, Fleischer B, Schmidt KH. 1994.
Separation of mitogenic and pyrogenic activities from so-called erythrogenic toxin type B (Streptococcal proteinase).
Zentralbl. Bakteriол. 280:507-514.
78. **Gerlach D**, Schmidt KH, Fleischer B. 2001.
Basic streptococcal superantigens (SPEX/SMEZ or SPEC) are responsible for the mitogenic activity of the so-called mitogenic factor (MF)
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 30:209-216.

79. **Giebler D**, Brehm G, Nicklas W, Kirchner H. 1986.
Activation of C57BL/6 spleen cells by the mitogenic principle derived from
mycoplasma arthritidis.
Immunobiology 171:57-66.
80. **Goodyear CS**, Silverman GJ. 2003.
Death by a B cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B cell
deletion by a Staphylococcal Toxin.
J. Exp. Med. 197:1125-1139.
81. **Goodyear CS**, Silverman GJ. 2005.
B cell superantigens: a microbe's answer to innate-like B cells and natural antibodies.
Springer Semin. Immunopathol. [Epub ahead of print, Vorabveröffentlichung]
82. **Goshorn SC**, Schlievert PM. 1989.
Bacteriophage association of streptococcal pyrogenic exotoxin type C.
J. Bacteriol. 171:3068-3073.
83. **Gregory S**, Zilber MT, Choqueux C, Mooney N, Charron D, Gelin C. 2000.
Role of the CD1a molecule in the superantigen-induced activation of MHC class II
negative human thymocytes.
Hum. Immunol. 61:427-437.
84. **Haffner AC**, Zepter K, Elmetts CA. 1996.
Major histocompatibility complex class I molecule serves as a ligand for presentation of
the superantigen staphylococcal enterotoxin B to T cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 93:3037-3042.
85. **Hakansson M**, Petersson K, Nilsson H, Forsberg G, Bjork P, Antonsson P, Svensson
LA. 2000.
The crystal structure of staphylococcal enterotoxin H: implications for binding
properties to MHC class II and TcR molecules.
J. Mol. Biol. 302:527-537.

86. **Hamad AR**, Marrack P, Kappler JW. 1997.
Transectosis of staphylococcal superantigen toxins.
J. Exp. Med. 185:1447-1454.
87. **Hanahan D**. 1983.
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. 166:557-580.
88. **Hawker KJ**, Billadello JJ. 1993.
A multiplex polymerase chain reaction colony miniprep.
Biotechniques 14:764-765.
89. **Herman A**, Croteau G, Sekaly RP, Kappler J, Marrack P. 1990.
HLA-DR alleles differ in their ability to present staphylococcal enterotoxins to T cells.
J. Exp. Med. 172:709-717.
90. **Herman A**, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM. 1991.
Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses.
Annu. Rev. Immunol. 9:745-772.
91. **Herman A**, Labrecque N, Thibodeau J, Marrack P, Kappler JW, Sekaly RP. 1991.
Identification of the staphylococcal enterotoxin A superantigen binding site in the beta 1 domain of the human histocompatibility antigen HLA-DR.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 88:9954-9958.
92. **Herrmann T**, Maryanski JL, Romero P, Fleischer B, MacDonald HR. 1990.
Activation of MHC class I-restricted CD8+ CTL by microbial T cell mitogens. Dependence upon MHC class II expression of the target cells and V beta usage of the responder T cells.
J. Immunol. 144:1181-1186.
93. **Herrmann T**, Romero P, Sartoris S, Paiola F, Accolla RS, Maryanski JL, MacDonald HR. 1991. Staphylococcal enterotoxin-dependent lysis of MHC class II negative target cells by cytolytic T lymphocytes.
J. Immunol. 146:2504-2512.

94. **Himmelreich R**, Plagens H, Hilbert H, Reiner B, Herrmann R. 1997.
Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*.
Nucleic Acids Res. 25:701-712.
95. **Ho SN**, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. 1989.
Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.
Gene 77:51-59.
96. **Homfeld J**, Homfeld A, Nicklas W, Rink L, Weyland A, Kirchner H. 1990.
Induction of interleukin-6 in murine bone marrow-derived macrophages stimulated by the *Mycoplasma arthritidis* mitogen MAS.
Autoimmunity 7:317-327.
97. **Hopkins PA**, Fraser JD, Pridmore AC, Russell HH, Read RC, Sriskandan S. 2005.
Superantigen recognition by HLA class II on monocytes up-regulates toll-like receptor 4 and enhances proinflammatory responses to endotoxin. Superantigen up-regulation of TLR4.
Blood. [Epub ahead of print, Vorabveröffentlichung]
98. **Hudson KR**, Robinson H, Fraser JD. 1993.
Two adjacent residues in staphylococcal enterotoxins A and E determine T cell receptor V beta specificity.
J. Exp. Med. 177:175-184.
99. **Ito Y**, Abe J, Yoshino K, Takeda T, Kohsaka T. 1995.
Sequence analysis of the gene for a novel superantigen produced by *Yersinia pseudotuberculosis* and expression of the recombinant protein.
J. Immunol. 154:5896-5906.
100. **Jansson E**, Makisara P, Vainio K, Vainio U, Snellman O, Tuuri S. 1971.
An 8-year study on mycoplasma in rheumatoid arthritis.
Ann. Rheum. Dis. 30:506-508.

101. **Jansson E**, Makisara P, Tuuri S. 1975.
Mycoplasma antibodies in rheumatoid arthritis.
Scand. J. Rheumatol. 4:165-168.
102. **Jardetzky TS**, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Chi YI, Stauffacher C, Strominger JL, Wiley DC. 1994.
Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen.
Nature 368:711-718.
103. **Jarraud S**, Lyon GJ, Figueiredo AM, Gerard L, Vandenesch F, Etienne J, Muir TW, Novick RP. 2000.
Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*.
J. Bacteriol. 182:6517-6522.
104. **Jarraud S**, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. 2002.
Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease.
Infect. Immun. 70:631-641.
105. **Jupin C**, Anderson S, Damais C, Alouf JE, Parant M. 1988.
Toxic shock syndrome toxin 1 as an inducer of human tumor necrosis factors and gamma interferon.
J. Exp. Med. 167:752-761.
106. **Kamezawa Y**, Nakahara T, Nakano S, Abe Y, Nozaki-Renard J, Isono T. 1997.
Streptococcal mitogenic exotoxin Z, a novel acidic superantigenic toxin produced by a T1 strain of *Streptococcus pyogenes*.
Infect. Immun. 65:3828-3833.

107. **Karp DR**, Long EO. 1992.
Identification of HLA-DR1 beta chain residues critical for binding staphylococcal enterotoxins A and E.
J. Exp. Med. 175:415-424.
108. **Kawabe Y**, Ochi A. 1990.
Selective anergy of V beta 8+,CD4+ T cells in *Staphylococcus* enterotoxin B-primed mice.
J. Exp. Med. 172:1065-1070.
109. **Kawabe Y**, Ochi A. 1991.
Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8+ CD4+ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B.
Nature 349:245-248.
110. **Kim J**, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. 1994.
Toxic shock syndrome toxin-1 complexed with a class II major histocompatibility molecule HLA-DR1.
Science 266:1870-1874.
111. **Kirchner H**, Nicklas W, Giebler D, Keyssner K, Berger R, Storch E. 1984.
Induction of interferon gamma in mouse spleen cells by culture supernatants of *mycoplasma arthritidis*.
J. Interferon Res. 4:389-397.
112. **Kirchner H**, Giebler D, Keyssner K, Nicklas W. 1984.
Lymphoproliferation induced in mouse spleen cells by *Mycoplasma arthritidis* mitogen. Reversal of the defect of nonresponder mice.
Scand. J. Immunol. 20:133-139.
113. **Kirchner H**, Brehm G, Nicklas W, Beck R, Herbst F. 1986.
Biochemical characterization of the T-cell mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis*.
Scand. J. Immunol. 24:245-249.

114. **Kirchner H**, Bauer A, Moritz T, Herbst F. 1986.
Lymphocyte activation and induction of interferon gamma in human leucocyte cultures by the mitogen in *Mycoplasma arthritidis* supernatant (MAS).
Scand. J. Immunol. 24:609-613.
115. **Knudtson KL**, Manohar M, Joyner DE, Ahmed EA, Cole BC. 1997.
Expression of the superantigen *Mycoplasma arthritidis* mitogen in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant protein.
Infect. Immun. 65:4965-4971.
116. **Koshimizu K**, Saito T, Shinozuka Y, Tsuchiya K, Cerda RO. 1993.
Isolation and identification of mycoplasma strains from various species of wild rodents.
J. Vet. Med. Sci. 55:323-324.
117. **Kraft M**, Filsinger S, Kramer KL, Kabelitz D, Hansch GM, Schoels M. 1998.
Synovial fibroblasts as target cells for staphylococcal enterotoxin-induced T-cell cytotoxicity.
Immunology 93:20-25.
118. **Kreiswirth BN**, Handley JP, Schlievert PM, Novick RP. 1987.
Cloning and expression of streptococcal pyrogenic exotoxin A and staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 in *Bacillus subtilis*.
Mol. Gen. Genet. 208:84-87.
119. **Kum WW**, Laupland KB, See RH, Chow AW. 1993.
Improved purification and biologic activities of staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1.
J. Clin. Microbiol. 31:2654-2660.
120. **Kumaran D**, Eswaramoorthy S, Furey W, Sax M, Swaminathan S. 2001.
Structure of staphylococcal enterotoxin C2 at various pH levels.
Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 57:1270-1275.

121. **Lafon M**, Lafage M, Martinez-Arends A, Ramirez R, Vuillier F, Charron D, Lotteau V, Scott-Algara D. 1992.
Evidence for a viral superantigen in humans.
Nature 358:507-510.
122. **Lamphear JG**, Stevens KR, Rich RR. 1998.
Intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-3 provide costimulation for superantigen-induced T lymphocyte proliferation in the absence of a specific presenting molecule.
J. Immunol. 160:615-623.
123. **Langlois MA**, Etongue-Mayer P, Ouellette M, Mourad W. 2000.
Binding of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen to human MHC class II molecules via its N terminus is modulated by invariant chain expression and its C terminus is required for T cell activation.
Eur. J. Immunol. 30:1748-1756.
124. **Langlois MA**, El Fakhry Y, Mourad W. 2003.
Zinc-binding sites in the N terminus of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen permit the dimer formation required for high affinity binding to HLA-DR and for T cell activation.
J. Biol. Chem. 278:22309-22315.
125. **Lapatschek MS**, Durr S, Sutter G, Wagner H, Miethke T. 2001.
Functional evaluation of HIV/SIV Nef as superantigen.
Virology 282:329-337.
126. **Laurence J**, Hodtsev AS, Posnett DN. 1992.
Superantigen implicated in dependence of HIV-1 replication in T cells on TCR V beta expression.
Nature 358:255-259.

127. **Lavoie PM**, Thibodeau J, Erard F, Sekaly RP. 1999.
Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research.
Immunol. Rev. 168:257-269.
128. **Layne E**. 1957.
Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring Proteins.
Methods Enzymol. 3: 447-454.
129. **Leder L**, Llera A, Lavoie PM, Lebedeva MI, Li H, Sekaly RP, Bohach GA, Gahr PJ, Schlievert PM, Karjalainen K, Mariuzza RA. 1998.
A mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxins B and C3 to the T cell receptor beta chain and major histocompatibility complex class II.
J. Exp. Med. 187:823-833.
130. **Letertre C**, Perelle S, Dilasser F, Fach P. 2003.
Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*.
J. Appl. Microbiol 95:38-43.
131. **Leung DY**, Giorno RC, Kazemi LV, Flynn PA, Busse JB. 1995.
Evidence for superantigen involvement in cardiovascular injury due to *Kawasaki* syndrome.
J. Immunol. 155:5018-5021.
132. **Li PL**, Tiedemann RE, Moffat SL, Fraser JD. 1997.
The superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin C (SPE-C) exhibits a novel mode of action.
J. Exp. Med. 186:375-383.
133. **Li H**, Llera A, Mariuzza RA. 1998.
Structure-function studies of T-cell receptor-superantigen interactions.
Immunol. Rev. 163:177-186.

134. **Li Y**, Li H, Dimasi N, McCormick JK, Martin R, Schuck P, Schlievert PM, Mariuzza RA. 2001.
Crystal structure of a superantigen bound to the high-affinity, zinc-dependent site on MHC class II.
Immunity 14:93-104.
135. **Llewelyn M**, Sriskandan S, Peakman M, Ambrozak DR, Douek DC, Kwok WW, Cohen J, Altmann DM. 2004.
HLA class II polymorphisms determine responses to bacterial superantigens.
J. Immunol. 172:1719-1726.
136. **Lo SC**, Hayes MM, Wang RY, Pierce PF, Kotani H, Shih JW. 1991.
Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV.
Lancet 338:1415-1418.
137. **Lynch DH**, Gurish MF, Cole BC, Daynes RA. 1983.
T cell proliferative responses to a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis* are controlled by the accessory cell.
J. Immunol. 131:1702-1706.
138. **Lynch DH**, Cole BC, Bluestone JA, Hodes RJ. 1986.
Cross-reactive recognition by antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cells of a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis* is clonally expressed and I-E restricted.
Eur. J. Immunol. 16:747-751.
139. **Makrides SC**. 1996.
Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*.
Microbiol. Rev. 60:512-538.
140. **Maniloff J**. 1992.
Mycoplasmas ; Molecular Biology and Pathogenesis. American Society for *Microbiology*, Washington.

141. **Mardh PA**, Nilsson FJ, Bjelle A. 1973.
Mycoplasmas and bacteria in synovial fluid from patients with arthritis.
Ann. Rheum. Dis. 32:319-325.
142. **Marguerat S**, Wang WY, Todd JA, Conrad B. 2004.
Association of human endogenous retrovirus K-18 polymorphisms with type 1 diabetes.
Diabetes 53:852-854.
143. **Marrack P**, Kappler J. 1990.
The staphylococcal enterotoxins and their relatives.
Science 248:705-711.
144. **Matthes M**, Schrezenmeier H, Homfeld J, Fleischer S, Malissen B, Kirchner H, Fleischer B. 1988.
Clonal analysis of human T cell activation by the *Mycoplasma arthritidis* mitogen (MAS).
Eur. J. Immunol. 18:1733-1737.
145. **McCormack WM**, Braun P, Lee YH, Klein JO, Kass EH. 1973.
The genital mycoplasmas.
N. Engl. J. Med. 288:78-89.
146. **McCormick JK**, Pragman AA, Stolpa JC, Leung DY, Schlievert PM. 2001.
Functional characterization of streptococcal pyrogenic exotoxin J, a novel superantigen.
Infect. Immun. 69:1381-1388.
147. **McCormick JK**, Yarwood JM, Schlievert PM. 2001.
Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update.
Annu. Rev. Microbiol. 55:77-104.
148. **Mehindate K**, Thibodeau J, Dohlsten M, Kalland T, Sekaly RP, Mourad W. 1995.
Cross-linking of major histocompatibility complex class II molecules by staphylococcal enterotoxin A superantigen is a requirement for inflammatory cytokine gene expression.
J. Exp. Med. 182:1573-1577.

149. **Meylan F**, De Smedt M, Leclercq G, Plum J, Leupin O, Marguerat S, Conrad B. 2005.
Negative thymocyte selection to HERV-K18 superantigens in humans.
Blood. [Epub ahead of print, Vorabveröffentlichung]
150. **Miyoshi-Akiyama T**, Zhao J, Kato H, Kikuchi K, Totsuka K, Kataoka Y, Katsumi M, Uchiyama T. 2003.
Streptococcus dysgalactiae-derived mitogen (SDM), a novel bacterial superantigen: characterization of its biological activity and predicted tertiary structure.
Mol. Microbiol. 47:1589-1599.
151. **Mollick JA**, Miller GG, Musser JM, Cook RG, Grossman D, Rich RR. 1993.
A novel superantigen isolated from pathogenic strains of *Streptococcus pyogenes* with aminoterminal homology to staphylococcal enterotoxins B and C.
J. Clin. Invest. 92:710-719.
152. **Monday SR**, Vath GM, Ferens WA, Deobald C, Rago JV, Gahr PJ, Monie DD, Iandolo JJ, Chapes SK, Davis WC, Ohlendorf DH, Schlievert PM, Bohach GA. 1999.
Unique superantigen activity of *staphylococcal exfoliative* toxins.
J. Immunol. 162:4550-4559.
153. **Montagnier L**, Blanchard A. 1993.
Mycoplasmas as cofactors in infection due to the human immunodeficiency virus.
Clin. Infect. Dis. Suppl 1:309-315.
154. **Mu HH**, Sawitzke AD, Cole BC. 2001.
Presence of Lps(d) mutation influences cytokine regulation in vivo by the *Mycoplasma arthritidis* mitogen superantigen and lethal toxicity in mice infected with *M. arthritidis*.
Infect. Immun. 69:3837-3844.
155. **Mu HH**, Pennock ND, Humphreys J, Kirschning CJ, Cole BC. 2005.
Engagement of Toll-like receptors by mycoplasmal superantigen: downregulation of TLR2 by MAM/TLR4 interaction.
Cell. Microbiol. 7:789-797.

156. **Munson SH**, Tremaine MT, Betley MJ, Welch RA. 1998.
Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*.
Infect. Immun. 66:3337-3348.
157. **Nocard, E.** und Roux, E. 1898.
Le microbe de la *peripneumonic*
Ann. Inst. Pasteur (Paris). 12: 240-262.
158. **Nocard**, Roux. 1896.
The microbe of *pleuropneumonia*.
Rev. Infect. Dis. 1990; 12:354-358.
159. **Norgren, M.**, Eriksson, A. 1997.
Streptococcal superantigens and their role in the pathogenesis of severe infections.
J. Toxicol. Toxin Rev. 16, 1-32.
160. **Norrby-Teglund A**, Newton D, Kotb M, Holm SE, Norgren M. 1994.
Superantigenic properties of the group A streptococcal exotoxin SpeF (MF).
Infect. Immun. 62:5227-5233.
161. **Norrby-Teglund A**, Nepom GT, Kotb M. 2002.
Differential presentation of group A streptococcal superantigens by HLA class II DQ and DR alleles.
Eur. J. Immunol. 32:2570-2577.
162. **Ohara-Nemoto Y, Sasaki M, Kaneko M, Nemoto T, Ota M.** 1994.
Cysteine protease activity of streptococcal pyrogenic exotoxin B.
Can. J. Microbiol. 40:930-936.
163. **Omoe K**, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. 2003.
Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids.
Infect. Immun. 71:6088-6094.

164. **Paliard X**, West SG, Lafferty JA, Clements JR, Kappler JW, Marrack P, Kotzin BL. 1991.
Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis.
Science 253:325-329.
165. **Panina-Bordignon P**, Fu XT, Lanzavecchia A, Karr RW. 1992.
Identification of HLA-DR alpha chain residues critical for binding of the toxic shock syndrome toxin superantigen.
J. Exp. Med. 176:1779-1784.
166. **Papageorgiou AC**, Acharya KR, Shapiro R, Passalacqua EF, Brehm RD, Tranter HS. 1995.
Crystal structure of the superantigen enterotoxin C2 from *Staphylococcus aureus* reveals a zinc-binding site.
Structure 3:769-779.
167. **Papageorgiou AC**, Brehm RD, Leonidas DD, Tranter HS, Acharya KR. 1996.
The refined crystal structure of toxic shock syndrome toxin-1 at 2.07 Å resolution.
J. Mol. Biol. 260:553-569.
168. **Papageorgiou AC**, Acharya KR. 1997.
Superantigens as immunomodulators: recent structural insights.
Structure 5:991-996.
169. **Papageorgiou AC**, Tranter HS, Acharya KR. 1998.
Crystal structure of microbial superantigen staphylococcal enterotoxin B at 1.5 Å resolution: implications for superantigen recognition by MHC class II molecules and T-cell receptors.
J. Mol. Biol. 277:61-79.
170. **Papageorgiou AC**, Collins CM, Gutman DM, Kline JB, O'Brien SM, Tranter HS, Acharya KR. 1999.
Structural basis for the recognition of superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin A (SpeA1) by MHC class II molecules and T-cell receptors.
EMBO J. 18:9-21.

171. **Papageorgiou AC**, Acharya KR. 2000.
Microbial superantigens: from structure to function.
Trends Microbiol. 8:369-375.
172. **Papageorgiou AC**, Baker MD, McLeod JD, Goda SK, Manzotti CN, Sansom DM, Tranter HS, Acharya KR. 2004.
Identification of a secondary zinc-binding site in staphylococcal enterotoxin C2
Implications for superantigen recognition.
J. Biol. Chem. 279:1297-1303.
173. **Petersson K**, Hakansson M, Nilsson H, Forsberg G, Svensson LA, Liljas A, Walse B. 2001.
Crystal structure of a superantigen bound to MHC class II displays zinc and peptide dependence.
EMBO J. 20:3306-3312.
174. **Petersson K**, Pettersson H, Skartved NJ, Walse B, Forsberg G. 2003.
Staphylococcal enterotoxin H induces V alpha-specific expansion of T cells.
J. Immunol. 170:4148-4154.
175. **Plano LR**, Gutman DM, Woischnik M, Collins CM. 2000.
Recombinant *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins are not bacterial superantigens.
Infect. Immun. 68:3048-3052.
176. **Prasad GS**, Earhart CA, Murray DL, Novick RP, Schlievert PM, Ohlendorf DH. 1993.
Structure of toxic shock syndrome toxin 1.
Biochemistry 32:13761-13766.
177. **Proft T**, Fraser J. 1998.
Superantigens: just like peptides only different.
J. Exp. Med. 187:819-821.
178. **Proft T**, Moffatt SL, Berkahn CJ, Fraser JD. 1999.
Identification and characterization of novel superantigens from *Streptococcus pyogenes*.
J. Exp. Med. 189:89-102.

179. **Proft T**, Moffatt SL, Weller KD, Paterson A, Martin D, Fraser JD. 2000.
The streptococcal superantigen SMEZ exhibits wide allelic variation, mosaic structure,
and significant antigenic variation.
J. Exp. Med. 191:1765-1776.
180. **Proft T**, Arcus VL, Handley V, Baker EN, Fraser JD. 2001.
Immunological and biochemical characterization of streptococcal pyrogenic exotoxins I
and J (SPE-I and SPE-J) from *Streptococcus pyogenes*.
J. Immunol. 166:6711-6719.
181. **Proft T**, Webb PD, Handley V, Fraser JD. 2003.
Two novel superantigens found in both group A and group C *Streptococcus*.
Infect. Immun. 71:1361-1369.
182. **Proft T**, Fraser JD. 2003.
Bacterial superantigens.
Clin. Exp. Immunol. 133:299-306.
183. **Proft T**, Sriskandan S, Yang L, Fraser JD. 2003.
Superantigens and streptococcal toxic shock syndrome.
Emerg. Infect. Dis. 9:1211-1218.
184. **Racke MK**, Quigley L, Cannella B, Raine CS, McFarlin DE, Scott DE. 1994.
Superantigen modulation of experimental allergic encephalomyelitis: activation of
anergy determines outcome.
J. Immunol. 152:2051-2059.
185. **Razin S**. 1978.
The mycoplasmas.
Microbiol. Rev. 42:414-470.
186. **Razin S**. 1985.
Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*).
Microbiol. Rev. 49:419-455.

187. **Reda KB**, Kapur V, Mollick JA, Lamphear JG, Musser JM, Rich RR. 1994.
Molecular characterization and phylogenetic distribution of the streptococcal superantigen gene (ssa) from *Streptococcus pyogenes*.
Infect. Immun. 62:1867-1874.
188. **Reichardt W**, Muller-Alouf H, Alouf JE, Kohler W. 1992.
Erythrogenic toxins A, B and C: occurrence of the genes and exotoxin formation from clinical *Streptococcus pyogenes* strains associated with streptococcal toxic shock-like syndrome.
FEMS Microbiol. Lett. 79:313-322.
189. **Ren K**, Bannan JD, Pancholi V, Cheung AL, Robbins JC, Fischetti VA, Zabriskie JB. 1994.
Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin.
J. Exp. Med. 180:1675-1683.
190. **Ribeiro-Dias F**, Shio MT, Timenetsky J, Oliane AP, Metran CC, Pessoa FB, Jancar S. 2003.
Mycoplasma arthritidis superantigen (MAM)-induced macrophage nitric oxide release is MHC class II restricted, interferongamma dependent, and toll-like receptor 4 independent.
Exp. Cell. Res. 286:345-354.
191. **Rink L**, Kruse A, Nicklas W, Hoyer J, Kirchner H. 1992.
Induction of cytokines in human peripheral blood and spleen cells by the *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen.
Lymphokine Cytokine Res. 11:105-108.
192. **Rink L**, Kirchner H. 1992.
Mycoplasma arthritidis-derived superantigen.
Chem. Immunol. 55:137-145.

193. **Rink L**, Nicklas W, Alvarez-Ossorio L, Koester M, Kirchner H. 1994.
Differential induction of tumor necrosis factor alpha in murine and human leukocytes by *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen.
Infect. Immun. 62:462-467.
194. **Rink L**, Nicklas W, Luhm J, Kruse R, Kirchner H. 1996.
Induction of a proinflammatory cytokine network by *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen (MAS).
J. Interferon Cytokine Res. 16:861-868.
195. **Rink L**, Nicklas W, Alvarez-Ossorio L, Fagin U, Kirchner H. 1997.
Microbial superantigens stimulate T cells by the superantigen bridge and independently by a cytokine pathway.
J. Interferon Cytokine Res. 17:489-499.
196. **Roganti FS**, Rosenthal AL. 1983.
DNases of *Acholeplasma* spp.
J. Bacteriol. 155:802-805.
197. **Roussel A**, Anderson BF, Baker HM, Fraser JD, Baker EN. 1997.
Crystal structure of the streptococcal superantigen SPE-C: dimerization and zinc binding suggest a novel mode of interaction with MHC class II molecules.
Nat. Struct. Biol. 4:635-643.
198. **Sachse S**, Seidel P, Gerlach D, Gunther E, Rodel J, Straube E, Schmidt KH. 2002.
Superantigen-like gene(s) in human pathogenic *Streptococcus dysgalactiae*, subsp *equisimilis*: genomic localisation of the gene encoding streptococcal pyrogenic exotoxin G (speG(dys)).
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 34:159-167.
199. **Sambrook J**, Fritsch E F, Maniatis T. 1989.
In: Molecular Cloning;
A Laboratory Manual, 2nd edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

200. **Saul FA**, Rovira P, Boulot G, Damme EJ, Peumans WJ, Truffa-Bachi P, Bentley GA. 2000.
Crystal structure of *Urtica dioica* agglutinin, a superantigen presented by MHC molecules of class I and class II.
Structure Fold Des. 8:593-603.
201. **Sawitzke A**, Joyner D, Knudtson K, Mu HH, Cole B. 2000.
Anti-MAM antibodies in rheumatic disease: evidence for a MAM-like superantigen in rheumatoid arthritis?
J. Rheumatol. 27:358-364.
202. **Schad EM**, Zaitseva I, Zaitsev VN, Dohlsten M, Kalland T, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Svensson LA. 1995.
Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type A.
EMBO J. 14:3292-3301.
203. **Schad EM**, Papageorgiou AC, Svensson LA, Acharya KR. 1997.
A structural and functional comparison of staphylococcal enterotoxins A and C2 reveals remarkable similarity and dissimilarity.
J. Mol. Biol. 269:270-280.
204. **Schlievert PM**, Shands KN, Dan BB, Schmid GP, Nishimura RD. 1981.
Identification and characterization of an exotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic-shock syndrome.
J. Infect. Dis. 143:509-516.
205. **Schlievert PM**, Jablonski LM, Roggiani M, Sadler I, Callantine S, Mitchell DT, Ohlendorf DH, Bohach GA. 2000.
Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals.
Infect. Immun. 68:3630-3634.

206. **Smoot JC**, Barbian KD, Van Gompel JJ, Smoot LM, Chaussee MS, Sylva GL, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Porcella SF, Parkins LD, Beres SB, Campbell DS, Smith TM, Zhang Q, Kapur V, Daly JA, Veasy LG, Musser JM. 2002.
Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99:4668-4673.
207. **Smoot LM**, McCormick JK, Smoot JC, Hoe NP, Strickland I, Cole RL, Barbian KD, Earhart CA, Ohlendorf DH, Veasy LG, Hill HR, Leung DY, Schlievert PM, Musser JM. 2002.
Characterization of two novel pyrogenic toxin superantigens made by an acute rheumatic fever clone of *Streptococcus pyogenes* associated with multiple disease outbreaks.
Infect. Immun. 70:7095-7104.
208. **Sohn MH**, Kim CH, Kim WK, Jang GC, Kim KE. 2003.
Effect of staphylococcal enterotoxin B on specific antibody production in children with atopic dermatitis.
Allergy Asthma Proc. 24:67-71.
209. **Sriskandan S**, Unnikrishnan M, Krausz T, Cohen J. 2000.
Mitogenic factor (MF) is the major DNase of serotype M89 *Streptococcus pyogenes*.
Microbiology. 146:2785-2792.
210. **Stevens DL**. 1992.
Invasive group A streptococcus infections.
Clin. Infect. Dis. 14:2-11.
211. **Su YC**, Wong AC. 1995.
Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H.
Appl. Environ. Microbiol. 61:1438-1443.
212. **Sundberg E**, Jardetzky TS. 1999.
Structural basis for HLA-DQ binding by the streptococcal superantigen SSA.
Nat. Struct. Biol. 6:123-129.

213. **Sundberg EJ**, Li H, Llera AS, McCormick JK, Tormo J, Schlievert PM, Karjalainen K, Mariuzza RA. 2002.
Structures of two streptococcal superantigens bound to TCR beta chains reveal diversity in the architecture of T cell signaling complexes.
Structure (Camb). 10:687-699.
214. **Sundstrom M**, Abrahmsen L, Antonsson P, Mehindate K, Mourad W, Dohlsten M. 1996.
The crystal structure of staphylococcal enterotoxin type D reveals Zn²⁺-mediated homodimerization.
EMBO J. 15:6832-6840.
215. **Sundstrom M**, Hallen D, Svensson A, Schad E, Dohlsten M, Abrahmsen L. 1996.
The Co-crystal structure of staphylococcal enterotoxin type A with Zn²⁺ at 2.7 Å resolution. Implications for major histocompatibility complex class II binding.
J. Biol. Chem. 271:32212-32216.
216. **Sutkowski N**, Palkama T, Ciurli C, Sekaly RP, Thorley-Lawson DA, Huber BT. 1996.
An *Epstein-Barr* virus-associated superantigen.
J. Exp. Med. 184:971-980.
217. **Sutkowski N**, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT. 2001.
Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen.
Immunity 15:579-589.
218. **Sutkowski N**, Chen G, Calderon G, Huber BT. 2004.
Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-2A is sufficient for transactivation of the human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen.
J. Virol. 78:7852-7860.
219. **Svensson LA**, Schad EM, Sundstrom M, Antonsson P, Kalland T, Dohlsten M. 1997.
Staphylococcal enterotoxins A, D, and E. Structure and function, including mechanism of T-cell superantigenicity.
Prep. Biochem. Biotechnol. 27:111-141.

220. **Swaminathan S**, Furey W, Pletcher J, Sax M. 1992.
Crystal structure of staphylococcal enterotoxin B, a superantigen.
Nature 359:801-806.
221. **Thibodeau J**, Cloutier I, Lavoie PM, Labrecque N, Mourad W, Jardetzky T, Sekaly RP. 1994.
Subsets of HLA-DR1 molecules defined by SEB and TSST-1 binding.
Science 266:1874-1878.
222. **Thomas P**, Webb PD, Handley V, Fraser JD. 2004.
Identification & characterisation of the two novel streptococcal pyrogenic exotoxins SPE-L & SPE-M.
Indian J. Med. Res. 119 Suppl:37-43.
223. **Tiedemann RE**, Fraser JD. 1996.
Cross-linking of MHC class II molecules by staphylococcal enterotoxin A is essential for antigen-presenting cell and T cell activation.
J. Immunol. 157:3958-3966.
224. **Tripp TJ**, McCormick JK, Webb JM, Schlievert PM. 2003.
The zinc-dependent major histocompatibility complex class II binding site of streptococcal pyrogenic exotoxin C is critical for maximal superantigen function and toxic activity.
Infect. Immun. 71:1548-1550.
225. **Tsai S**, Wear DJ, Shih JW, Lo SC. 1995.
Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 92:10197-10201.
226. **Tu AH**, Clapper B, Schoeb TR, Elgavish A, Zhang J, Liu L, Yu H, Dybvig K. 2005.
Association of a major protein antigen of *Mycoplasma arthritidis* with virulence.
Infect. Immun. 73:245-249.

227. **Tumang JR**, Posnett DN, Cole BC, Crow MK, Friedman SM. 1990.
Helper T cell-dependent human B cell differentiation mediated by a mycoplasmal superantigen bridge.
J. Exp. Med. 171:2153-2158.
228. **Valdimarsson H**, Baker BS, Jonsdottir I, Powles A, Fry L. 1995.
Psoriasis a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens?
Immunol. Today. 16:145-149.
229. **Watson AR**, Mittler JN, Lee WT. 2003.
Staphylococcal enterotoxin B induces anergy to conventional peptide in memory T cells.
Cell. Immunol. 222:144-55.
230. **Weeks CR**, Ferretti JJ. 1984.
The gene for type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) is located in bacteriophage T12.
Infect. Immun. 46:531-536.
231. **White J**, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrack P. 1989.
The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice.
Cell 56:27-35.
232. **Williams RJ**, Ward JM, Henderson B, Poole S, O'Hara BP, Wilson M, Nair SP. 2000.
Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcal exotoxin-like proteins: characterization of the prototypic gene and its protein product, SET1.
Infect. Immun. 68:4407-4415.
233. **Wright AD**, Chapes SK. 1999.
Cross-linking staphylococcal enterotoxin A bound to major histocompatibility complex class I is required for TNF-alpha secretion.
Cell. Immunol. 197:129-135.

234. **Yamao F**, Muto A, Kawauchi Y, Iwami M, Iwagami S, Azumi Y, Osawa S. 1985.
UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 82:2306-2309.
235. **Yarwood JM**, Leung DY, Schlievert PM. 2000.
Evidence for the involvement of bacterial superantigens in psoriasis, atopic dermatitis,
and *Kawasaki* syndrome.
FEMS Microbiol. Lett. 192:1-7.
236. **Yarwood JM**, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. 2002.
Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island
3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands.
J. Biol. Chem. 277:13138-13147.
237. **Yoshioka T**, Matsutani T, Toyosaki-Maeda T, Suzuki H, Uemura S, Suzuki R, Koike M,
Hinuma Y. 2003.
Relation of streptococcal pyrogenic exotoxin C as a causative superantigen for
Kawasaki disease.
Pediatr. Res. 53:403-410.
238. **Yutsudo T**, Murai H, Gonzalez J, Takao T, Shimonishi Y, Takeda Y, Igarashi H,
Hinuma Y. 1992.
A new type of mitogenic factor produced by *Streptococcus pyogenes*.
FEBS Lett. 308:30-34.
239. **Zamvil SS**, Steinman L. 1990.
The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis.
Annu. Rev. Immunol. 8:579-621.
240. **Zhang S**, Iandolo JJ, Stewart GC. 1998.
The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin
determinant (sej).
FEMS Microbiol. Lett. 168:227-233.

241. **Zhao Y**, Li Z, Drozd S, Guo Y, Stack R, Hauer C, Li H. 2004.
Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Mycoplasma arthritidis*-
derived mitogen complexed with peptide/MHC class II antigen.
Acta. Crystallogr. D .Biol. Crystallogr. 60:353-356.
242. **Zhao Y**, Li Z, Drozd SJ, Guo Y, Mourad W, Li H. 2004.
Crystal structure of *Mycoplasma arthritidis* mitogen complexed with HLA-DR1 reveals
a novel superantigen fold and a dimerized superantigen-MHC complex.
Structure (Camb). 12:277-288.

11 Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Lothar Rink, für das interessante Thema und seine Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, für die hilfreichen Diskussionen und die wertvollen Tips zur Bewältigung so mancher Probleme. Ferner bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Holger Kirchner, der mir den Beginn der Promotion in Lübeck ermöglichte, sowie bei allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie und Transfusionsmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck, wo ich meine Arbeit begann.

Herrn Professor Dr. Hanno Baumann danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Für die Einführung in die Arbeit bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Antje Galuschka. Bei Frau Beate Höschler und Frau Sylvia Hartz bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Assays.

Unserer ehemaligen Sekretärin Frau Veronika Franklin danke ich für den herzlichen Empfang im Universitätsklinikum in Aachen.

Mein Dank gilt den Mitarbeiterinnen der Immunologie Frau Gabi Engelhardt, Frau Daniela Fleischer, Frau Silke Hebel, Frau Dagmar Marx und Frau Birgit Plümäkers für ihre vielfältige Unterstützung. Besonders bei Frau Birgit Plümäkers bedanke ich mich für ihre Ausdauer bei den Vitalitätstests und ihre tatkräftige Unterstützung bei der Säulenaufreinigung der Proteinfractionen und den anschließenden Assays. Für die Hilfestellung bei den Arbeiten am FACS bedanke ich mich bei Frau Hildegard Ostendorp. Nicht zu letzt bei unseren "Post-Docs" Frau Dr. rer. nat. Sabine Arlt, Herrn Dr. rer. nat. Peter Uciechowski und Herrn jun. Professor Dr. rer. nat. Hajo Haase bedanke ich mich für nützliche Tips und viele angenehme Gespräche.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir den Weg bis zur Promotion ermöglicht und mich immer liebevoll unterstützt haben. Auch meinen beiden Brüdern danke ich für ihre Hilfe und Ermunterung.

12 Lebenslauf

Lebenslauf

Markus Diedershagen
Rathausstraße 5
52072 Aachen

geboren am 22.04.1969 in Duisburg, ledig

Ausbildung

1975-1985	Grund- und Hauptschule Friedrichsfeld
1985-1989	Besuch des Gymnasiums Voerde, Abschluss Abitur
1989-1990	Wehrdienst

Wissenschaftliche Ausbildung

1990-2000	Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
1999-2000	Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Biochemie (AG Genregulation Professor Dr. B.-J. Benecke) der Fakultät für Chemie an der Ruhr-Universität Bochum Thema: Isolierung genomischer 7sK und 7sL DNA aus dem Zebrafisch <i>Danio rerio</i> Note: gut
01.05.2000	Beginn der Dissertation im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK 288 "Strukturen und Mediatoren der Zellinteraktion" am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin (Direktor Professor Dr. med. H. Kirchner, Betreuer PD Dr. rer. nat. L. Rink) der Medizinischen Universität zu Lübeck Thema: Charakterisierung der Eigenschaften des <i>Mycoplasma Arthritidis</i> Superantigens
01.02.2002	Umzug der Arbeitsgruppe nach Aachen und Fortsetzung der Dissertation am Institut für Immunologie (Direktor Professor Dr. rer. nat. L. Rink) des Universitätsklinikums der RWTH-Aachen
02. 09. 2005	Tag der mündlichen Prüfung Note: sehr gut