

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.

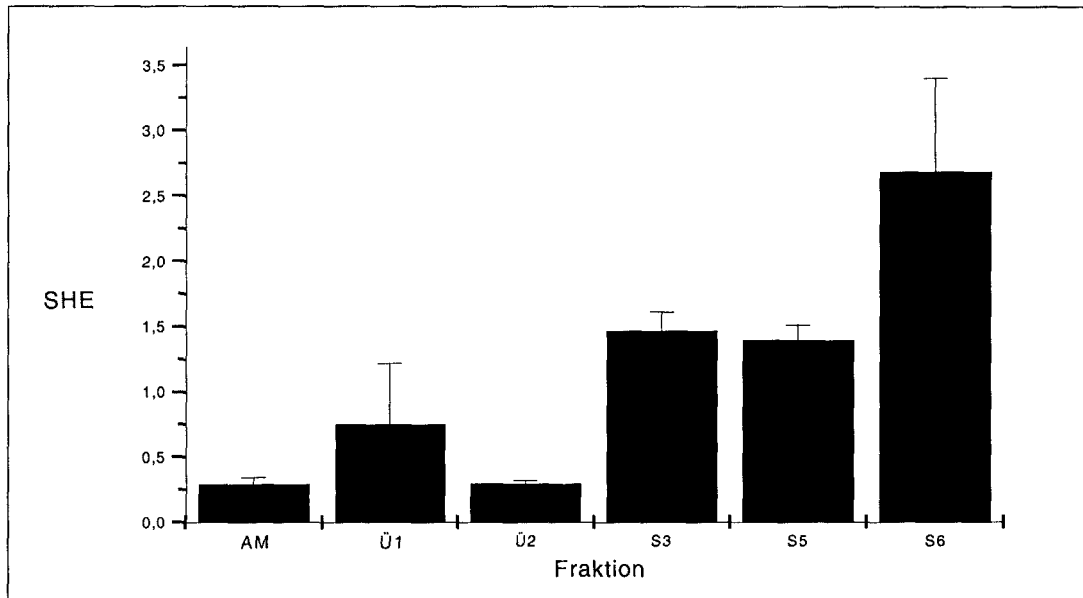


Abb. 5.1 Quantifizierung des gp400 in den einzelnen Fraktionen der Endosomenpräparation nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990).

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.

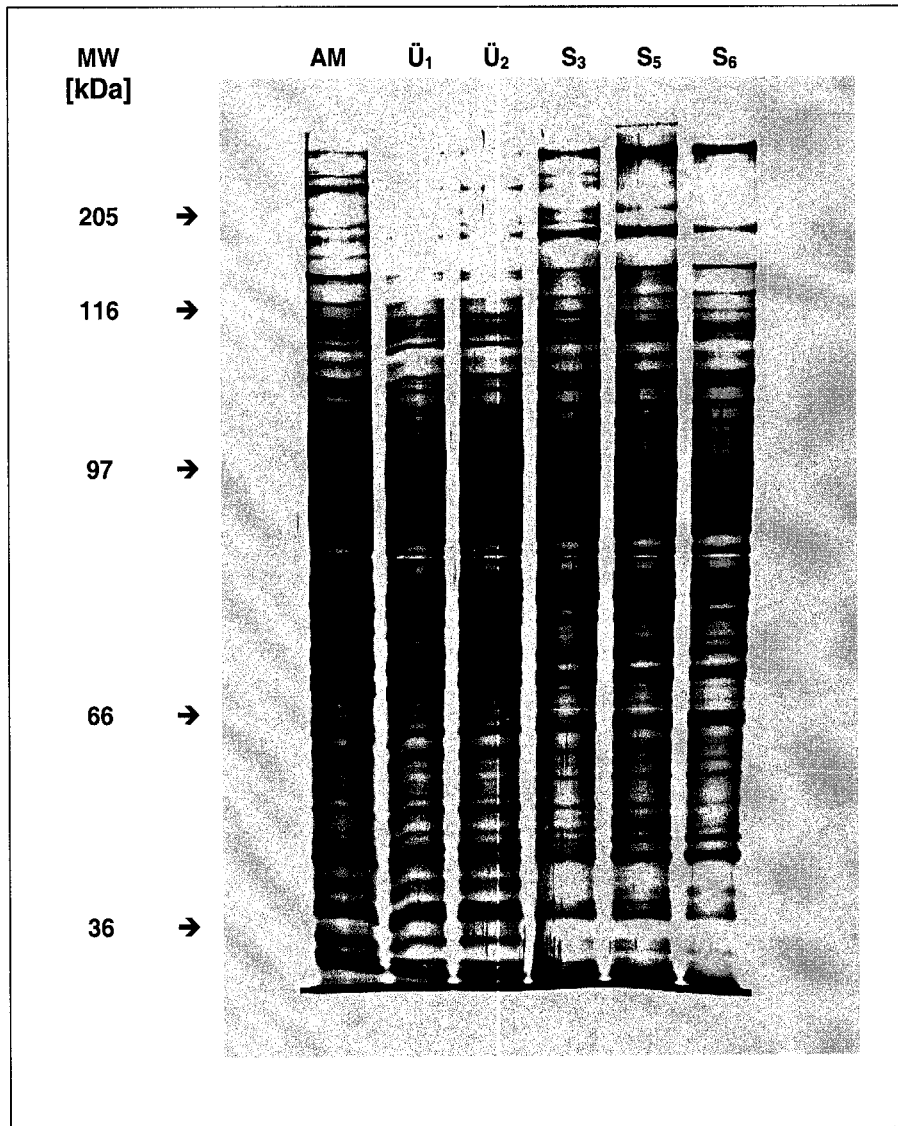


Abb. 5.2 Silberfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen der Endosomenpräparation nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990)
 Die jeweils weiterverarbeiteten Fraktionen der Endosomenpräparation wurden zur Visualisierung einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach LAEMMLI (1970) unterzogen (Trenngel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

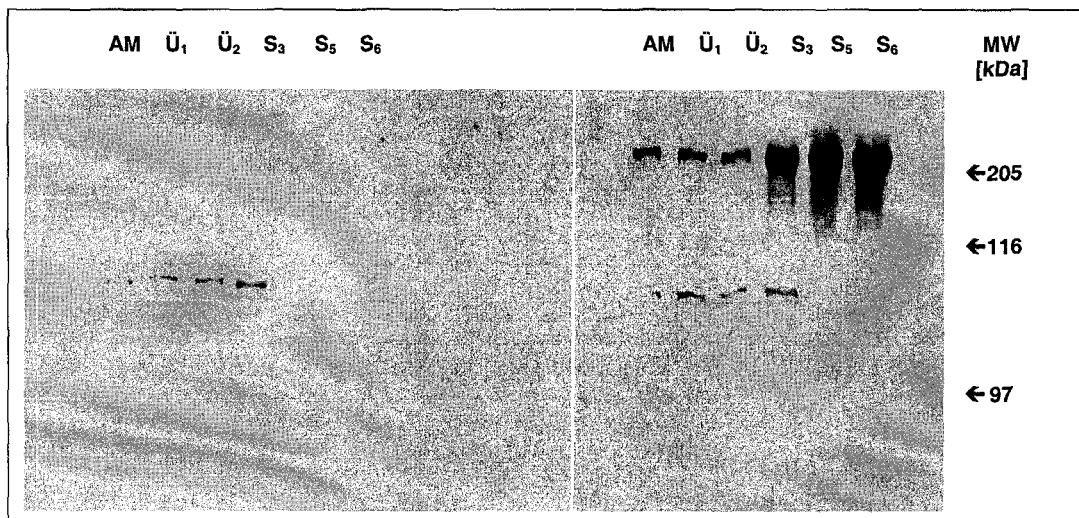


Abb. 5.3 Detektion des gp400 in den einzelnen Fraktionen der Endosomenpräparation (ECL-Entwicklung).

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 geblottet. 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: Desoxycholat (DOC), Cholat, 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 Desoxycholat 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. [µg/ml]	SHE bei einer Proteinkonzentration von 25 µg/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.

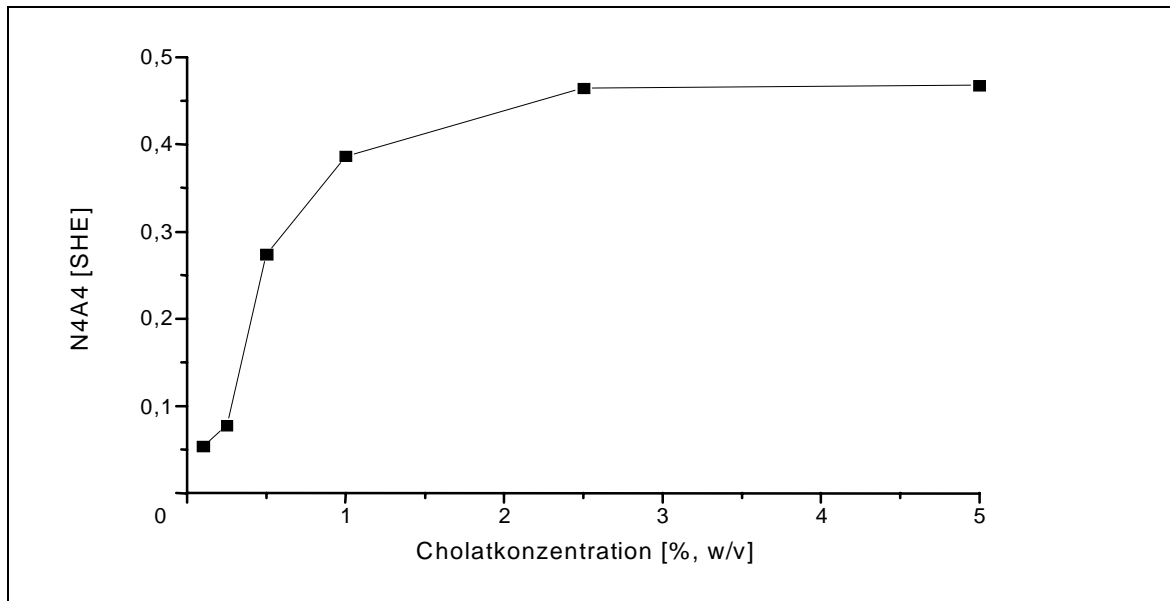


Abb. 5.4 Solubilisierung des gp400 bei unterschiedlichen Cholatkonzentrationen
 Cholatkonzentrationen von 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 und 5,0 % (w/v) wurden zur Solubilisierung des gp400 eingesetzt. Im Zentrifugationsüberstand wurde das gp400 mittels Festphasen-Radioimmunoassay gemessen und in SHE (Schweinenierencortex-Homogenat-Einheiten) 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 Immunaффinitätschromatographie eingehen könnte. Gleichzeitig konnte der isoelektrische Punkt des gp400 ermittelt werden.

Die Solubilisierung der Proteine der Endosomenfraktion wurde mit Cholat, 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

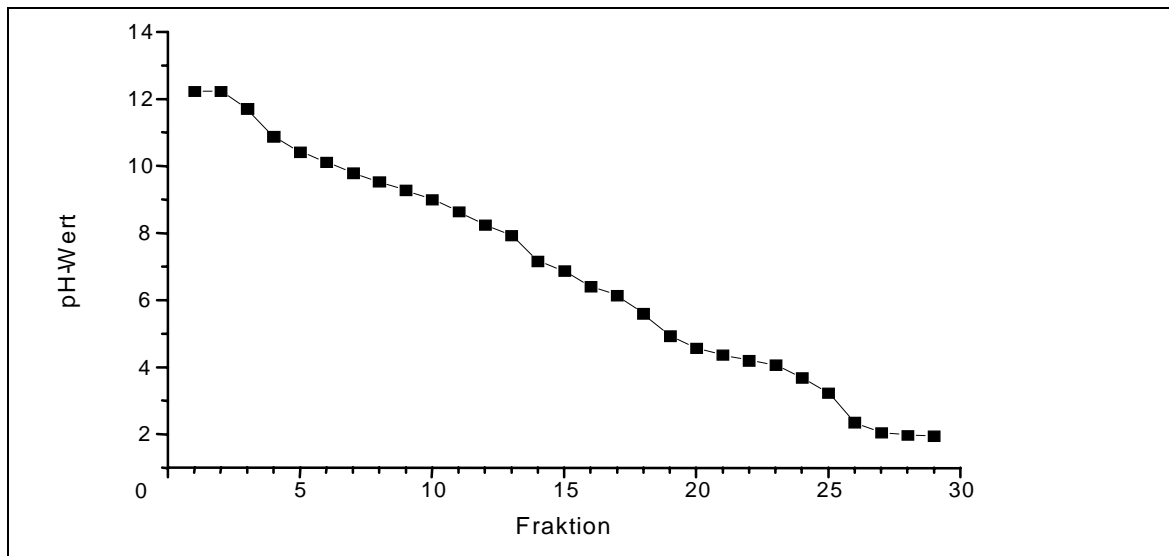


Abb. 5.5 pH-Werte der einzelnen Fraktionen nach isoelektrischer Fokussierung
 Mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung im Svensson-Rohr wurden die solubilisierten Proteine der Endosomenfraktion des Schweine-Nierencortex nach ihren isoelektrischen Punkten aufgetrennt. Nach IEF (16 h, 2 kV, 15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

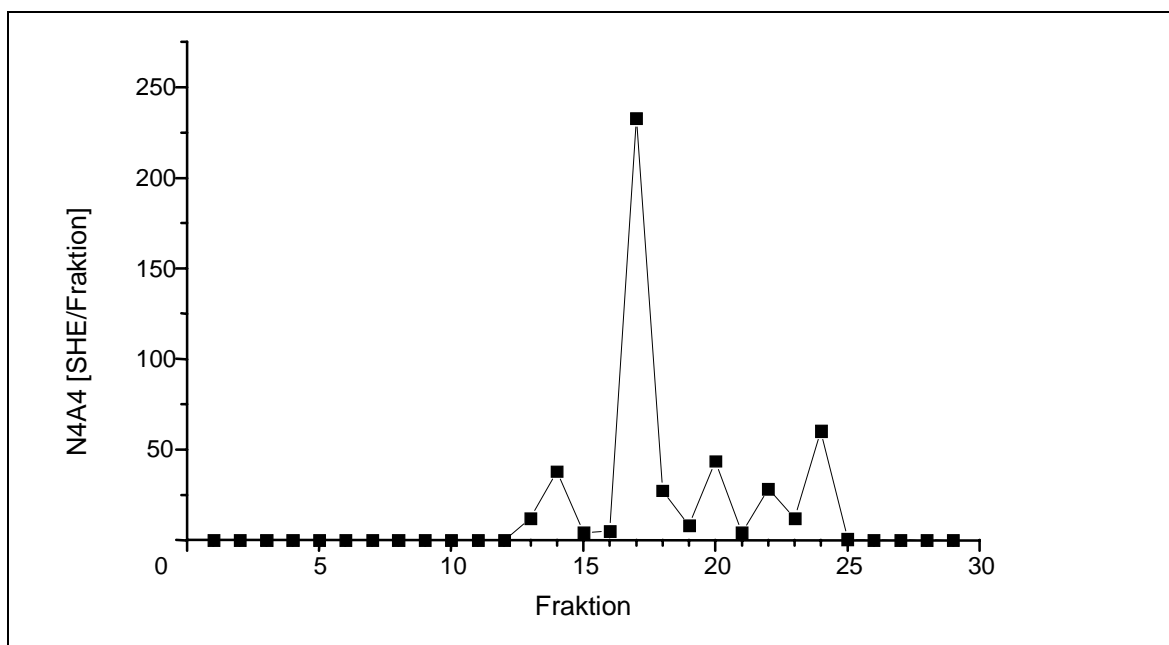


Abb. 5.6 Verteilung des gp400 in den einzelnen Fraktionen nach präparativer isoelektrischer Fokussierung im Svensson-Rohr
 Mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung im Svensson-Rohr wurden die solubilisierten Proteine der Endosomenfraktion des Schweine-Nierencortex nach ihren isoelektrischen 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.

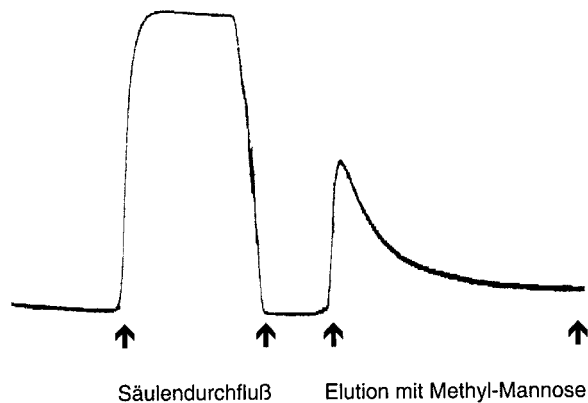


Abb. 5.7 Typischer Verlauf einer Affinitätschromatographie mit Concanavalin A
 Die solubilisierter Endosomenfraktion des Schweinenierencortex wurde einer Affinitätschromatographie mit dem zuckerbindenden Lektin Concanavalin A unterworfen. Bei 280 nm wurde die Absorption der Eluatfraktion und somit der 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
	Fraktion 2	4,8	0,11	0,52	0,0008
	Fraktion 3	4,3	0,13	0,54	0,0039
	Fraktion 4	4,8	0,07	0,35	0,0211
	Fraktion 5	5,7	0,05	0,31	0,0387
	Fraktion 6	7,1	0,04	0,29	0,0474
	Fraktion 7	7,5	0,04	0,28	0,0520
	Fraktion 8	9,2	0,03	0,30	0,0546
	Fraktion 9	9,2	0,03	0,23	0,0516
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 solubilisierter 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 Säulendurchfluß 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 Immunaффinitätschromatographie

5.5.1 Monoklonaler Antikörper N4A4

Die Immunaффinitätschromatographie 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 Immunaффinitätschromatographie mit dem monoklonalen Antikörper N4A4
Der monoklonale Antikörper N4A4 wurde kovalent an Protein G gekoppelt und zur Immunaффinitätschromatographie 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 Immunaффinitätschromatographie 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).

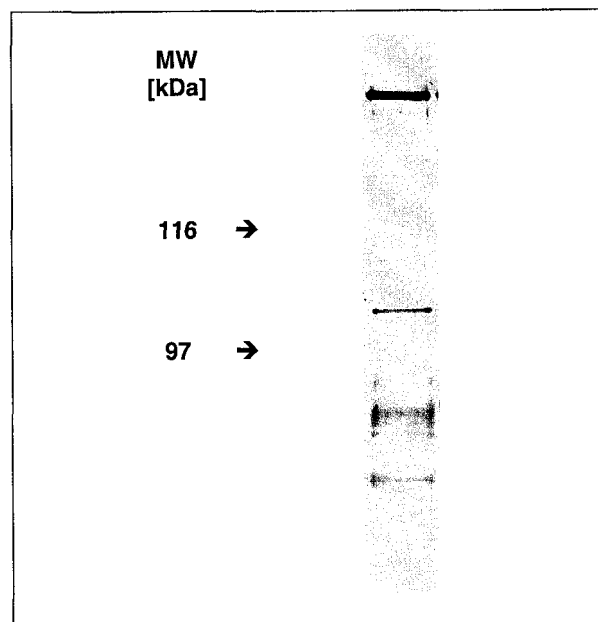


Abb. 5.8 Gelelektrophoretische Auftrennung der Eluatfraktion nach Immunaффinitätschromatographie mit dem monoklonalen Antikörper L4D6
Der monoklonale Antikörper L4D6 wurde kovalent an Protein G gekoppelt und zur Immunadsorption mit der solubilisierten Endosomenfraktion des Schweinenierencortex eingesetzt. 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).

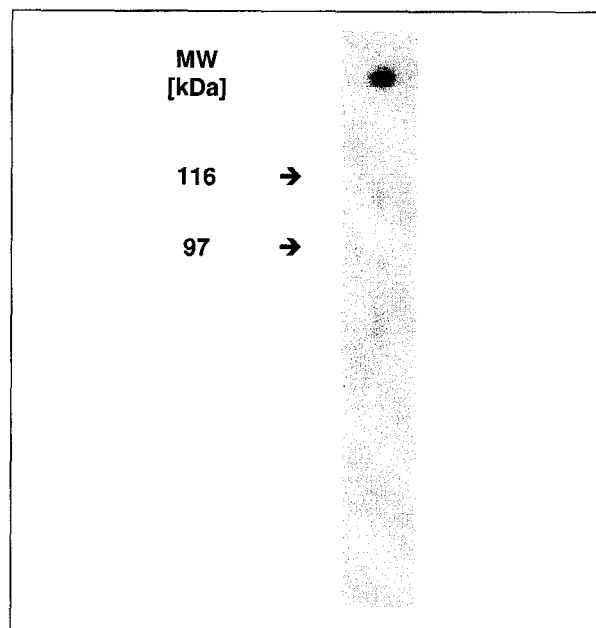


Abb. 5.9 Western-Blot (mAk N4A4) der Eluatfraktion nach Immunadsorption (mAk L4D6)
 Der monoklonale Antikörper L4D6 wurde kovalent an Protein G gekoppelt und zur Immunadsorption mit der solubilisierten Endosomenfraktion des Schweinenierencortex eingesetzt. Die Proteine der Eluatfraktion wurde gelelektrophoretisch 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.

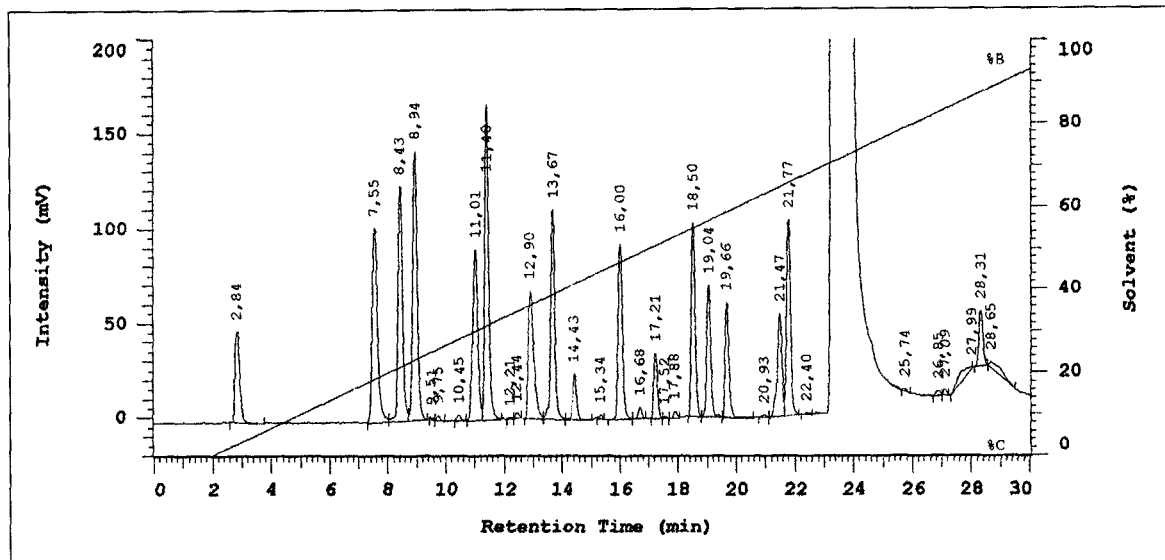


Abb. 5.10 HPLC-Elutionsprofil nach Aminosäurenanalyse der Immunadsorptions-Eluatfraktion

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.

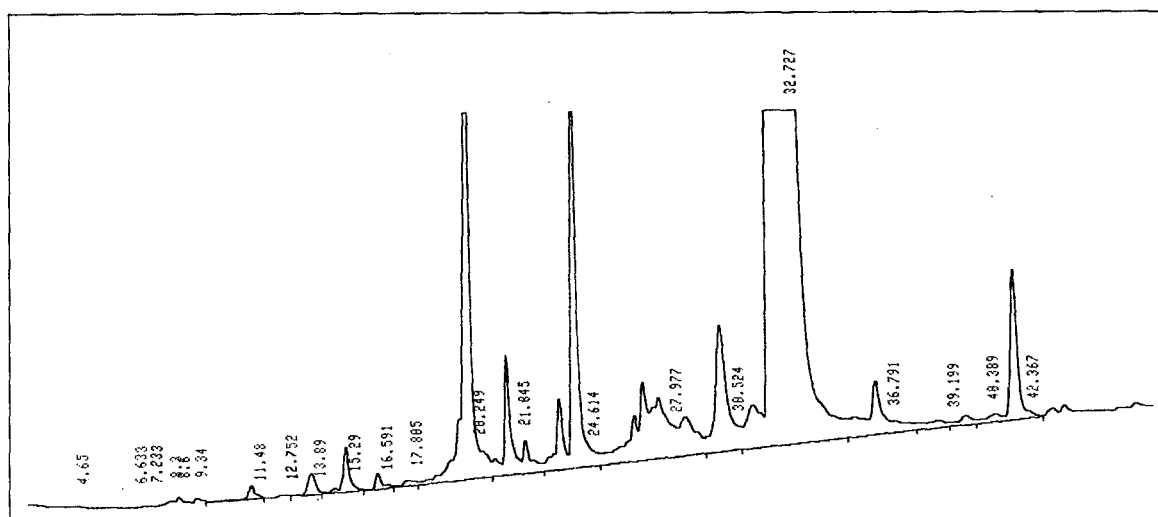


Abb. 5.11 **HPLC-Elutionsprofil nach Verdau mit der Endoproteinase Lys-C: Leerwert**

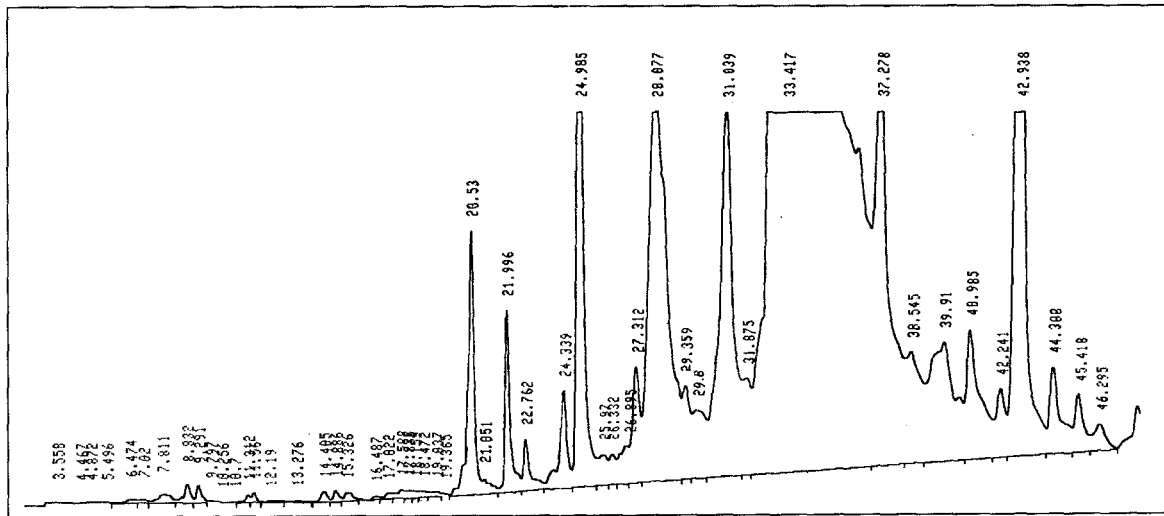


Abb. 5.12 **HPLC-Elutionsprofil nach Verdau mit der Endoproteinase Lys-C: Probe**

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.

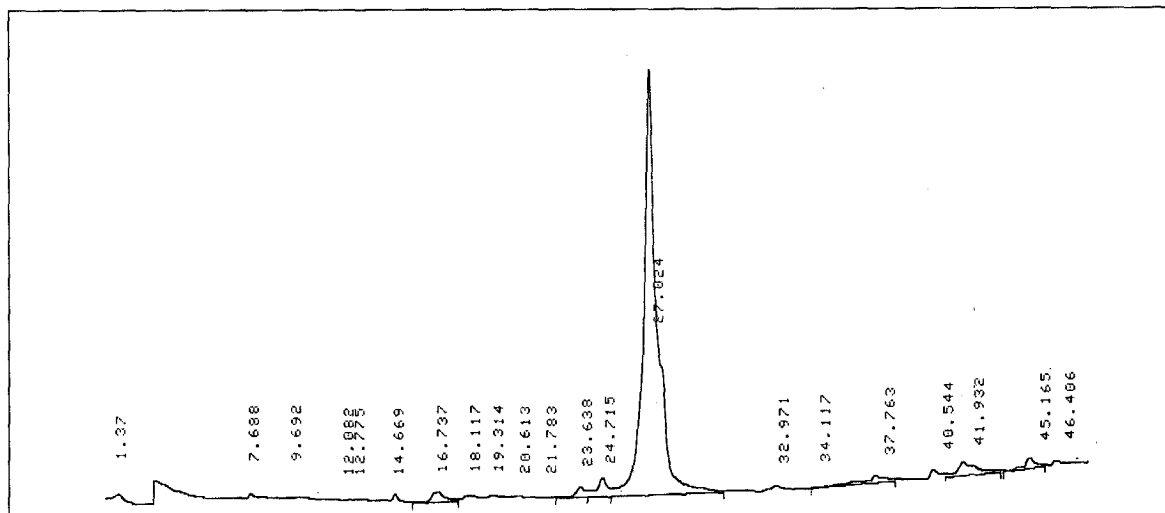


Abb. 5.13 **Rechromatographie einer ausgewählten Peptidfraktion**

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.

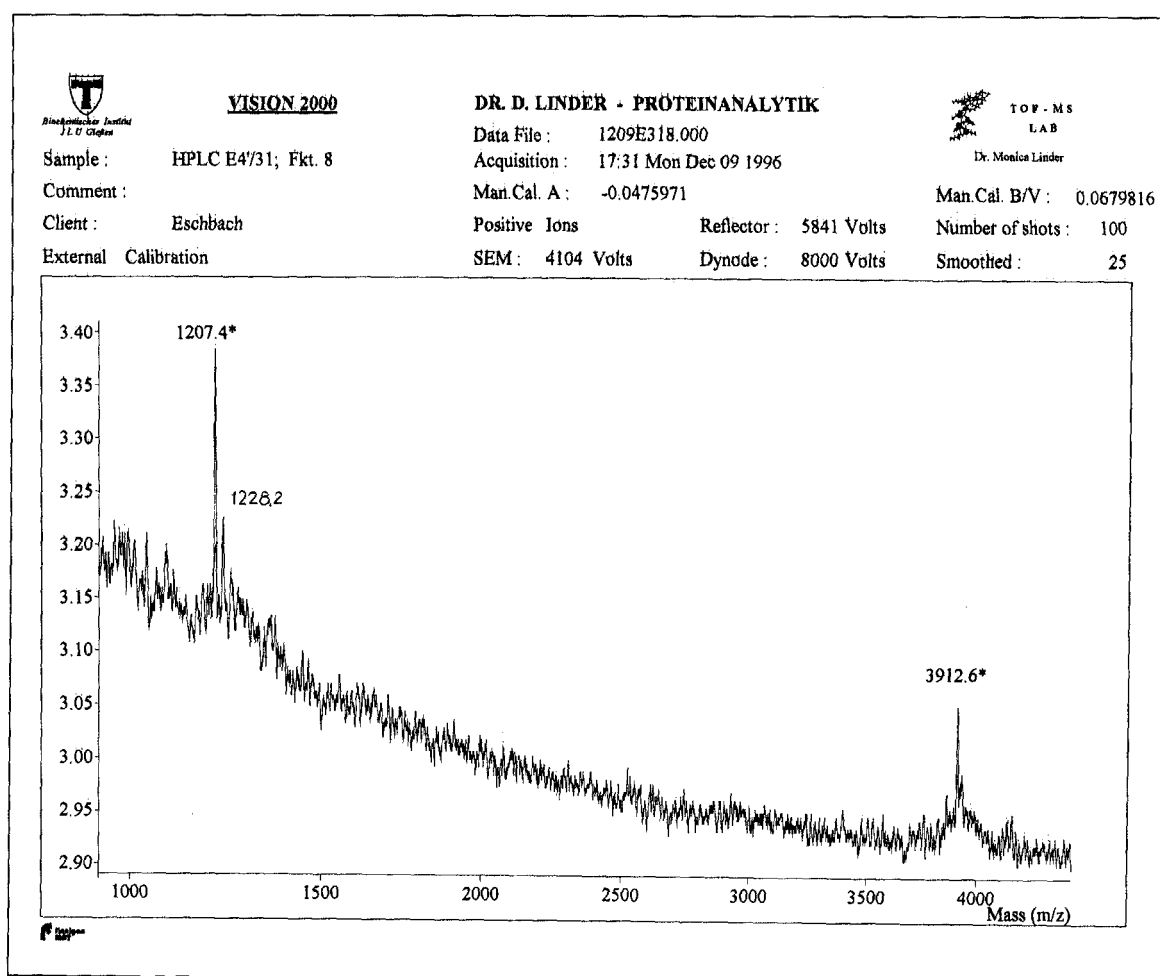


Abb. 5.14 **Massenspektrum einer ausgewählten Peptidfraktion nach Proteinverdau im SDS-Gel, Elution der Peptide und anschließender HPLC-Auftrennung der Peptidfragmente**

Solubilisierte 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 Peptidfraktion 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 Fraktion einem Sequenzierungsversuch mittels EDMAN Abbau unterworfen (s. Abschnitt 4.15).

Nach zwölf durchgeführten Sequenzierungsschritten wurde die folgende Peptidsequenz vermutet:

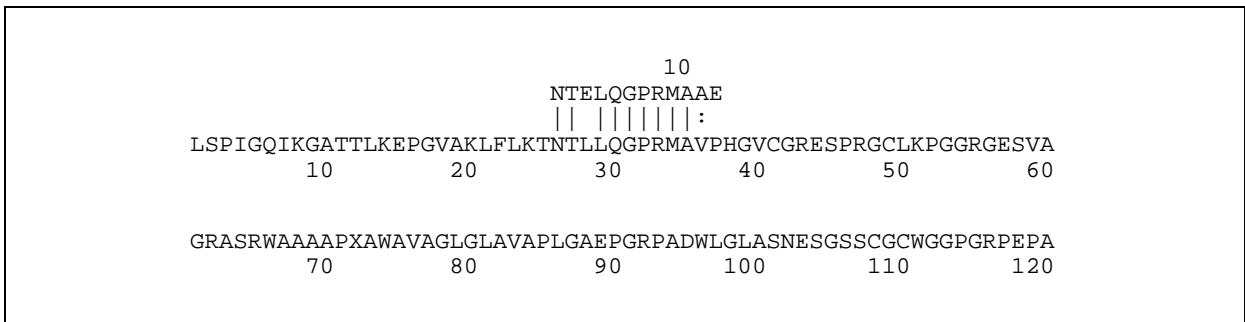
N T E L Q G P R M A A E

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 Sequenzierungsschritten 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.

Die mittels Massenspektrometrie untersuchte Peptidfraktion wurde mittels Sequenzanalyse weiteruntersucht. Die vorgeschlagene Peptidsequenz, bestehend aus 12 Aminosäuren, wurde unter Zuhilfenahme des Suchprogrammes TFASTA mit den Gendatenbanken GenBank und EMBL library verglichen. Hierbei konnte eine 90%ige Homologie zu einem humanen cDNA Klon H29160 gefunden werden. Der Klon stammt aus infantilem Hirngewebe und ist bislang nicht näher charakterisiert. (a, t, c, g: Nukleotidbasen; n kann jede Base sein)



Die in Abb. 5.15 dargestellte Gensequenz des humanen cDNA Klon kann mittels dreier möglicher Leserahmen in eine Aminosäuresequenz übersetzt werden. Eine mögliche

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