

Reinigung des nierenspezifischen Glykoproteins gp400 mittels Immunaффinitätschromatographie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. oec. troph.
des Fachbereichs Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Angefertigt im Nephrologischen Labor des Zentrums für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Dipl. Oec. troph. Lucia Bodemer, geb. Eschbach
aus Kenzingen/Breisgau

Gießen 2000

Dissertation im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorsitzender	Prof. Dr. J. Bottler
1. Gutachter	PD Dr. med. H.-W. Birk
2. Gutachterin	Prof. Dr. H. Daniel
Prüferin	Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg
Prüfer	Prof. Dr. E. Weigand

Tag der Disputation 24. November 2000

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Abbildungsverzeichnis	VI
	Tabellenverzeichnis	VIII
	Abkürzungsverzeichnis	IX
1	Einleitung	1
1.1	Herstellung, Charakterisierung und Bedeutung monoklonaler Antikörper	1
1.2	Beschreibung der monoklonalen Antikörper N4A4 und L4D6	4
1.3	Bedeutung des gp400 für die nichtinvasive Urindiagnostik	6
1.4	Zur Diagnostik und Therapie von Nierenzellkarzinomen - die Bedeutung von monoklonalen Antikörpern	8
1.5	Das Heymann-Nephritis-Antigen "Megalin"	10
1.6	Strategien zur Reinigung eines Proteins	12
2	Ziel dieser Arbeit	16
3	Material	17
3.1	Allgemeine Materialien	17
3.2	Antisera und monoklonale Antikörper	18
3.3	Radiochemikalien	18
3.4	Nierengewebe	18
3.5	Zusammensetzung der Puffer	18
3.6	Eichproteine für die Elektrophorese	19
3.7	Geräte	20
4	Methoden	22
4.1	Präparation der Endosomenfraktion des Nierencortex	22
4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	23
4.3	Aminosäureanalyse	24
4.4	Festphasen-Radioimmunoassay	25

4.4.1	Jodierung des Antikörpers	25
4.4.2	Durchführung des Radioimmunoassays	25
4.4.3	Auswertung	27
4.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	27
4.5.1	Herstellung der Gele	27
4.5.2	Vorbereitung der Proben	28
4.5.3	Elektrophorese-Laufbedingungen	29
4.6	Gelfärbung	29
4.6.1	Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung	29
4.6.2	Silberfärbung	29
4.7	Western-Blot-Technik: Elektrotransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen	30
4.7.1	Autoradiographie	31
4.7.2	Chemilumineszenz	31
4.8	Solubilisierung der Membranproteine	32
4.9	Präparative isoelektrische Fokussierung	33
4.10	Affinitätschromatographie mit Concanavalin A	34
4.11	Immunaффinitätschromatographie mit monoklonalen Antikörpern	35
4.11.1	Kopplung der Protein G-Säule mit monoklonalen Antikörpern	35
4.11.2	Durchführung der Immunaффinitätschromatographie	36
4.12	Verdau des Proteins im SDS Gel und Elution der Peptide aus der Gelmatrix	36
4.13	Auftrennung der Peptidfragmente	37
4.14	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	37
4.15	Peptidsequenzierung	38
5	Ergebnisse	39
5.1	Präparation von Endosomen des Nierencortex	39
5.1.1	Quantifizierung des gp400 im Verlauf der Präparation mittels Festphasen-Radioimmunoassay	39
5.1.2	Western-Blot	40
5.2	Solubilisierung des gp400	42
5.3	Präparative isoelektrische Fokussierung	45
5.4	Affinitätschromatographie mit Concanavalin A	47
5.5	Immunaффinitätschromatographie	49
5.5.1	Monoklonaler Antikörper N4A4	49
5.5.2	Monoklonaler Antikörper L4D6	49

5.6	Nachweis der Identität des Antigens der monoklonalen Antikörper N4A4 und L4D6	50
5.7	Aminosäurenanalyse zur quantitativen Proteinbestimmung in der Eluatfraktion	51
5.8	HPLC-Auftrennung der Peptidfragmente nach Verdau des Proteins und Elution aus der Gelmatrix	52
5.9	Massenspektrometrie	54
5.10	Sequenzierung	55
6	Diskussion	58
6.1	Präparation von Endosomen des Nierencortex	58
6.2	Solubilisierung des N4A4-Antigens	59
6.3	Präparative isoelektrische Fokussierung	61
6.4	Affinitätschromatographie mit Concanavalin A	62
6.5	Immunaффinitätschromatographie	62
6.6	Weiterführende Untersuchungen nach der Reinigung von gp400: Massenspektrometrie und Sequenzierung	65
6.7	Identität von gp400 und Heymann-Nephritis-Antigen Megalin?	68
6.8	Alternative Vorgehensweisen	69
7	Zusammenfassung	71
8	Summary	73
9	Literatur	74
10	Anhang	87
11	Danksagung	89

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1 Herstellung eines polyklonalen Antiserums (linke Bildhälfte) im Vergleich zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern (rechte Bildhälfte) (MILSTEIN, 1980)
- Abb. 1.2 Bau eines Antikörpermoleküls am Beispiel des Immunglobulin G (MILSTEIN, 1980)
- Abb. 1.3 Lichtmikroskopische Immunfärbung des Nierencortex vom Schwein. Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase nach Inkubation mit dem APAAP-Komplex (BIRK et al., 1993)
- Abb. 1.4 Elektronenmikroskopische Darstellung der Lokalisierung des N4A4-Antigens im proximalen Tubulus mit goldmarkiertem Protein A (BIRK et al., 1993)
- Abb. 1.5 Einfluß des nichtionischen Röntgenkontrastmittels Iopamidol auf die Urinexkretion verschiedener renaler proximaltubulärer Antigene. (R4A6: Na⁺-D-Glukose Kotransporter; T8A4: Kernmembranantigen; ID2C3: Villin) (BIRK et al., 1990)
- Abb. 4.1 Endosomenpräparation aus dem Cortex von Schweinenieren
- Abb. 4.2 Schematische Darstellung des für die präparative isoelektrische Fokussierung verwendeten Svensson-Rohres
- Abb. 5.1 Quantifizierung des gp400 in den einzelnen Fraktionen der Endosomenpräparation nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990)
- Abb. 5.2 Silberfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen der Endosomenpräparation nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990)
- Abb. 5.3 Detektion des gp400 in den einzelnen Fraktionen der Endosomenpräparation (ECL-Entwicklung)
- Abb. 5.4 Solubilisierung des gp400 bei unterschiedlichen Cholatkonzentrationen
- Abb. 5.5 pH-Werte der einzelnen Fraktionen nach isoelektrischer Fokussierung
- Abb. 5.6 Verteilung des gp400 in den einzelnen Fraktionen nach präparativer isoelektrischer Fokussierung im Svensson-Rohr

- Abb. 5.7 Typischer Verlauf einer Affinitätschromatographie mit Concanavalin A
- Abb. 5.8 Gelelektrophoretische Auftrennung der Eluatfraktion nach Immunadsorption mit dem monoklonalen Antikörper L4D6
- Abb. 5.9 Western-Blot (mAk N4A4) der Eluatfraktion nach Immunadsorption (mAk L4D6)
- Abb. 5.10 HPLC-Elutionsprofil nach Aminosäurenanalyse der Immunadsorptions-Eluatfraktion
- Abb. 5.11 HPLC-Elutionsprofil nach Verdau mit der Endoproteinase Lys-C: Leerwert
- Abb. 5.12 HPLC-Elutionsprofil nach Verdau mit der Endoproteinase Lys-C: Probe
- Abb. 5.13 Rechromatographie einer ausgewählten Peptidfraktion
- Abb. 5.14 Massenspektrum einer ausgewählten Peptidfraktion nach Proteinverdau im SDS-Gel, Elution der Peptide und anschließender HPLC-Auftrennung der Peptidfragmente
- Abb. 5.15 Basensequenz des humanen cDNA Klons (H29160)
- Abb. 5.16 Mögliche Aminosäuresequenz des humanen cDNA Klons (H29160)

Tabellenverzeichnis

- Tab. 5.1 Vergleich unterschiedlicher Detergenzien hinsichtlich ihrer Solubilisierungseigenschaften für das gp400
- Tab. 5.2 Affinitätschromatographie mit Concanavalin A: Detektion des gp400 in den gesammelten Fraktionen mittels Festphasen-Radioimmunoassay
- Tab. 5.3 Immunadsorption mit dem monoklonalen Antikörper N4A4
- Tab. 5.4 Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Aminosäureanalyse
- Tab. 10.1 Präparation von Endosomen des Schweinenierencortex: Bindung des N4A4-Antikörpers in den einzelnen Präparationsfraktionen
- Tab. 10.2 Solubilisierung des gp400gens bei unterschiedlichen Cholatkonzentrationen: Meßergebnisse nach Festphasen-Radioimmunoassay
- Tab. 10.3 Isoelektrische Fokussierung der solubilisierten Endosomenfraktion des Schweinenierencortex

Abkürzungsverzeichnis

A	Anodenlösung
Abb	Abbildung
a.d.	aqua destillata
AM	Ausgangsmaterial
APAAP	Alkalische Phosphatase komplexiert mit einem Antikörper gegen Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
C bzw. % C	Gewichtsprozent an Crosslinkern relativ zu Monomeren
CBB	Coomassie-Brilliant-Blue
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	3-Cholamidopropyltrimethylammonio-1-propansulfonat
cmc	kritische Mizellare Konzentration
cpm	counts per minute
DMP	Dimethylpimelimidat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholat
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
E	Extinktionseinheiten
E. coli	Escherichia coli
Fab	antigenbindende Domäne eines Antikörpers
Fc	konstante Domäne eines Antikörpers
FMOC	9-Fluorenylmethylchloroformat
G	Gradient
gp400	Glykoprotein 400
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
Ig	Immunglobulin
K	Kathodenlösung
kDa	Kilodalton, Einheit des Molekulargewichtes
kV	Kilovolt, Einheit der elektrischen Spannung
LysC	Endoproteinase LysC
M	Molarität oder Mittelwert
mAk	Monoklonaler Antikörper
MALDI-MS	Matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
MBq	Mega Becquerel, Einheit für die Aktivität
min	Minute
mRNA	Botenribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht

NKS	Neugeborenen-Kälber-Serum
NP-40	Nonidet P 40
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-A	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit NaN ₃
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration in mol/liter
pI	Isoelektrischer Punkt
Pk	Proteinkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAP	Rezeptor assoziiertes Protein
RP-HPLC	Reversed-phase high performance liquid chromatography
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Retentionszeit
S	Sediment
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHE	Schweinenierencortex-Homogenat-Einheiten
T bzw. % T	Prozentuale Konzentration (w/v) der Monomere Acrylamid und Bisacrylamid
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethyldiamin
TOF	Time-of-flight
TFA	Trifluoressigsäure
TRA	Triethanolamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
Ü	Überstand
W	Watt, Einheit der elektrischen Leistung

Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin
B	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
Z	Glutamin oder Glutaminsäure

Genetischer Code

a	Adenin
c	Cytosin
n	nicht eindeutig identifizierte Base
g	Guanin
t	Thymin

1 Einleitung

1.1 Herstellung, Charakterisierung und Bedeutung monoklonaler Antikörper

Ein Antikörper ist ein Protein, das von einem höheren Lebewesen nach Kontakt mit einer fremden Substanz, einem sogenannten Antigen, produziert wird. Ist das Antigen ein Molekülgemisch, so werden verschiedene Antikörper gegen dessen Bestandteile gebildet. Aber auch wenn das Antigen aus nur einer Molekülsorte besteht, kann diese mehrere sogenannte determinante Gruppen enthalten und somit ebenfalls die Bildung unterschiedlicher Antikörper hervorrufen. Gegen dieselbe determinante Gruppe kann der Organismus außerdem mehrere Antikörper-Arten erzeugen. Nach Eindringen des Antigens in den fremden Organismus reagiert das Immunsystem des Empfängers, indem sich die zur Gruppe der Leukozyten gehörenden B-Lymphozyten vermehren und als Plasmazellen Antikörper gegen die determinanten Gruppen des Antigens produzieren. Die Antikörper werden in das Blut sezerniert. Befreit man das Blut von seinen zellulären Bestandteilen, so erhält man eine als Antiserum bezeichnete Flüssigkeit, in der alle gegen das Antigen gebildeten Antikörper enthalten sind. Antiseren enthalten immer Antikörper-Gemische und werden deshalb auch als polyklonale Antiseren bezeichnet. Sie sind von Spender zu Spender verschieden (MILSTEIN, 1980).

Im Jahre 1975 gelang es KÖHLER und MILSTEIN erstmalig, Zellen eines Mäuse-Myeloms mit Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten aus der Milz von Mäusen zu verschmelzen. Die so entstandenen Hybridzellen besitzen sowohl die Fähigkeit der Lymphozyten, Antikörper gegen ein beliebiges Antigen zu synthetisieren, als auch die Eigenart der Myelomzellen, unsterblich zu sein. Einzelne Hybridzellen kann man in Nährmedien zu Zellklonen heranwachsen lassen, wobei alle Zellen dieses Klones denselben Antikörper bilden. Diese monoklonalen Antikörper werden von den Zellen an das Nährmedium abgegeben und können daraus in großen Mengen gewonnen werden (s. Abb. 1.1). Im Unterschied zum polyklonalen Antiserum ist der hauptsächlichste Vorteil monoklonaler Antikörper darin zu sehen, daß zumindest theoretisch unendlich viele homogene Antikörper gegen ein definiertes Epitop erzeugt werden können (DUNBAR und SKINNER, 1990).

Bei den meisten höher entwickelten Säugetieren kennt man fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinmolekülen, nämlich IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Sie unterscheiden sich voneinander in Größe, elektrischer Ladung, Aminosäurezusammensetzung und in ihrem Kohlenhydratanteil. IgG ist das Hauptimmunglobulin im normalen menschlichen Serum und macht ca. 70-75 % des gesamten Immunglobulinpools aus. IgM besitzt eine pentamere Struktur und stellt etwa 10 % des gesamten Immunglobulinpools dar. Dieser Antikörper ist der vorherrschende "frühe" Antikörper gegen infektiöse Organismen. IgA repräsentiert ca. 15-20 % des menschlichen Immunglobulinpools im Serum und ist das vorherrschende Immunglobulin in seromukösen Sekreten. Die beiden Immunglobulinklassen IgD und IgE

machen insgesamt weniger als 1 % des Antikörperpools aus. IgE spielen hauptsächlich bei den Überempfindlichkeitsreaktionen des Soforttyps eine Rolle (TURNER, 1991).

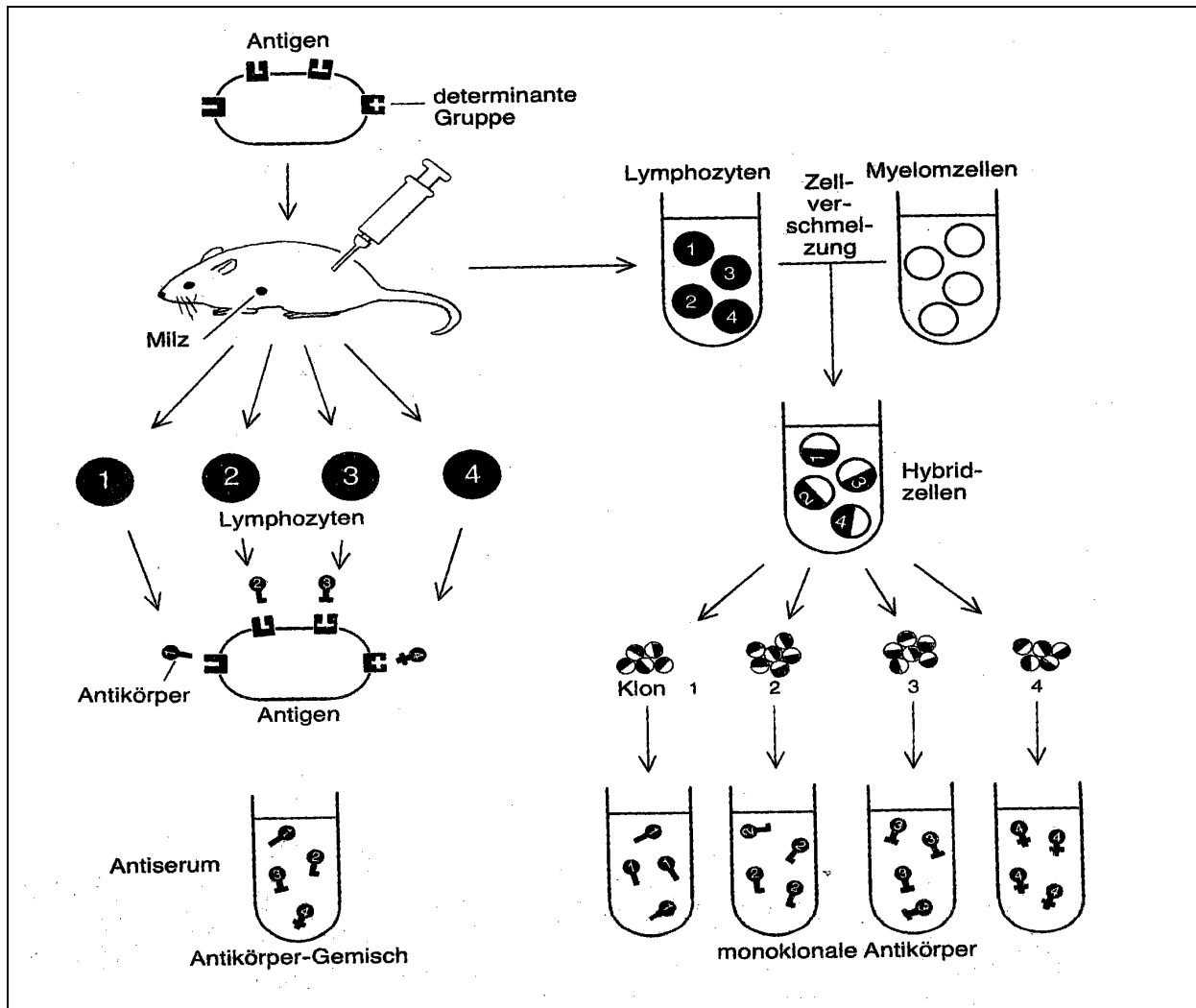


Abb. 1.1: **Herstellung eines polyklonalen Antiserums (linke Bildhälfte) im Vergleich zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern (rechte Bildhälfte) (MILSTEIN, 1980)**

Die Grundstruktur eines Immunglobulinmoleküls ist jeweils eine Einheit aus zwei identischen leichten Polypeptidketten und zwei identischen schweren Polypeptidketten, die untereinander durch Disulfidbrücken verbunden sind (s. Abb. 1.2). Jede Klasse besitzt einen charakteristischen Typ der schweren Kette mit einem Molekulargewicht zwischen 50.000 und 77.000 Da. Eine Variation in der Struktur der schweren Kette innerhalb einer Klasse führt zur Bildung von Immunglobulinsubklassen. Als Beispiel besteht das menschliche IgG aus vier Subklassen, d.h. es gibt vier verschiedene Typen von γ -Ketten. Vom menschlichen IgA sind zwei Subklassen bekannt, bei den anderen Klassen wurden noch keine Subklassen eindeutig identifiziert. Da die Immunglobulinsubklassen erst nach der Differenzierung der verschiedenen Spezies aufgetreten sind, können die menschlichen Subklassen nicht mit z.B.

den vier Subklassen des IgG der Maus verglichen werden. Die kleinere, leichte Polypeptidkette hat ein Molekulargewicht von 25.000 Da und ist bei allen Klassen von Immunglobulinen gleich. Die pflanzliche Proteinase Papain spaltet das IgG-Molekül in zwei identische Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Während die Fc-Region Effektorfunktionen wie Komplementfixierung oder Monozytenbindung vermittelt, ist die Fab-Region für die Antigenbindung zuständig (TURNER, 1991).

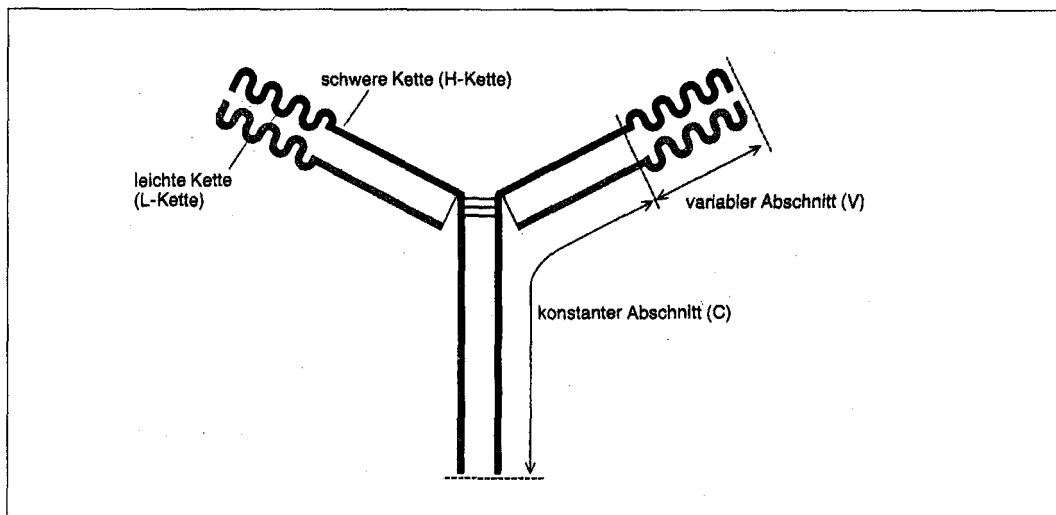


Abb 1.2 Bau eines Antikörpermoleküls am Beispiel des Immunglobulin G. Die konstanten Abschnitte haben in allen Antikörpern einer Untergruppe die gleiche Aminosäurezusammensetzung. Sie sorgen für die Komplementbindung und für den Transport der Antikörpermoleküle durch biologische Membranen. Die Aminosäurezusammensetzung des variablen Abschnitts ist charakteristisch für jeden Antikörper (MILSTEIN, 1980)

Das Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten für monoklonale Antikörper ist breit. Besonders hervorzuheben ist die relativ einfach gewordene Isolierung von Molekülen anhand einzelner antigener Determinanten (EISENBARTH, 1981). Mit dieser Methode gelang es beispielsweise SECHER und BURKE (1980), Interferon aus einem Rohextrakt 5000fach anzureichern. In der Klinik gewannen monoklonale Antikörper vor allem durch ihren Einsatz in der Diagnostik und Therapie von Tumoren an Bedeutung. Radiomarkierte monoklonale Antikörper binden an tumorassoziierte Antigene und können mittels bildgebender Verfahren Tumoren und Metastasen zur Darstellung bringen (GOLDENBERG, 1988). Eine therapeutische Wirkung auf Tumoren kann mit monoklonalen Antikörpern erzielt werden, wenn diese zuvor mit radioaktiven Isotopen, zytotoxischen Substanzen oder potenten Toxinen gekoppelt wurden (RIETHMÜLLER et al., 1993).

Durch die Etablierung gentechnologischer Methoden wurde es möglich, Antikörpermoleküle zu manipulieren. Bispezifische Antikörper, die mit jeder ihrer Antigenbindungsdomäne unterschiedliche Antigene binden können (MILSTEIN und CUELLO, 1983) wurden somit

entwickelt. Desweiteren wurden Techniken etabliert, die es möglich machten, Antikörper zu synthetisieren, die sowohl murine als auch humane Komponenten besitzen. Chimärisierte und humanisierte monoklonale Antikörper sind zusammengesetzt aus variablen Domänen des ursprünglichen Mausantikörpers und konstanten Domänen des menschlichen Immunglobulins. In chimärisierten Antikörpern sind dabei die gesamten variablen Regionen des murinen monoklonalen Antikörpers mit humanen konstanten Regionen kombiniert. Demgegenüber enthalten humanisierte Antikörper lediglich die Originalsequenzen der hypervariablen Bindungsregionen aus dem ursprünglichen murinen Antikörper. Der Rest des Antikörpers besteht aus humanen Anteilen (NEUBERGER et al., 1985; WINTER und MILSTEIN, 1991). Es konnte gezeigt werden, daß nach Humanisierung die Immunogenität von murinen Antikörpern deutlich reduziert ist (WINTER und HARRIS 1993). In der Transplantationsmedizin werden bereits chimärisierte murine Antikörper gegen den Interleukin-2 Rezeptor verabreicht. Abstossungsreaktionen konnten somit signifikant reduziert werden, da die Bindung von Interleukin-2 an seinen Rezeptor durch die Antikörperbindung verhindert wurde (NASHAN et al., 1997).

1.2 Beschreibung der monoklonalen Antikörper N4A4 und L4D6

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper N4A4 und L4D6 wurden im Rahmen von Untersuchungen zu Transportmechanismen in renalen und intestinalen Epithelzellen von der Arbeitsgruppe um Prof. H. Koepsell am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt/Main generiert (BIRK et al., 1993). Beide Antikörper, die der Subklasse IgG₁ angehören und durch die Immunisierung von Mäusen mit renalen Bürstensaummembranen vom Schwein hergestellt wurden, reagieren spezifisch mit renalem Gewebe, eine Bindung in anderen Geweben des Körpers konnte von den Autoren nicht nachgewiesen werden. Nur der Antikörper N4A4 zeigt eine Kreuzreaktion mit der Humanniere.

Lichtmikroskopische immunhistochemische Untersuchungen haben ergeben, daß beide Antikörper ausschließlich an die Bürstensaummembran proximaler Tubuluszellen der Niere (S1- bis S3-Segment) binden, auf Nierencortex Schnitten vom Schwein färbten beide Antikörper identische Areale (s. Abb. 1.3). Eine elektronenmikroskopische Untersuchung mit dem N4A4-Antikörper ergab weiter, daß dieser an die basalen Anteile der Mikrovilli und an apikale endozytotische Vesikel bindet (BIRK et al., 1991, s. Abb. 1.4).

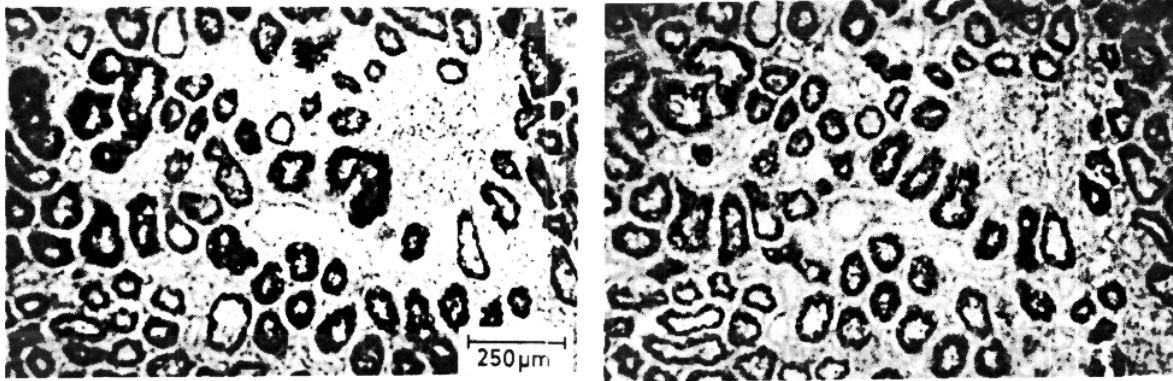


Abb. 1.3 *Lichtmikroskopische Immunfärbung des Nierencortex vom Schwein. Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase nach Inkubation mit dem APAAP-Komplex. Links: monoklonaler Antikörper N4A4, rechts: L4D6 (BIRK et al., 1993)*



Abb. 1.4 *Elektronenmikroskopische Darstellung der Lokalisierung des N4A4-Antigens im proximalen Tubulus mit goldmarkiertem Protein A (BIRK et al., 1993)*

Das Molekulargewicht des N4A4-Antigens wird mit 400 kDa, das des L4D6-Antigens mit 440 und 50 kDa angegeben (BIRK et al., 1993), wobei jeweils unterschiedliche Methoden zur Molekulargewichtsanalyse angewendet wurden. BERNOTAT-DANIELOWSKI und Mitarbeiter (1986) beschrieben das N4A4-Antigen aufgrund der Bindung von Concanavlin A an die 400 kDa-Bande als Glykoprotein und bezeichneten es als "Glykoprotein 400" (gp400). BIRK und Mitarbeiter (1991) vermuteten weiter, daß es sich bei gp400 um ein integrales Membranprotein handelt, da es erst nach Behandlung mit Detergenzien von der Bürstensaummembran getrennt werden konnte.

1.3 Bedeutung des gp400 für die nichtinvasive Urindiagnostik

GP400 wird mit dem Urin unter physiologischen Bedingungen ausgeschieden und liegt hier einerseits assoziiert mit Membranvesikeln, andererseits auch in löslicher Form vor (BIRK et al., 1991). Da die Lokalisierung des nierenspezifischen Proteins auf den proximalen Tubulus beschränkt ist und ein spezifisches Nachweisverfahren existiert, wurde die Möglichkeit untersucht, gp400 als diagnostischen Marker einzusetzen (BIRK et al., 1991). Tubulusschädigungen könnten somit auf nichtinvasivem Wege erkannt und möglicherweise hinsichtlich Art und Schweregrad differenziert werden. Da die Differentialdiagnostik von Nierenerkrankungen nach wie vor auf Nierenbiopsien angewiesen ist, sind Fortschritte auf diesem Gebiet wünschenswert (BIRK et al., 1990). Auch die Enzymdiagnostik im Urin, die bereits zur Erfassung, Schweregradbeurteilung und Verlaufskontrolle tubulärer Schädigungen eingesetzt wurde, sollte die nichtinvasive Diagnostik von Nierenerkrankungen voranbringen (PRICE, 1982; DUBACH und LEHIR, 1984; DUBACH et al., 1989). Voraussetzung hierfür war ebenso das Wissen um die Expression der untersuchten Enzyme entlang des Nephrons und deren subzelluläre Lokalisierung (SCHMIDT und GUDER, 1976; GUDER und ROSS, 1984). Kritisch zu beurteilen ist dieser Ansatz allerdings aufgrund physiologischer Schwankungen des Urinmilieus. Da diese sich auf die Enzymaktivitäten auswirken, ist eine quantitative Erfassung schwierig (PRICE, 1982).

SCHERBERICH und Mitarbeiter (1990) setzten ein polyklonales Antiserum gegen Bürstensaummembranproteine des proximalen Tubulus humaner Nieren ein, um mittels Radioimmunoblotting die in den Urin freigesetzten Gewebeantigene zu detektieren und deren Menge abzuschätzen. Bei Patienten mit einer Glomerulonephritis, einer Pyelonephritis oder anderen Nierenschädigungen konnte eine erhöhte Ausscheidungsrate dieser Proteine in den Urin im Vergleich zu nierengesunden Kontrollpersonen gezeigt werden. Allerdings waren die nachgewiesenen renalen tubulären Antigene nur wenig definiert. Genau hier ist der Vorteil von monoklonalen Antikörpern begründet. Mit diesen kann die Exkretionsrate eines einzelnen Proteins, das mit gut etablierten Methoden näher charakterisiert werden kann, bestimmt werden (BIRK et al. 1990).

Zuvor beschriebene Anwendungen monoklonaler Antikörper in der Urindiagnostik bedienen sich meist eines Sandwich-Immunoassays zum Urinantigenachweis (PIERARD et al., 1983; FALKENBERG et al., 1986). Der Nachteil dieser Methode ist darin zu sehen, daß pro Antigen ein monoklonaler Antikörper zu dessen Immobilisierung benötigt wird, ein weiterer für die Detektion. Da nur selten zwei verschiedene monoklonale Antikörper gegen ein Markerantigen verfügbar sind (TOLKOFF-RUBIN et al., 1987), entwickelten BIRK und Mitarbeiter (1991) einen Festphasen-Radioimmunoassay. Hierbei werden die Antigene durch unspezifische Bindung an eine Nitrozellulosemembran immobilisiert, der Nachweis erfolgt über den einen verfügbaren monoklonalen Antikörper. Der sensitive Test erlaubt die simultane und vor allem quantitative Analyse verschiedener renaler Zellproteine. Ein großer Vorteil ist darin zu sehen, daß die Antigene aufgrund der Sensitivität der Methode auch im Urin von gesunden Probanden nachgewiesen werden können und somit Normalwertbereiche definiert werden konnten (BIRK, 1992).

GP400 liegt im Urin zu 75 % in Form von sedimentierbaren Aggregaten mit Fettsäuren und Cholesterin vor, die restlichen 25 % sind an Bürstensaummembranvesikel gebunden (BIRK et al., 1991). In den untersuchten Vesikeln konnten neben gp400 sowohl Villin als auch der Na⁺-D-Glukose Kotransporter nachgewiesen werden. Die Autoren deuteten dies dahingehend, daß die Vesikel sowohl von intermikrovillären Membranregionen als auch von den Mikrovilli herrühren. Die Freisetzung des gp400 in den Urin gesunder Menschen scheint demnach im Rahmen physiologischer Erneuerungsvorgänge im Tubulusepithel zu erfolgen. Die Freisetzung aus subapikalen Vesikeln durch Exozytose erscheint ebenfalls wahrscheinlich (BIRK et al., 1991; PIBERHOFER, 1992).

Untersuchungen bezüglich der Exkretionsrate von gp400 nach Einwirken verschiedener Nephrotoxine wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt. BIRK und Mitarbeiter (1990) untersuchten 24-Stunden-Sammelurine von nierengesunden Patienten vor und nach Durchführung einer Koronarangiographie mit i.v. Applikation des nichtionischen Röntgenkontrastmittels Iopamidol mit Hilfe des Festphasen-Radioimmunoassays. Dabei konnten die Autoren zeigen, daß die Freisetzung verschiedener Zellproteine in den Urin, u.a. auch des gp400, durch die Kontrastmittelgabe statistisch signifikant gegenüber der Normalausscheidung erhöht war (s. Abb. 1.5). Die vier untersuchten Antigene verhielten sich hierbei zeitsynchron, der Vorgang war reversibel.

BIRK und Mitarbeiter (1992) untersuchten Patienten mit normaler Nierenfunktion unter Cisplatintherapie hinsichtlich ihrer Ausscheidung renaler Tubuluszellantigene. Die Exkretionsrate der untersuchten Zellproteine des proximalen und distalen Tubulus sowie eines Kernmembranantigens stieg während der sechstägigen Meßperiode bis maximal auf das Achtfache des Ausgangswertes an. Die Autoren deuteten diesen Befund dahingehend, daß Cisplatin sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulus zu toxischen Zellschäden führt und somit verstärkt Zellnekrosen hervorruft.

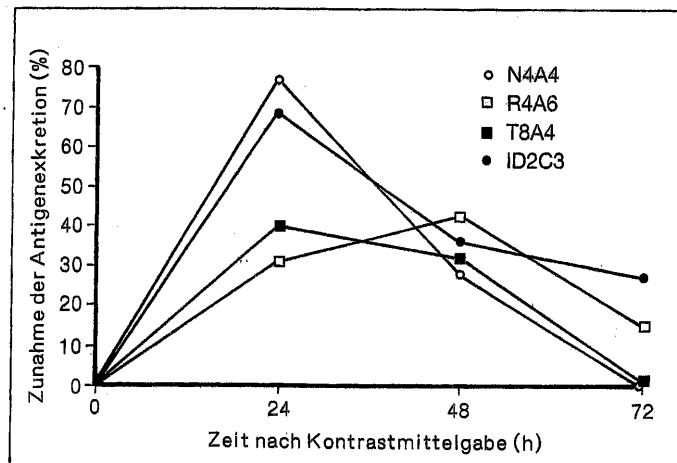


Abb 1.5 **Einfluß des nichtionischen Röntgenkontrastmittels Iopamidol auf die Urinexkretion verschiedener renaler proximaltubulärer Antigene.** (R4A6: Na⁺-D-Glukose Kotransporter; T8A4: Kernmembranantigen; ID2C3: Villin) (BIRK et al., 1990)

Bei Patienten mit Fadenwurmbefall untersuchten LANGHAMMER und Mitarbeiter (1997) das Vorkommen von gp400 im Urin. Verglichen mit einer Kontrollgruppe konnte eine statistisch gesicherte, signifikant höhere Exkretionsrate des Antigens beobachtet werden. Eine Schädigung der Niere durch die Parasiten (*Brugia malayi*) konnte somit bestätigt werden.

HARTMANN (1993) etablierte ein Zellkulturmodell der LLC-PK₁-Zelllinie und untersuchte damit die Freisetzung renaler Bürstensaummembranproteine in den Zellkulturüberstand unter dem Einfluß der Nephrotoxine HgCl₂ und Gentamicin. Schon bei geringen Toxinkonzentrationen konnte die Autorin eine erhöhte Proteinfreisetzung beobachten, wobei eine verstärkte Zell-Lyse als auslösender Faktor ausgeschlossen werden konnte.

1.4 Zur Diagnostik und Therapie von Nierenzellkarzinomen - die Bedeutung von monoklonalen Antikörpern

GP400 wird auch in Nephroblastomen (ALTMANNBERGER et al., 1988) und in höherdifferenzierten klar- und chromophilzelligen Nierenzellkarzinomen proximaltubulären Ursprungs exprimiert (BIRK et al., unveröffentlichte Ergebnisse) und bietet damit eine interessante Perspektive zur immunologischen Diagnostik und Therapie von Metastasen renaler Tumoren, insbesondere des Nierenzellkarzinoms. Das Nierenzellkarzinom ist insgesamt gesehen eine relativ seltene Erkrankung und macht ca. 3 % aller malignen Tumoren des Erwachsenen aus. Der Altersgipfel bei Diagnosestellung liegt bei 60 Jahren, Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen (SCHMID und SZABO, 1997; YOUNG, 1998). Ausgangspunkt der meisten Nierenzellkarzinome sind die Epithelzellen des

proximalen Tubulus (OBERLING et al., 1960; MARTENSSON, 1995). Durch die zunehmende Verbreitung moderner bildgebender Verfahren wie Sonographie und Computertomographie und die lang andauernde Symptomlosigkeit der Erkrankung werden heutzutage mehr als ein Drittel aller Nierenzellkarzinome zufällig im Rahmen der Abklärung einer Abdominalkrankheit entdeckt (SCHMID und SZABO, 1997). Fast ein Drittel aller Nierenzellkarzinome sind deshalb bereits bei Diagnosestellung metastasiert (CHOW et al., 1994; YOUNG, 1998), wobei die Lunge am häufigsten hiervon betroffen ist (RITCHIE und CHISHOLM, 1983). Die verbesserten Diagnosemöglichkeiten erklären sicherlich die steigende Inzidenz dieses Tumors in den letzten 20 Jahren (MOTZER et al., 1996).

Fünf Subtypen des Nierenzellkarzinoms können zytomorphologisch unterschieden werden: Mit ca. 75 % ist das klarzellige Nierenzellkarzinom das am häufigsten vorkommende. Sein Grundzelltyp zeichnet sich durch einen hohen Glykogengehalt aus. Am zweithäufigsten (11%) findet sich das chromophilzellige Nierenzellkarzinom, dessen Zellen weitgehend glykogenfrei sind. Die restlichen drei Subtypen sind vergleichsweise selten (chromophobzellig: 2-5 %; Duct Bellini Karzinom: 1 %; Onkozytom: 0,5 %) (THOENES et al., 1990)

Die einzige kurative Therapie des Nierenzellkarzinoms ist nach wie vor die vollständige operative Entfernung sämtlichen Tumorgewebes, also die radikale Nephrektomie (ROBSON et al., 1969; SCHMID und SZABO, 1997). Nur in Ausnahmefällen, z.B. wenn nur noch eine Niere vorhanden ist oder nur ein kleiner solitärer Tumor vorhanden ist, ist eine partielle Nephrektomie angezeigt (NOVICK, 1995). Im metastasierten Zustand raten SCHMID und SZABO (1997) von einer radikalen Nephrektomie ab. Das Nierenzellkarzinom ist weitgehend strahlenresistent. Randomisierte prospektive Studien zeigten keinen Überlebensvorteil durch eine prä- oder postoperative Radiotherapie (FINNEY, 1973; WERF-MESSING, 1973). Auch Chemotherapien konnten bisher nicht erfolgversprechend eingesetzt werden (REESE, 1992; YAGODA et al., 1995). Ursache scheint die sog. "multi-drug-resistance" zu sein (MICKISCH et al., 1990; CHAPMAN und GOLDSTEIN, 1995).

Aufgrund des beschriebenen generellen schlechten Therapieansprechens von Nierenzellkarzinomen sind neue Ansätze gefragt. Monoklonale Antikörper können hierbei von großer Bedeutung für Diagnostik und Therapie dieser malignen Erkrankung sein. Antikörper, die an tumorspezifische Antigene binden, könnten sowohl für bildgebende Verfahren als auch für die Vermittlung von toxischen Substanzen eingesetzt werden. Außerdem können diese dazu beitragen, Antigene zu identifizieren, die für die Antitumorvakzinierung Verwendung finden könnten (MULDERS et al., 1997).

Am weitesten fortgeschritten sind derartige Untersuchungen wohl bei dem Nierenzellkarzinom-spezifischen Antigen G250. Dieses Antigen wurde jüngst identifiziert und kloniert (OOSTERWIJK et al., 1996). Der murine monoklonale Antikörper gegen G250

gehört der Subklasse IgG₁ an und reagiert mit 85 % aller Nierenzellkarzinom-Zelllinien, nicht aber mit der Normalniere. Lediglich in der Magenmukosa und Gallengangszellen konnte das Antigen detektiert werden (OOSTERWIJK et al., 1986). In einer klinischen Studie der Phase II konnte mit dem ¹³¹J markierten Antikörper bei 3 von 15 Nierenzellkarzinompatienten eine partielle Remission erreicht werden (KRANENBORG et al., 1995). Diagnostisch eignet sich der mit ¹³¹J markierte monoklonale Antikörper gegen G250 sehr gut zur Darstellung von Nierenzellkarzinomen (OOSTERWIJK et al., 1993). Der später entwickelte chimäre, humanisierte monoklonale Antikörper gegen G250 zeigte nach Markierung mit ¹³¹J ebenfalls sehr gute Aufnahmeleistungen in die Tumorzellen bei fehlender Immunogenität (STEFFENS et al., 1997). Allerdings bedingt die geringe Clearance von radiomarkierten Antikörpern aus Blut und Normalgewebe, daß eine optimale Bildgebung einige Tage verzögert wird und die lange Verweildauer in normalem Gewebe für Toxizitäten verantwortlich ist (BUCHSBAUM, 1995). Mit einem neuen Modell versuchten KRANENBORG und Mitarbeiter (1998) deshalb, diese Probleme zu umgehen. Die Autoren entwickelten einen bispezifischen monoklonalen Antikörper, dessen eine Domäne an das G250 Antigen bindet und die andere ein Chelat erkennt (DTPA), wenn dieses mit einem Metall beladen ist. Der bispezifische Antikörper wird mit zeitlichem Vorlauf gegeben, währenddessen dieser an sein Antigen binden kann. Danach kann ¹¹¹In-DTPA verabreicht werden, das an die zweite antigenbindende Domäne des bispezifischen Antikörpers bindet und den Tumor somit zur Darstellung bringt. Bei Studien an Nacktmäusen, denen humane Nierenzelltumoren xenotransplantiert wurden, konnten die Autoren sehr gute Aufnahmeleistungen des Radiochelates erzielen, während die zuvor beschriebene unspezifische Verweildauer in extratumoralem Gewebe wesentlich verkürzt werden konnte. Die Autoren versprechen sich von diesem Modell noch bessere Möglichkeiten für die humane Tumordiagnostik und -therapie.

Weitere Ansätze sind einerseits die Erzeugung von humanen monoklonalen Antikörpern, um die Immunogenität auszuschalten (BORREBACK, 1989). Andererseits können von murinen Antikörpermolekülen mittels Pepsin- oder Papainverdau Fragmente erzeugt werden. Diese F(ab')₂ bzw. Fab Fragmente sind weniger immunogen und können den Tumor leichter penetrieren. Somit erzeugen diese Fragmente bei der Tumordarstellung ein schärferes Signal als dies mit dem kompletten Antikörpermolekül möglich gewesen wäre (McKEARN, 1993).

1.5 Das Heymann-Nephritis-Antigen "Megalyn"

Aufgrund der subzellulären Lokalisierung und des Molekulargewichtes von gp400 und des sog. Heymann-Nephritis-Antigens gp330/Megalyn könnte eine Identität beider Proteine vermutet werden. Das apparente Molekulargewicht des Megalins der Ratte wurde zuerst mit 330 kDa dokumentiert (KERJASCHKI und FARQUHAR, 1982). Spätere proteinchemische Untersuchungen geben das apparente Molekulargewicht allerdings mit 440 kDa an

(BACHINSKY et al., 1993). Nach der Klonierung und Sequenzierung des Heymann-Nephritis-Antigens wurde das Molekulargewicht aufgrund der vorhergesagten Aminosäuresequenz auf 516 kDa korrigiert, weshalb der Name Megalin vorgeschlagen wurde (SAITO et al., 1994). KOUNNAS und Mitarbeiter (1992) stellten fest, daß in Präparationen von Megalin stets mehrere hochmolekulare Banden im SDS Gel sichtbar waren. Die Autoren diskutierten daraufhin, daß diese multiplen Polypeptide Degradierungsprodukte des ursprünglichen Proteins oder unterschiedlich glykosylierte Formen von Megalin darstellen. RAYCHOWDHURY und Mitarbeiter (1989) leiteten aus Aminosäureteilsequenzen ab, daß gp330 einen sehr großen extrazellulären Anteil besitzt, eine 29 Aminosäuren umfassende transmembranäre Domäne und einen 188 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Anteil. MAKKER (1993) beschrieb Megalin als ein anionisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 4,6.

Megalin ist eines der häufigsten Membranproteine im proximalen Tubulus (KERJASCHKI und FARQUHAR, 1982) und kommt dort in der apikalen intermikrovillären Domäne und in endozytotischen Vesikeln vor (KERJASCHKI et al., 1984). BACHINSKY und Mitarbeiter (1993) postulierten, daß neben dieser Form des gp330-Moleküls eine weitere besteht, die keinen zytoplasmatischen Proteinanteil besitzt und die nur auf den Mikrovilli vorzufinden ist. Die Expression von Megalin in den endozytotischen Vesikeln des glomerulären Epithels und in den Podozyten der Glomeruli konnte ebenfalls nachgewiesen werden (KERJASCHKI und FARQUHAR, 1983). Aufgrund des Vorkommens von Megalin in den Clathrin enthaltenden Vesikeln wird davon ausgegangen, daß es sich bei diesem Protein um einen endozytotischen Rezeptor handelt. CHRISTENSEN und Mitarbeiter (1995) beschrieben Megalin als einen proximaltubulären Scavenger-Rezeptor für glomerulär filtrierte Proteine. Außerdem weist die Aminosäuresequenz alle strukturellen Charakteristika der LDL-Rezeptorfamilie auf (SAITO et al., 1994). Potentielle Megalin Liganden wurden bereits beschrieben: Extrazelluläre Matrixkomponenten (MENDRICK et al., 1990); Plasminogen (KANALAS und MAKKER, 1991); Calcium (CHRISTENSEN et al., 1992); Laktoferrin und Apolipoprotein E angereicherte Lipoproteine (WILLNOW et al., 1992); Aprotinin (MOESTRUP et al., 1994). Megalin wird auch in extrarenalen Geweben exprimiert. Vorzugsweise sind dies Gewebe, die eine hohe rezeptorvermittelte Endozytoserate aufweisen: Lunge (Typ II Zellen), Epithelzellen des Innenohres, Epididymis, Brustdrüse, Schilddrüse, Retina (ZHENG et al., 1994). Da gp400 weder in den Glomeruli noch in Typ II Pneumozyten oder der Epididymis vorzufinden war, postulierten BIRK und Mitarbeiter (1993), daß gp400 ein von Megalin verschiedenes Protein ist.

KOUNNAS und Mitarbeiter (1992) beschreiben ein Protein, das bei affinitätschromatographischer Reinigung von Megalin jeweils zusammen mit diesem aufgereinigt wurde. Dieses sog. Rezeptor-assoziierte Protein (RAP) besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 39 kDa. Die Autoren konnten zeigen, daß RAP mit hoher Affinität an Megalin bindet und postulierten daher, daß RAP entweder eine Ligandenbindung an Megalin

verhindert, oder aber eine Bedeutung bei der Biosynthese und/oder dem intrazellulären Transport von Megalin besitzt.

Megalin ist wesentlich beteiligt an der Pathophysiologie der sog. Heymann-Nephritis, die bereits sehr früh als nephrotisches Syndrom bei der Ratte beschrieben wurde (HEYMANN et al., 1959). Die Heymann-Nephritis bei der Ratte stellt ein Modell für die sog. membranöse Glomerulonephritis beim Menschen dar. Beide Krankheitsbilder sind gekennzeichnet durch granuläre Ablagerungen in der glomerulären Basalmembran und durch schwere Proteinurie (KERJASCHKI et al., 1987). Die Heymann-Nephritis kann daher wertvolle Einblicke in die molekulare Pathogenese dieser Krankheit bieten (CAVALLO, 1994). Diese Einblicke sind von Bedeutung, weil immunologische Prozesse, die zu komplexen Immunablagerungen in den Glomeruli führen, eine Hauptursache vieler Nierenerkrankungen darstellen (KERJASCHKI et al., 1987). Es wird die aktive Heymann-Nephritis, bei der eine Immunisierung der Ratten mit Bürstensaummembranen des Nierencortex erfolgte, von der passiven Heymann-Nephritis unterschieden. Bei der letzteren wird den Tieren Serum bzw. gereinigte Immunglobuline von immunisierten Tieren injiziert (KERJASCHKI und FARQUHAR, 1982). Die gebildeten bzw. injizierten anti-Megalin-Antikörper binden an der Podozytenoberfläche der Glomeruli der Ratte an ihr Antigen. Dieser Immunkomplex wird abgekoppelt und bindet sodann an die glomeruläre Basalmembran, wo er als Immunablagerung nachgewiesen werden kann (KERJASCHKI et al., 1987).

KERJASCHKI und Mitarbeiter (1987) beschreiben zusätzlich ein humanes Äquivalent zum Megalin der Ratte. Dieses 400 kDa Protein weist biochemische, immunochemische und immunomorphologische Ähnlichkeiten zum Megalin der Ratte auf. So konnte z.B. eine Kreuzreaktion des polyklonalen Antiserums gegen das Megalin der Ratte mit dem humanen 400 kDa Äquivalent nachgewiesen werden. Desweiteren konnte das Protein in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus, genauer an der Basis der Mikrovilli und in den Clathrin enthaltenden Vesikeln, nachgewiesen werden. Eine eventuelle Identität des 400 kDa Proteins zum gp400 wurde bereits von BIRK und Mitarbeitern (1991) andiskutiert und erscheint sowohl aufgrund der ultrastrukturellen Lokalisierung in den proximalen Tubuli humaner Nieren als auch aufgrund des apparenten Molekulargewichtes möglich.

1.6 Strategien zur Reinigung eines Proteins

Die Reinigung von Proteinen liefert neben der Bereitstellung von Untersuchungsmaterial oft bereits erste Hinweise auf spezielle Eigenschaften des Proteins oder mögliche Unterschiede zu bekannten Proteinen, indem qualitative und quantitative Unterschiede durch hochauflösende elektrophoretische, chromatographische oder immunologische Verfahren aufgezeigt werden. Für eine eingehende Charakterisierung eines Proteins ist die Reinigung allerdings eine notwendige Voraussetzung (WESTERMANN, 1997).

Der wichtigste vorbereitende Schritt zur Reinigung eines Proteins ist die Entwicklung eines geeigneten Testsystems, wobei hierbei dessen Sensitivität und Genauigkeit ausschlaggebend sind (LINN, 1990). Ebenso wichtig ist die Wahl des Ausgangsmaterials. Einerseits sollten Gewebe gewählt werden, in denen größere Mengen des zu isolierenden Proteins vorkommen, andererseits sollten diese Gewebe selbst auch in größeren Mengen erhalten werden können (COOPER, 1980).

Unter Anwendung von klassischen Reinigungsmethoden werden Proteine durch Fraktionierungsverfahren getrennt. In einer Reihe unabhängiger Schritte wird das gewünschte Protein unter Ausnutzung seiner physikochemischen Eigenschaften zunehmend von anderen Substanzen getrennt (VOET und VOET, 1992). So können nach Zellaufschluß durch Lyse, Homogenisieren oder Ultraschallbehandlung Zellorganellen (GRAHAM, 1993), Membranvesikel (SABOLIC und BURCKHARDT, 1990; HAMMOND et al., 1994) oder Plasmamembranen (OZOLS, 1990) durch fraktionierte Zentrifugation vom löslichen Zytosol abgetrennt werden. Dichtegradientenzentrifugationen werden eingesetzt, um Zellbestandteile anhand ihrer Dichte aufzutrennen (SABOLIC und BURCKHARDT, 1990). In der Verwendung eines Percoll-Gradienten sehen THOMAS und McNAMEE (1990) einen Vorteil gegenüber dem früher häufiger eingesetzten Sucrose Gradienten. Mit Percoll kann ein nahezu isoosmotischer Gradient erzeugt werden. Nach dieser Grobfractionierung können chromatographische Verfahren eingesetzt werden, die besonders bei der Kombination verschiedener Trennprinzipien die Isolierung bereits relativ reiner Proteine gestatten (JANSON und RYDEN, 1989). Aufgrund ihrer amphoteren Natur wandern Proteine im elektrischen Feld, weshalb sich elektrophoretische Trennmethode wie die Polyacrylamidgelelektrophorese (LAEMMLI, 1970) oder die isoelektrische Fokussierung (NEUMEIER, 1980) ebenfalls sehr gut für die Trennung von Proteingemischen eignen.

Stehen ein polyklonales Antiserum oder ein monoklonaler Antikörper gegen das gesuchte Protein zur Verfügung, bieten sich in der Regel spezifische Affinitätstechniken zur Proteinisolierung an (CALTON, 1984). Die Kombination von Chromatographiemethoden und Immunaaffinitätstechniken kann im Idealfall zur spektakulären Ein-Schritt-Reinigung führen (SCHNEIDER et al., 1982; KENNEDY und BURCHELL, 1983). Die Immobilisierung des Antikörpers kann hierbei auf verschiedene Weisen erfolgen. Wird Cyanbromid-aktivierte Sepharose zur Kopplung des Antikörpers eingesetzt (MARCH et al., 1974), findet eine ungerichtete kovalente Bindung des Antikörpers an das Trägermedium statt. Demgegenüber haben die Immunglobulin-bindenden Moleküle Protein A aus Staphylokokken und Protein G aus Streptokokken den Vorteil, daß sie den Antikörper an seinem Fc-Teil binden und die Fab-Domäne ohne sterische Hinderung ihr Antigen binden kann (ELIASSON et al., 1989). Je nach Immunglobulin sind die Affinitäten zu Protein A bzw. G unterschiedlich. Nach AKERSTRÖM et al., (1985) besitzt ein IgG₁ der Maus eine höhere Affinität zu Protein G als

zu Protein A. Das gereinigte Protein kann anschließend einer Aminosäuresequenzanalyse zugeführt werden (EDMAN, 1950; LOTTSPREICH et al., 1994).

Ist das zu reinigende Protein ein integrales Membranprotein, besitzt dieses an der Stelle der membranspannenden Domänen hydrophobe Aminosäuren. Wird das Protein aus der umgebenden Membran herausgelöst, müssen andere Moleküle dessen Stabilisierung übernehmen (THOMAS und McNAMEE, 1990). Detergenzien sind hierbei durch ihre amphiphilen Eigenschaften in der Lage, als Lösungsvermittler zu fungieren und hydrophobe Proteine in einem polaren Milieu in Lösung zu bringen. Somit werden weitere Reinigungsschritte ermöglicht (NEUGEBAUER, 1990; BLAICHER, 1993). Da die Lipid- und Proteinzusammensetzung nativer Membranen sehr unterschiedlich sein kann, gibt es kein für alle Membranen gleich gut geeignetes Detergenz. Das geeignete Detergenz muß für das betreffende Membranprotein individuell herausgefunden werden (HELENIUS et al., 1979).

Die Charakterisierung eines Detergenzes erfolgt anhand seiner kritischen Mizellkonzentration (cmc), seiner Aggregationszahl und des Molekulargewichtes der gebildeten Mizelle. Hierbei ist die kritische Mizellkonzentration diejenige Detergenzkonzentration, bei der die monomeren Detergenzmoleküle sich zu Mizellen anordnen. Die Aggregationszahl sagt aus, wieviele Monomere zur Bildung einer Mizelle notwendig sind (HELENIUS und SIMONS, 1975). Detergenzien können grob in ionische und nichtionische eingeteilt werden. Die ionischen sind entweder anionisch (wie z.B. SDS oder die Gallensalze Cholat und Desoxycholat), kationisch oder zwitterionisch (wie z.B. CHAPS). Beispiele für nichtionischen Detergenzien sind Oktylglykosid oder die Polyoxyethylenderivate (Triton X-100^R oder Detergenzien der Tween Serie) (THOMAS und McNAMEE, 1990). Die Wahl eines Detergenzes ist einerseits abhängig von den zum Einsatz kommenden Methoden zur Reinigung, andererseits auch davon, ob das Detergenz am Ende wieder entfernt werden soll oder nicht. Für ein späteres Entfernen eines Detergenzes sind sowohl eine hohe kritische Mizellkonzentration als auch ein geringes Mizellmolekulargewicht wichtig (HJELMELAND und CHRAMBACH, 1984). Ionische Detergenzien haben generell eine hohe kritische Mizellkonzentration und sind damit leicht zu entfernen. Cholat, Desoxycholat und CHAPS formen sehr kleine Mizellen (4-6 kDa), die dialysierbar sind. Demgegenüber ist das Molekulargewicht der Triton X-100 Mizelle mit 90 kDa ungleich höher (HJELMELAND und CHRAMBACH, 1984). Nichtionische Detergenzien wie Triton X-100 eignen sich besonders, wenn die biologische Aktivität des zu reinigenden Proteins wichtig ist. Diese sind vergleichsweise milde Detergenzien und interferieren außerdem nicht mit späteren Separierungsmethoden, die auf der Ladung von Proteinen basieren, wie z.B. der Ionenaustauschchromatographie (RENSWOUDE und KEMPF, 1984). Bei der Auswahl eines Detergenzes sollte auch die Temperatur, der pH Wert und die Ionenstärke bei Versuchsbedingungen berücksichtigt werden. So sind z.B. Ca²⁺- und Mg²⁺-Salze der Cholsäure unlöslich (NEUGEBAUER, 1990). Außerdem bilden Dihydroxygallensalze bei

neutralem pH ein Gel (HELENIUS et al., 1979), bei niedrigeren pH Werten bilden sich große, präzipitierende Aggregate (RENSWOUDE und KEMPF, 1984).

Die Etablierung molekularbiologischer Techniken brachte neue Möglichkeiten für die Identifizierung eines Proteins mit sich. Die Aminosäuresequenz eines Proteins kann nun mittels Klonierungs- und Sequenzierungsmethoden ermittelt werden. Heutzutage ist es möglich, fast jede gewünschte cDNA und damit fast jedes gewünschte Protein zu klonieren (WATSON et al., 1993).

Der erste Schritt auf dem Weg zur Klonierung eines Proteins, von dem keine Nukleotidsequenzen bekannt sind, ist die Erstellung einer Expressionsbibliothek (WATSON et al., 1993). In dieser sollen sämtliche Proteine des gewünschten Gewebes kodiert sein und zur Expression gebracht werden können. Die Generierung einer solchen Expressionsbibliothek erfolgt nach Standardmethoden (SAMBROOK et al., 1989). Hierzu wird die gesamte mRNA des gewünschten Gewebes isoliert, die komplementäre cDNA synthetisiert, in geeignete Plasmide oder Phagen kloniert und anschließend in *E. coli* Bakterien zur Expression gebracht. Steht ein Antikörper gegen das gesuchte Protein zur Verfügung kann mit dessen Hilfe sein Antigen detektiert werden (YOUNG und DAVIS, 1983) und der entsprechende Klon nach Subklonierung in einen Vektor (SAMBROOK et al., 1989) sequenziert werden (SANGER et al., 1977). Vielfache Anwendungen dieser Methode sind bereits in der Literatur beschrieben (VEYHL et al., 1993; OHSAKO et al., 1994). Steht kein Antikörper zur Verfügung, kann die isolierte komplementäre RNA auch in anderen Systemen, z.B. in *Xenopus laevis* Oozyten, zur Expression gebracht werden (BERTRAN et al., 1992) und anhand bekannter funktioneller Charakteristika identifiziert werden. Somit kann ebenfalls der entsprechende Klon einer Sequenzierung zugeführt werden. Praktische Anwendungen sind auch hier beschrieben (BOLL et al., 1996).

Ist bereits eine Nukleinsäuresequenz des gesuchten Proteins bekannt, kann eine Klonierung mittels Nukleinsäurehybridisierung durchgeführt werden (WATSON et al., 1993).

Aus der Vielzahl der genannten, sehr unterschiedlichen Methoden muß eine Reinigungsstrategie für das jeweils gesuchte, individuelle Protein erstellt werden. Dabei ist nicht nur entscheidend, welche Eigenschaften des gesuchten Proteins bislang bekannt sind und welche Hilfsmittel wie z.B. Antikörper zur Verfügung stehen. Die Auswahl richtet sich ebenso nach der Etabliertheit der Methoden im jeweiligen Labor.

2 Ziel dieser Arbeit

Das von BIRK und Mitarbeitern (1993) beschriebene Glykoprotein gp400 konnte bisher in keinem anderen Gewebe als der Niere nachgewiesen werden. Antigene des proximalen Tubulus, die weder in intestinalen Zellen vorkommen wie Villin (BRETSCHER et al., 1981) noch in anderen Geweben präsent sind, wurden bisher nicht beschrieben. Das einzige nierenspezifische Protein, das bislang bekannt ist, ist das sog. Tamm-Horsfall-Protein, das im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife synthetisiert wird (RONCO et al., 1987).

Weitere Eigenschaften von gp400, wie dessen Vorkommen im Urin sowohl von gesunden als auch von nierengeschädigten Personen (BIRK et al., 1991), und der Nachweis des Proteins in Nephroblastomen (ALTMANNBERGER et al., 1988) und in höherdifferenzierten klar- und chromophilzelligen Nierenzellkarzinomen proximaltubulären Ursprungs (BIRK et al., unveröffentlichte Ergebnisse) wurden bisher beschrieben. Eine Eignung von gp400 als Marker für die nichtinvasive Urindiagnostik und für Diagnose und Therapie von Nierenzellkarzinomen wäre wünschenswert und erscheint aufgrund bisheriger Ergebnisse möglich. Untersuchungen hierzu werden momentan in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. H.-W. BIRK an der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das nierenspezifische Glykoprotein gp400 durch Immunaффinitätschromatographie mit Hilfe der vorliegenden monoklonalen Antikörper zu reinigen. Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei gp400 um ein integrales Membranprotein handelt (BIRK et al., 1991), sollte ein geeignetes Detergenz gefunden werden, mit dem das Protein bestmöglich solubilisiert werden kann. Hierbei war zu beachten, daß eine zu hohe Detergenzkonzentration aufgrund der Auflösung der Membranstruktur eine Denaturierung der Epitope nach sich ziehen kann, während eine zu geringe Konzentration an Detergenz keine vollständige Solubilisierung erzielt. Um eine im Bezug auf das gp400 angereicherte Fraktion für die Immunaффinitätschromatographie einsetzen zu können, sollten initial verschiedene biochemische und immunologische Methoden hinsichtlich ihrer Eignung für diesen Ansatz getestet werden. Idealerweise sollte das Protein schließlich in reiner Form vorliegen, um es weitergehenden Untersuchungen wie der Aminosäuresequenzanalyse zuführen zu können.

3 Material

3.1 Allgemeine Materialien

Beriglobin^R, N-Protein-Standard SY: *Behringwerke AG*, Marburg.

2-Mercaptoethanol, Natriumdodecylsulfat (SDS), Tetramethylethylenediamin (TEMED): *Bio-Rad Laboratories GmbH*, München.

Endoproteinase Lys-C, sequencing grade: *Boehringer Mannheim*, Mannheim.

1-Amino-Adamantan-Hydrochlorid, 9-Fluorenylmethylchloroformat (Fmoc): *Fluka*

2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES), Neugeborenen-Kälberserum (NKS): *Gibco BRL Life Technologies*, Eggenstein.

Ethanol absolut, Methanol: *Mallinckrodt Baker B.V.*, Deventer, Holland.

Amidoschwarz 10 B, 1-Butanol, Chloroform, Essigsäure 96 %, Essigsäure 96 % suprapur, Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz, Dihydrat (Na₂-EDTA, Titriplex^R III), Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, D(+)-Glucose, Glutardialdehydlösung 25 %, Glycerin 87 %, Harnstoff, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat, Magnesiumsulfat-7-hydrat, D(-)-Mannit, Natriumacetat, Natriumacetat wasserfrei suprapur, Natriumazid, Natriumcarbonat, Natriumdisulfit, di-Natriumhydrogenphosphat, Natriumthiosulfat-Pentahydrat, Natriumvanadat, Natronlauge 1 M, Natronlauge-Plättchen, *ortho*-Phosphorsäure 85%, Saccharose, Salzsäure rauchend 37 %, Salzsäure 30 % suprapur, Silbernitrat, Trichloressigsäure, Triethanolamin, Zinkchlorid2: *Merck*, Darmstadt.

Con A-Sepharose, Percoll, Protein A, lyophilized: *Pharmacia Biotech*, Uppsala, Schweden.

Acetonitril HPLC-gradient grade, 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (rotiphorese Gel 30), Glycerin, Isopropanol HPLC-grade, Natriumchlorid (NaCl), Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (TRIS): *Carl Roth GmbH & Co*, Karlsruhe.

Coomassie-Brilliant-Blue R-250 (CBB R-250), Natrium-Tartrat, Servalyt 3-10 (A42940): *Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG*, Heidelberg.

Albumin, bovine, Fraction V (BSA), Ammoniumperoxidsulfat (APS), Angiotensin, Bromphenolblau, Chloramin-T, Cholic acid sodium salt (Cholat), Diethylamine-HCl, Formaldehyd 37 %, Insulin, bovine, Kaliumjodid (KJ), Polyoxyethylene-sorbitanmonolaurate (Tween-20), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF): *Sigma Chemie GmbH*, Deisenhofen.

Sofern nicht anders angegeben besitzen die verwendeten Substanzen höchsten Reinheitsgrad (p.a.). Für die HPLC wurden Reagenzien der Qualität suprapur, HPLC-grade oder HPLC-gradient grade eingesetzt.

3.2 Antiseren und monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper N4A4 und L4D6		eigene Herstellung
Kaninchen-anti-Maus Immunglobuline	2,9 g/l	<i>Dako Diagnostika GmbH</i> , Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen Ig-Fraktion	19 g/l	<i>Sigma Chemie GmbH</i> , Deisenhofen
Kaninchen-anti-Ziege IgG-Fraktion	7,1 g/l	<i>Dako Diagnostika GmbH</i> , Hamburg

3.3 Radiochemikalien

74 MBq Na[¹²⁵ J]/20 µl	<i>Amersham Buchler</i> , Braunschweig
------------------------------------	--

3.4 Nierengewebe

Die zur Präparation der Endosomenfraktion eingesetzte Schweineniere wurde direkt am örtlichen Schlachthof abgeholt.

3.5 Zusammensetzung der Puffer

<u>Präparationspuffer-1</u>	300 mM Mannit 12 mM HEPES 0,5 mM PMSF pH 7,4 mit TRIS-HCl, 1 M
-----------------------------	---

<u>Präparationspuffer-2</u>	300 mM Mannit 100 mM KCl 5 mM MgSO ₄ 5 mM HEPES 0,5 mM PMSF pH 7,0 mit TRIS-HCl, 1M
-----------------------------	---

<u>PBS</u>	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄
------------	--

	1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
<u>PBS-A</u>	PBS, zusätzlich 0,02 % (w/v) NaN ₃
<u>TBS</u>	150 mM NaCl 10 mM TRIS-HCl pH 7,4
<u>Probenpuffer, 2 fach konzentriert</u>	0,125 M TRIS-HCl, pH 6,8 4 % (w/v) SDS 0,286 M 2-Mercaptoethanol 20 % (w/v) Glycerin Bromphenolblau, 1 % (w/v) in a.d., ad libitum
<u>Probenpuffer, 4 fach konzentriert</u>	0,25 M TRIS-HCl, pH 6,8 8 % (w/v) SDS 0,572 M 2-Mercaptoethanol 40 % (w/v) Glycerin Bromphenolblau, 1 % (w/v) in a.d., ad libitum

3.6 Eichproteine für die Elektrophorese

<u>Myosin</u>	205 kDa	<i>Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
<u>β-Galactosidase</u>	116 kDa	<i>Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
<u>Phosphorylase b</u>	97 kDa	<i>Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
<u>Rinderserumalbumin</u>	66 kDa	<i>Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
<u>Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase</u>	36 kDa	<i>Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
<u>Trypsinogen</u>	24 kDa	<i>Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen</i>

Prestained-Marker, broad range, *Bio-Rad Laboratories*, München, wurde verwendet, um den Elektrophoreseverlauf zu verfolgen und um nach Western-Blotting visuell die Qualität des Proteintransfers auf die Nitrocellulose beurteilen zu können.

3.7 Geräte

Affinitätschromatographie

Dialysierschläuche VISKING Typ 27/32, Ausschlußgrenze 10-20 kDa, *Carl Roth GmbH & Co*, Karlsruhe

Vakuumfiltersysteme 8360, 0,2 µm Porengröße: *Corning Costar GmbH*, Bodenheim

LKB Uvicord II Control Unit 8300: *LKB*, Stockholm, Schweden

LKB Uvicord Ultraviolet Absorptiometer Detector unit Typ 8303A: *LKB*, Stockholm, Schweden

Peristaltic Pump P-1: *Pharmacia Biotech*, Uppsala, Schweden

Endosomen-Präparation

Kühlzentrifuge SORVALL Dupont RC5C: *Dupont de Nemours*, Bad Homburg

pH-Meter PHM 93: *Radiometer Copenhagen*, Lyon, Frankreich

Rotoren: SLA-1500, SS-34: *Dupont de Nemours*, Bad Homburg

Teflon-Glas-Homogenisator: *IKA Werke Janke und Kunkel GmbH & Co. KG*, Staufen

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Gelelektrophoresekammern GE-2/4 LS, vertikal: *Pharmacia Biotech*, Uppsala, Schweden

Gelgießständer GSC-2: *Pharmacia Biotech*, Uppsala, Schweden

Power Supply LKB 2103: *LKB*, Stockholm, Schweden

Taumler Reax 3, *Heidolph Elektro GmbH & Co KG*, Kelheim

Umlaufkühlung Colora-Spezial-Kühlgerät: *Colora*, Lorch

Aqua inieciabilia, steril und pyrogenfrei: *Pharmacia Biotech*, Uppsala, Schweden

Proteinbestimmung

Photometer eppendorf 1101 M: *Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH*, Hamburg

Schüttelwasserbad GFL 1083, *Gesellschaft für Labortechnik mbH*, Burgwedel

Tischzentrifuge Eba 12, *Heraeus Instruments GmbH*, Osterode

Aminosäurenanalyse

Hydrolysengefäße: *Beckman Instruments GmbH*, München

HPLC-Anlage: *Hitachi - Merck*, Tokyo, Japan

Säule: Supersphere 60 RP8

Software: D-7000 HPLC System Manager

Pumpe L-6200 A

Fluoreszenz Detektor F-1050

Autosampler AS-4000

Radioimmunoassay

Bio Dot-Apparatus 170-6545, *Bio-Rad Laboratories*, München

β-Counter Matrix™ 96 mit Software 'Riasmart': *Packard Instruments B.V.*, Frankfurt / M.

γ -Counter Minaxi γ -5530: *Packard Instruments B.V.*, Frankfurt / M.
Nitrocellulose, 0,45 μ m Porengröße: *Bio-Rad Laboratories*, München

Solubilisierung

Ultrazentrifuge L2-65 B Typ G, *Beckman Instruments GmbH*, München
Rotor SW 60 Ti, Seriennummer 93E1460, *Beckman Instruments GmbH*, München

Präparative Isoelektrische Fokussierung

Umlaufkühlung
Gradientenmischer (Pumpe)
Svensson-Rohr

Immunadsorption

Immunopure^R Protein G IgG Orientation Kit Nr. 44896, *Pierce*, Rockford, USA
CentriplusTM Concentrators, MW Cut-off 100 kDa, *Amicon GmbH*, Witten

Western-Blotting

Röntgenfilm X-OMAT DS, 24 x 30 cm, *Eastman KODAK Company*, New York, USA
Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell with Plate Electrodes: *Bio-Rad Laboratories*, München

Proteinverdau

Speed Vac Concentrator: *Savant Instruments*, Hicksville, New York, USA

Auftrennung der Peptidfragmente

Integriertes Trennsystem 130 A: *Applied Biosystems*, Weiterstadt
Chromatopac-Integrator C-R5A: *Shimadzu*, Kyoto, Japan
Säule: Vydac 300 Å-Microbore-Säule: *Hesperia*, Kalifornien, USA

MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Massenspektrometer Vision 2000 mit pulsierendem Stickstofflaser, Wellenlänge 337 nm:
Finnegan MAT / Thermo Bioanalysis Limited, United Kingdom

Sequenzierung

Sequencer Modell 471A bzw. 477A mit „on-line“ HPLC-Analysator Modell 140B bzw. 120A:
Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
AS-Analyse, Modell LC 6001: *Biotronik*

4 Methoden

4.1 Präparation der Endosomenfraktion des Nierencortex

Die Präparation endozytischer Vesikel aus dem Cortex von Schweinenieren erfolgte mittels einer Kombination aus Differential- und Dichtegradientenzentrifugation, modifiziert nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990). Alle Präparationsschritte nach Organentnahme wurden bei 4 °C durchgeführt. Eine Übersicht der Präparationstechnik ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

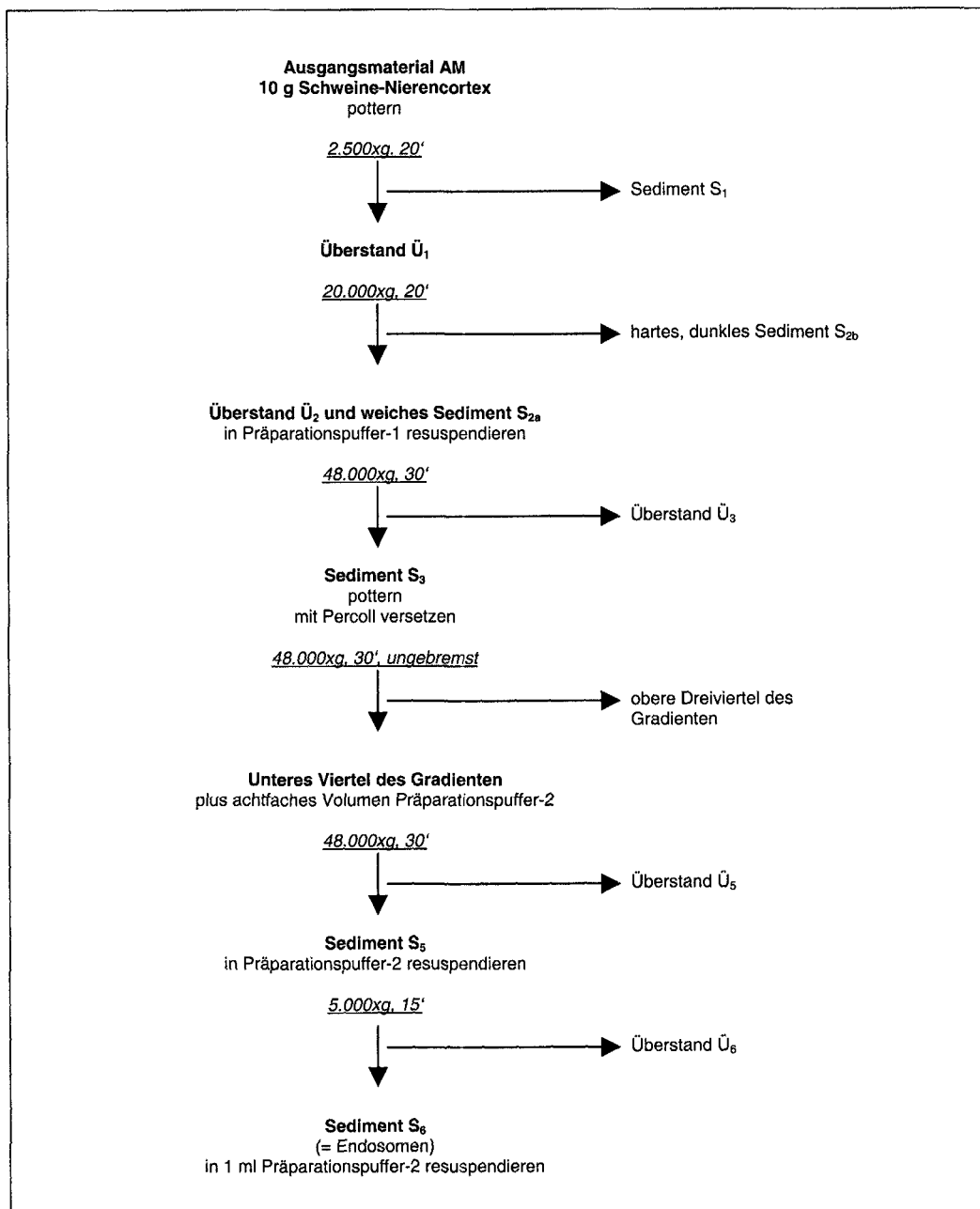


Abb. 4.1 Endosomenpräparation aus dem Cortex von Schweinenieren

Die Schweinenieren wurden im örtlichen Schlachthof den frischgeschlachteten Tieren entnommen und in eiskalter 0,9 %iger (w/v) NaCl-Lösung in das Labor transportiert. 10 g Nierencortex wurden in 40 ml frisch angesetztem, eiskaltem Präparationspuffer-1 mit einer Schere grob zerkleinert und durch 12 Hübe in einem motorgetriebenem Teflon-Glas-Homogenisator bei 1200 rpm homogenisiert. Das Homogenat wurde mit weiteren 40 ml Präparationspuffer-1 versetzt und bei 2.500 x g für 20 Minuten abzentrifugiert. Das Sediment S_1 wurde verworfen und der Überstand \ddot{U}_1 erneut für 20 Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Großteil dieses Überstandes \ddot{U}_2 wurde abgenommen und der Rest dazu verwendet, das weiche Sediment zu resuspendieren. Hierbei blieb ein hartes, braunes Sediment zurück. Der gesamte Überstand \ddot{U}_2 wurde einer erneuten Zentrifugation bei 48.000 x g für 30 Minuten unterzogen. Das hieraus resultierende Sediment S_3 sollte auf einem Percoll-Dichtegradienten weiter aufgetrennt werden. Hierzu wurde dieses in 20 ml Präparationspuffer-1 aufgenommen und durch 30 Hübe in einem Teflon-Glas-Homogenisator bei 1.200 rpm homogenisiert. Zum Homogenat wurden 16 % (w/w) unverdünntes Percoll hinzugegeben, das Ganze gut gemischt und erneut bei 48.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Um den sich bildenden Gradienten nicht zu vermischen, wurde die Zentrifuge diesmal im Auslaufen nicht gebremst. Die obersten Dreiviertel des Gradienten wurden verworfen, und das untere Viertel, in dem sich der Großteil der endozytotischen Vesikel befand, wurde mit dem achtfachen Volumen des Präparationspuffers-2 versetzt, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Der darauf folgende Zentrifugationsschritt bei 48.000 x g über 30 Minuten diente dazu, das Percoll-Material abzutrennen: Dieses setzte sich als hartes, glasiges Sediment ab. Der Überstand \ddot{U}_5 wurde verworfen und das weiche Membransediment S_5 vom harten Percollsediment abgenommen und in 20 ml Präparationspuffer-2 resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation bei 5.000 x g für 15 Minuten wurde der Überstand \ddot{U}_6 verworfen und die endosomale Fraktion im Sediment S_6 zurückbehalten. Das Sediment S_6 wurde in 1 ml Präparationspuffer-2 aufgenommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Der durchschnittliche Proteingehalt dieser Fraktion lag bei ca. 20 mg/ml.

4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach LOWRY et al. (1951)

Die zu bestimmenden Proben wurden mit aqua bidest. so verdünnt, daß sie mit ihrer geschätzten Proteinkonzentration unter 1 mg/ml lagen. Als Standard wurde BSA in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet, als Leerwert diente aqua bidest. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung vorgenommen.

Je 50 μ l der zu untersuchenden Probe, des Standards und des Leerwerts wurden mit 1 ml 10 %iger (w/v) TCA 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 12.000 x g in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand dekantiert und das gefällte Protein in 100 μ l einer Lösung aus 0,9 % (w/v) SDS in 1 N NaOH bei leichtem Schütteln für 10 Minuten bei 37 °C alkalisiert. Anschließend wurde 1 ml einer Lösung aus 0,04 % (w/v) Na^+ -Tartrat und 0,02 % (w/v) CuSO_4 in 2 % (w/v) Na_2CO_3 hinzugefügt. Nach zehnmütiger Inkubation bei

Raumtemperatur erfolgte die Entwicklung nach Zusatz von 100 µl Folin-Reagenz (Folin-Ciocalteus Phenolreagenz 1:2 verdünnt in aqua dest.) bei 37 °C für 30 Minuten. Die Extinktionsmessung erfolgte im Eppendorf-Photometer bei 578 nm in Küvetten der Schichtdicke 1 cm. Die Proteinkonzentrationen (Pk) wurden nach folgender Formel berechnet:

$$Pk_{\text{Probe}} [\text{mg/ml}] = Pk_{\text{Standard}} [\text{mg/ml}] \times \frac{E_{\text{Probe}} - E_{\text{Leerwert}}}{E_{\text{Standard}} - E_{\text{Leerwert}}}$$

4.3 Aminosäurenanalyse

Die Aminosäurezusammensetzung eines Proteins bzw. der Aminosäuregehalt einer Proteinlösung kann durch Aminosäurenanalyse ermittelt werden. Hierbei wird das Protein zuerst einer vollständigen sauren Hydrolyse unterworfen. Die freigesetzten Aminosäuren werden nach geeigneter Derivatisierung durch RP-HPLC aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgt durch einen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Derivate mit einem Standard bekannter Aminosäurenkonzentrationen (KELLNER et al., 1994).

Zur Säurehydrolyse wurde 6 N Salzsäure, suprapur, eingesetzt, die mit 0,02 % 2-Mercaptoethanol als Antioxidanz versetzt wurde (NG et al., 1987). 1 ml dieser Lösung wurde auf den Boden der Hydrolysegefäße pipettiert. Die zuvor getrockneten Proben wurden im Teflonständer in den Reaktionsraum gebracht. Die Hydrolyse erfolgte unter Vakuum in der Gasphase bei 110 °C für 24 Stunden (MOORE und STEIN, 1963). Die Proben wurden danach entnommen und in 20 µl 0,5 M Boratpuffer, pH 7,7, aufgenommen. Die Vor-Säulen-Derivatisierung der Aminosäuren erfolgte mit 20 µl einer 2,5 mM Lösung aus 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC) in Aceton (EINARSSON et al., 1987). Nach zehn Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl einer 12 mM Adamantanlösung in aqua bidest. abgestoppt. Die daraus resultierenden 42 µl wurden mit aqua bidest. auf 210 µl verdünnt, wobei 21 µl hiervon, also 10 %, in die HPLC-Anlage injiziert wurden. Der Gradient wurde wie folgt gefahren:

- A: 50 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 4,8, 18 % Acetonitril, 3 % Isopropanol
- B: 100 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 4,8, 60 % Acetonitril

2 Minuten: 100 % A
 30 Minuten: bis 100 % B
 3 Minuten: 100 % B

Die Extinktion der derivatisierten Aminosäuren wurde bei 263 nm gemessen. Der zur Quantifizierung herangezogene Standard (SIGMA AA-S-18) enthielt jede Aminosäure in einer Konzentration von 2 pMol.

4.4 Festphasen-Radioimmunoassay

4.4.1 Jodierung des Antikörpers

Die Jodierung von Antikörpern mit ^{125}J erfolgte nach der Chloramin-T-Methode, modifiziert nach GREENWOOD und Mitarbeitern (1963). Unmittelbar vor Gebrauch wurden folgende Lösungen frisch angesetzt:

Chloramin-T-Lösung	4 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung	4 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5
KJ-Lösung	34 mg/ml in aqua bidest.

Für die Jodierungsreaktion wurden jeweils 20 μl der IgG-Antikörperfraktion aus einem Kaninchen-anti-Ziege-Antiserum eingesetzt, dessen Konzentration zuvor auf 2 mg/ml in aqua bidest. eingestellt wurde. Dieses Antiserum wurde mit 50 μl 0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, vermischt und anschließend 74 MBq $\text{Na}[^{125}\text{J}]$ (20 μl) zugegeben. Durch die Zugabe von 10 μl Chloramin-T-Lösung als oxidierendes Agens wurde die Jodierungsreaktion gestartet und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung abgestoppt: Natriumdisulfit verhindert einen weiteren Einbau von ^{125}J -Atomen in das Protein, indem es verbleibendes ^{125}J zu Jodid reduziert. Nach Zugabe von 50 μl KJ-Lösung wurde das jodierte Protein vom verbleibenden freien Jod mittels Gelfiltration abgetrennt. Als Säulenmaterial wurden 7 ml Sephadex G-25 f in 1 % (w/v) BSA in PBS-A verwendet. Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf die Säule aufgegeben und die Säule mit 5 ml 1 % BSA (w/v) in PBS-A gespült. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 0,5 ml aufgefangen und im γ -Counter die aktive Fraktion bestimmt. Diese jodierte Immunglobulinfraktion wurde bei 4 °C maximal drei Wochen gelagert und im Radioimmunoassay als letztes Glied der Antikörperkaskade eingesetzt.

In der Autoradiographie zum Nachweis geblotteter Proteine (3.7.1) wurde jodiertes Protein A verwendet. Die Jodierung erfolgte wie beschrieben, es wurden ebenfalls 40 μg Protein eingesetzt.

4.4.2 Durchführung des Radioimmunoassays

Die Durchführung des Radioimmunoassays erfolgte modifiziert nach BIRK und Mitarbeitern (1991). Die zu untersuchenden Proben werden mittels eines Mikrofiltrationsapparates

(BioDot-Apparat), der den simultanen Auftrag von 96 Proben auf ein definiertes, 7 mm² großes Membranareal (ein Dot) erlaubt, auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Als Eichkurvenmaterial wurde Schweinenierencortex-Homogenat in einer Verdünnungsreihe von 2 bis 0,03125 µg/Dot aufgetragen. Probe und Eichkurve wurden vor dem Auftragen mit SDS in PBS-A auf eine Endkonzentration von 0,0025 % (w/v) SDS gebracht. Als Leerwert diente PBS-A. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt, das Auftragsvolumen betrug 250 µl. In der Regel wurde 1 µg Protein pro Dot aufgetragen.

Nach schwerkraftbedingtem Einziehen der Proben wurden die auf der Nitrocellulose gebundenen Proteine zweimal mit 300 µl PBS-A unter Anlegen eines Vakuums gewaschen. Danach wurde die Nitrocellulosemembran aus der Apparatur entfernt und zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen eine Stunde in Blockpuffer (10 % (v/v) NKS, 0,5 % (v/v) Tween-20 in PBS-A) bei 37 °C inkubiert.

Die membrangebundenen Antigene wurden nun mit den laboreigenen monoklonalen Antikörpern N4A4 bzw. L4D6 inkubiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden diese Klonüberstände zuvor in einem Festphasen-Radioimmunoassay mit einer Eichkurve subklassenidentischer Myelomzell-Immunglobuline verglichen. Die monoklonalen Antikörper wurden in Blockpuffer in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Dieser Blockpuffer enthielt nur 0,05 % (v/v) Tween-20 und wurde in allen weiteren Schritten eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 30 Minuten bei 37 °C und anschließend 16 Stunden bei 4 °C. Parallelansätze wurden zur Bestimmung der unspezifischen Bindung mit dem Kontrollantikörper Myeloma IgG₁ in gleicher Konzentration inkubiert.

Nach jeder Antikörper- bzw. Antiseruminkubation wurde die Nitrocellulose zweimal für fünf Minuten mit Waschpuffer (0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS-A) gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden danach mit Blockpuffer über fünf Minuten abgesättigt.

Die Detektion gebundener Immunglobuline erfolgte durch sequentielle Inkubation (jeweils eine Stunde bei 37 °C) mit verschiedenen speziesspezifischen Antiseren. Die verwendeten Antiseren wurden zuvor 10 Minuten bei 12.000 x g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand im Radioimmunoassay eingesetzt:

- anti-Maus-IgG-Antiserum vom Kaninchen, 1:5000 in Blockpuffer
- anti-Kaninchen-Ig-Antiserum von der Ziege, 1:1000 in Blockpuffer
- [¹²⁵J]- anti-Ziege-IgG-Antiserum vom Kaninchen, 0,5 x 10⁶ cpm/ml in Blockpuffer

Abschließend wurde die Nitrocellulose dreimal für fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen und danach getrocknet.

4.4.3 Auswertung

Die Quantifizierung der pro Dot membrangebundenen Radioaktivität erfolgte im MATRIX 96 β -Counter. Dieses Gerät erlaubt die simultane Messung von 96 Proben, wobei die räumliche Anordnung der Zählrohre dem Aufbau des BioDot-Apparates entsprechen. Die gewonnenen Meßdaten wurden unmittelbar in das Software-Programm RIASMART übernommen und folgendermaßen ausgewertet:

Nachdem von jedem Meßwert in cpm der Leerwert abgezogen wurde, erfolgte die Verrechnung der unspezifischen Bindung. Hierzu wurden für jede Probe der Bindungswert des Myeloma-Antikörpers von den Bindungsdaten der spezifisch bindenden monoklonalen Antikörpern subtrahiert.

Die mitgeführte Eichkurve aus Schweinenierencortex-Homogenat wurde mittels eines nicht-linearen Kurven-fitting-Programms (polynomiale Gleichung 'SPLINE', RIASMART-Programm) charakterisiert. Mittels dieser Eichkurvengleichung wurden die zuvor hinsichtlich ihrer unspezifischen Bindung bereinigten Meßdaten in Schweinenierencortex-Homogenat-Einheiten (SHE) umgerechnet. Dabei wurde eine SHE als diejenige Antigenmenge definiert, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat vorhanden ist. Die Enddaten stellen den Mittelwert aus drei Parallelbestimmungen dar.

4.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

4.5.1 Herstellung der Gele

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von LAEMMLI (1970) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte über Flachgele in vertikalen Gelelektrophoresekammern. Die Gele waren jeweils 14 x 18 cm groß und 0,75 mm dick. Wegen des hohen Molekulargewichtes des gesuchten Proteins wurde der besseren Auflösung wegen ein 7,5 %iges Trenngel eingesetzt:

Trenngel (7,5 % T, 2,6 % C)

30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	15,3 ml
0,75 M TRIS-HCl, pH 8,8	31,5 ml
aqua bidest.	14,9 ml
10 % (w/v) SDS	630 μ l
10 % (v/v) TEMED	300 μ l
10 % (w/v) APS	370 μ l

Das Trenngel wurde in der Gelgießkammer GE-2/4 LS (Pharmacia) gegossen und mit einer schwereren Lösung unterschichtet. Die schwere Lösung bestand zu gleichen Teilen aus 0,75

M TRIS-HCl, pH 8,8 und Glycerin und wurde mit einer Lösung aus 1 % (w/v) Bromphenolblau angefärbt. Während der Polymerisationszeit von einer Stunde wurde das Gel mit 200 µl wassergesättigtem 1-Butanol überschichtet.

Bevor das 5 %ige Sammelgel gegossen werden konnte, mußte die Trenngeloberfläche gut mit 0,75 M TRIS-HCl, pH 8,8, 1:2 mit aqua bidest. verdünnt, gespült werden, um jegliche Reste von 1-Butanol zu entfernen.

Sammelgel (5 % T, 2,6 % C)

30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	5 ml
0,25 M TRIS-HCl, pH 6,8	15 ml
aqua bidest.	10 ml
10 % (w/v) SDS	310 µl
10 % (v/v) TEMED	150 µl
10 % (w/v) APS	240 µl

In der Regel wurden 14 Probenauftragsschächte vorbereitet. Lediglich für die Sequenzierung wurde ein Gel hergestellt, bei dem auf der gesamten Gelbreite Probe aufgetragen werden konnte. Nach 30 Minuten Polymerisationszeit wurde das Gel aus der Gießapparatur entfernt und direkt in die Laufkammer, in der sich bereits Puffer befand, eingehängt. Dieser Puffer bestand aus 25 mM TRIS-HCl, 190 mM Glycin sowie 0,1 % (w/v) SDS. Der Probenauftrag erfolgte direkt im Anschluß.

4.5.2 Vorbereitung der Proben

Die Proben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden mit TBS auf ein Endvolumen von 20 µl verdünnt und mit 20 µl 2 fach konzentriertem Probenpuffer versetzt. Proben mit geringerer Proteinkonzentration wurden mit TBS auf ein Endvolumen von 30 µl verdünnt und mit 10 µl 4 fach konzentriertem Probenpuffer versetzt.

Wenn Protein aus einem relativ großen Probenvolumen aufgetrennt werden sollte oder wenn sich noch Detergenzreste in der Probe befanden, wurde das Protein, wie von WESSEL und FLÜGGE (1984) beschrieben, mit unverdünntem Methanol und Chloroform ausgefällt und in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Proteinsedimente wurden in TBS aufgenommen und mit dem gleichem Volumen an 2 fach konzentriertem Probenpuffer versetzt.

Vor Auftrag wurden die Proben für 3 Minuten auf 98 °C erhitzt und 30 Sekunden bei 12.000 x g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. In der Regel wurden 20 µl Probe pro Auftragsschacht eingesetzt.

4.5.3 Elektrophorese-Laufbedingungen

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteingemische erfolgte bei konstanter Stromstärke (40 mA). Die Spannung erhöhte sich während des Laufs auf maximal 250 V. Der Elektrophorese-Laufpuffer wurde während der Elektrophorese mittels Umlaufkühlung auf 12 °C gehalten.

4.6 Gelfärbung

Nach Beendigung des Elektrophoreselaufes wurde das Sammelgel abgetrennt und das verbleibende Trenngel mit aqua bidest von den Glasplatten gelöst. Die Färbung erfolgte in Glasschalen, wobei jeweils soviel Färbelösung zugegeben wurde, daß das Gel frei schwamm (ca. 200 ml je Gel). Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Taumler durchgeführt.

4.6.1 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung

Die Coomassie-Färbemethode wurde eingesetzt, um das für die Sequenzierung aufgetrennte Protein sichtbar zu machen. Hierbei wurde auf eine Fixierung verzichtet, um im Anschluß die Peptide möglichst quantitativ aus dem Gel eluieren zu können.

Färbelösung 0,2 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R-250
 50 % (v/v) Methanol
 in aqua bidest.

Entfärbelösung 25 % (v/v) Methanol
 6 % (v/v) Essigsäure
 in aqua bidest.

Die Färbung erfolgte über 15 Minuten auf einem Taumler. Nachdem das Gel kurz in aqua bidest. gespült wurde, konnte die Entfärbelösung zugegeben werden. Nach weiteren 15 Minuten waren Proteinbanden zu erkennen. Das Gel wurde danach in aqua bidest. überführt.

4.6.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung der Proteine erfolgte in Anlehnung an HEUKESHOVEN und DERNICK (1985). Folgende Stammlösungen, aus denen bei Bedarf die benötigten Verdünnungen hergestellt wurden, wurden im voraus in aqua bidest. angesetzt:

2 % (w/v) Na₂S₂O₃

2,5 M Na-Acetat
 1 % (w/v) AgNO₃
 10 % (w/v) Na₂CO₃
 6 % (w/v) Na₂-EDTA

Die Fixierung der Gele erfolgte für mindestens 30 Minuten in einer Lösung aus 10 % (v/v) Essigsäure und 30 % (v/v) Ethanol in aqua bidest. Um für die nachfolgende Silberfärbung das notwendige neutrale pH-Millieu zu schaffen, wurden die Gele für mindestens 2 Stunden oder auch über Nacht in einer Lösung aus 0,5 M Na-Acetat, 30 % (v/v) Ethanol, 0,125 % Glutaraldehyd und 0,2 % Na₂S₂O₃ in aqua bidest. inkubiert. Danach wurden die Gele dreimal für 5 Minuten in viel aqua bidest. gewaschen und die Färbelösung zugegeben: 0,1 % Silbernitrat und 0,2 % Formaldehyd, 37 % in aqua bidest. Die Färbung erfolgte für 30 bis 40 Minuten, woraufhin die Gele 10 Sekunden mit viel aqua bidest. gewaschen wurden. Die gefärbten Proteinbanden wurden 15 Minuten in 2,5 % Na₂CO₃ und 0,1 % Formaldehyd, 37 %, entwickelt. Um eine Überfärbung zu vermeiden, wurde die Färbereaktion mit 1,5 % Na₂-EDTA abgestoppt. Die gefärbten Gele können in dieser Lösung für mehrere Tage bei 4 °C aufbewahrt werden. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Gele fotografiert und anschließend getrocknet (Geltrockner *Biometra*, Göttingen).

4.7 Western-Blot-Technik: Elektrotransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen

Der Elektrotransfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte nach BURNETTE (1981). Unmittelbar nach Elektrophoreseende wurde von den SDS-Gelelen das Sammelgel entfernt und die verbliebenen Trenngele für 30 Minuten in Blotpuffer inkubiert (25 mM TRIS-HCl, 190 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,075 % (w/v) SDS). Der Proteintransfer erfolgte im Naßblotverfahren in einem vertikalen Puffertank mit Plattenelektroden bei 60 V über 2 Stunden. Das Packen des Blot-Sandwichs erfolgte luftblasenfrei unter Blotpuffer, um einen einwandfreien Transfer der Proteine zu gewährleisten. Ausgehend von der Anode wurde wie folgt gepackt: Schwamm - Filterpapier - SDS-Gel - Nitrocellulosemembran - Filterpapier - Schwamm. Das Blotting fand bei 4 °C statt.

Um den Proteintransfer visuell beurteilen zu können, wurden 'prestained marker' eingesetzt, die ohne Färben direkt auf der Nitrocellulose sichtbar waren. Um sicherzustellen, daß die Proteine nicht durch die Nitrocellulose 'durchgeblottet' wurden, wurde eine zweite Nitrocellulosemembran hinter die erste geschichtet. Auf dieser zweiten Nitrocellulose sollte nach Färbung mit Amidoblack kein Protein sichtbar werden. Die Amidoblackfärbung erfolgte über fünf Minuten in der Färbelösung (0,02 % (w/v) Amidoblack in 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure in aqua bidest.) und weiteren 5 Minuten in der Entfärbelösung (60 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in aqua bidest.).

4.7.1 Autoradiographie

Die Autoradiographie zum Nachweis geblotteter Antigene wurde nach BIRK und KOEPEL (1987) durchgeführt. Zu Beginn wurde die Nitrocellulose für 16 Stunden bei 37°C in PBS-A inkubiert. Unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulose sollten danach mit Blockpuffer (10 % (v/v) NKS, 0,5 % (v/v) Tween-20 in PBS-A) für 2 Stunden bei 37 °C und leichtem Schütteln abgesättigt werden. Die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C und 16 Stunden bei 4 °C. Die Antikörper wurden in PBS-A, dem 10 % (v/v) NKS, 20 % (v/v) Glycerin, 2 M Glucose und 0,5 % (v/v) Tween-20 zugefügt wurden, in einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt. Hierbei sollten Glycerin und Glucose die unspezifischen Antikörperbindungen herabsetzen. Die Nitrocellulose wurde anschließend zweimal mit Waschpuffer (0,5 % (v/v) Tween-20 in PBS-A) für jeweils fünf Minuten gewaschen und fünf Minuten in Blockpuffer abgesättigt. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte mit [¹²⁵J]-Protein A. Es wurden 0,5 x 10⁶ cpm/ml in Blockpuffer eingesetzt, die Inkubation erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die Nitrocellulose getrocknet und bei -80 °C in der Regel über 24 Stunden autoradiographiert.

4.7.2 Chemilumineszenz

Neben der Autoradiographie wurde die Chemilumineszenz-Methode mit dem 'enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection system' der Firma Amersham, Braunschweig, zur Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung angewendet. In den hier verwendeten Puffern durfte kein Natrium-Azid enthalten sein, da dies die Entwicklungsreaktion stören würde. Nach dem Proteintransfer erfolgte die Blockade der unspezifischen Proteinbindungsstellen der Nitrocellulosemembran mit Blockpuffer (10 % (v/v) NKS, 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS-A) über Nacht bei 4 °C. Die Inkubation des ersten Antikörpers (20 µg/ml in Blockpuffer) erfolgte zuerst für zwei Stunden bei 37 °C und mäßigem Schütteln und danach über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Nitrocellulosemembran einmal 20, zweimal 15 und zweimal 5 Minuten mit ausreichend Waschpuffer gewaschen (0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS-A). Als zweiter Antikörper wurden Anti-Maus-IgG (1:1000 in Waschpuffer, 2 Stunden bei Raumtemperatur, Taumler) eingesetzt, die mit einer Peroxidase konjugiert waren. Nach wiederholtem Waschen (einmal 30 Minuten, zweimal 10 und viermal 5 Minuten in Waschpuffer) wurde die Membran nach kurzem Abtrocknen in der Chemilumineszenzlösung für eine Minute inkubiert. Hierbei katalysiert die Peroxidase die Oxidation des Luminols in Anwesenheit von H₂O₂. Unmittelbar nach Oxidation befindet sich das Luminol in angeregtem Zustand, wobei es beim Zurückkehren in seinen Grundzustand Licht emittiert. Zum Nachweis dieser Lichtemission wurde die Membran für 0,5 bis 2 Minuten einem Röntgenfilm exponiert.

4.8 Solubilisierung der Membranproteine

BIRK und Mitarbeiter (1991) postulierten, daß es sich bei dem Polypeptid mit der Masse 400.000 um ein integrales Membranprotein handelt, da dieses erst nach vollständiger Solubilisierung von der Bürstensaummembran getrennt werden konnte. Deshalb sollte ein geeignetes Detergenz gefunden werden, mit dem das Antigen in Lösung gebracht werden kann.

Hierzu wurde circa 1 ml der präparierten Endosomen des Schweinenierencortex (s. Abschnitt 4.1) mit PBS-A, dem 0,5 mM PMSF zugesetzt wurde, auf eine Proteinkonzentration zwischen 2 und 15 mg/ml eingestellt. Dem Endvolumen wurde das gleiche Volumen einer doppelkonzentrierten Detergenz-Lösung in PBS-A, 0,5 mM PMSF, zugesetzt, so daß bei halbiertem Proteinkonzentration Detergenz-Endkonzentrationen zwischen 5 und 0,3 % (w/v) zur Solubilisierung eingesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte eine Stunde auf Eis. Danach wurden die nicht solubilisierten Proteine mit 105.000 x g bei 4°C für eine Stunde abzentrifugiert. Folgende Detergenzien kamen zum Einsatz: Die Gallensäuresalze Desoxycholat und Cholat, deren Abkömmling CHAPS sowie die nichtionischen Detergenzien NP-40 und Triton X-100.

Um zu entscheiden, welches Detergenz bezogen auf das gp400 die besten Solubilisierungseigenschaften aufwies, wurden neben den Überständen auch nichtzentrifugierte, identische Parallelproben im Festphasen-Radioimmunoassay (s. Abschnitt 4.4) hinsichtlich ihrer Menge an solubilisiertem Antigen untersucht. Um einheitliche Detergenzkonzentrationen im Radioimmunoassay einzusetzen, wurden alle Proben mit PBS-A, 0,5mM PMSF, auf eine Detergenzkonzentration von 0,05 % (w/v) eingestellt. Die Proteinkonzentrationen der verdünnten Fraktionen wurden mittels Proteinbestimmung nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) parallel zum Radioimmunoassay ermittelt. Die gemessenen SHEs wurden danach in Abhängigkeit von der jeweils ermittelten Proteinkonzentration korrigiert.

Die Solubilisate wurden für die sich anschließenden proteinchemischen Reinigungsverfahren eingesetzt. Welches Detergenz in welcher Konzentration hierbei zum Einsatz kam, wurde nach Messung der Antikörper-Bindung der Solubilisate im Festphasen-Radioimmunoassay entschieden.

Bei Verwendung von Cholat enthielt das in der Solubilisierung eingesetzte PBS-A mit 200 mM einen höheren NaCl-Anteil als das sonst verwendete PBS-A. Nach TZAGOLOFF und PENEFSKY (1971) sowie HELENIUS und SIMONS (1975) wird die Solubilisierungseffektivität von Salzen der Gallensäuren durch monovalente Salze gesteigert.

4.9 Präparative isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung ist vom Prinzip her eine Elektrophorese in einem pH-Gradienten und bewirkt die Trennung eines Proteingemisches aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte (pI) (NEUMEIER, 1980). Zur Anwendung kam eine präparative Isoelektrische Fokussierung in einem ca. 30 cm langen U-Rohr (Svensson-Rohr), das mit einem Zucker-Dichtegradienten gefüllt wurde. Zur Ausbildung des pH-Gradienten wurden Ampholyte mit pI zwischen 3 und 10 eingesetzt (Servalyt 3-10). Der Zucker-Dichtegradient diente der Stabilisierung des pH-Gradienten sowie der fokussierten Proteinbanden. Das verwendete U-Rohr ist in Abb. 4.2 schematisch dargestellt.

Pro Fokussierung wurden ca. 10 mg Protein einer Endosomenpräparation eingesetzt, das zuvor wie in Abschnitt 4.8 beschrieben solubilisiert wurde. Sowohl die benötigten Puffer als auch alle Geräte wurden auf 4 °C gekühlt, während der Fokussierung hielt eine Umlaufkühlung die Temperatur bei 4 °C. Zum Befüllen wurden zuerst 20 ml Kathodenlösung (s.u.) in die Säule eingebracht. Zur Ausbildung des Dichtegradienten wurden hierauf nacheinander die dichte und die leichte Lösung (s.u.) gepumpt (ca. 80 ml). Um eine Verwirbelung im Gradienten zu vermeiden, wurde darauf geachtet, daß die Lösung nicht eintropft, sondern langsam an der Säulenwand abläuft. Nachdem die Säule zu ca. einem Drittel gefüllt war, erfolgte der Probenauftrag. Hierzu wurden ca. 9 ml Solubilisat vorsichtig auf den Gradienten aufgegeben. Abschließend erfolgte die Überschichtung mit der restlichen leichten Lösung sowie mit 15 ml Anodenlösung (s.u.).

<u>Dichte Lösung</u>	1,5 M Saccharose	<u>Leichte Lösung</u>	0,15 M Saccharose
	2 M Harnstoff		2 M Harnstoff
	3,8 % (v/v) Servalyt 3-10		3,8 % (v/v) Servalyt 3-10
	100 µM Na ₃ VO ₄		100 µM Na ₃ VO ₄
	100 µM ZnCl ₂		100 µM ZnCl ₂
 <u>Kathodenlösung</u>	 1,8 M Saccharose	 <u>Anodenlösung</u>	 2 M Harnstoff
	2 M Harnstoff		87,2 mM H ₃ PO ₄
	0,24 N NaOH		

Der Aufbau des elektrischen Feldes erfolgte bei 2,0 kV, 15 W und einer nach oben unbegrenzten Stromstärke, die Fokussierungsdauer betrug 16 Stunden. Danach wurden ca. 30 Fraktionen à 4 ml am unteren Säulenende über einen Schlauch langsam ausgeleitet und der pH-Wert jeder einzelnen Fraktion bestimmt.

Zur Entfernung der Ampholyte und der Puffersalze wurden sämtliche Fraktionen mind. 24 Stunden gegen 2 x 10 l aqua bidest. bei 4 °C dialysiert.

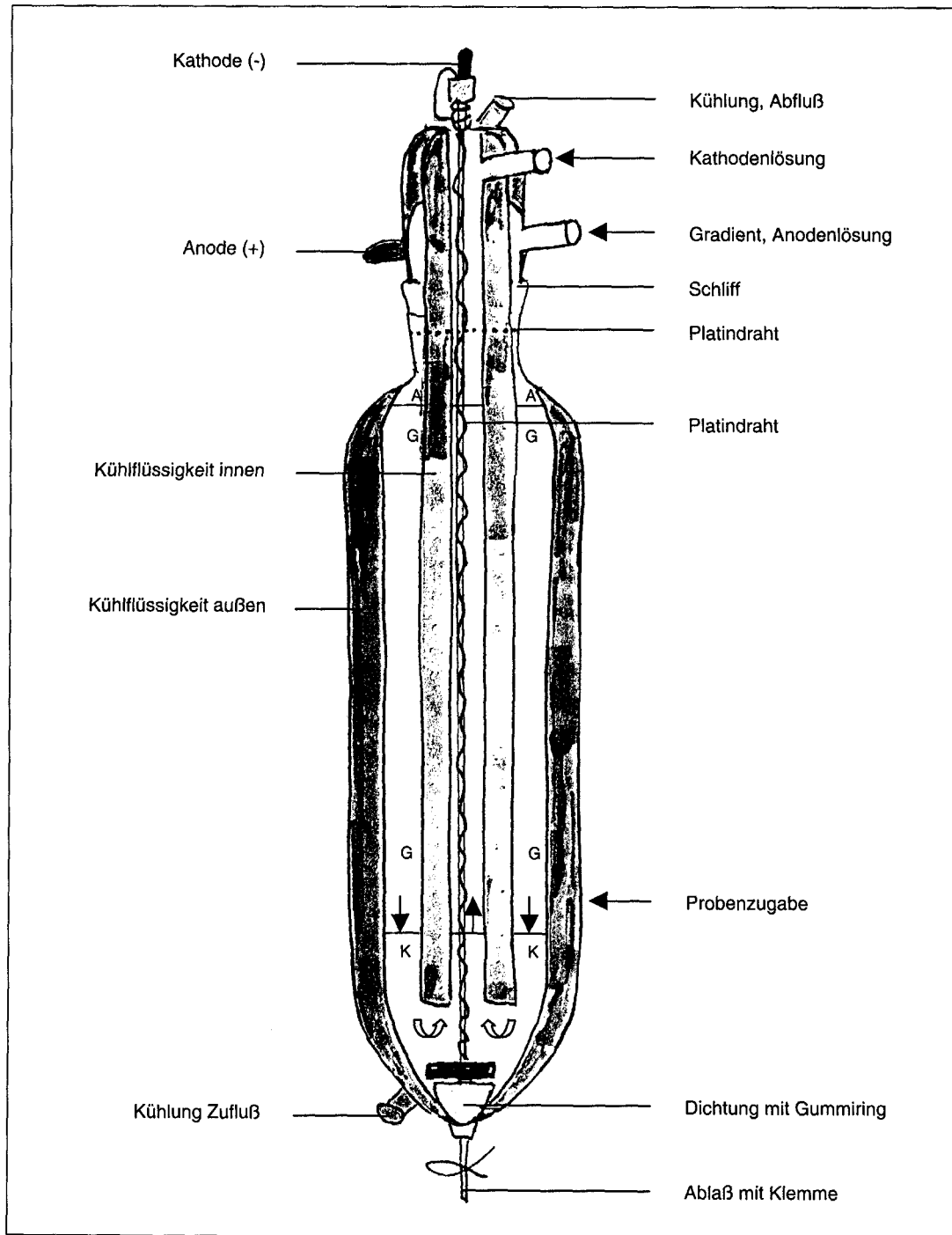


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des für die präparative isoelektrische Fokussierung verwendeten Svensson-Rohres (Abk.: A: Anodenlösung; G: Gradient; K: Kathodenlösung)

4.10 Affinitätschromatographie mit Concanavalin A

Aufgrund der vermuteten Glykokonjugate des gp400 (BERNOTAT-DANIELOWSKI et al., 1986) wurde eine Affinitätschromatographie mit Concanavalin A durchgeführt. Concanavalin

A, ein Protein der Schwertbohne, bindet spezifisch an α -D-Glukose- und α -D-Mannose-Moleküle (SUROLIA et al., 1975).

5 ml des Säulenmaterials (Con-A-Sepharose) wurden mit Laufpuffer (10 mM TRA, 10 % (w/v) Glycerin, 150 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen und anschließend mit Laufpuffer, dem 2% (w/v) Cholat zugesetzt wurden, äquiliibriert. Nach Auftrag des Solubilisates (12 mg Protein, solubilisiert mit 2 % (w/v) Cholat) wurde die Säule mit Laufpuffer plus Detergenz gewaschen, bis der an den Detektor angeschlossene Schreiber eine stabile Nulllinie zeichnete. Hiermit sollte sichergestellt werden, daß alle nichtgebundenen Bestandteile des Solubilisats quantitativ ausgewaschen wurden. Die Elution gebundener Glykokonjugate erfolgte durch einen linearen Gradienten aus α -Methyl-D-Mannosid in TRA/Cholat-Puffer in einer Konzentration von 0,2 – 1 M. Die Eluatfraktionen wurden manuell gesammelt, 16 Stunden gegen 2 x 5 l PBS-A dialysiert und nach Proteinkonzentrationsbestimmung nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) im Festphasen-Radioimmunoassay hinsichtlich ihres Antigengehaltes untersucht.

4.11 Immunaффinitätschromatographie mit monoklonalen Antikörpern

Die Affinitätschromatographie wurde mit dem 'Immunopure^R Protein G IgG Orientation Kit' der Firma Pierce durchgeführt. Da Maus IgG₁ Antikörper eine höhere Affinität für Protein G besitzen (AKERSTRÖM et al., 1985), wurde dies gegenüber Protein A vorgezogen.

4.11.1 Kopplung der Protein G-Säule mit monoklonalen Antikörpern

Bei Mäuse-Immunglobulinen können laut Herstellerangaben 6-8 mg Antikörper pro ml Säulenmaterial für die Kopplungsreaktion eingesetzt werden. Für eine Kopplung an 4 ml Säulenmaterial wurden deshalb ca. 28 mg Antikörper verwendet. Aus Gründen, die später noch erläutert werden, kam neben dem monoklonalen Antikörper N4A4 noch ein weiterer laboreigener monoklonaler Antikörper zum Einsatz: L4D6.

Entsprechende Klonüberstände (28 mg Immunglobuline waren in ca. 200 ml Klonüberstand enthalten) wurden bei 37 °C aufgetaut, über vier Tage gegen PBS-A bei 4 °C dialysiert und anschließend über ein Vakuumfiltersystem mit einer Porengröße von 0,2 μ m filtriert. Jegliche primären Amine wie z.B. TRIS oder Glycin mußten vor der Kopplungsreaktion entfernt werden. Die für die Kopplung verwendeten Puffer und Reagenzien waren im Kit gebrauchsfertig enthalten:

Waschpuffer (50 mM Natriumborat, pH 8,2)

Antikörperbindungspuffer (0,2 M Triethanolamin, pH 8,2)

Blockpuffer (0,1 M Ethanolamin, pH 8,2)

Crosslinking-Reagenz Diemethylpimelimidat (DMP)

Die Protein G-Säule (4 ml) wurde vor und nach dem Auftragen des monoklonalen Antikörpers mit Waschpuffer gespült. Für die kovalente Kopplung des gebundenen Antikörpers wurde DMP in 4 ml Antikörperbindungspuffer gelöst, auf die Säule gegeben und unter ständigem vorsichtigem Über-Kopf-Wenden der Säule eine Stunde inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden nach der Kopplungsreaktion mit Blockpuffer (4 ml, 10 Minuten Über-Kopf-Wenden) abgesättigt. Danach erfolgte ausgiebiges Spülen mit Waschpuffer. Die Säule wurde in PBS-A bei 4°C gelagert und konnte so mehrfach wiederverwendet werden.

4.11.2 Durchführung der Immunaффinitätschromatographie

Die Immunadsorption wurde nach SCHNEIDER und Mitarbeitern (1982) mit Modifikationen nach HUBERT und Mitarbeitern (1986) durchgeführt. Hierzu wurde das nach Abschnitt 4.8 hergestellte Solubilisat 1:10 mit PBS-A und dem an Protein G gekoppelten monoklonalen Antikörper verdünnt, so daß die Cholatkonzentration 0,5 % (w/v) betrug. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Taumler. Danach wurde das gesamte Material in die Säule gegeben und mit PBS-A, dem 0,5 % (w/v) Cholat zugesetzt wurde, gespült. Die Spülung wurde beendet, sobald der angeschlossene Schreiber eine stabile Nulllinie zeigte. Die Elution des gebundenen Antigens erfolgte mit 0,05 M Diethylamin, 0,5 % (w/v) Cholat, pH 11,5. Ca. 10 ml Eluat wurden hierbei manuell gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit PBS-A/Cholat äquibriert und mit PBS-A vor der weiteren Lagerung gespült. Um die bei der Aminosäurenanalyse und der Sequenzierung störenden Puffersalze herauszufiltrieren, wurde die Eluatfraktion mit 2-Mercaptoethanol bis zu einer Endkonzentration von 1 % (v/v) versetzt und über Centriplus™-Konzentratoren mit einem Ausschlußvolumen von 100 kDa bis auf ein Volumen von ca 1 ml eingengt. Das Konzentrat wurde noch zweimal mit 10 ml 1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol in aqua bidest. versetzt und erneut aufkonzentriert. Die aufkonzentrierte Eluatfraktion (ca. 1 ml) wurde bis zur Aminosäurenanalyse bzw. Sequenzierung bei -80 °C gelagert.

4.12 Verdau des Proteins im SDS-Gel und Elution der Peptide aus der Gelmatrix

Der Proteinverdau im SDS-Gel sowie die anschließende Elution der Peptide aus der Gelmatrix erfolgte im proteinanalytischen Labor der Arbeitsgruppe Drs. Linder im Biochemischen Institut am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen. Hierzu wurden die Eluatfraktionen von ca. 100 Immunadsorptionen (ca. 100 ml) gepoolt und über Centriplus™-Konzentratoren auf ein Volumen von 1 ml eingengt. Das darin enthaltene Protein wurde auf drei SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung der SDS-Gele mit Coomassie-Brilliant-Blue wurden die gut sichtbaren Proteinbanden mit einem Skalpell

aus dem Polyacrylamidgel herausgeschnitten und zerkleinert. Die kleinen Gelstückchen wurden in Eppendorf-Cups gesammelt und zur Entfernung von Substanzen, die den Verdau stören könnten, mit aqua bidest. bei 4°C einige Tage gewässert. Um ein möglichst vollständiges Eindringen des Verdaupuffers in die Gelmatrix zu gewährleisten, wurden die gewässerten Gelstückchen vor dem Verdau für ca. vier Stunden in der Vakuum-Zentrifuge (Speed-Vac) getrocknet und anschließend mit 100 µl Acetonitril befeuchtet. Laut Herstellerangaben ist die Enzymaktivität in Gegenwart von schwach denaturierenden Agenzien, insbesondere 10 % Acetonitril, erhöht. Anschließend wurden die Gelstückchen mit 880 µl Verdaupuffer (25 mM TRIS-HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA) und mit 20 µl der in Verdaupuffer gelösten Endoproteinase Lys-C (0,1 µg/µl) versetzt. Die Inkubation erfolgte unter Argonbegasung bei 30 °C. Um einen möglichst vollständigen Verdau sicherzustellen, wurden die Proben nach 16 Stunden mit weiteren 550 µl Verdaupuffer, dem 10 % (v/v) Acetonitril zugesetzt wurden, sowie 25 µl gelöster Proteinase (0,1 µg/µl) versetzt. Die Inkubation erfolgte wiederum in Argonatmosphäre bei 30 °C. Nach 16 Stunden wurde der Überstand abpipettiert, die Gelstückchen mit 200 µl Verdaupuffer nachgewaschen und die gepoolten Fraktionen in der Speed-Vac auf ein Viertel des Ausgangsvolumens eingeeengt. Bis zur weiteren Analyse der Peptidfragmente wurde die Verdau-Fraktion bei -20 °C aufbewahrt.

Als Kontrolle wurden aus einem Polyacrylamidgel, auf das kein Protein aufgetragen wurde, Gelstückchen ausgeschnitten und in identischer Weise mit Verdaupuffer und Endoproteinase Lys-C versetzt und weiterbehandelt.

4.13 Auftrennung der Peptidfragmente

Die beim enzymatischen Verdau entstehenden Peptidfragmente wurden mittels RP-HPLC in einem integrierten Trennsystem, welches mit einem C-R5A-Chromatopac-Integrator ausgestattet war, aufgetrennt (LINDER et al., 1994). Als Säule diente eine Vydac-Säule (C4, Porendurchmesser 300 Å, 2,1 x 250 mm). Es wurde ein linearer Acetonitril-Gradient aufgetragen (0 - 100% B in 45 Minuten, A: 0,108% (v/v) TFA, B: 0,095% (v/v) TFA, 60% (v/v) Acetonitril). Die Flußrate betrug 200 µl/min, die Temperatur 28 °C. Die Laufmittel wurden mit Helium begast und die Proben vor Auftrag drei Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 220 nm, die Fraktionen wurden manuell gesammelt.

4.14 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

In der MALDI-TOF-Massenspektrometrie sollten die in der RP-HPLC manuell gesammelten Peptidfraktionen hinsichtlich ihrer Eignung für die Proteinsequenzierung untersucht werden. Eine Fraktion eignet sich ideal für die Sequenzierung, wenn in ihr nur ein Peptid enthalten ist. Würde ein Peptidgemisch vorliegen, könnten die Ergebnisse der Sequenzierung

fehlinterpretiert werden. Die in der Massenspektrometrie ermittelte Masse kann außerdem dazu verwendet werden, die Richtigkeit der Sequenz zu überprüfen.

Prinzip der Massenspektrometrie ist es, ein nichtflüchtiges Biopolymer in ein intaktes, ionisiertes Molekül in der Gasphase umzuwandeln. Bei der MALDI-MS werden die zu untersuchenden Makromoleküle zuvor in eine Matrix eingebettet, die aus kleinen organischen Molekülen besteht, welche bei der Wellenlänge des Lasers absorbieren (= matrix assisted laser desorption ionization: MALDI). Die Bildung der gasförmigen Ionen wird durch kurze intensive Laserimpulse induziert. Die Matrix absorbiert die Energie des Lasers und überträgt diese auf das Biopolymer, welches somit relativ schonend, meist als Ganzes, verdampft wird (HILLENKAMP et al., 1991). Zur Detektion wird MALDI meist mit TOF (time of flight) gekoppelt: Die Ionen werden im elektrischen Feld beschleunigt, wobei die Zeit bis zum Eintreffen am Detektor gemessen wird. Aufgrund individueller masseabhängiger Geschwindigkeiten werden die Ionen während ihres Fluges getrennt (BAHR et al., 1994).

Die vorliegenden Massenspektren wurden auf einem Vision 2000-Gerät der Firma Finnegan MAT im 'positive-ion reflectron mode' erzeugt. Die Ionisierung erfolgte über einen pulsierenden Stickstoff-Laser (Wellenlänge 337 nm, Leistungsdichte 10^6 W cm^{-2}). Zur Kalibrierung wurden Angiotensin und bovines Insulin als externe Standards eingesetzt. Die ausgewählten Fraktionen (0,5 μl) wurden mit Matrixlösung (10 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure in 0,1 % (v/v) TFA und 30 % (v/v) Acetonitril, 1 μl) gemischt und für die Massenspektrometrie direkt auf dem Probenhalter gemischt und an der Luft getrocknet.

4.15 Peptidsequenzierung

Die Peptidfragmente, die nach massenspektrometrischer Beurteilung für eine Sequenzierung geeignet erschienen, wurden mittels Edman-Abbau auf einem 'pulsed-liquid-phase sequencer' sequenziert (EDMAN, 1950). Der eigentlichen Sequenzierung nach LINDER und Mitarbeitern (1994) wurde ein modifiziertes, zusätzliches Waschprogramm vorgeschaltet (Applied Biosystem SDS-wash cycle).

5 Ergebnisse

5.1 Präparation von Endosomen des Nierencortex

Immunhistologische Untersuchungen von BIRK und Mitarbeitern (1993) zeigten, daß gp400 ausschließlich an der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus lokalisiert ist. Die Autoren spezifizierten hierbei das Vorkommen auf die basalen Anteile der Mikrovilli und die apikalen endozytotischen Vesikel. Da das Ziel der vorliegenden Arbeit die Reinigung des gp400 war, sollte anhand der Präparation von Endosomen aus dem Nierencortex eine initiale Anreicherung des gp400 erzielt werden. Die so erhaltene Endosomenfraktion sollte das Ausgangsmaterial für die darauf folgenden biochemischen Verfahren der Proteinisolierung bzw. für die Immunaффinitätschromatographie mit dem monoklonalen Antikörper N4A4 darstellen. Zur Anwendung kam eine Endosomenpräparation nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990, s. Abb. 4.1).

5.1.1 Quantifizierung des gp400 im Verlauf der Präparation mittels Festphasen-Radioimmunoassay

Ausgehend vom Nierencortex-Homogenat der Schweineniere (Ausgangsmaterial, AM) wurde die jeweils weiterverarbeitete Fraktion (\ddot{U}_1 , \ddot{U}_2 , S_3 , S_5 , S_6) mittels Festphasen-Radioimmunoassay hinsichtlich ihres Gehaltes an gp400 untersucht. Der Antigengehalt wird ausgedrückt in Schweinenierencortex-Homogenat-Einheiten (SHE), wobei eine SHE derjenigen Antigenmenge entspricht, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat vorhanden ist. Die Ergebnisse aus zwei Präparationen, jeweils Trippelbestimmungen, sind in Abbildung 5.1 dargestellt. Die einzelnen Meßwerte sind Tabelle 9.1 im Anhang zu entnehmen.

Die verworfenen Fraktionen S_1 , S_2 , \ddot{U}_3 , \ddot{U}_5 und \ddot{U}_6 wurden ebenfalls im Radioimmunoassay bezüglich ihres Antigengehaltes untersucht. Mit Ausnahme der Fraktion S_2 waren die detektierten Mengen an gp400 vernachlässigbar gering.

Verglichen mit dem Ausgangsmaterial (0,28 SHE) konnte in der Endfraktion (2,68 SHE) ein nahezu 10-fach höherer Gehalt an gp400 detektiert werden. Aus diesem Grund erschien diese Präparationstechnik geeignet, genügend angereichertes Ausgangsmaterial für die folgende Proteinisolierung zu liefern.

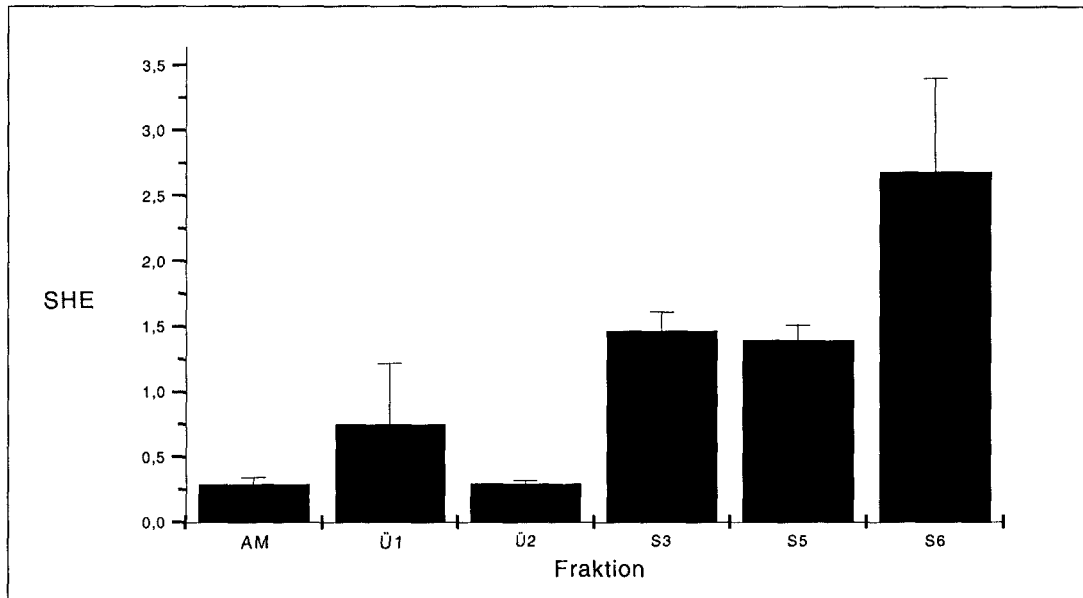


Abb. 5.1 Quantifizierung des gp40 in den einzelnen Fraktionen der Endosomenpräparation nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990).

Die einzelnen Fraktionen der Endosomenpräparation wurden im Festphasen-Radioimmunoassay hinsichtlich ihres Antigengehaltes untersucht. Der Antigengehalt wird ausgedrückt in Schweinenierencortex-Homogenateinheiten (SHE), wobei ein SHE derjenigen Antigenmenge entspricht, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat enthalten ist. (AM=Ausgangsmaterial, Ü=Überstand, S=Sediment)

5.1.2 Western-Blot

Die Proteine in den einzelnen Fraktionen der Vesikelpräparation wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das gefärbte Silbergel ist in Abb. 5.2 dargestellt.

Durch Elektrotransfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran, Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper N4A4 und Detektion mittels ECL-Entwicklung konnte analog zum Festphasen-Radioimmunoassay eine deutliche Anreicherung des gesuchten Antigens im Verlauf der Vesikelpräparation nachgewiesen werden (Röntgenfilm s. Abb. 5.3).

Die Detektion des gp400 aufgrund des Western-Blots erlaubte die Zuordnung der Proteinbande im Silbergel. Das gesuchte Protein wies eine apparente Molmasse von 400 kDa auf dem SDS-Polyacrylamidgel auf.

Zusätzlich wurde ein Protein mit einer apparenten Molmasse von ca. 110 kDa auf dem SDS-Gel detektiert (s. Abb. 5.3). Da dieses Protein auch auf der Negativkontrolle mit Myeloma IgG₁ als unspezifischem erstem Antikörper nachgewiesen werden konnte, ist sichergestellt, daß dieses 110 kDa Protein nicht spezifisch vom N4A4-Antikörper gebunden wurde.

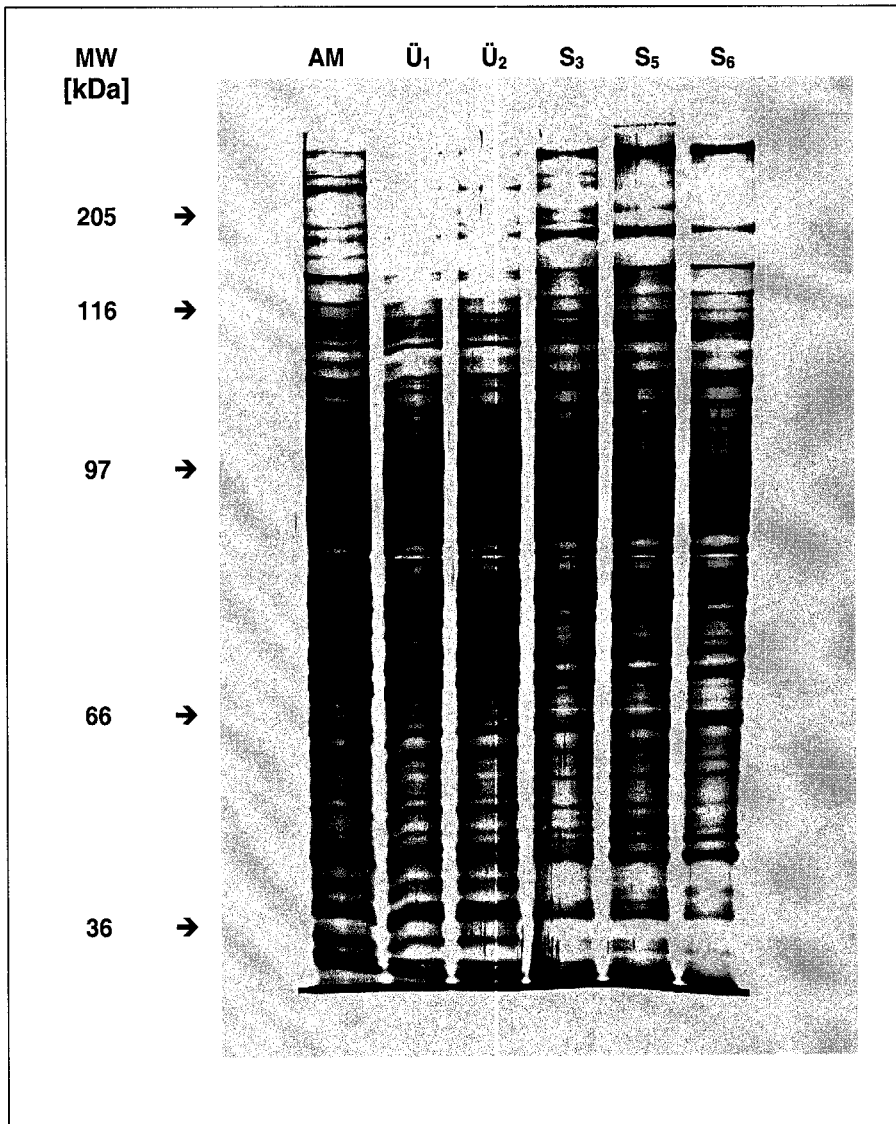


Abb. 5.2 **Silberfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen der Endosomenpräparation nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990)**
 Die jeweils weiterverarbeiteten Fraktionen der Endosomenpräparation wurden zur Visualisierung einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach LAEMMLI (1970) unterzogen (Trenngel 7,5 %). Die aufgeführten Markerproteine wurden auf dem gleichen Gel aufgetrennt. (AM=Ausgangsmaterial, Ü=Überstand, S=Sediment)

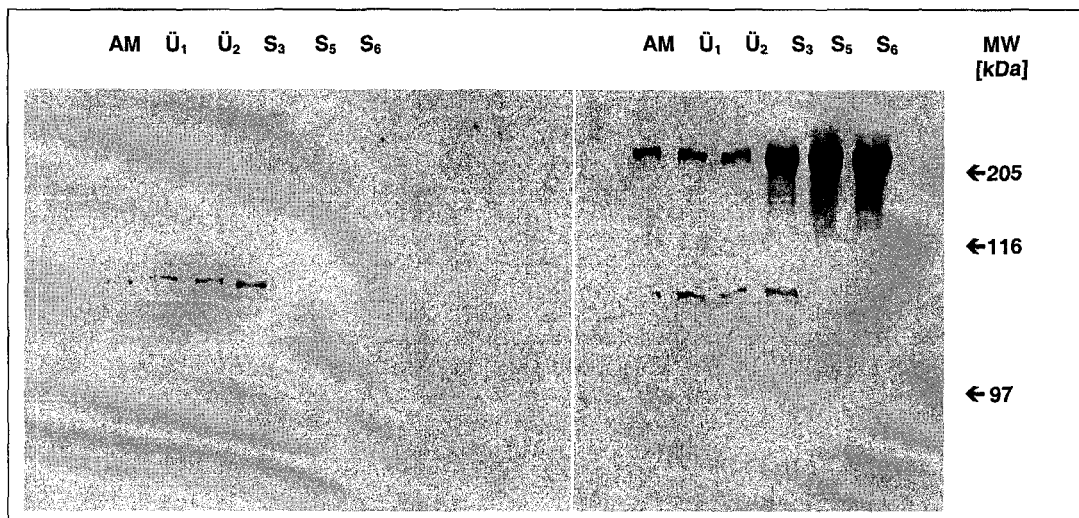


Abb. 5.3 **Detektion des gp400 in den einzelnen Fraktionen der Endosomenpräparation (ECL-Entwicklung).**

Die jeweils weiterverarbeiteten Fraktionen der Endosomenpräparation nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (LAEMMLI 1970) und die Proteine nach BIRK und KOEPESELL (1987) auf Nitrocellulose geblotet. Die Inkubation des N4A4- und des Myeloma-IgG₁-Antikörpers erfolgte für 2 Stunden bei 37°C und über Nacht bei 4°C. Als Zweitantikörper wurde ein mit einer Peroxidase gekoppelter anti-Maus-IgG eingesetzt. Die Entwicklung erfolgte über 1 Minute in einer Chemiluminollösung. Links Negativkontrolle: Myeloma IgG₁ wurde als erster Antikörper eingesetzt, rechts: N4A4-Antikörper als erster Antikörper (AM=Ausgangsmaterial, Ü=Überstand, S=Sediment)

5.2 Solubilisierung des gp400

In einem ersten Ansatz sollten folgende Detergenzien hinsichtlich ihrer Fähigkeit, das gp400 in Lösung bringen zu können, untersucht werden: Desoxycholol (DOC), Cholol, CHAPS, NP-40 sowie Triton X-100. Die Detergenzien wurden in Konzentrationen von 2; 1 und 0,5 % (w/v) eingesetzt. Die Proteinkonzentration im Solubilisierungsansatz betrug 1 mg/ml.

Von jedem Ansatz wurden zwei Parallelproben erstellt, wobei nur eine Probe bei 105.000 x g abzentrifugiert wurde. Die nicht zentrifugierte Probe sollte den Referenzwert für die Beurteilung des Solubilisierungsvermögens darstellen. Zur Messung im Radioimmunoassay enthielten die Proben eine Detergenzendkonzentration von 0,05 % (w/v). Die Proteinkonzentration nach Verdünnung sollte 25 µg/ml betragen. Die ermittelten SHEs wurden in Abhängigkeit von der tatsächlich gemessenen Proteinkonzentration nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) korrigiert (s. Tabelle 5.1).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß sich das ionische Detergenz Desoxycholol am besten für die Solubilisierung des gp400 eignet. Bei Detergenzkonzentrationen von 2 bzw. 1 % (w/v) wurden im Zentrifugationsüberstand 116,7 bzw. 97,0 % des Antigens verglichen mit

der nichtzentrifugierten Probe detektiert. Bei einer DOC-Konzentration von 0,5 % (w/v) sank der detektierte N4A4-Anteil bereits deutlich auf 34,6 %.

Das ebenfalls ionische Detergenz Cholat wies vergleichbar gute Solubilisierungseffekte auf. Bei Cholatkonzentrationen von 2 bzw. 1 % (w/v) konnten noch 66,8 bzw. 60,1 % des in der nicht zentrifugierten Probe gemessenen gp400 nach Zentrifugation detektiert werden. Bei einer Cholatkonzentration von 0,5 % (w/v) konnten immerhin noch 53,5 % des gp400 gemessen werden.

Das zwitterionische Detergenz CHAPS erwies sich für die Solubilisierung des gp400 als weniger geeignet. Bei analogen Detergenzkonzentrationen von 2; 1 und 0,5 % (w/v) konnten im Zentrifugationsüberstand jeweils 11,0; 19,3 bzw. 22,0 % verglichen mit der nicht zentrifugierten Probe nachgewiesen werden.

Detergenz	Konzentration (w/v) [%]	Nr.	Zentrifugation 105.000xg, 1 h	gp400 SHE	Proteinkonz. [$\mu\text{g/ml}$]	SHE bei einer Proteinkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$	Solubilisierter gp400-Anteil im Vergleich zur nicht zentrifugierten Probe [%]
DOC	2	1	ja	0,0592	18,3	0,0808	116,7
		2	nein	0,0491	17,7	0,0693	
	1	3	ja	0,0442	18,1	0,0610	97,0
		4	nein	0,0566	22,5	0,0629	
	0,5	5	ja	0,0139	17,3	0,0201	34,6
		6	nein	0,0442	19,0	0,0581	
Cholat	2	7	ja	0,0653	10,4	0,1569	66,8
		8	nein	0,1015	10,8	0,2349	
	1	9	ja	0,0508	10,2	0,1244	60,1
		10	nein	0,0894	10,8	0,2070	
	0,5	11	ja	0,0321	8,4	0,0956	53,5
		12	nein	0,0772	10,8	0,1787	
CHAPS	2	13	ja	0,0041	16,9	0,0060	11,0
		14	nein	0,0381	17,3	0,0550	
	1	15	ja	0,0063	16,7	0,0094	19,3
		16	nein	0,0335	17,1	0,0490	
	0,5	17	ja	0,0048	14,4	0,0083	22,0
		18	nein	0,0284	18,8	0,0378	
NP-40	2	19	ja	0,0030	14,2	0,0052	8,6
		20	nein	0,0402	16,7	0,0601	
	1	21	ja	0,0027	16,7	0,0040	8,5
		22	nein	0,0372	19,8	0,0470	
	0,5	23	ja	0,0070	23,8	0,0073	12,3
		24	nein	0,0520	21,9	0,0594	
Triton X-100	2	25	ja	0,0068	16,3	0,0104	21,2
		26	nein	0,0404	20,6	0,0490	
	1	27	ja	0,0000	17,9	0,0000	0,0
		28	nein	0,0363	22,1	0,0410	
	0,5	29	ja	0,0000	15,4	0,0000	0,0
		30	nein	0,0369	21,9	0,0422	
ohne	31	ja	0,0000	11,3	0,0000	0,0	
	32	nein	0,0310	16,7	0,0464		

Tab. 5.1 **Vergleich unterschiedlicher Detergenzien hinsichtlich ihrer Solubilisierungseigenschaften für das gp400**

Für die Solubilisierungsversuche wurden die Detergenzien DOC (Desoxycholat), Cholat, CHAPS, NP-40 und Triton-X-100 in einer Konzentration von 2, 1 und 0,5 % (w/v) eingesetzt. Die Überstände nach Zentrifugation (105.000 x g, 1 h) sowie die nicht zentrifugierten Proben wurden im Festphasen-Radioimmunoassay hinsichtlich ihres Gehaltes an gp400 gemessen, wobei eine SHE (Schweinenierencortex-Homogenat-Einheit) derjenigen Antigenmenge entspricht, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat enthalten ist.

Die beiden nichtionischen Detergenzien NP-40 sowie Triton X-100, die sich in der Länge ihrer Polyoxyethylenkette unterscheiden, zeigten sich ungeeignet, das gp400 ausreichend in Lösung zu bringen: Bei eingestellten Detergenzkonzentrationen von 2; 1 und 0,5 % (w/v) konnten bei NP-40 lediglich 8,6; 8,5 bzw. 12,3 % des gp400 im Vergleich zur nicht zentrifugierten Probe detektiert werden. In Gegenwart von Triton X-100 wurden 21,2 % bei einer Detergenzkonzentration von 2 % (w/v) bzw. 0% bei Konzentrationen von 1 und 0,5 % (w/v) nachgewiesen.

Die Versuchsergebnisse ließen erkennen, daß sich die ionischen Detergenzien Desoxycholat und Cholat für die Solubilisierung des gp400 eignen. Aufgrund der Eigenschaft von Desoxycholat, in Abhängigkeit vom pH Wert ein zähes Gel zu bilden, wurde Cholat aus praktischen Gründen für den weiteren Einsatz in den verschiedenen proteinchemischen Reinigungsverfahren vorgezogen.

Um die optimale Cholatkonzentration zu bestimmen, die zur Solubilisierung des gp400 benötigt wird, wurden Versuchsansätze mit folgenden Konzentrationen ausgewählt: 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25 sowie 0,1 % (w/v). Um für die sich anschließenden proteinchemischen Reinigungsverfahren genügend Protein in einem relativ geringen Volumen zur Verfügung zu haben, wurde die Proteinkonzentration im Solubilisierungsansatz auf 5 mg/ml erhöht. Analog zu den zuvor beschriebenen Solubilisierungsversuchen enthielten die in PBS-A verdünnten Proben bei Messung im Radioimmunoassay eine Detergenzendkonzentration von 0,05 % (w/v). Die Meßergebnisse wurden hinsichtlich der tatsächlich ermittelten Proteinkonzentration nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) korrigiert und sind in Abb. 5.4 grafisch dargestellt. Die einzelnen Meßwerte sind Tabelle 10.2 im Anhang zu entnehmen.

Die dargestellte Sättigungskurve zeigt deutlich, daß bei Konzentrationen von 0,1 bzw. 0,25 % nahezu keine Solubilisierung des gp400 festzustellen ist (0,054 bzw. 0,078 SHE). Erst bei einer Konzentration von 0,5 % (w/v) ist das gp400 in nennenswerter Menge im Zentrifugationsüberstand nachzuweisen (0,27 SHE). Cholatkonzentrationen von 1 bzw. 2,5 % (w/v) vermögen eine noch bessere Solubilisierung des gp400 (0,39 bzw. 0,46 SHE). Ein weiterer Anstieg der Detergenzkonzentration bringt indessen keinen weiteren positiven Effekt: mit 0,47 SHE ist bei einer Cholatkonzentration von 5 % (w/v) im Festphasen-Radioimmunoassay annähernd die gleiche Menge an gp400 zu messen wie bei 2,5 % (w/v).

Für die sich anschließenden proteinchemischen Reinigungsverfahren sollte eine Detergenzkonzentration ausgewählt werden, die eine ausreichende Solubilisierung des gp400 gewährleistet. Um jedoch zu vermeiden, daß eine zu hohe Detergenzkonzentration spezifische Bindungen des gp400 unterdrückt, sollte die Detergenzkonzentration auch so gering wie möglich gehalten werden. Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse wurde eine Cholatkonzentration von 2 % (w/v) zur Solubilisierung des gp400 ausgewählt.

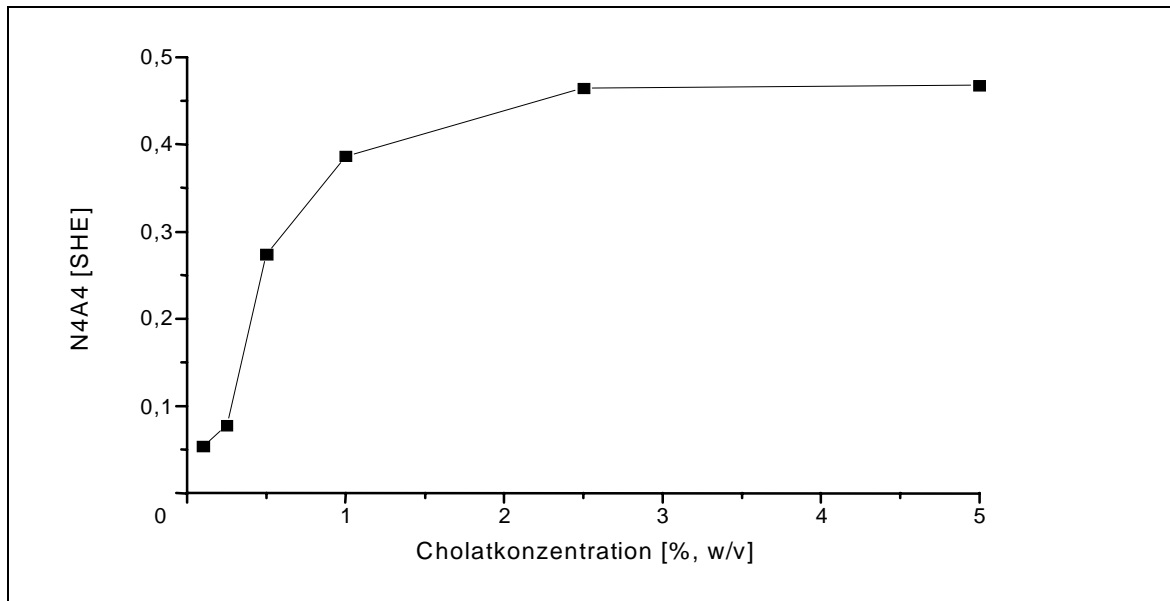


Abb. 5.4 Solubilisierung des gp400 bei unterschiedlichen Cholatkonzentrationen
 Cholatkonzentrationen von 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 und 5,0 % (w/v) wurden zur Solubilisierung des gp400 eingesetzt. Im Zentrifugationsüberstand wurde das gp400 mittels Festphasen-Radioimmunoassay gemessen und in SHE (Schweinenierencortex-Homogenat-Einheiten) ausgedrückt. Hierbei ist eine SHE diejenige gp400-Menge, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat zu detektieren ist.

5.3 Präparative isoelektrische Fokussierung

Die Präparative isoelektrische Fokussierung sollte zum Einsatz kommen, um die in der Endosomenfraktion enthaltenen Proteine nach ihren isoelektrischen Punkten aufzutrennen. Dies mit dem Ziel, eine bezüglich des gp400 angereicherte Fraktion finden zu können, die in die Immunaffinitätschromatographie eingehen könnte. Gleichzeitig konnte der isoelektrische Punkt des gp400 ermittelt werden.

Die Solubilisierung der Proteine der Endosomenfraktion wurde mit Chol, 2 % (w/v), durchgeführt. Die Proteinkonzentration im Solubilisierungsansatz betrug 2 mg/ml. Probe und Gradient wurden wie in Abschnitt 3.9 beschrieben auf die Säule aufgetragen. Nach einer Fokussierungszeit von 16 Stunden wurden 29 Fraktionen à 4 ml gesammelt. Die pH-Werte der Fraktionen wurden bestimmt und sind in Abb. 5.5 dargestellt. Wie erwartet, zeigte sich eine annähernd lineare pH-Wert-Verteilung

Nach 24stündiger Dialyse gegen aqua bidest. wurde von jeder Fraktion das Volumen ermittelt, die Proteinkonzentration nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) gemessen und die Bindung des N4A4-Antikörpers im Festphasen-Radioimmunoassay bestimmt. Hierbei wurden 5 µg Protein je dot aufgetragen. Da die Volumina und auch die

Proteinkonzentrationen der gesammelten Fraktionen differierten, wurde der Gesamtproteingehalt je Fraktion errechnet und dieser als Referenzwert für die gemessenen

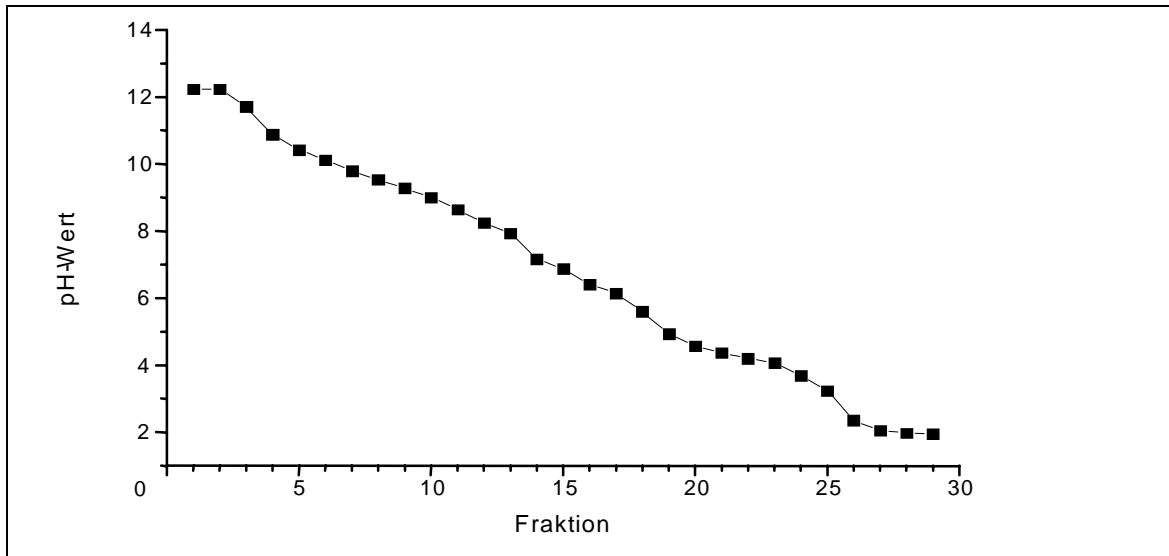


Abb. 5.5 *pH-Werte der einzelnen Fraktionen nach isoelektrischer Fokussierung*
 Mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung im Svensson-Rohr wurden die solubilisierten Proteine der Endosomenfraktion des Schweine-Nierencortex nach ihren isoelektrischen Punkten aufgetrennt. Nach IEF (16 h, 2 kV, 15 W) wurden ca. 30 Fraktionen gesammelt und die pH-Werte der einzelnen Fraktionen bestimmt.

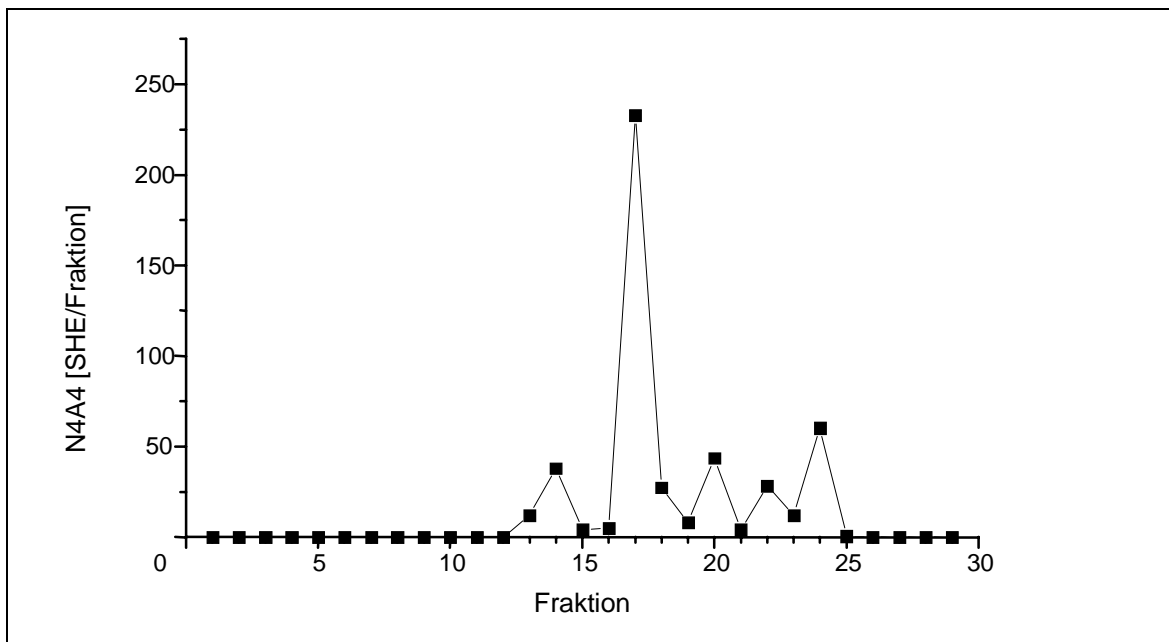


Abb. 5.6 *Verteilung des gp40 in den einzelnen Fraktionen nach präparativer isoelektrischer Fokussierung im Svensson-Rohr*
 Mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung im Svensson-Rohr wurden die solubilisierten Proteine der Endosomenfraktion des Schweine-Nierencortex nach ihren isoelektrischen Punkten aufgetrennt. Nach IEF (16 h, 2 kV, 15 W) wurden ca. 30 Fraktionen gesammelt und die Bindung des N4A4-Antikörpers in den einzelnen Fraktionen mittels Festphasen-Radioimmunoassay bestimmt. und in SHE (Schweinenierencortex-Homogenat-

Einheiten) ausgedrückt. Hierbei ist eine SHE diejenige gp400-Menge, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat zu detektieren ist.

SHEs (je 5 µg Protein) herangezogen. Die für die einzelnen Fraktionen im Festphasen-Radioimmunoassay gemessene Bindung des N4A4-Antikörpers ist Abb. 5.6 zu entnehmen. Die einzelnen Meßergebnisse sind in Tabelle 10.3 im Anhang wiedergegeben.

In Abb. 5.6 ist eine deutliche Fokussierung des gp400 in Fraktion Nr. 17 zu erkennen. Quantitativ geringere Mengen an gp400 konnten in den benachbarten Fraktionen 13 bis 25 nachgewiesen werden. Der Isoelektrische Punkt des gesuchten gp400 konnte mit 6,14 im schwach sauren Bereich bestimmt werden.

5.4 Affinitätschromatographie mit Concanavalin A

Aufgrund von Beschreibungen von BERNOTAT-DANIELOWSKI und Mitarbeitern (1986), daß es sich bei gp400 um ein Glykoprotein handelt, lag es nahe, mittels einer Affinitätschromatographie mit dem zuckerbindenden Lektin Concanavalin A das gesuchte Antigen anzureichern. Concanavalin A ist ein Protein der Schwertbohne und bindet spezifisch an α -D-Glukose- und α -D-Mannose-Moleküle (SUROLIA et al., 1975).

Die Elution der Proteine bei Affinitätschromatographie ist in Abb. 5.7 dargestellt. Hierbei zeichnete der an die Säule angeschlossene Schreiber die Absorption des Eluats bei einer Wellenlänge von 280 nm auf. Das Gros der Proteine eluierte im Durchfluß, während die Glykoproteine mittels linearem α -Methyl-D-Mannosid-Gradienten von der Säule gewaschen wurden. Die manuell gesammelten Fraktionen (Durchfluß und neun Eluatfraktionen) wurden nach Dialyse einer Proteinkonzentrationsbestimmung nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) unterworfen und anschließend im Festphasen-Radioimmunoassay hinsichtlich ihres gp400-Gehaltes untersucht. Der Probenauftrag betrug 5 µg. Die Meßergebnisse sind in Tab. 5.2 dargestellt.

Bei einem Gesamtproteinauftrag von 29,5 mg wurde der größte Proteinanteil im Säulendurchfluß wiedergefunden (27,8 mg). Ca. 10% des Proteinauftrages konnten mit Hilfe des α -Methyl-D-Mannosid-Gradienten als Glykoproteine eluiert werden. Bei der anschließenden Detektion des gp400 in den einzelnen Eluatfraktionen mittels Festphasen-Radioimmunoassay war auffallend, daß der Großteil zwar im Säulendurchfluß zu finden war, die detektierte Antigenmenge allerdings nur ca. ein Zehntel der ursprünglich im Solubilisat vorhandenen gp400-Menge ausmachte. In den mit Methyl-Mannose eluierten Fraktionen war der gp400-Anteil sehr gering. Die kumulierten N4A4-SHEs in diesen Eluatfraktionen erreichten nur ca. 10% der Menge, wie sie im Durchfluß zu finden war.

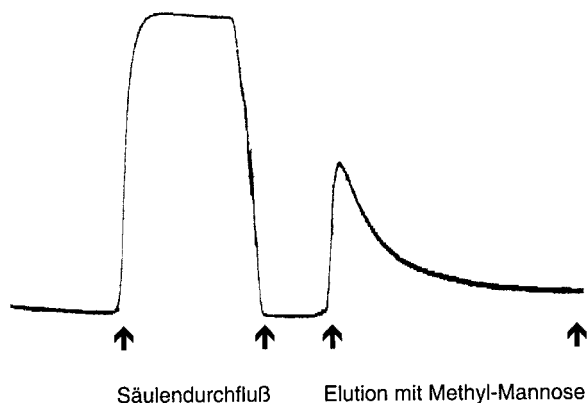


Abb. 5.7 Typischer Verlauf einer Affinitätschromatographie mit Concanavalin A
 Die solubilisierete Endosomenfraktion des Schweinenierencortex wurde einer Affinitätschromatographie mit dem zuckerbindenden Lektin Concanavalin A unterworfen. Bei 280 nm wurde die Absorption der Eluatfraktion und somit der eluierten Proteine von einem Schreiber aufgezeichnet.

	Gesamtvolumen [ml]	Proteinkonzentration [mg/ml]	Gesamtprotein [mg]	gp400 [SHE/5µg]	Gesamt gp400 [SHE/Fraktion]
Solubilisat	20,0	1,47	29,45	0,2770	1631,0700
Durchlauf	29,0	0,96	27,82	0,0285	158,4100
Eluat					
Fraktion 1	5,6	0,04	0,20	0,0000	0,0000
Fraktion 2	4,8	0,11	0,52	0,0008	0,0790
Fraktion 3	4,3	0,13	0,54	0,0039	0,4160
Fraktion 4	4,8	0,07	0,35	0,0211	1,4900
Fraktion 5	5,7	0,05	0,31	0,0387	2,3700
Fraktion 6	7,1	0,04	0,29	0,0474	2,7600
Fraktion 7	7,5	0,04	0,28	0,0520	2,9200
Fraktion 8	9,2	0,03	0,30	0,0546	3,2600
Fraktion 9	9,2	0,03	0,23	0,0516	2,3800
Summe Eluatfraktionen			3,02	0,27	15,68

Tab. 5.2 Affinitätschromatographie mit Concanavalin A: Detektion des gp400 in den gesammelten Fraktionen mittels Festphasen-Radioimmunoassay
 Die solubilisierete Endosomenfraktion des Schweinenierencortex wurde einer Affinitätschromatographie mit dem zuckerbindenden Lektin Concanavalin A unterworfen. Solubilisat, Durchlauf sowie die einzelnen Eluatfraktionen wurden gesammelt und die Bindung des N4A4-Antikörpers in diesen Fraktionen mittels Festphasen-Radioimmunoassay gemessen und in SHE (Schweinenierencortex-Homogenat-Einheiten) ausgedrückt. Hierbei ist eine SHE diejenige gp400-Menge, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat zu detektieren ist.

Insgesamt gesehen konnte vom gesamten N4A4-Auftrag mittels Festphasen-Radioimmunoassay nur ca. 10% nach Säulendurchlauf detektiert werden. Die restlichen 90% konnten aus Gründen, die zu diskutieren sind, nicht nachgewiesen werden. Von den detektierten 10 % war der überwiegende Anteil im Säulendurchfluß zu finden. In den Fraktionen nach Elution mit α -Methyl-D-Mannosid wurden im Vergleich zum Durchfluß nur 10% des gp400 detektiert, also ca. 1 % der ursprünglich eingesetzten Menge an gp400. Aufgrund dieser hohen Verluste wurde diese Methode nicht zur Anreicherung des gp400 eingesetzt.

5.5 Immunaffinitätschromatographie

5.5.1 Monoklonaler Antikörper N4A4

Die Immunaffinitätschromatographie wurde wie in Abschnitt 4.11 beschrieben durchgeführt. Während im Säulendurchfluß insgesamt ca. 18.876,70 SHE gp400 detektiert werden konnten, waren im Eluat nur ca. 1,81 SHE gp400 zu detektieren (s. Tab. 5.3). Diese Meßergebnisse konnten anhand der visuellen Probendarstellung im Silbergel bestätigt werden: In der Eluatfraktion konnte im Molekulargewichtsbereich von 400 kDa keine Proteinbande angefärbt werden, wohingegen in der Durchflußfraktion eine eindeutige Bande im genannten Bereich zu sehen war (Silbergel nicht dargestellt).

Fraktion	Proteinkonzentration [mg/ml]	Volumen [ml]	Protein gesamt [mg]	gp400 [SHE/ μ g]	gp400 gesamt SHE
Durchfluß	0,387	50,000	19,350	0,97554	18.876,70
Eluat	0,290	0,770	0,223	0,00810	1,81

Tab. 5.3 Immunaffinitätschromatographie mit dem monoklonalen Antikörper N4A4
 Der monoklonale Antikörper N4A4 wurde kovalent an Protein G gekoppelt und zur Immunaffinitätschromatographie mit der solubilisierten Endosomenfraktion des Schweinenierencortex eingesetzt. Die Bindung des N4A4-Antikörpers in Durchfluß und Eluat wurde mittels Festphasen-Radioimmunoassay bestimmt und in SHE (Schweinenierencortex-Homogenat-Einheiten) ausgedrückt. Hierbei ist eine SHE diejenige gp400-Menge, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat zu detektieren ist.

5.5.2 Monoklonaler Antikörper L4D6

Die Immunaffinitätschromatographie wurde wie in Abschnitt 4.11 beschrieben durchgeführt. Parallel hierzu wurde als Negativkontrolle Solubilisierungspuffer ohne Antigen auf die L4D6-gekoppelte Protein G Säule aufgetragen. Jeweils 100 μ l der Eluatfraktionen wurden einer

Proteinfällung nach WESSEL und FLÜGGE (1984) unterzogen und die enthaltenen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Silbergel der Positivkontrolle ist in Abb. 5.8 dargestellt.

Im Eluat der Immunaффinitätschromatographie konnte nach Gelelektrophorese eine deutliche Proteinbande mit einer apparenten Molmasse von ca. 400 kDa angefärbt werden. Drei weitere Proteine eluierten mit Diethylamin und konnten im Silbergel nachgewiesen werden: ca. 105, 78 bzw. 54 kDa. Die Stärke der Bande ließ ein quantitativ geringeres Vorkommen letztgenannter Proteine im Vergleich zur 400 kDa Bande erkennen. Von den drei niedermolekularen Proteinen zeigte sich die 105 kDa Bande als am stärksten im Silbergel anfärbbar. Alle drei niedermolekularen Proteine, jedoch nicht das 400 kDa Protein, konnten auch nachgewiesen werden, wenn eine L4D6-gekoppelte Protein G Säule nach Auftrag von Solubilisierungspuffer ohne Antigen mit Diethylamin eluiert wurde (Negativkontrolle, Silbergel nicht dargestellt).

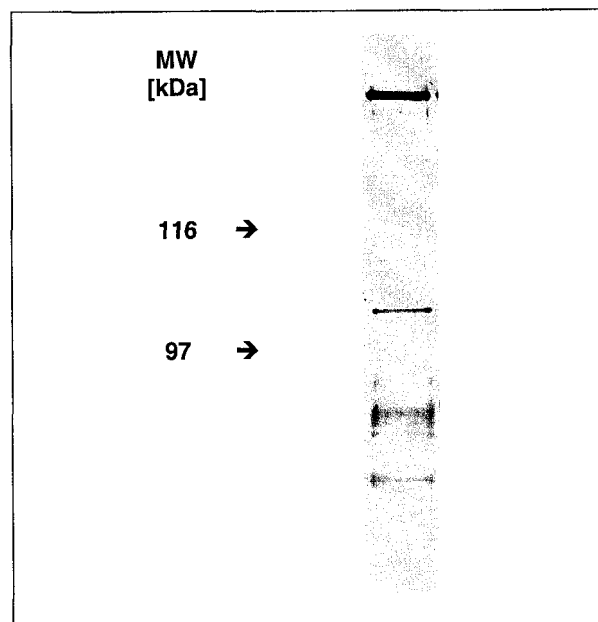


Abb. 5.8 Gelelektrophoretische Auftrennung der Eluatfraktion nach Immunaффinitätschromatographie mit dem monoklonalen Antikörper L4D6
 Der monoklonale Antikörper L4D6 wurde kovalent an Protein G gekoppelt und zur Immunadsorption mit der solubilisierten Endosomenfraktion des Schweinenierencortex eingesetzt. Die Proteine der Eluatfraktion wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Silberfärbung visualisiert.

5.6 Nachweis der Identität des Antigens der monoklonalen Antikörper N4A4 und L4D6

Die Eluatfraktion nach Immunadsorption mit dem monoklonalen Antikörper L4D6 wurde einem Western-Blotting nach BURNETTE (1981) unterzogen. Die Autoradiographie ist in

Abb. 5.9 dargestellt. Der monoklonale Antikörper N4A4 zeigte im Western Blot der L4D6-Eluatfraktion eine eindeutige Reaktion mit der 400 kDa Bande. Dies beweist, daß das Antigen beider monoklonaler Antikörper identisch ist.

Eine parallel durchgeführte Kontrollautoradiographie mit dem unspezifischen Antikörper Myeloma IgG₁ als erstem Antikörper zeigte keine Reaktion mit der 400 kDa Proteinbande, jedoch ebenso wie der N4A4-Antikörper eine geringe unspezifische Reaktion mit den drei niedermolekularen Proteinen (nicht dargestellter Western Blot).

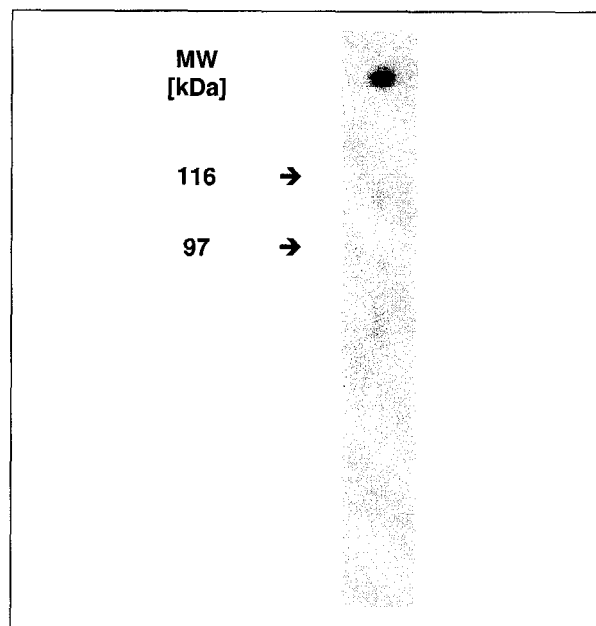


Abb. 5.9 **Western-Blot (mAk N4A4) der Eluatfraktion nach Immunadsorption (mAk L4D6)**
 Der monoklonale Antikörper L4D6 wurde kovalent an Protein G gekoppelt und zur Immunadsorption mit der solubilisierten Endosomenfraktion des Schweinenierencortex eingesetzt. Die Proteine der Eluatfraktion wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blotting auf eine Nitrocellulose transferiert. Die Autoradiographie erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper N4A4.

5.7 Aminosäurenanalyse zur quantitativen Proteinbestimmung in der Eluatfraktion

Um einschätzen zu können, welche Proteinmenge pro Immunadsorption von der Affinitätssäule eluierten, wurde die Eluatfraktion nach Aufkonzentrierung über Centriplus-100^R einer quantitativen Aminosäurenanalyse unterzogen. Gleichzeitig konnte hierbei eine Aussage über die Aminosäurezusammensetzung des Proteins getroffen werden. Diese Aussage war im Hinblick auf einen späteren Verdau des Proteins, und somit der Auswahl des entsprechenden Verdauenzym, von Bedeutung. Es war darauf zu achten, daß für die Aminosäurenanalyse nur eine Eluatfraktion nach Immunadsorption eingesetzt wurde, in der

die Proteine, die neben dem gesuchten Antigen eluierten, nur in einer unbedeutenden Menge vorlagen. Um dies beurteilen zu können, wurden die Eluatfraktionen jeweils im Silbergel auf Homogenität untersucht. Das HPLC-Eluatprofil nach Aminosäurenanalyse ist in Abb. 5.10 dargestellt. Die Konzentrationsberechnungen erfolgten anhand von Flächenintegrationen.

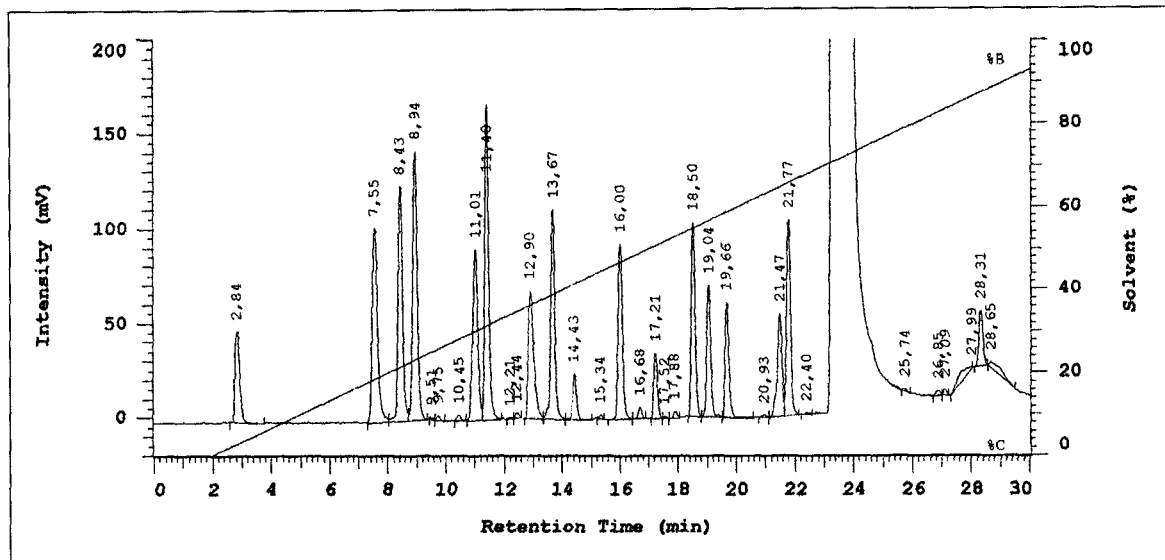


Abb. 5.10 HPLC-Elutionsprofil nach Aminosäurenanalyse der Immunadsorptions-Eluatfraktion
Die solubilisierten Proteine der Endosomenfraktion des Schweinenierencortex wurden zur Immunadsorption mit dem monoklonalen Antikörper L4D6 eingesetzt. Die Eluatfraktion nach Elution mit Diethylamin wurde einer Aminosäurenanalyse unterzogen.

Im Durchschnitt konnte durch eine Immunadsorption ca. 1 µg Protein isoliert werden. Bei 100 durchgeführten Immunadsorptionen konnten somit ca. 100 µg Protein gewonnen werden. Dies entspricht 250 pmol des 400 kDa Proteins. Da die parallel eluierten Proteine ebenfalls berücksichtigt werden müssen, diese aber nach Beurteilung im Silbergel nicht die Hälfte der eluierten Proteinmenge ausmachen dürften, konnte von mindestens 125 pmol N4A4-Antigen ausgegangen werden, die in die Sequenzierung eingehen konnten.

Von jeder Immunadsorptions-Eluatfraktion wurde ein 20 µl Aliquot gelelektrophoretisch aufgetrennt, um deren Reinheit zu beurteilen. Ein weiteres 20 µl Aliquot wurde in der Aminosäurenanalyse zur Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt.

5.8 HPLC-Auftrennung der Peptidfragmente nach Verdau des Proteins und Elution aus der Gelmatrix

Die Serin-Protease Lys-C spaltet Proteine im alkalischen Milieu spezifisch C-terminal an Lysinresten. Aufgrund des relativ großen Lysinanteils im gesuchten 400 kDa Protein erschien die Endoproteinase Lys-C geeignet zu sein, das N4A4-Antigen in Peptidfragmente einer Größe spalten zu können, wie sie in der sich anschließenden Sequenzierung eingesetzt werden können. Der Verdau des Proteins mit Elution aus der Gelmatrix erfolgte wie in Abschnitt 4.12 beschrieben. Ein Leerwert, bestehend aus einem Gelstückchen, auf dem kein Protein aufgetrennt wurde, wurde parallel dazu erstellt.

Die HPLC-Chromatogramme der Eluatfraktionen, Leerwert und Probe, sind in Abb. 5.11 bzw. 5.12 dargestellt. Auffallend war hierbei, daß bereits der Leerwert ein ausgeprägtes Chromatographieprofil zeigte. Nach Vergleich der beiden Chromatogramme wurde der Peak mit der Retentionszeit 27,312 min, welcher im Leerwertprofil nicht vorhanden war, zur Sequenzierung ausgewählt.

Zunächst wurde die entsprechende Fraktion einer Rechromatographie unterworfen. Das Rechromatogramm ist in Abb. 5.13 dargestellt. Nach Rechromatographie wurden die Peptide des Peaks manuell gesammelt und einer weitergehenden Untersuchung (MS, Sequenzierung) unterworfen.

Nicht dargestellte weiterführende Untersuchungen wurden analog mit anderen gesammelten Peptidfraktionen durchgeführt. Diese führten jedoch nicht zum Erhalt von Sequenzdaten.

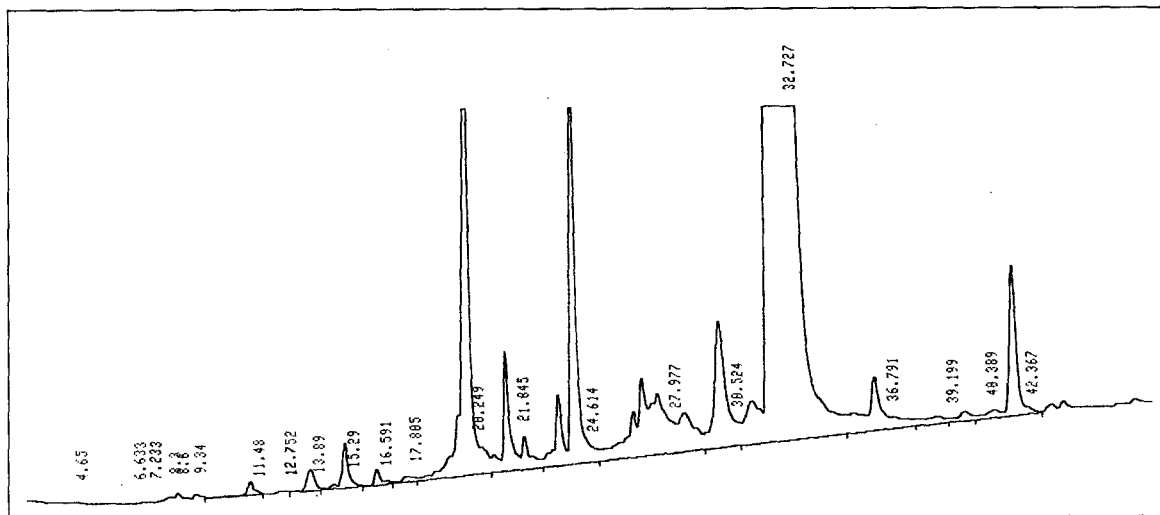


Abb. 5.11 HPLC-Elutionsprofil nach Verdau mit der Endoproteinase Lys-C: Leerwert

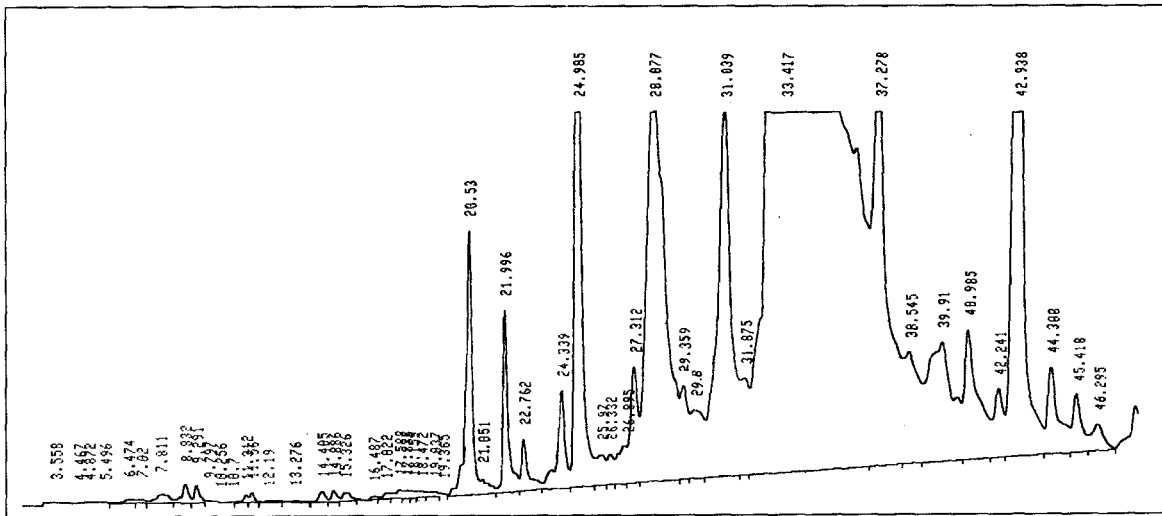


Abb. 5.12 **HPLC-Elutionsprofil nach Verdau mit der Endoproteinase Lys-C: Probe**

Solubilisierte Endosomen des Schweinenierencortex wurden einer Immunadsorption mit dem monoklonalen Antikörper L4D6 unterzogen und die Proteine der Eluatfraktion gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die mittels Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung visualisierte Bande im fraglichen Molekulargewichtsbereich wurde aus dem SDS-Gel herausgeschnitten und einem Verdau mit der Endoproteinase Lys-C im Gel zugeführt. Die entstandenen Peptide wurden mittels RP-HPLC aufgetrennt. Der Leerwert wurde analog zur Probe aus einem Gelstückchen hergestellt, auf dem kein Protein aufgetrennt wurde.

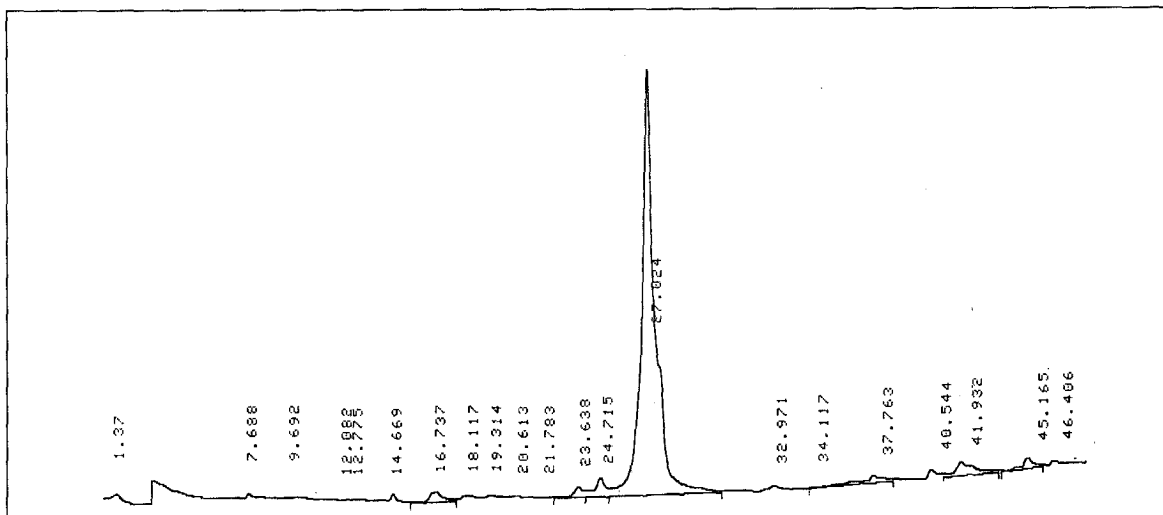


Abb. 5.13 **Rechromatographie einer ausgewählten Peptidfraktion**

Nach Vergleich der beiden vorangegangenen HPLC-Chromatogramme wurde der Peak mit der Retentionszeit 27,312 min, welcher im Leerwertprofil nicht vorhanden war, zur Sequenzierung ausgewählt. Um eine möglichst reine Fraktion in die Sequenzierung einzubringen, wurde die Peptidfraktion einer Rechromatographie unterworfen.

5.9 Massenspektrometrie

Die in der Rechromatographie manuell gesammelte Peptidfraktion mit der Retentionszeit von 27,024 min wurde einer Massenspektrometrie wie in Abschnitt 4.14 beschrieben unterworfen. Das Ergebnis ist in Abb. 5.14 dargestellt.

Im Idealfall sollte anhand der Massenspektrometrie gezeigt werden, daß die untersuchte Peptidfraktion homogen ist, d.h. nur aus einem Peptid besteht. Somit könnte dieses Peptid einer Sequenzierung unterzogen werden, ohne daß Peptidsequenzen marginal vorhandener Peptide das Ergebnis verfälschen würden.

Trotz mehrerer Versuche, unterschiedlichste Peptidfraktionen zu untersuchen, auch solche von weiteren angefertigten Chromatographien nach Lys-C-Verdau, konnte keine Fraktion ermittelt werden, die eine entsprechende Homogenität aufwies: Im dargestellten Massenspektrum sind vorwiegend drei Peptide mit den Massen 1207,4; 1228,2 bzw. 3912,6 Da detektiert worden. Ein Sequenzierungsversuch wurde mit dieser Fraktion durchgeführt.

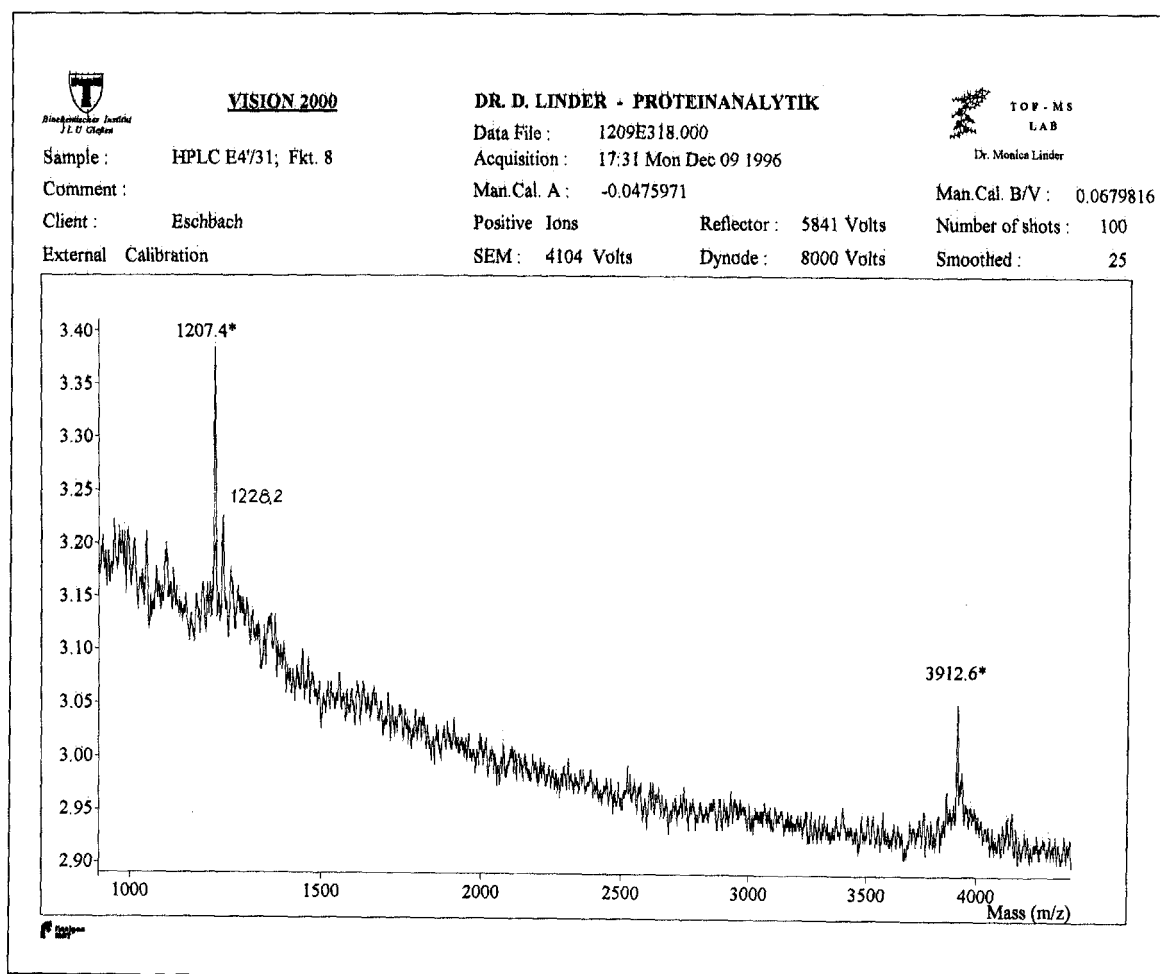


Abb. 5.14 **Massenspektrum einer ausgewählten Peptidfraktion nach Proteinverdau im SDS-Gel, Elution der Peptide und anschließender HPLC-Auftrennung der Peptidfragmente**

Solubilisierete Endosomen des Schweinenierencortex wurden einer Immunadsorption (mAk L4D6) unterworfen und die eluierte Proteinfraction gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinbande im fraglichen Molekulargewichtsbereich wurde ausgeschnitten, im Gel mit der Endoproteinase Lys-C verdaut. Die Peptidfragmente wurden eluiert und mittels RP-HPLC aufgetrennt. Eine manuell gesammelte Peptidfraction wurde rechromatographiert und anschließend der Massenspektrometrie (MALDI-TOF) unterworfen.

5.10 Sequenzierung

Obwohl anhand der Massenspektrometrie (Abb. 5.14) gezeigt werden konnte, daß nach der HPLC Auftrennung der Peptidfragmente (Abb. 5.12) kein homogenes Peptid, sondern vielmehr ein Gemisch aus mindestens drei Peptiden gewonnen werden konnte, wurde die untersuchte Fraction einem Sequenzierungsversuch mittels EDMAN Abbau unterworfen (s. Abschnitt 4.15).

Nach zwölf durchgeführten Sequenzierungsschritten wurde die folgende Peptidsequenz vermutet:

N T E L Q G P R M A A E

Anstelle der zweiten Aminosäure T wurde alternativ ein L bzw. ein G vorgeschlagen. Ebenso anstelle der neunten Position (M) alternativ ein S, bzw. anstelle von Position 11 (A) ein L. Die Aminosäuren 7-12 konnten nur relativ vage aus den vorliegenden Sequenzierungschromatogrammen interpretiert werden. Die vorgeschlagene Aminosäuresequenz wurde als N-Terminus des Peptids mit der Masse 3912,6 Da gedeutet.

Alle Sequenzvorschläge wurden mit Proteindatenbanken verglichen, um Hinweise auf ein eventuelles Vorkommen in bereits bekannten Proteinen zu erhalten. Hierbei konnten keine Homologien gefunden werden.

Unter Zuhilfenahme des Suchprogrammes TFASTA konnte beim Vergleich o.g. Peptidsequenz mit den Gendatenbanken GenBank und EMBL library im Programmpaket HUSAR des GENIUSnets des DKFZ Heidelberg eine 90%ige Homologie mit einem humanen cDNA Klon (accession number H29160) gefunden werden. Von diesem Klon, der aus infantilem Hirngewebe stammt und bisher nicht näher charakterisiert wurde, wurden bisher die Basen 1–457 sequenziert (s. Abb. 5.15). Wird diese Basensequenz in Proteinsequenz übersetzt, enthält sie in einem der drei möglichen Leserahmen zu 90% die Sequenz des vorgeschlagenen Peptids (Abb. 5.16). Die Bedeutung dieser Homologie ist zu diskutieren.

Aminosäuresequenz hiervon wies eine 90%ige Homologie mit der Peptidsequenz auf, wie sie nach durchgeführtem Sequenzversuch vorgeschlagen wurde.

6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das von BIRK und Mitarbeitern (1993) beschriebene nierenspezifische Glykoprotein gp400 durch Immunaffinitätschromatographie zu reinigen. Das gereinigte Protein sollte danach weiterführenden Analysen, z.B. einer Sequenzanalyse, zugeführt werden können.

Als Ausgangsmaterial für die Proteinreinigung soll nach COOPER (1980) ein Gewebe verwendet werden, in dem das gesuchte Protein in größeren Mengen vorkommt, wobei das Gewebe selbst auch in größeren Mengen zur Verfügung stehen sollte. LINN (1980) sieht eine Voraussetzung für die Proteinreinigung darin, daß ein sensitives Testsystem für das aufzureinigende Protein zur Verfügung steht.

GP400 kommt nur in der Niere vor, wobei der N4A4-Antikörper sowohl das Antigen der Humanniere als auch das der Schweineniere erkennt (BIRK et al., 1993). Da zusätzlich der monoklonale Antikörper L4D6 zum Einsatz kommen sollte, dieser aber nicht mit der menschlichen Niere kreuzreagiert, wurde als Ausgangsmaterial die Schweineniere gewählt. Im Vergleich zur Schweineniere wären Humannieren auch nur in geringen Mengen verfügbar gewesen, weshalb auch dies ein Argument für das Ausgangsmaterial Schweineniere war. Als Testsystem für das gesuchte Antigen stand ein von BIRK und Mitarbeitern (1991) entwickelter Festphasen-Radioimmunoassay, mit dessen Hilfe simultan eine große Anzahl von Proben mit hoher Sensitivität analysiert werden können, zur Verfügung.

6.1 Präparation von Endosomen des Nierencortex

Die intrazelluläre Lokalisierung von gp400 wurde von BIRK und Mitarbeitern (1993) beschrieben. Die Autoren konnten das Protein in der intervillären Region und in subapikalen Vesikeln an der luminalen Seite von Zellen des proximalen Tubulus nachweisen. Aufgrund dieser Tatsache erschien eine Präparation dieser Vesikel sinnvoll. SABOLIC und BURCKHARDT (1990) beschrieben eine Präparationstechnik, mit der sie anhand einer Kombination aus Differential- und Dichtegradientenzentrifugation Endosomen, die unterhalb der luminalen Membran des proximalen Tubulus lokalisiert waren, stark anreichern konnten. Die Autoren setzten für ihre Untersuchungen Nierencortex der Ratte ein, konnten aber mit Schweinenieren eine ebenso gute Anreicherung der Endosomenfraktion erzielen. Daher erschien diese Endosomenpräparation sehr gut geeignet, gp400 in einem ersten Schritt anzureichern.

Die Endosomenpräparation wurde wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurde in der jeweils weiterverarbeiteten Fraktion eine Quantifizierung des gp400 mittels Festphasen-Radioimmunoassay vorgenommen. Obwohl nach dem ersten Zentrifugationsschritt eine Anreicherung von gp400 um den Faktor 2,6 erzielt werden konnte,

war nach der zweiten Zentrifugation weniger Antigen mittels Radioimmunoassay nachzuweisen. Gegenüber der Ausgangsmenge war somit vorerst keine Anreicherung mehr vorhanden (s. Abb. 5.1). Nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990) sollte nach der zweiten Zentrifugation das weiche, obere Sediment vorsichtig mit Hilfe des Überstandes abgenommen werden, während das harte, mitochondriale Sediment zurückbehalten werden sollte. Da BIRK und Mitarbeiter (1993) kein Vorkommen von gp400 auf der Mitochondrienmembran beschrieben, muß davon ausgegangen werden, daß das weiche, obere Sediment nur ungenügend abgenommen wurde und somit zu viel gp400 im unteren Sediment zurückblieb und verworfen wurde. Der dritte Zentrifugationsschritt erbrachte im Sediment eine Anreicherung um den Faktor 5,2 bezogen auf das Ausgangsmaterial. Nach der sich anschließenden Dichtegradientenzentrifugation über einen Percollgradienten konnte im Sediment 5, nach Entfernen des Percollmaterials, vorerst keine Anreicherung im Vergleich zum vorherigen Sediment 3 erzielt werden. Die Menge an detektierbarem gp400 war gegenüber der vorangegangenen Fraktion gleichgeblieben. Nach der abschließenden sechsten Zentrifugation war gp400 im Sediment um den Faktor 9,5 gegenüber dem Ausgangsmaterial angereichert. SABOLIC und BURCKHARDT (1990) konnten bei ihrer Endosomenpräparation eine 40fache Anreicherung beobachten. Die Autoren bestimmten die Endosomenanreicherung allerdings funktionell anhand der ATP-abhängigen Protonenaufnahme im Vergleich zum Ausgangshomogenat.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine in den jeweils weiterverarbeiteten Zentrifugationsfraktionen, anschließendem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran und immunologischem Nachweis des gp400 konnte das Ergebnis nach Festphasen-Radioimmunoassay visuell verdeutlicht werden. Wie in Abb. 5.3 dargestellt, konnte die Anreicherung gegenüber der Ausgangsfraktion deutlich sichtbar gemacht werden. Das Ergebnis des Radioimmunoassays konnte somit bestätigt werden. Die erzielte Anreicherung erschien genügend hoch, um die Endfraktion der Endosomenpräparation als Ausgangsmaterial für die sich anschließenden Reinigungsschritte einzusetzen.

6.2 Solubilisierung des N4A4-Antigens

BIRK und Mitarbeiter (1991) postulierten, daß es sich bei gp400 um ein integrales Membranprotein handelt, da dieses erst nach vollständiger Solubilisierung von der Bürstensaummembran freigesetzt werden konnte. Deshalb sollte ein Detergenz gefunden werden, welches gp400 optimal in Lösung bringt. Außerdem sollte die quantitative Erfassung von gp400 mittels Festphasen-Radioimmunoassay auch nach einer Solubilisierung möglich sein. Nach THOMAS und McNAMEE (1990) ist die Stärke einer Antigen-Antikörper-Bindung ausschlaggebend dafür, inwiefern ein immunologischer Nachweis nach Solubilisierung erfolgreich durchgeführt werden kann. Es muß ebenfalls berücksichtigt werden, daß das Detergenz vor einer eventuellen Sequenzierung entfernt werden muß. Nach HJELMELAND

und CHRAMBACH (1984) sind deshalb Detergenzien vorzuziehen, die eine hohe kritische Mizellkonzentration (cmc) und ein niedriges Mizellmolekulargewicht besitzen. Dies ist insbesondere bei ionischen Detergenzien der Fall. Speziell sind hier die Gallensalze sowie das zwitterionische Detergenz CHAPS anzuführen.

Die in Abschnitt 5.2 dargestellten Versuchsergebnisse zeigten, daß sich von den fünf eingesetzten Detergenzien Desoxycholat am besten eignete, gp400 in Lösung zu bringen, gefolgt von Cholat. Generell sind auch HELENIUS und Mitarbeiter (1979) der Meinung, daß die Dihydroxygallensäure Desoxycholat ein wirkungsvolleres Detergenz darstellt als das Trihydroxyderivat Cholat. RENSWOUDE und KEMPF (1984) sind der Meinung, daß sich generell die Gallensäuresalze am besten für die Solubilisierung von Membranproteinen eignen. HJELMELAND und CHRAMBACH (1984) schreiben, daß Gallensäurederivate wesentlich effizienter Proteinkomplexe dissoziieren können als nichtionische Detergenzien.

Leider bildete Desoxycholat in den eigenen Untersuchungen bei neutralem pH-Wert ein zähes Gel und konnte somit aus Praktikabilitätsgründen nicht für spätere Solubilisierungen eingesetzt werden. Auch HELENIUS und SIMONS (1975) beobachteten, daß Natrium-Desoxycholat bei einem pH Wert von 6,9 präzipitiert und bei einem geringfügig höheren pH Wert ein zähes Gel bildet. HELENIUS und Mitarbeiter (1979) sowie RENSWOUDE und KEMPF (1984) beschreiben dieses Phänomen neben Desoxycholat auch für Cholat. Diese Beobachtung konnte in den eigenen Untersuchungen jedoch nicht gemacht werden.

Das zwitterionische Trihydroxygallensäurederivat CHAPS, das sich von Cholat und Desoxycholat nur in seiner Seitenkette des Steroidgrundgerüsts unterscheidet, eignete sich weniger gut für die Solubilisierung von gp400, jedoch besser als die beiden nichtionischen Detergenzien NP-40 und Triton X-100. Wie Cholat und Desoxycholat besitzt CHAPS eine relativ hohe kritische Mizellkonzentration und ein geringes Mizellenmolekulargewicht (THOMAS und McNAMEE, 1990). Sowohl diese Autoren als auch HJELMELAND und CHRAMBACH (1984) schlagen auf jeden Fall vor, dieses Detergenz in Solubilisierungstests mit einzubeziehen. CHAPS besitzt generell gute Solubilisierungseigenschaften und die bereits beschriebenen vorteilhaften physikochemischen Eigenschaften. Triton X-100 und NP-40 dissoziieren Proteinkomplexe weniger effektiv als die ionischen Detergenzien. Manche Proteine sind allerdings in nichtionischen Detergenzien stabiler als in ionischen (THOMAS und McNAMEE, 1990). Im Hinblick auf ein späteres Entfernen des Detergenzes wären beide Detergenzien aufgrund ihrer relativ hohen cmc Werte eher schlecht geeignet gewesen.

Aufgrund der beschriebenen Versuchsergebnisse wurde für die nachfolgenden Untersuchungen Cholat zur Solubilisierung von gp400 herangezogen.

Um die Solubilisierung von gp400 bei unterschiedlichen Cholat-Konzentrationen vergleichen zu können, wurden Konzentrationen zwischen 0,25 und 5 % (w/v) Cholat eingestellt und diese zur Solubilisierung der Endosomenfraktion des Schweinenierencortex eingesetzt. Der

freigesetzte Anteil des gp400 wurde mittels Festphasen-Radioimmunoassay gemessen. Bei ansteigenden Cholatkonzentrationen ergab sich ein sigmoider Kurvenverlauf (s. Abb. 5.4). Mit steigenden Cholatkonzentrationen konnte ein verbessertes Solubilisierungsverhalten des gp400 beobachtet werden, bei hohen Cholatkonzentrationen war die Detektion von gp400 gleichbleibend. Diese Beobachtung konnten auch SIMONDS und Mitarbeiter (1980) bei der Solubilisierung von Opiatrezeptoren mit einem zwitterionischen Derivat von Cholat machen. Nach HJELMELAND und CHRAMBACH (1984) gibt es auch Detergenzien, die bei ansteigenden Konzentrationen verminderte Solubilisierungsqualitäten besitzen, oder andere, bei denen trotz ansteigender Detergenzkonzentration keine Veränderung in der Solubilisierungsqualität beobachtet werden kann. Interessanterweise konnte das starke Ansteigen der Solubilisierungskurve oberhalb der eingesetzten Cholatkonzentration von 0,25 % (w/v) festgestellt werden. Da HJELMELAND und CHRAMBACH (1984) die kritische mizellare Konzentration von Cholat mit 0,36 % (w/v) angeben, wird ersichtlich, daß erst oberhalb dieser Konzentration ein deutlicher Solubilisierungseffekt eintritt. Dieser Effekt wurde vielfach in der Literatur beschrieben (HELENIUS et al., 1979; THOMAS und McNAMEE, 1990). Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse wurde in den späteren Untersuchungen Cholat in einer Konzentration von 2 % (w/v) eingesetzt, um gp400 zu solubilisieren.

6.3 Präparative isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung ist eine für Membranproteine besonders geeignete Separierungsmethode, da diese bei geringen Salzkonzentrationen durchgeführt wird (BLAICHER, 1993). Hohe Salzkonzentrationen wie bei der Ionenaustauschchromatographie würden den hydrophoben Effekt verstärken und zu einer vermehrten Aggregatbildung der Membranproteine führen. Anhand der präparativen isoelektrischen Fokussierung sollte eine weitere Anreicherung des gp400 aus der Endosomenfraktion erzielt werden, bevor die Immunaффinitätschromatographie zum Einsatz kam.

Mit der isoelektrischen Fokussierung konnte eine deutliche Konzentrierung des gp400 erzielt werden (s. Abb. 5.6). Das Entfernen der Ampholyte aus dieser Fraktion mittels Dialyse ist eine allgemein übliche Methode (RADOLA, 1984; GARFIN, 1990). Aufgrund des hohen technischen und zeitlichen Aufwandes dieser Methode erschien es jedoch nicht sinnvoll, diese nach Endosomenpräparation zur zusätzlichen Anreicherung des gp400 einzusetzen.

Der pH-Wert der Fraktion, in der das N4A4-Antigen angereichert war, wurde mit 6,14 im schwach sauren Bereich bestimmt. Kritisch zu beurteilen ist für das N4A4-Antigen die Tatsache, daß bei der isoelektrischen Fokussierung das anionische Detergenz Cholat zur Solubilisierung eingesetzt wurde. Nach HJELMELAND (1990) sollten für auf Ladungen basierende Trennmethoden nicht- oder zwitterionische Detergenzien verwendet werden. GARFIN (1990) empfiehlt ebenfalls die Verwendung des zwitterionischen Detergenzes

CHAPS oder nichtionische Detergenzien. Deshalb ist unklar, wie der gemessene isoelektrische Punkt zu bewerten ist. Das anionische Detergenz könnte mit seiner negativen Ladung dazu beigetragen haben, daß das Antigen im elektrischen Feld näher an die Anode wanderte, als dies ohne Detergenz der Fall gewesen wäre. Deshalb ist es wahrscheinlich, daß der isoelektrische Punkt für das mit Cholat solubilisierte Antigen bei einem niedrigeren pH-Wert liegt als für das native Antigen.

6.4 Affinitätschromatographie mit Concanavalin A

Da BERNOTAT-DANIELOWSKI und Mitarbeiter (1986) gp400 als Glykoprotein beschrieben, wurde eine Affinitätschromatographie mit dem zuckerbindenden Lektin Concanavalin A durchgeführt. In der Summe konnten nur ca. 10 % des gp400-Auftrags nach der Concanavalin A-Affinitätschromatographie mittels Festphasen-Radioimmunoassay wiedergefunden werden. Hiervon befanden sich 9 % im Säulendurchfluß, während im Eluat nur ca. 1 % der ursprünglich eingesetzten gp400-Menge detektiert werden konnte. Es wäre möglich, daß der nicht detektierte gp400-Anteil an Concanavalin A gebunden hat und trotz Elution durch den Methylmannosegradienten nicht von dem Lektin abgelöst werden konnte. Aufgrund der Befunde von RENSWOUDE und KEMPF (1984), daß ionische Detergenzien die Bindungseigenschaften von Lektinen für Glykoproteine reduzieren oder sogar inhibieren, erscheint diese These allerdings eher unwahrscheinlich. Auch LOTAN und Mitarbeiter (1977) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß Concanavalin A nur bis zu einer DOC-Konzentration von 0,25 % (w/v) noch Bindungseigenschaften für Glykoproteine zeigte. Eine andere Interpretationsmöglichkeit wäre die, daß die zur Elution eingesetzte konzentrierte Mannose einen strukturverändernden Einfluß auf das N4A4-bindende Epitop des gp400 ausübt, woraufhin eine Antigen-Antikörperbindung im späteren Festphasen-Radioimmunoassay nicht mehr möglich war. Dieser Interpretationsansatz würde unterstreichen, daß aus der Erfolglosigkeit dieser Versuche nicht ableitbar ist, daß gp400 nicht mit Concanavalin A reagiert. Somit würden die hier dargestellten Versuchsergebnisse nicht dem Befund von BERNOTAT-DANIELOWSKI und Mitarbeitern (1986) widersprechen, daß es sich bei gp400 um ein Glykoprotein handelt.

Die Affinitätschromatographie mit Concanavalin A wurde aufgrund dieser Ergebnisse, die keine Anreicherung des gp400-Anteils erkennen liessen, nicht für eine Vorreinigung von gp400 aus der Endosomenfraktion in Betracht gezogen.

6.5 Immunaффinitätschromatographie

Die Durchführung einer Immunaффinitätschromatographie zur Reinigung von gp400 war aufgrund der Verfügbarkeit des monoklonalen Antikörpers N4A4 naheliegend. Eine mittels Endosomenpräparation im Bezug auf das gp400 vorgereinigte Fraktion sollte in die

Immunaффinitätschromatographie eingehen, um das Antigen in möglichst reiner Form zu gewinnen.

Die gerichtete Kopplung des Antikörpers an ein Immunglobulin-bindendes Protein (ELIASSON et al., 1989) ist vorteilhafter als eine ungerichtete Kopplung an Cyanbromid-aktivierte Sepharose (MARCH et al., 1974). Bei der gerichteten Kopplung bindet der Antikörper das Säulenmaterial über seinen Fc-Teil, während die Fab-Domäne das Antigen ungehindert binden kann. Aufgrund der Tatsache, daß ein muriner IgG₁ eine höhere Affinität zu Protein G besitzt als zu Protein A (AKERSTRÖM et al., 1985), wurde Protein G als Affinitätsmedium ausgewählt. Um zu vermeiden, daß der Antikörper bei den Elutionsbedingungen zusammen mit dem Antigen von der Protein G Säule abgelöst wird, wurde dieser kovalent an das Protein G Material gekoppelt (REEVES et al., 1981). In Anlehnung an HUBERT und Mitarbeiter (1986) erfolgte die Inkubation mit den solubilisierten Proteinen über einen ausgedehnten Zeitraum von ca. 16 Stunden. Die Elution des Antigens erfolgte mit einer basischen Diethylaminlösung (SCHNEIDER et al., 1982). Andere Autoren setzten stark saure Lösungen zur Antigenelution ein (TSUCHIDA und SATO, 1982). Da Cholat bei sauren Bedingungen präzipitiert (RENSWOUDE und KEMPF, 1984), verbot sich diese Möglichkeit im vorliegenden Ansatz von vorneherein.

Die Immunaффinitätschromatographie mit dem monoklonalen Antikörper N4A4 brachte keinen nachweisbaren Erfolg. In der Eluatfraktion konnte weder mittels Festphasen-Radioimmunoassay noch im SDS-Polyacrylamidgel eine Anreicherung des N4A4-Antigens gezeigt werden. Dieser Befund muß dahingehend interpretiert werden, daß das solubilierte gp400 bei Anwesenheit von 2 % (w/v) Cholat nicht vom monoklonalen Antikörper N4A4 gebunden werden konnte.

Reinigungsprotokolle, die ein zuvor mit Detergenzien behandeltes Antigen mittels Immunadsorption anreichern konnten, sind in der Literatur beschrieben (SCHNEIDER et al., 1982; TSUCHIDA und SATO, 1983; KITTELBERGER und NEALE, 1990). Hierbei setzten TSUCHIDA und SATO (1983) ein polyklonales Antiserum zur Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose ein, während die zudem genannten Arbeitsgruppen monoklonale Antikörper verwendeten. Nach THOMAS und McNAMEE (1990) ist die Stärke der Antigen-Antikörper Bindung der kritische Faktor, wenn Antikörper ihr Antigen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Detergenzien binden sollen. Die Autoren schlagen deshalb vor, das Antigen über einen ausgedehnten Zeitraum mit der Immunaффinitätssäule zu inkubieren. Dennoch ist die Tatsache, daß ein solubiliertes Antigen nicht mehr von seinem Antikörper gebunden werden kann, ein in der Literatur häufig beschriebenes Phänomen (BJERRUM, 1977; HELENIUS et al., 1979; HJELMELAND und CHRAMBACH, 1984). HELENIUS und SIMONS (1975) schreiben, daß kationische Detergenzien viele Membranproteine auf eine ähnliche Weise wie SDS zu denaturieren scheinen. Eine konzentrationsabhängige Bindungshemmung zwischen gp400 und N4A4-Antikörper unter dem Einfluß von SDS konnte bereits von BIRK (1992) gezeigt werden. Die Tatsache, daß beim nachfolgenden

Nachweis des gp400 mittels Festphasen-Radioimmunoassay die Proben auf eine Cholatkonzentration von 0,05 % (w/v) verdünnt wurden, beweist nicht, daß auch bei der höheren Detergenzkonzentration von 2 % (w/v) eine Antigen-Antikörperbindung stattfinden kann.

Die kovalente Kopplung des monoklonalen Antikörpers N4A4 an das Protein G Material mit Hilfe des Crosslinking Reagenzes DMP könnte sich ebenfalls negativ auf seine Bindungsfähigkeit ausgewirkt haben. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß die stark basischen Bedingungen bei Elution (pH 11,5) das Epitop des Antigens denaturiert hatten, woraufhin im Festphasen-Radioimmunoassay keine Antigen-Antikörperbindung mehr eingegangen werden konnte. Ähnliches beschreiben auch RENSWOUDE und KEMPF (1984).

Von BIRK und Mitarbeitern (1993) wurde ein weiterer monoklonaler Antikörper L4D6 beschrieben, dessen Antigen verglichen mit dem N4A4-Antigen eine identische immunhistologische Lokalisierung aufwies und ebenfalls Nierenspezifität zeigte. Das apparente Molekulargewicht des N4A4-Antigens wurde mit 400 kDa, das des L4D6-Antigens mit 440 und 50 kDa angegeben, wobei allerdings unterschiedliche Methoden zur Molekulargewichtsbestimmung eingesetzt wurden. Das Molekulargewicht des N4A4-Antigens wurde im Western Blot nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmt. Da der monoklonale Antikörper L4D6 keine positive Reaktion im Western Blot zeigte, wurde dieser biotinyliert und an Streptavidinkügelchen gekoppelt, um anschließend mit ¹²⁵J-markierten und mit 1 % (w/v) NP-40 solubilisierten Bürstensaummembranproteinen inkubiert zu werden. Die von L4D6 gebundenen Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mittels Silberfärbung visualisiert.

Aufgrund der beschriebenen Lokalisierungen und des nahezu identischen Molekulargewichtes konnte vermutet werden, daß das Antigen beider monoklonaler Antikörper identisch sei. Deshalb wurde nach Fehlschlagen der Immunadsorption mit dem monoklonalen Antikörper N4A4 der Antikörper L4D6 eingesetzt, zumal diese Methode im Prinzip bereits von BIRK und Mitarbeitern (1993) erfolgreich angewandt werden konnte. Das L4D6-Antigen konnte nach diesen Versuchen als eindeutige Bande im Silbergel nachgewiesen werden. Somit scheint die L4D6-Antigen-Bindung im Vergleich zum N4A4 trotz Anwesenheit von Detergenz weniger denaturierungsanfällig und somit stabiler zu sein. Nach Blottransfer des L4D6-Antigens auf eine Nitrocellulosemembran konnte mittels Autoradiographie gezeigt werden, daß der monoklonale Antikörper N4A4 an das L4D6-Antigen bindet. Somit konnte bewiesen werden, daß beide monoklonale Antikörper gegen das gleiche Antigen gerichtet sind. Aus der Tatsache, daß der N4A4-Antikörper im Gegensatz zum L4D6 mit der menschlichen Niere kreuzreagiert (BIRK et al., 1993) kann abgeleitet werden, daß die beiden monoklonalen Antikörper gegen unterschiedliche Epitope des Antigens gerichtet sind. Während das Epitop des L4D6-Antigens speziesspezifische

Modifikationen aufweist, scheint das Epitop des N4A4-Antigens einer konservierten Proteinregion zuzuordnen zu sein.

Drei Proteine, die zusammen mit dem gp400 von der L4D6-Immunaффinitätssäule eluierten, konnten im Silbergel sichtbar gemacht werden. Deren Molekulargewicht wurde mit ca. 54, 78 bzw. 105 kDa nach WEBER und OSBORN (1969) ermittelt. Aufgrund der Tatsache, daß diese drei Proteinbanden ebenfalls nachgewiesen werden konnten, wenn Solubilisierungspuffer ohne Antigen auf eine L4D6-gekoppelte Protein G-Säule aufgetragen und mit basischem Diethylamin eluiert wurde, kann ausgeschlossen werden, daß diese Proteine vom Antigen herrühren. Es erscheint somit wahrscheinlich, daß diese Proteine entweder vom gekoppelten Antikörper oder vom Protein G der Säule herrühren. Das Molekulargewicht von Protein G wird in der Literatur kontrovers angegeben. BJÖRCK und KRONVALL (1984) konnten im SDS-Gel ein apparentes Molekulargewicht von 30 kDa für Protein G ermitteln. Die Autoren führten einen Papain Verdau durch, um Protein G aus der Zellmembran der Streptokokken herauszulösen. Zwei Arbeitsgruppen klonierten den Fc Rezeptor der Streptokokken: FAHNESTOCK und Mitarbeiter (1986) isolierten ein Gen, das für ein Protein der Masse 47 kDa kodiert. GUSS und Mitarbeiter (1986) fanden zusätzliche Basenpaare und sagten ein Protein der Masse 51 kDa voraus. Aufgrund dieser Größenheterogenität und anderen Unterschieden hinsichtlich Stabilität und Selektivität untersuchten FAULMANN und Mitarbeiter (1989) kommerziell erhältliche Wildtyp- und rekombinante Formen von Protein G. Hierbei konnte das Molekulargewicht des in der vorliegenden Arbeit verwendeten rekombinanten Protein G von Pharmacia mit 28 kDa ermittelt werden. Somit könnte postuliert werden, daß die visualisierten Proteine Multimere des Protein G Moleküls darstellen. Da die drei Proteine jedoch ebenfalls von den Antikörpermolekülen herrühren könnten, kann deren wirkliche Identität hier nicht abschließend geklärt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß mit Hilfe der Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers L4D6 das gesuchte gp400 nach vorheriger Vesikelpräparation und Solubilisierung der Membranproteine aufgereinigt werden konnte. Im Silbergel wurde eine definierte Bande im vorhergesagten Molekulargewichtsbereich identifiziert. Die drei Proteine, die neben gp400 im Eluat nachgewiesen wurden, spielten quantitativ eine eher untergeordnete Rolle. Außerdem konnte gezeigt werden, daß diese Proteine nicht vom Antigen herrühren.

6.6 Weiterführende Untersuchungen nach der Reinigung von gp400: Massenspektrometrie und Sequenzierung

Nach den Immunaффinitätschromatographien wurde die Menge an aufgereinigtem und konzentriertem gp400 mittels Aminosäurenanalyse auf 125 pmol bzw. ca. 50 µg abgeschätzt. Nach KELLNER und Mitarbeiter (1994) stellt die Aminosäurenanalyse die Methode der Wahl

dar, um bei Proteinmengen im Mikromaßstab quantitative Informationen abzuschätzen. Für die danach beabsichtigte Aminosäuresequenzanalyse sind nach LOTTSPREICH und Mitarbeitern (1994) bereits 10 pmol Protein ausreichend, während EDMAN (1950) mit 10 nmol noch die tausendfache Menge forderte. Allerdings gibt KELLNER (1994) zu bedenken, daß für eine interne Sequenzanalyse ca. 5-10 mal mehr Material benötigt wird als für den direkten N-terminalen Ansatz. Der Autor begründet dies damit, daß die Fragmentierung und die sich anschließende Isolierung der Peptide einen Proteinverlust bedingen.

Vor der Aminosäuresequenzanalyse wurden die Eluatfraktionen von ca. 100 Immunaффinitätschromatographien über Centriplus™-Konzentratoren auf ca. 1 ml eingengt. Hierbei sollte gleichzeitig das restliche Detergenz entfernt werden, da dieses sogar in geringen Mengen mit der sich anschließenden Edman-Chemie interferieren würde (LOTTSPREICH et al., 1994). Laut Herstellerangaben eignen sich diese Konzentratoren zur Entfernung von kleinen Molekülen, z.B. Detergenzien, aus Lösungen. So konnte z.B. aus einer 5 %igen (w/v) Natrium-Desoxycholatlösung das Detergenz nach einer Zentrifugation zu mehr als 90 % entfernt werden. THOMAS und McNAMEE (1990) beurteilen diese Konzentrierungsmethode jedoch insbesondere für Membranproteine sehr kritisch. Membranproteine können hierbei irreversibel aggregieren und sich bei gleichzeitiger Zentrifugation auf der Filtermembran absetzen. Im vorliegenden Fall kann demnach nicht ausgeschlossen werden, daß bei diesem Schritt eine unbestimmte Proteinmenge verlorengegangen ist und somit weniger Protein als eigentlich angenommen in die weiteren Analysen eingegangen ist.

Der enzymatische Verdau eines Proteins im SDS-Gel ist eine etablierte Methode, um die so erhaltenen internen Peptide einer anschließenden Sequenzierung zuzuführen (ROSENFELD et al., 1992; FIEDLER et al., 1994). Da ca. 50 % aller natürlich vorkommenden Proteine N-terminal blockiert sind (LOTTSPREICH et al., 1994) und diese deshalb initial keiner Sequenzierung nach EDMAN (1950) zugeführt werden können, bietet die interne Spaltung eine Möglichkeit, dies zu umgehen. ECKERSKORN und LOTTSPREICH (1993) beschreiben alternativ die Möglichkeit, das im SDS-Gel separierte Protein auf eine Membran zu blotten, und dieses Protein mitsamt der Membran direkt in die Aminosäuresequenzanalyse einzubringen. Die Autoren sehen einen Vorteil darin, daß nur wenige Schritte bis zur Sequenzierung nötig sind, was mit weniger Proteinverlust gleichbedeutend ist. Außerdem ist die Methode sehr zeitsparend und das Protein kann meist kontaminationsfrei der Sequenzierung zugeführt werden. Für das gp400 wurde diese Methode nicht herangezogen, da die Transferrate beim Elektroblothing vom Molekulargewicht eines Proteins abhängig ist (BURNETTE, 1981) und bei dem 400 kDa großen Antigen ein Proteinverlust wahrscheinlich gewesen wäre. Die Bloteffizienz kann hierbei auch durch eine Verringerung der Acrylamidkonzentration im Gel nur unwesentlich beeinflusst werden (GERSHONI und PALADE, 1983).

Die Auftrennung der eluierten Peptidfragmente mittels RP-HPLC sowie deren Sequenzanalyse erfolgte nach LINDER und Mitarbeitern (1994), wobei die einzelnen Peptidfraktionen nach RP-HPLC z.T. einer Rechromatographie unterworfen wurden, um die Auflösung zu erhöhen (SERWE und MEYER, 1994). Nach RP-HPLC hatte auch der Leerwert ein Elutionschromatogramm mit ähnlichem Profil wie das der eluierten Peptide (s. Abb. 5.11 und 5.12). Die Absorptionspeaks im Chromatogramm des Leerwertes müssen von Substanzen herrühren, die zur Erstellung des SDS-Polyacrylamidgels verwendet wurden, da hierbei kein Protein auf das Gel aufgetragen wurde. Eine quantitative Beurteilung beider Chromatogramme ließ keine signifikanten Proteinmengenunterschiede in beiden Proben erkennen. Deshalb muß in Erwägung gezogen werden, daß der Großteil des Proteins bereits in den vorangegangenen Arbeitsschritten verloren ging. Die Reinheit einzelner Chromatographiefraktionen wurde anhand von MALDI-MS überprüft (BAHR et al., 1994). Die erstellten Massenspektren konnten in den eigenen Untersuchungen keine Fraktion ermitteln, in der nur ein Peptid enthalten war. Der Versuch einer Aminosäuresequenzanalyse wurde dennoch unternommen. Leider reichte die eingesetzte Probenmenge nicht aus, um die Sequenz bis zum C-terminalen Ende des Peptids zu ermitteln, wie die unsichere Interpretation der letzten Sequenzierschritte zeigte.

Die gefundene Sequenz besaß eine 90 %ige Homologie zu einem humanen cDNA Klon, der aus infantilem Hirngewebe stammte. Dieses Gewebe wurde von BIRK und Mitarbeitern (1993) nicht hinsichtlich der Expression von gp400 untersucht. Rückenmarkszellen zeigten allerdings keine gp400-Expression. Es muß an dieser Stelle diskutiert werden, inwiefern die ermittelten Sequenzdaten tatsächlich die Aminosäuresequenz von gp400 wiedergeben. Falls es während der Aufkonzentrierung über die CentriplusTM-Konzentratoren zur Proteinaggregation und -ausfällung kam, war die Gefahr groß, daß diese Aggregate sich auf der Filtermembran absetzten. Inwiefern das mehrmalige Spülen der Filtermembran mit dem verwendeten SDS-Probenpuffer derartige Aggregate ablösen konnte, kann nicht beantwortet werden. Die Tatsache allerdings, daß nach der Proteinauftrennung im SDS-Gel mit Coomassie Brilliant Blue eine Bande im fraglichen Molekulargewichtsbereich angefärbt werden konnte, zeigt zumindest, daß eine nicht mehr quantifizierbare Proteinmenge in die weiterführenden Analysen einging. Das Eluieren der Peptidfragmente aus der Gelmatrix stellte den nächsten kritischen Schritt in der Probenaufbereitung dar. Da jedoch zum einen der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue aus den Gelstückchen eluiert wurde, und zum anderen eine Silberfärbung der Gelstückchen nach Elution der Peptide (HEUKESHOVEN und DERNICK, 1985) keine Färbung mehr hervorrief, muß davon ausgegangen werden, daß die zu diesem Zeitpunkt noch vorhandenen Peptide erfolgreich aus dem Gel eluiert wurden. Da das Chromatographieprofil von Leerwert und Probe in der sich anschließenden RP-HPLC keinen signifikanten Proteinmengenunterschied erkennen ließ, liegt der Schluß nahe, daß der Großteil des gereinigten gp400 bereits zuvor verlorengegangen ist und somit nicht genügend Protein in die Aminosäuresequenzanalyse eingegangen ist. Die Tatsache, daß in der für die Sequenzierung eingesetzten Fraktion drei verschiedene Peptide enthalten waren, erschwert zudem die Interpretation der Sequenzierchromatogramme bzw. stellt diese

komplett in Frage. Die ermittelten Sequenzdaten können somit nicht sicher dem gp400 zugeordnet werden. Eine eventuelle Homologie zwischen dem humanen cDNA-Klon H29160 und gp400 ist demnach rein spekulativ.

6.7 Identität von gp400 und Heymann-Nephritis-Antigen Megalin?

Eine Identität von gp400 mit dem Heymann-Nephritis-Antigen Megalin/gp330 wurde bereits von BIRK und Mitarbeitern (1993) zur Diskussion gestellt. Besonders das apparente Molekulargewicht beider Proteine, deren auf den proximalen Tubulus der Niere beschränkte Expression sowie deren intrazelluläre Lokalisierung nährten diese Vermutung. Das Molekulargewicht von Megalin wurde zuerst mit 330 kDa angegeben (KERJASCHKI und FARQUHAR, 1982), später mit 440 kDa (BACHINSKY et al., 1993). Zur Molekulargewichtsbestimmung setzten KERJASCHKI und FARQUHAR (1982) reduzierte SDS-Gele ein, während BACHINSKY und Mitarbeiter (1993) nicht-reduzierte SDS-Gele verwendeten. Nach Klonierung und Sequenzierung gaben SAITO und Mitarbeiter (1994) das Molekulargewicht mit 516 kDa an. Megalin ist eines der häufigsten Membranproteine im proximalen Tubulus (KERJASCHKI und FARQUHAR, 1982) und kommt dort in der apikalen intermikrovillären Domäne und in endozytotischen Vesikeln vor (KERJASCHKI et al., 1984). Da Megalin im Unterschied zum gp400 allerdings auch in extrarenalen Geweben exprimiert wird (ZHENG et al., 1994) kamen BIRK und Mitarbeiter (1993) zu dem Schluß, daß das gp400 höchstwahrscheinlich ein von Megalin verschiedenes Protein ist.

Der isoelektrische Punkt von Megalin liegt bei 4,6 (MAKKER, 1993). In der vorliegenden Arbeit konnte der isoelektrische Punkt von gp400 mit 6,14 bestimmt werden, wobei zu berücksichtigen ist, daß ein anionisches Detergenz bei der isoelektrischen Fokussierung eingesetzt wurde. Es bleibt deshalb fraglich, inwiefern die Tatsache, daß beide isoelektrischen Punkte im sauren Bereich liegen, einen Hinweis auf eine eventuelle Identität beider Proteine liefert.

KOUNNAS und Mitarbeiter (1992) beschreiben ein 39 kDa großes, sog. Rezeptor-assoziiertes Protein, das bei der Affinitätschromatographischen Reinigung von Megalin stets gemeinsam mit Megalin aufgereinigt wurde und im Silbergel dargestellt werden konnte. Da in der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteinfraction nach Immunadsorption mit dem monoklonalen Antikörper L4D6 keine Proteinbande im Molekulargewichtsbereich von 39 kDa gefunden werden konnte, können auch hieraus keine Schlüsse auf eine eventuelle Identität von Megalin und gp400 gezogen werden.

KERJASCHKI und Mitarbeiter (1987) beschrieben zusätzlich ein humanes Äquivalent des Megalins. Dieses Protein, dessen Molekulargewicht die Autoren mit 400 kDa angaben, konnte in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus nachgewiesen werden; genauer an der Basis der Mikrovilli und in den Clathrin enthaltenden Vesikeln. Somit könnte

eine Identität bzw. Homologie mit gp400 vermutet werden. Da das humane 400 kDa Protein allerdings neben dem proximalen Tubulus auch in den Coated Pits von parietalen Epithelzellen der Bowmanschen Kapsel nachgewiesen werden konnte (KERJASCHKI et al., 1987) und diese Lokalisierung von BIRK und Mitarbeitern (1993) für das gp400 nicht untersucht wurde, kann das Identitätsproblem vorerst nicht gelöst werden. Auch machen KERJASCHKI und Mitarbeiter (1987) keine Angaben über ein Vorkommen ihres humanen 400 kDa Proteins in extrarenalen Geweben.

6.8 Alternative Vorgehensweisen

Nach der erfolgreichen Reinigung von gp400 müssen nun weitere Versuche zur Aufklärung von Funktion und Sequenz des Proteins erfolgen.

Die im SDS-Gel nach Silberfärbung visuell quantitative Beurteilung der von der Immunaффinitätssäule eluierten Proteine deutete daraufhin, daß die drei parallel eluierten niedermolekularen Proteine im Vergleich zum gp400 in geringerer Menge vorlagen. Wenn die Möglichkeit bestünde, die Sequenz des dominanten gp400 fehlerfrei zu lesen, könnte dieses Proteingemisch direkt einer Sequenzanalyse zugeführt werden. Nach LOTTSPREICH und Mitarbeitern (1994) kann die Interpretation einer Haupt- und einer Nebensequenz nur erfolgreich sein, wenn z.B. in einem Gemisch zweier Proteine die individuellen Mengen signifikant unterschiedlich sind. Die Autoren machen in diesem Zusammenhang die Angabe, daß selbst bei einem Massenverhältnis von 2:1 die Sequenzinterpretation nicht gesichert ist. Insofern erscheint es eher unwahrscheinlich, daß die Analyse des von der Säule eluierten Proteingemisches eine gesicherte Sequenzinformation liefern würde. Die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erscheint demnach weiterhin sinnvoll, um das gesuchte Antigen von den niedermolekularen Proteinen zu separieren. Eventuell könnte auch eine RP-HPLC direkt nach der Immunaффinitätschromatographie zur Trennung des Proteingemisches eingesetzt werden. Die Eignung der RP-HPLC für diese Anwendung müßte überprüft werden. Sollte es gelingen, das Proteingemisch nach der Immunaффinitätssäule bereits über RP-HPLC aufzutrennen, wäre sowohl die Aufkonzentrierung als auch die Separierung mittels SDS Gel überflüssig. Nach LOTTSPREICH und Mitarbeitern (1994) wäre bei dieser Vorgehensweise ein Vorteil darin zu sehen, daß ein Arbeitsschritt weniger anfallen würde. Gerade bei Proteinmengen im Mikrogrammbereich könnte ein unspezifischer Proteinverlust somit eingedämmt werden. Der Verdau des Proteins würde dann gleichfalls nicht im Gel, sondern in Lösung stattfinden.

Sollte der beschriebene Ansatz nicht erfolgreich sein, müßten die Immunaффinitätsfraktionen jedoch nach wie vor aufkonzentriert werden bzw. einer Proteinseparierung zugeführt werden. SERWE und MEYER (1994) sehen in der RP-HPLC die effizienteste Separierungsmethode für Peptide und Proteine. Dies sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab. Die Effizienz liegt nach Meinung der Autoren einerseits in der Vielzahl der einsetzbaren

mobilen und stationären Phasen begründet, andererseits können auch viele unterschiedliche Säulendurchmesser hinsichtlich ihrer Eignung getestet werden.

Die weitere Vorgehensweise (Auftrennung der Peptidfragmente mittels RP-HPLC, Massenspektrometrie, Aminosäuresequenzanalyse) ist etabliert (LINDER et al. 1994) und erscheint weiterhin sinnvoll. Wenn eine Peptidsequenz erfolgreich gelesen werden kann, kann diese für eine Datenbankanalyse verwendet werden.

Als Alternative zur proteinbiochemischen Aufreinigung und Sequenzanalyse könnten molekularbiologische Techniken zur Identifizierung des gp400 eingesetzt werden. Ein erster Schritt wäre hierbei die Erstellung einer Expressionsbibliothek mittels mRNA, die aus renalem Cortex des Schweines isoliert wurde. Diese Bibliothek könnte mit Hilfe der beiden monoklonalen Antikörper N4A4 oder L4D6 gescreent werden. VEYHL und Mitarbeiter (1993) setzten in ihren Untersuchungen bereits eine Expressionsbibliothek des Nierencortex vom Schwein ein. Eine Expressionsklonierung in Oozyten wie von BOLL und Mitarbeitern (1996) beschrieben, dürfte für das gp400 nicht sinnvoll sein, da keine funktionelle Nachweismethode für das gesuchte Antigen existiert. Falls mittels Aminosäuresequenzanalyse erfolgreich eine Peptidsequenz des gp400 gefunden werden könnte, könnte auch eine aus der erhaltenen Peptidsequenz abgeleitete DNA-Sequenz als Sonde zum Screenen der Expressionsbibliothek zum Einsatz kommen. Positive Klone müßten isoliert und ihre DNA sequenziert werden. Mit den erhaltenen DNA-Sequenzen könnten Datenbanken nach weiteren Informationen abgesucht werden. Eine Übersetzung der DNA-Sequenz in eine Proteinsequenz gäbe hierbei weitere Hinweise über das gesuchte Antigen.

7 Zusammenfassung

Durch die Immunisierung von Mäusen mit renalen Bürstensaummembranen vom Schwein wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. H. Koepsell eine Reihe von monoklonalen Antikörpern generiert, die bereits ausführlich charakterisiert wurden. Das nierenspezifische Antigen des monoklonalen Antikörpers N4A4 wurde von den Autoren als gp400 bezeichnet. Klinisch konnte eine Eignung des monoklonalen Antikörpers N4A4 für die nichtinvasive Urindiagnostik nachgewiesen werden, da gp400 bereits unter physiologischen Bedingungen in den Urin ausgeschieden wird. Da gp400 auch in Nierenzellkarzinomen proximaltubulären Ursprungs exprimiert wird, wird derzeit untersucht, inwiefern der Antikörper in Diagnostik und Therapie dieser Tumoren eingesetzt werden kann.

Die Identität von gp400 ist bisher nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit hatte deshalb das Ziel, dieses Protein mit Hilfe von proteinchemischen und immunologischen Methoden aufzureinigen, um nachfolgend eine Sequenzierung zu ermöglichen.

Initial konnte mit einer Endosomenpräparation aus dem Nierencortex von Schweinen eine ca. zehnfache Anreicherung des gp400 erzielt werden. Diese Vesikelfraktion wurde als Ausgangsmaterial für die sich anschließenden Reinigungsschritte eingesetzt. Für die Solubilisierung von gp400 wurde nach einem Vergleich verschiedener Detergenzien die anionische Detergenz Cholat in einer Konzentration von 2 % (w/v) ausgewählt.

Die Lektinaffinitätsreinigung mit Concanavalin A konnte keine weitere Anreicherung des gp400 erzielen. Dies lag sehr wahrscheinlich an Wechselwirkungen zwischen Lektin und Detergenz. Die isoelektrische Fokussierung erbrachte zwar eine weitere Konzentrierung des gp400, kam jedoch aufgrund des hohen technischen und zeitlichen Aufwands nicht zum Einsatz. Der isoelektrische Punkt von gp400 wurde mit 6,14 bestimmt.

Zur Immunaффinitätschromatographie kam eine Protein G Säule mit kovalent gekoppelten monoklonalen Antikörpern zum Einsatz. Mit dem monoklonalen Antikörper N4A4 konnte gp400 nicht isoliert werden. Es wurde angenommen, daß die gleichzeitige Anwesenheit des Detergenzes Cholat eine Antigen-Antikörperbindung unterband. Unter Einsatz des monoklonalen Antikörpers L4D6 gelang die Isolierung von gp400. Da der monoklonale Antikörper N4A4 im Western Blot mit dem von der L4D6-Säule eluierten Protein positiv reagierte, konnte bewiesen werden, daß das Antigen beider Monoklonaler identisch ist. Die L4D6-Säule wurde deshalb für die Isolierung des gp400 eingesetzt. Ca. 125 pmol des gesuchten Proteins konnten somit gewonnen werden.

Das aufgereinigte Protein sollten nach Konzentrierung mittels Ultrafiltration und enzymatischem Verdau im Gel einer Aminosäuresequenzanalyse zugeführt werden. Obwohl hierbei vage eine Sequenz gelesen werden konnte, die eine 90 %ige Homologie zu einem nicht näher definierten humanen cDNA Klon besaß, muß angezweifelt werden, daß

diese Sequenzdaten dem gp400 zuzuordnen sind. Vermutlich ging der Großteil des aufgereinigten gp400 bereits bei der Ultrafiltration verloren.

8 Summary

Immunizing of mice with porcine renal brush border membranes by Prof. H. Koepsell and coworkers resulted in the generation of different monoclonal antibodies. These antibodies already have been characterized in detail. One of these monoclonal antibodies, N4A4, recognizes a kidney specific antigen named gp400 and can be used for noninvasive urinary diagnostics as gp400 is excreted into the urine under physiological conditions. As gp400 is expressed in renal cell carcinomas of proximal tubular origin a current study determines whether N4A4 can be used as a diagnostic tool or a therapeutic agent for these tumors.

Since the identity of gp400 is still not known, the goal of the here presented work was the purification of gp400 with biochemical and immunological methods to allow amino acid sequencing.

An approximate tenfold enrichment of gp400 could be initially achieved by vesicle preparation of porcine renal cortex. This vesicular fraction was used as starting material for further purification steps. After comparing different detergents, the anionic detergent cholic acid was used at a concentration of 2 % (w/v) to solubilize gp400.

Lectin affinity purification with concanavalin A did not result in an enrichment of gp400, probably due to interactions between lectin and detergent. In contrast isoelectric focusing could be used to further concentrate gp400 and to determine its isoelectric point at 6,14, but was not practical for large-scale purification.

Therefore we tried Protein G with covalently coupled monoclonal antibodies as immuno affinity chromatography. GP400 could not be purified using N4A4 most likely due to interference between cholic acid and the antigen-antibody-binding. However, after using L4D6 isolation of gp400 was achieved. As N4A4 showed a positive reaction in western blotting of the protein eluted from the L4D6 column it was proven that the antigen of both monoclonals is identical. A total of 125 pmol of gp400 could be recovered.

After concentration by ultrafiltration and in gel digest an attempt was made to determine the amino acid sequence of gp400. Although some sequence data, which showed 90% homology to a protein encoded by a yet uncharacterized human cDNA clone could be obtained it should be doubted whether the sequence belongs to gp400. Presumably the biggest amount of purified gp400 was already lost during ultrafiltration.

9 Literatur

- AKERSTRÖM, B.; BRODIN, T.; REIS, K.; BJÖRCK, L. (1985): Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.* **135**, 2589-92
- ALTMANNBERGER, M.; BIRK, H. W.; WAGNER, F.; FITH, H.; OSBORN, M. (1988): Differenzierung in embryonalen Tumoren. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **72**, 150-63
- BACHINSKY, D. R.; ZHENG, G.; NILES, J. L.; LAUGHLIN, Mc, M.; ABBATE, M.; ANDRES, G.; BROWN, D.; CLUSKEY, Mc, R. T. (1993): Detection of two forms of gp330. Their role in Heymann Nephritis. *Am. J. Pathol* **143**, 598-611
- BAHR, U.; KARAS, M.; HILLENKAMP, F. (1994): Analysis of biopolymers by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. In: KELLNER, R.; LOTTSCHEICH, F.; MEYER, H. E. (Hrsg.): *Microcharacterization of proteins*. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 149-66
- BERNOTAT-DANIELOWSKI, S.; BIRK, H.-W.; JAQUES, G.; HAASE, W.; KOEPESELL, H. (1986): Monoklonale Antikörper gegen Proteine aus Bürstensaummembranen proximaler Tubuli von Schweinenieren. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* **15** (9), 383
- BERTRAN, J.; WERNER, A.; STANGE, G.; MARKOVICH, D.; BIBER, J.; TESTAR, X.; ZORZANO, A.; PALACIN, M.; MURER, H. (1992): Expression of Na⁺-independent amino acid transport in *Xenopus laevis* oocytes by injection of rabbit kidney cortex mRNA. *Biochem. J.* **281**, 717-23
- BIRK, H.-W. (1992): *Analyse der Urinexkretion renaler Bürstensaumproteine mit Hilfe monoklonaler Antikörper*. Justus-Liebig-Universität Giessen, Habilitationsschrift
- BIRK, H. W.; KOEPESELL, H. (1987): Reaction of monoclonal antibodies with plasma membrane proteins after binding on nitrocellulose: renaturation of antigenic sites and reduction of nonspecific antibody binding. *Anal. Biochem.* **164**, 16-22
- BIRK, H. W.; OGIERMANN, M.; ALTMANNBERGER, M.; SCHÜTTERLE, G.; HAASE, W.; KOEPESELL, H. (1993): Monoclonal antibodies against luminal membranes of renal proximal tubules which are kidney-specific. *Biochim. Biophys. Acta* **1148**, 67-76
- BIRK, H. W.; PIBERHOFER, S.; SCHÜTTERLE, G.; HAASE, W.; KÖTTING, J.; KOEPESELL, H. (1991): Analysis of Na⁺-D-glucose cotransporter and other renal brush border proteins in human urine. *Kidney Int.* **40**, 823-37

- BIRK, H.-W.; SCHOEPE, H.; SCHROYENS, W.; KOEPESELL, H.; SCHÜTTERLE, G. (1992): Charakterisierung der Urinexkretion renaler Tubuluszellproteine nach Cisplatinapplikation. *Nieren- u. Hochdruckkrankheiten* **21**, 363 (Abstr.)
- BIRK, H. W.; STÖRKEL, S.; OGIERMANN, M.; ALTMANNBERGER, M.; KOEPESELL, H.; SCHÜTTERLE, G.: unveröffentlichte Ergebnisse
- BJERRUM, O. J. (1977): Immunochemical investigation of membrane proteins. A methodological survey with emphasis placed on immunoprecipitation in gels. *Biochim. Biophys. Acta* **472**, 135-95
- BJÖRCK, L.; KRONVALL, G. (1984): Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J. Immunol.* **133**, 969-74
- BLAICHER, M. (1993): Reinigung von Membranproteinen. *BioTec* **4**, 38-43
- BOESKEN, W. H.; MAMIER, A. (1985): Molekulargewichtsbezogene Urinprotein-Elektrophorese in der Diagnostik von Nierenkrankheiten. *Labormedizin* **9**, 285-91
- BOLL, M.; HERGET, M.; WAGENER, M.; WEBER, W. M.; MARKOVICH, D.; BIBER, J.; CLAUSS, W.; MURER, H.; DANIEL, H. (1996): Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 284-9
- BORREBACK, C. A. K. (1989): Human mAbs produced by primary in-vitro immunization. *Immunol. Today* **9**, 355-9
- BRETSCHER, A.; OSBORN, M.; WEHLAND, J.; WEBER, K. (1981): Villin associates with specific microfilamentous structures as seen by immunofluorescence microscopy on tissue sections and cells microinjected with villin. *Exp. Cell Res.* **135**, 213-9
- BUCHSBAUM, D. J. (1995): Experimental approaches to increase radiolabeled antibody localization in tumors. *Cancer Res.* **55**, 5729s-32s
- BURNETTE, W. N. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203
- CALTON, G. J. (1984): Immunosorbent separations. *Meth. Enzymol.* **104**, 381-7
- CAVALLO, T. (1994): Membranous nephropathy: insights from Heymann nephritis. *Am. J. Pathol.* **144**, 651-8

- CHAPMAN, A. E.; GOLDSTEIN, L. J. (1995): Multiple drug resistance: biologic basis and clinical significance in renal-cell carcinoma. *Sem. Oncol.* **22**, 17-28
- CHOW, W. H.; GRIDLEY, G.; McLAUGHLIN, J.K.; MANDEL, J. S.; WACHOLDER, S.; BLOT, W. J.; NIWA, S.; FRAUMENI, J. F. (1994): Protein intake and risk of renal cell cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 1131-9
- CHRISTENSEN, E. I.; GLIEMANN, J.; MOESTRUP, S. K. (1992): Renal tubule gp330 is a calcium binding receptor for endocytotic uptake of protein. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1481-90
- CHRISTENSEN, E. I.; NIELSEN, S.; MOESTRUP, S. K.; BORRE, C.; MAUNSBACH, A. B.; HEER, de, E.; RONCO, P.; HAMMOND, T. G.; VERROUST, P. (1995): Segmental distribution of the endocytosis receptor gp330 in renal proximal tubules. *Europ. J. Cell Biol.* **66**, 349-64
- COOPER, T. G. (1980): Reinigung von Proteinen. In: COOPER, T. G. (Hrsg.): *Biochemische Arbeitsmethoden*. Walter de Gruyter Berlin, New York, 334-79
- DUBACH, U. C.; LEHIR, M. (1984): Critical evaluation of the diagnostic use of urinary enzymes. *Contr. Nephrol.* **42**, 74-80
- DUBACH, U. C.; LEHIR, M.; GANDHI, R. (1989): Use of urinary enzymes as markers of nephrotoxicity. *Toxicol. Letters* **46**, 193-6
- DUNBAR, B. S.; SKINNER, S. M. (1990): Preparation of monoclonal antibodies. *Methods in Enzymologie* **182**, 670-9
- ECKERSKORN, C.; LOTTSPREICH, F. (1989): Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by gel electrophoresis after tryptic digestion in polyacrylamide matrix. *Chromatographia* **28**, 92-4
- EDMAN, P. (1950): Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.* **4**, 283-290
- EINARSSON, S.; JOSEFSSON, B.; MOELLER, P.; SANCHEZ, D. (1987): Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **282**, 609-18
- EISENBARTH, G. S. (1981): Application of monoclonal antibody techniques to biochemical research. *Anal. Biochem.* **111**, 1-16

- ELIASSON, M.; ANDERSSON, R.; OLSSON, A.; WIGZELL, H.; UHLEN, M. (1989): Differential IgG-binding characteristics of staphylococcal protein A, streptococcal protein G, and a chimeric protein AG. *J. Immunol.* **142**, 575-81
- FAHNESTOCK, S. R.; ALEXANDER, P.; NAGLE, J.; FILPULA, D. (1986): Gene for an immunoglobulin-binding protein from a group G streptococcus. *J. Bacteriol.* **167**, 870-80
- FALKENBERG, F. W.; MAI, U.; PUPPE, C.; RISSE, P.; HERRMANN, G.; HECKING, E.; BREMER, K.; MONDORF, A. W.; SHAPIRA, Z. (1986): Kidney-derived urinary antigens assayed with monoclonal antibodies for the detection of renal damage. *Clinica Chimica Acta* **160**, 171-82
- FAULMANN, E. L.; OTTEN, R. A.; BARRETT, D. J.; BOYLE, M. D. P. (1989): Immunological applications of type III Fc binding proteins. Comparison of different sources of protein G. *J. Immunol. Meth.* **123**, 269-81
- FIEDLER, K.; PARTON, R. G.; KELLNER, R.; ETZOLD, T.; SIMONS, K. (1994): Vip36, a novel component of glycolipid rafts and exocytotic carrier vesicles in epithelial cells. *EMBO J.* **13**, 1729-40
- FINNEY, R. (1973): The value of radiotherapy in the treatment of hypernephroma - a clinical trial. *Br. J. Urol.* **45**, 258-69
- GARFIN, D. E. (1990): Isoelectric focussing. *Meth. Enzymol.* **182**, 459-77
- GERSHONI, J. M.; PALADE, G. E. (1983): Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* **131**, 1-15
- GOLDENBERG, D. M. (1988): Targeting of cancer with radiolabeled antibodies: Prospects for imaging and therapy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **112**, 580-6
- GRAHAM, J. M. (1993): The isolation of mitochondria, mitochondrial membranes, lysosomes, peroxisomes, and golgi membranes from rat liver. In: GRAHAM, J. M.; HIGGINS, J. A. (Hrsg.): *Methods in molecular biology*, Vol. 19, Biomembrane protocols I. Isolation and analysis. Humana Press, Totowa, New Jersey, 29-40
- GREENWOOD, F. C.; HUNTER, W. M.; CLOVER, J. S. (1963): The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* **89**, 114-23
- GUDER, W. G.; ROSS, S. O. (1984): Enzyme distribution along the nephron. *Kidn. Int.* **26**, 101-11

- GUSS, B.; ELIASSON, M.; OLSSON, A.; UHLEN, M.; FREJ, A.-K.; JÖRNVALL, H.; FLOCK, J.-I.; LINDBERG, M. (1986): Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *EMBO J.* **5**, 1567-75
- HAMMOND, T. G.; VERROUST, P. J.; MAJEWSKI, R. R.; MUSE, K. E.; OBERLEY, T. D. (1994): Heavy endosomes isolated from the rat renal cortex show attributes of intermicrovillar clefts. *Am. J. Physiol.* **267**, F516-F527
- HARTMANN, H. (1993): Expression und Freisetzung renaler Bürstensaumproteine: Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Charakterisierung der Wirkungsweise nephrotoxischer Substanzen. Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertationsschrift
- HELENIUS, A.; McCASLIN, D. R.; FRIES, E.; TANFORD, C. (1979): Properties of detergents. *Meth. Enzymol.* **56**, 734-49
- HELENIUS, A.; SIMONS, K. (1975): Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 29-79
- HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R. (1985): Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**, 103-12
- HEYMANN, W.; HACKEL, D. B.; HARWOOD, S.; WILSON, S. G. F.; HUNTER, J. L. P. (1959): Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **100**, 660-4
- HILLENKAMP, F.; KARAS, M.; BEAVIS, R. C.; CHAIT, B. T. (1991): Matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal. Chem.* **63** (24), 1193A-203A
- HJELMELAND, L. M. (1990): Solubilization of native membrane proteins. *Meth. Enzymol.* **182**, 253-65
- HJELMELAND, L. M.; CHRAMBACH, A. (1984): Solubilization of functional membrane proteins. *Meth. Enzymol.* **104**, 305-18
- HUBERT, J. J.; SCHENK, D. B.; SKELLY, H.; LEFFERT, H. L. (1986): Rat hepatic (Na⁺, K⁺)-ATPase: α -subunit isolation by immunoaffinity chromatography and structural analysis by peptide mapping. *Biochemistry* **25**, 4156-63
- JANSON, J. C.; RYDEN, L. (1989): Protein purification. Principles, high resolution methods, applications. VCH, Weinheim
- KANALAS, J. J.; MAKKER, S. P. (1991): Identification of the rat Heymann nephritis autoantigen (gp330) as a receptor site for plasminogen. *J. Biol. Chem.* **266**, 10825-9

- KEARN, Mc., T. J. (1993): Radioimmuno-detection of solid tumors. Future horizons and applications for radioimmunotherapy. *Cancer* **71**, 4302-13
- KELLNER, R. (1994): Chemical and enzymatic fragmentation of proteins. In: KELLNER, R.; LOTTSPREICH, F.; MEYER, H. E. (Hrsg.): *Microcharacterization of proteins*. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 11-27
- KELLNER, R.; MEYER, H. E.; LOTTSPREICH, F. (1994): Amino acid analysis. In: KELLNER, R.; LOTTSPREICH, F.; MEYER, H. E. (Hrsg.): *Microcharacterization of proteins*. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 93-113
- KENNEDY, S. M. E.; BURCHELL, B. (1983): Single-step purification of epoxide hydrolase from rat liver microsomes using monoclonal-antibody chromatography. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 2029-32
- KERJASCHKI, D.; FARQUHAR, M. G. (1982): The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5557-61
- KERJASCHKI, D.; FARQUHAR, M. G. (1983): Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (gp330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J. Exp. Med.* **157**, 667-86
- KERJASCHKI, D.; HORVAT, R.; BINDER, S.; SUSANI, M.; DEKAN, G.; OJHA, P. P.; HILLEMANN, P.; ULRICH, W.; DONINI, U. (1987): Identification of a 400-kd Protein in the Brush Borders of Human Kidney Tubules that is similar to gp330, the nephritogenic antigen of rat Heymann nephritis. *Am. J. Pathol* **129**, 183-91
- KERJASCHKI, D.; MIETTINEN, A.; FARQUHAR, M. G. (1987): Initial events in the formation of immune deposits in passive Heymann Nephritis. *J. Exp. Med.* **166**, 109-28
- KERJASCHKI, D.; NORONHA-BLOB, L.; SACKFOR, B.; FARQUHAR, M. G. (1984): Microdomains of distinctive glycoprotein composition in the kidney proximal tubule brush border. *J. Cell Biol.* **98**, 1505-13
- KITTELBERGER, R.; NEALE, T. J. (1990): Isolation and characterization of an unique kidney antigen of relevance in human renal disease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **172**, 439-45
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature London* **256**, 495-497

- KOUNNAS, M. Z.; ARGRAVES, W. S.; STRICKLAND, D. K. (1992): The 39-kDa receptor-associated protein interacts with two members of the low density lipoprotein receptor family, α_2 -macroglobulin receptor and glycoprotein 330. *J. Biol. Chem.* **267**, 21162-6
- KRANENBORG, M. H.; BOERMAN, O. C.; OOSTERWIJK-WAKKA, J. C.; WEIJdsERT, de, M. C.; CORSTENS, F. H.; OOSTERWIJK, E. (1995): Development and characterization of anti-renal cell carcinoma x antichelate bispecific monoclonal antibodies for two-phase targeting of renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **55**, 5864S-7S
- KRANENBORG, M. H. G. C.; BOERMAN, O. C.; OOSTERWIJK-WAKKA, J. C.; WEIJERT, de, M. C.; CORSTENS, F. H.; OOSTERWIJK, E. (1998): Two-step radio-immunotargeting of renal-cell carcinoma xenografts in nude mice with anti-renal-cell-carcinoma x anti-DTPA bispecific monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* **75**, 74-80
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature London* **227**, 680-5
- LANGHAMMER, J.; BIRK, H.-W.; ZAHNER, H. (1997): Renal disease in lymphatic filariasis: evidence for tubular and glomerular disorders at various stages of the infection. *Trop. Med. Internat. Health* **2**, 875-84
- LINDER, M.; WENZEL, V.; LINDER, D.; STIRM, S. (1994): Structural elements in glycoprotein 70 from polytropic friend mink cell focus-inducing virus and glycoprotein 71 from ecotropic friend murine leukemia virus, as defined by disulfide-bonding pattern and limited proteolysis. *J. Virol.* **68**, 5133-41
- LINN, S. (1990): Strategies and considerations for protein purifications. *Meth. Enzymol.* **182**, 9-15
- LOTAN, R.; BEATTIE, G.; HUBBELL, W.; NICOLSON, G. L. (1977): Activities of lectins and their immobilized derivatives in detergent solutions. Implications on the use of lectin affinity chromatography for the purification of membrane glycoproteins. *Biochem.* **16**, 1787-94
- LOTTSPREICH, F.; HOUTHAEVE, T.; KELLNER, R. (1994): The Edman Degradation. In: KELLNER, R.; LOTTSPREICH, F.; MEYER, H. E. (Hrsg.): *Microcharacterization of proteins*. VCH Weinheim, 117-30
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-75
- LUITEN, R. M.; CONEY, L. R.; FLEUREN, G. J.; WARNAAR, S. O.; LITVINOV, S. V. (1996): Generation of chimeric bispecific G250/anti-CD3 monoclonal antibody, a tool to combat renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **74**, 735-44

- MAKKER, S. P. (1993): Analysis of glomeruli-eluted gp330 autoantibodies and of gp330 antigen of Heymann Nephritis. *J. Immunol.* **151**, 6500-8
- MARCH, S. C.; PARIKH, I.; CUATRECASAS, P. (1974): A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal. Biochem.* **60**, 149-52
- MARTENSSON, S.; BRUNMARK, C.; OHLSSON, L.; BAK-JENSEN, E.; BUTKOWSKI, R.; BOKETOFT, A.; WIESLANDER, J. (1995): Heterogeneity of renal cell carcinoma. *Nephrol. Dial. Transpl.* **10**, 1637-43
- MENDRICK, D. L.; CHUNG, D. C.; RENNKE, H. G. (1990): Heymann antigen gp330 demonstrates affinity for fibronectin, laminin, and type I collagen and mediates rat proximal tubule epithelial cell adherence to such matrices in vitro. *Exp. Cell Res.* **188**, 23-35
- MICKISCH, G. H.; KÖSSIG, J.; KEILHAUER, G.; SCHLICK, E.; TSCHADA, R. K.; ALKEN, P. M. (1990): Effects of calcium antagonists in multidrug resistant primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res.* **50**, 3670-4
- MILSTEIN, C. (1980): Monoklonale Antikörper. *Spektrum der Wissenschaft* **12**, 96-108
- MILSTEIN, C.; CUELLO, A. C. (1983): Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature London* **305**, 537-40
- MOESTRUP, S. K.; CHRISTENSEN, E. I.; NIELSEN, S.; JORGENSEN, K. E.; BJORN, S. E.; ROIGAARD, H.; GLIEMANN, J. (1994): Binding and endocytosis of proteins mediated by epithelial gp330. *Ann. NY Acad. Sci.* **737**, 20-38
- MOORE, S.; STEIN, W. H. (1963): Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Meth. Enzymol.* **6**, 819-31
- MOTZER, R. J.; BANDER, N. H.; NANUS, D. M. (1996): Renal-cell carcinoma. *New England J. Med.* **335**, 865-75
- MULDERS, P.; FIGLIN, R.; KERNION, de, J. B.; WILTROUT, R.; LINEHAN, M.; PARKINSON, D.; WOLF, de, W.; BELLDEGRUN, A. (1997): Renal cell carcinoma: progress and future directions. *Cancer Res.* **57**, 5189-95
- NASHAN, B.; MOORE, R.; AMLOT, P.; SCHMIDT, A.-G.; ABEYWICKRAMA, K.; SOULILOU, J.-P. (1997): Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. *Lancet* **350**, 1193-8

- NEUBERGER, M. S.; WILLIAMS, G.T.; MITCHELL, E. B.; JOUHAL, S. S.; FLANAGAN, J. G.; RABBITTS, T. H. (1985): A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature London* **314**, 268-70
- NEUGEBAUER, J. M. (1990): Detergents: an overview. *Meth. Enzymol.* **182**, 239-53
- NEUMEIER, R. (1980): Isoelektrische Fokussierung. In: COOPER, T. G. (Hrsg.): *Biochemische Arbeitsmethoden*. Walter de Gruyter Berlin, New York, 196-200
- NG, L. T.; PASCAUD, A.; PACAUD, M. (1987): Hydrochloric acid hydrolysis of proteins and determination of tryptophan by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **167**, 47-52
- NOVICK, A. C. (1995): Partial nephrectomy for renal cell carcinoma. *Urol* **46**, 149-52
- OBERLING, C.; RIVIERE, M.; HAGUENAU, F. (1960): Ultrastructure of the clear cells in renal carcinomas and its importance for the demonstration of their renal origin. *Nature London* **186**, 402-3
- OHSAKO, S.; HAYASHI, Y.; BUNICK, D. (1994): Molecular cloning and sequencing of calnexin-t. *J. Biol. Chem.* **269**, 14140-8
- OOSTERWIJK, E.; BANDER, N. H.; DIVGI, C. R.; WELT, S.; WAKKA, J. C.; FINN, R. D.; CARSWELL, E. A.; LARSON, S. M.; WARNAAR, S. O.; FLEUREN, G. J.; OETTGEN, H. F.; OLD, L. J. (1993): Antibody localization in human renal cell carcinoma: a phase I study of monoclonal antibody G250. *J. Clin. Oncol.* **11**, 738-50
- OOSTERWIJK, E.; RUITER, D. J.; HOEDEMAEKER, P. J.; PAUWELS, E. K. J.; JONAS, U.; ZWARTENDUK, J.; WARNAAR, S. O. (1986): Monoclonal antibody G250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *Int. J. Cancer* **38**, 489-94
- OOSTERWIJK, E.; WEIJERT, de, M.; BOKHOVEN, van, A.; BRAKENHOFF, R. H.; PEELEN, W. P.; DEBRUYNE, F. M. (1996): Molecular characterization of the renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **37**, A3147
- OZOLS, J. (1990): Preparation of membrane fractions. *Meth. Enzymol.* **191**, 225-35
- PIBERHOFER, S. (1992): Charakterisierung der Harnexkretion renaler tubulärer Zellproteine mit Hilfe monoklonaler Antikörper bei gesunden Probanden und nach Gabe des Röntgenkontrastmittels IOPAMIDOL. Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertationsschrift

- PIERARD, D.; HERRMANN, G.; MAI, U.; HECKING, E.; MONDORF, A. W.;
SCHERBERICH, J. E.; FALKENBERG, F. W. (1983): Sandwich enzyme-immunoassay
for the quantification of kidney-derived antigens in urine using monoclonal antibodies.
In: AVRAMEAS, S.; DRUET, P.; MASSEYEFF, R.; FELMANN, G. (Hrsg.):
Immunoenzymatic Techniques. Elsevier Science Publishers BV, Basel, 333
- RAYCHOWDHURY, R.; NILES, J.; CLUSKEY, Mc, R. T.; SMITH, J. A. (1989): Autoimmune
target in Heymann Nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL-receptor.
Science **244**, 1163-5
- PRICE, R. G. (1982): Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. *Toxicology* **23**, 99-
134
- RADOLA, B. J. (1984): High-resolution preparative isoelectric focusing. *Meth. Enzymol.* **104**,
256-75
- REESE, J. H. (1992): Renal cell carcinoma. *Curr. Op. Oncol.* **4**, 427-34
- REEVES, H. C.; HEEREN, R.; MALLOY, P. (1981): Enzyme purification using antibody
crosslinked to protein A agarose: application to *Escherichia coli* NADP-isocitrate
dehydrogenase. *Anal. Biochem.* **115**, 194-6
- RENSWOUDE, van, J.; KEMPF, C. (1984): Purification of integral membrane proteins. *Meth.*
Enzymol. **104**, 329-39
- RIETHMÜLLER, G.; SCHNEIDER-GÄDICKE, E.; JOHNSON, J. P. (1993): Monoclonal
antibodies in cancer therapy. *Curr. Op. Immunol.* **5**, 732-9
- RITCHIE, A. W. S.; CHISHOLM, G. D. (1983): The natural history of renal carcinoma. *Semin.*
Oncol. **10**, 390-400
- ROBSON, C. J.; CHURCHILL, B. M.; ANDERSON, W. (1969): The results of radical
nephrectomy for renal cell carcinoma. *J. Urol.* **101**, 297-301
- RONCO, P.; BRUNISHOLZ, M.; GENITEAU-LEGENDRE, M.; CHATELET, F.; VERRROUST,
P.; RICHET, G. (1987): Physiopathologic aspects of Tamm-Horsfall protein: a
phylogenetically conserved marker of the thick ascending limb of Henle's loop. *Adv.*
Nephrol. **16**, 231-49
- ROSENFELD, J.; CAPDEVIELLE, J.; GUILLEMOT, J. C.; FERRARA, P. (1992): In-gel
digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel
electrophoresis. *Anal. Biochem.* **203**, 173-9

- SABOLIC, I.; BURCKHARDT, G. (1990): ATP-driven proton transport in vesicles from the kidney cortex. *Meth. Enzymol.* **101**, 505-20
- SAITO, A.; PIETROMONACO, S.; LOO, A.; FARQUHAR, M. G. (1994): Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9725-9
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-7
- SCHERBERICH, J. E.; BIRK, H. W.; SCHOEPPE, W. (1990): Tubule-derived membrane glycoproteins in the urine of patients (including those with AIDS) as analysed by radioimmunoblotting. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **28**, 31-35
- SCHMID, H.-P.; SZABO, J. (1997): Das Nierenzellkarzinom - eine aktuelle Übersicht. *PRAXIS: Schweizer. Rundsch. Medizin* **86**, 837-43
- SCHMIDT, U.; GUDER, W. G. (1976): Sites of enzyme activity along the nephron. *Kidn. Int.* **9**, 233-42
- SCHNEIDER, C.; NEWMAN, R. A.; SUTHERLAND, D. R.; ASSER, U.; GREAVES, M. F. (1982): A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J. Biol. Chem.* **257**, 10766-9
- SECHER, D. S.; BURKE, D. C. (1980): A monoclonal antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon. *Nature London* **285**, 446-50
- SERWE, M.; MEYER, H. E. (1994): Microseparation techniques I: High performance liquid chromatography. In: KELLNER, R.; LOTTSPEICH, F.; MEYER, H. E. (Hrsg.): *Microcharacterization of proteins*. VCH Weinheim, 29-45
- SIMONDS, W. F.; KOSKI, G.; STREATY, R. A.; HJELMELAND, L. M.; KLEE, W. A. (1980): Solubilization of active opiate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4623-7
- STEFFENS, M. G.; BOERMAN, O.; OOSTERWIJK-WAKKA, J. C.; OOSTERHOF, G. O. N.; WITJES, J. A.; KOENDERS, E. B.; OYEN, W. J. G.; BUIJS, W. C. A. M.; DEBRUYNE, F. M. J.; CORSTENS, F. H. M.; OOSTERWIJK, E. (1997): Targeting of renal cell carcinoma with iodine-131-labeled chimeric monoclonal antibody G250. *J. Clin. Oncol.* **15**, 1529-37

- SUROLIA, A.; BISHAYEE, S.; AHMAD, A.; BALASUBRAMANIAN, K. A.; THAMBI-DORAI, D.; PODDER, S. K.; BACHHAWAT, B. K. (1975): Studies on the interaction of concanavalin with glycoproteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **55**, 95-115
- THOENES, W.; RUMPELT, H. J.; STÖRKEL, S. (1990): Klassifikation der Nierenzellkarzinome/Tumoren und ihre Beziehung zum Nephron-Sammelrohrsystem. *Klin. Wochenschr.* **68**, 1102-11
- THOMAS, C. T.; McNAMEE, M. G. (1990): Purification of membrane proteins. *Meth. Enzymol.* **182**, 499-520ds
- TOLKOFF-RUBIN, N. E.; THOMPSON, R. E.; PIPER, D. J.; HANSEN, W. P.; BANDER, N. H.; CORDON-CARDO, C.; FINSTAD, C. J.; KLOTZ, L. H.; OLD, L. J.; RUBIN, R. H. (1987): Diagnosis of renal proximal tubular injury in renal transplant patients by a urinary assay for a proximal tubular antigen, the adenosine-deaminase-binding-protein. *Transplant.* **41**, 593-7
- TSUCHIDA, S.; SATO, K. (1983): Purification of detergent-solubilized form and membrane-binding domain of rat γ -glutamyltransferase by immuno-affinity and hydrophobic chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* **756**, 341-8
- TURNER, M. (1991): Moleküle, die Antigene erkennen. In: ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. K. (Hrsg.): *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 54-65
- TZAGOLOFF, A.; PENEFSKY, H. S. (1971): Extraction and purification of lipoprotein complexes from membranes. *Meth. Enzymol.* **XXII**, 219-30
- VEYHL, M.; SPANGENBERG, J.; PÜSCHEL, B.; POPPE, R.; DEKEL, C.; FRITZSCH, G.; HAASE, W.; KOEPEL, H. (1993): Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na⁺-D-glucose cotransporter. *J. Biol. Chem.* **268**, 25041-53
- VOET, D.; VOET, J. G. (1992): Techniken der Proteinreinigung. In: VOET, D.; VOET, J. G. (Hrsg.): *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 72-105
- WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. (1993): *Rekombinierte DNA*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- WEBER, K.; OSBORN, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-12
- WERF-MESSING, Van der, B. (1973): Carcinoma of the kidney. *Cancer* **32**, 1056-61

- WESSEL, D.; FLÜGGE, U. I. (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141-3
- WESTERMANN, P. (1997): Enzym- und Proteinanalytik. In: GANTEN, D.; RUCKPAUL, K. (Hrsg.): *Handbuch der molekularen Medizin, Band 1, Molekular- und zellbiologische Grundlagen.* Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 109-44
- WILLNOW, T. E.; GOLDSTEIN, J. L.; ORTH, K.; BROWN, M. S.; HERZ, J. (1992): Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J. Biol. Chem.* **267**, 26172-80
- WINTER, G.; HARRIS, W. J. (1993): Humanized Antibodies. *Immunol. Today* **14**, 243-6
- WINTER, G.; MILSTEIN, C. (1991): Man-made antibodies. *Nature London* **349**, 293-9
- YAGODA, A.; ABI-RACHED, B.; PETRYLAK, D. (1995): Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma:1983-1993. *Sem. Oncol.* **22**, 42-60
- YOUNG, R. A.; DAVIS, R. W. (1983): Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1194-8
- YOUNG, R. C. (1998): Metastatic renal-cell carcinoma: what causes occasional dramatic regressions? *New Engl. J. Med.* **338**, 1305-6
- ZHENG, G.; BACHINSKY, D. R.; STAMENKOVIC, I.; STRICKLAND, D. I.; BROWN, D.; ANDRES, G.; McCLUSKEY, R. T. (1994): Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family. gp330 and LRP/ α 2MR, and the receptor-associated protein, (RAP). *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 531-42

10 Anhang

Fraktion	gp400 [SHE]			
	Präparation-1	Präparation-2	M	SD
AM	0,3333	0,2452	0,2826	0,0541
	0,3134	0,2195		
	0,3572	0,2271		
Ü1	1,2036	0,3045	0,7458	0,4272
	1,2401	0,3429		
	1,0648	0,3190		
Ü2	0,2445	0,3224	0,2895	0,0278
	0,2826	0,3007		
	0,2676	0,3191		
P3	1,3183	1,5823	1,4625	0,1332
	1,3633	1,4883		
	1,3440	1,6787		
P5	1,4034	1,3097	1,3897	0,1087
	1,4118	1,2101		
	1,5588	1,4446		
P6	2,0796	3,3519	2,6834	0,6554
	2,1881	3,0752		
	1,8762	3,5291		

Tab. 10.1 **Präparation von Endosomen des Schweinenierencortex: Bindung des N4A4-Antikörpers in den einzelnen Präparationsfraktionen**

Ausgehend vom Nierencortex der Schweineniere wurde eine Endosomenpräparation nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990) durchgeführt. Von jeder weiterverarbeiteten Fraktion wurde ein Aliquot entnommen und mittels Festphasen-Radioimmunoassay hinsichtlich der Bindung des N4A4-Antikörpers untersucht. Die Meßergebnisse sind in SHE ausgedrückt. Eine SHE (Schweinenierencortex-Homogenat-Einheit) stellt hierbei jene Antigenmenge dar, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat enthalten ist. Es wurden drei Präparationen durchgeführt, wobei von jeder Präparation Tripelbestimmungen durchgeführt wurden.

Detergenz	Konzentration (w/v) [%]	Gp400 SHE	Proteinkonz. [µg/ml]	bereinigte SHE (bei theoretischer Proteinkonzentration von 30 µg/ml)
Cholat	5,00	0,4473	28,7	0,4675
	2,50	0,3529	22,8	0,4643
	1,00	0,2604	20,2	0,3867
	0,50	0,1900	20,8	0,2741
	0,25	0,0470	18,1	0,0778
	0,10	0,0308	17,1	0,0540

Tab. 10.2 **Solubilisierung des gp400 bei unterschiedlichen Cholatkonzentrationen: Meßergebnisse nach Festphasen-Radioimmunoassay**

Endosomen des Schweinenierencortex wurden mit unterschiedlichen Cholatkonzentrationen wie in Abschnitt 4.8 beschrieben solubilisiert. Die Zentrifugationsüberstände wurden anschließend im Festphasen-Radioimmunoassay hinsichtlich der Bindungsfähigkeit des N4A4-Antikörpers untersucht. Die Meßergebnisse sind ausgedrückt in SHE, wobei eine SHE (Schweinenierencortex-Homogenat-Einheit) derjenigen Antigenmenge entspricht, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat vorhanden ist.

Fraktion	pH-Wert	Volumen nach Dialyse [ml]	Proteinkon- zentration [mg/ml]	Gesamtprotein [mg]	N4A4 [SHE/5 μ g]	Gesamt N4A4 [SHE]
1	12,23	15,7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	12,23	16,3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3	11,71	15,3	0,0041	0,0627	0,0000	0,0000
4	10,88	14,4	0,0084	0,1210	0,0000	0,0000
5	10,43	13,9	0,0069	0,0959	0,0000	0,0000
6	10,12	14,2	0,0075	0,1065	0,0000	0,0000
7	9,79	13,0	0,0077	0,1001	0,0000	0,0000
8	9,53	12,7	0,0077	0,0978	0,0000	0,0000
9	9,28	11,6	0,0077	0,0893	0,0000	0,0000
10	9,00	10,5	0,0101	0,1061	0,0000	0,0000
11	8,64	10,1	0,0141	0,1424	0,0000	0,0000
12	8,25	10,0	0,0305	0,3050	0,0000	0,0000
13	7,93	10,1	0,0608	0,6141	0,0989	12,1465
14	7,16	9,7	0,0761	0,7382	0,2571	37,9567
15	6,88	7,5	0,0753	0,5648	0,0375	4,2356
16	6,41	8,6	0,0842	0,7241	0,0344	4,9790
17	6,14	8,1	0,1317	1,0668	1,0907	232,7052
18	5,60	8,0	0,0889	0,7112	0,1921	27,3286
19	4,93	7,3	0,0553	0,4037	0,1004	8,1021
20	4,57	8,2	0,0378	0,3100	0,7035	43,6083
21	4,37	7,1	0,0156	0,1108	0,1838	4,0711
22	4,20	7,0	0,0141	0,0987	1,4289	28,2065
23	4,07	7,1	0,0152	0,1079	0,5679	12,2582
24	3,69	6,9	0,0469	0,3236	0,9310	60,2581
25	3,25	6,1	0,0553	0,3373	0,0085	0,5755
26	2,36	5,2	0,0335	0,1742	0,0000	0,0000
27	2,05	4,8	0,0308	0,1478	0,0000	0,0000
28	1,98	4,6	0,0254	0,1168	0,0000	0,0000
29	1,95	5,5	0,0433	0,2382	0,0000	0,0000

Tab. 10.3 **Isoelektrische Fokussierung der solubilisierten Endosomenfraktion des Schweinenierencortex**

Die mit Cholat, 2 % (w/v), solubilierte Endosomenfraktion des Schweinenierencortex wurde einer präparativen isoelektrischen Fokussierung im Svensson-Rohr unterworfen. Nach der Fokussierungszeit von 16 h (2,0 kV, 15 W) wurden ca. 30 Fraktionen gesammelt. Der pH-Wert jeder Fraktion wurde bestimmt und das Volumen jeder Fraktion nach 24stündiger Dialyse gegen PBS-A gemessen. Die Proteinkonzentration wurde nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) bestimmt und die jeweilige Bindung des N4A4-Antikörpers mittels Festphasen-Radioimmunoassay ermittelt. Das Ergebnis ist in SHE (Schweinenierencortex-Homogenat-Einheiten) ausgedrückt, wobei eine SHE derjenigen Antigenmenge entspricht, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex enthalten ist.

11 Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. med. Horst-Walter Birk, Oberarzt an der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen, danke ich für die Überlassung des Themas und für die wertvolle Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Professor Dr. oec. troph. Hannelore Daniel vom Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie am Institut für Ernährungswissenschaft der Technischen Universität München danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. med. Sönke Jeßen, Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik II der Universitätsklinik Gießen, danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft im Verlauf der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr. med. Peter Presek vom Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie danke ich für die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der präparativen isoelektrischen Fokussierung im Svensson-Rohr.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Dr. rer. nat. Monica Linder und Herrn Dr. rer. nat. Dietmar Linder vom Biochemischen Institut der Universitätsklinik Gießen für ihren tatkräftigen Einsatz bei der Durchführung der Aminosäuresequenzanalyse.

Allen Mitarbeitern des Nephrologischen Labors der Medizinischen Klinik II am Universitätsklinikum Gießen danke ich sehr herzlich für die nette Zusammenarbeit.