

# **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, Ökötrophologie 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
 <b>1 Einleitung</b>	 <b>1</b>
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 "Megalyn"	10
1.6 Strategien zur Reinigung eines Proteins	12
 <b>2 Ziel dieser Arbeit</b>	 <b>16</b>
 <b>3 Material</b>	 <b>17</b>
3.1 Allgemeine Materialien	17
3.2 Antiseren 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
 <b>4 Methoden</b>	 <b>22</b>
4.1 Präparation der Endosomenfraktion des Nierencortex	22
4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	23
4.3 Aminosäurenanalyse	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
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
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
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
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	Immunaffinitätschromatographie	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
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>87</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>89</b>

**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<sup>+</sup>-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 präparatover 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 Aminosäurenanalyse
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-propanesulfonat
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 <sub>3</sub>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -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