

## 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 Klonen 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 hauptsächliche 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).

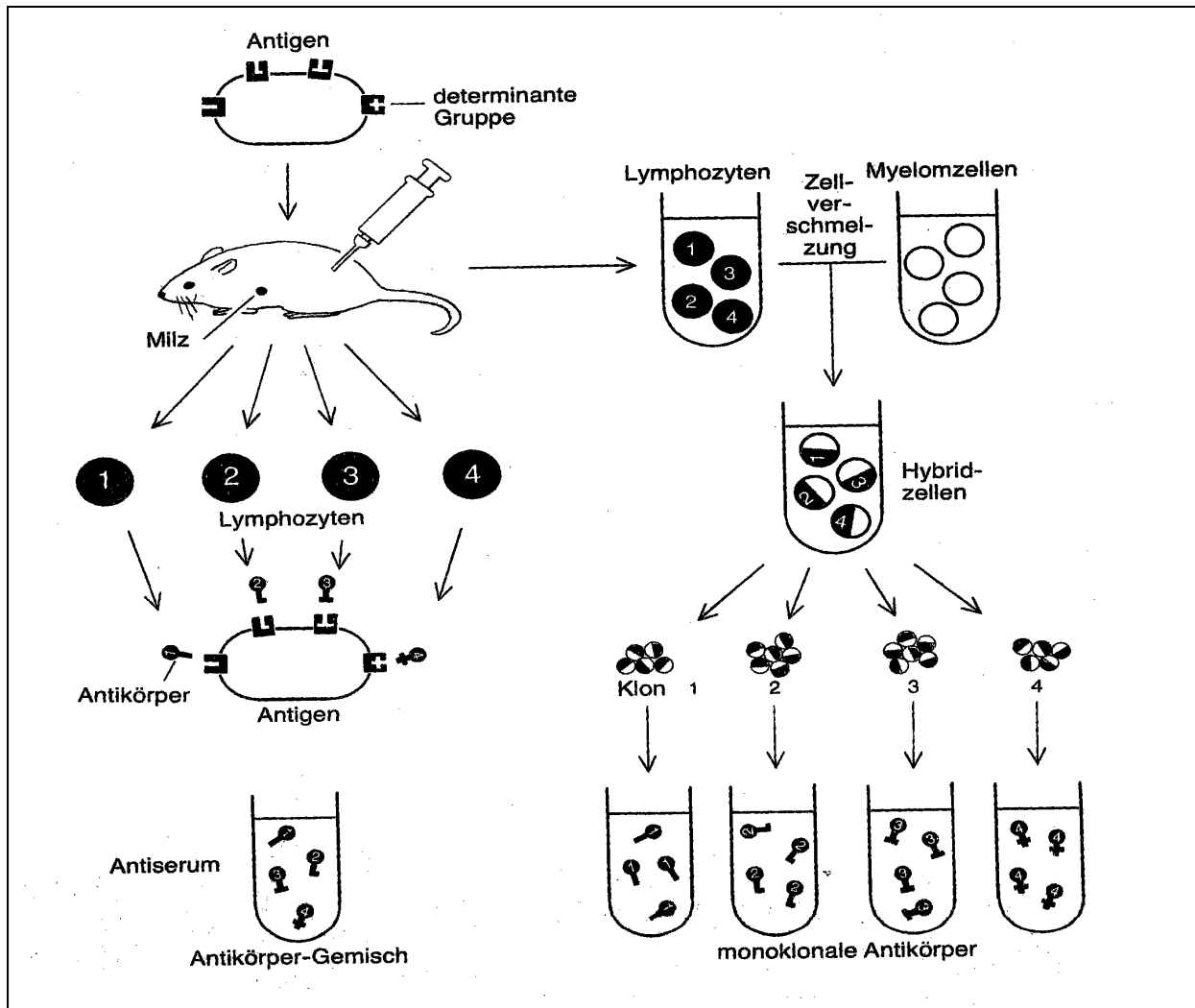
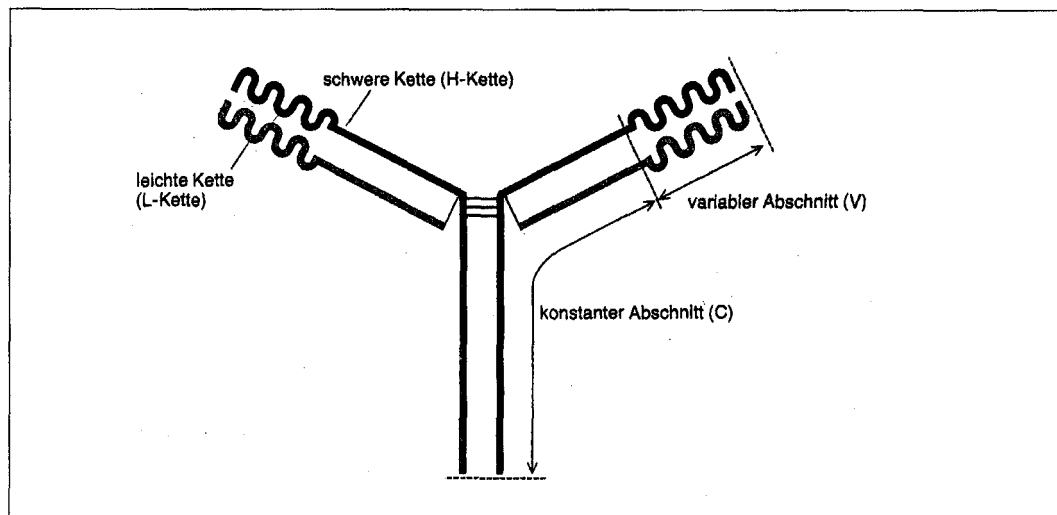


Abb. 1.1: **Herstellung eines polyklonalen Antiserums (linke Bildhälfte) im Vergleich zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern (rechte Bildhälfte) (MILSTEIN, 1980)**

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  $\gamma$ -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).

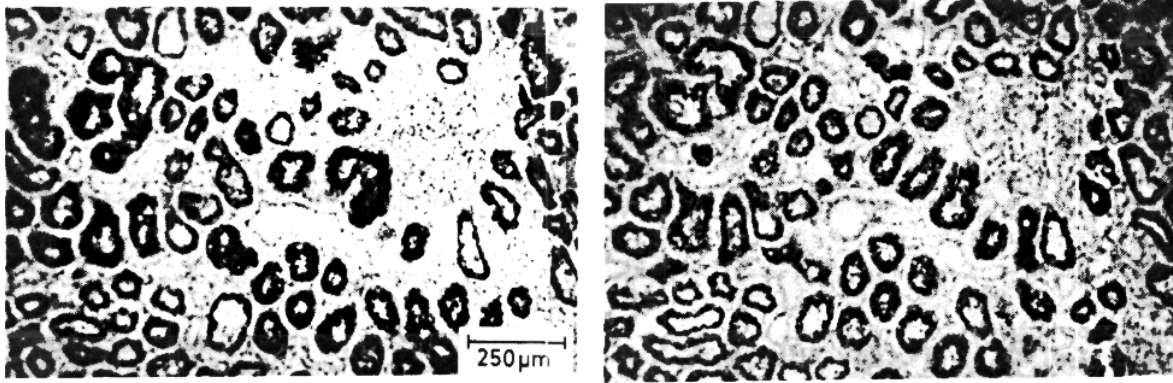
Durch die Etablierung gentechnologischer Methoden wurde es möglich, Antikörpermoleküle zu manipulieren. Bispezifische Antikörper, die mit jeder ihrer Antigenbindungsdomäne unterschiedliche Antigene binden können (MILSTEIN und CUELLO, 1983) wurden somit

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 IgG<sub>1</sub> 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 bedienten sich meist eines Sandwich-Immunoassays zum Urinantigennachweis (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<sup>+</sup>-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.

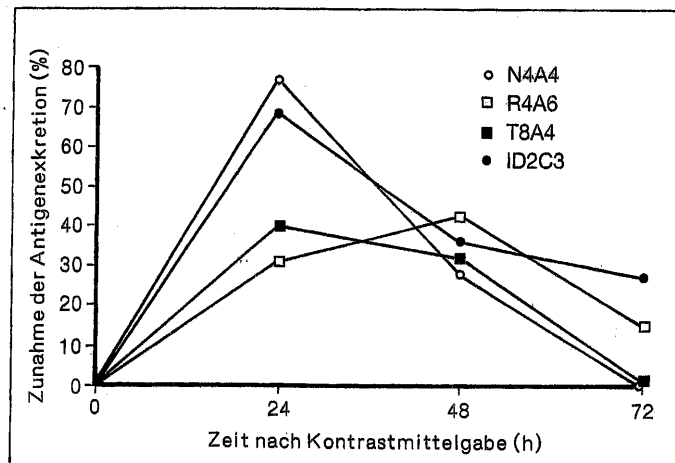


Abb 1.5 **Einfluß des nichtionischen Röntgenkontrastmittels Iopamidol auf die Urinexkretion verschiedener renaler proximaltubulärer Antigene.** (R4A6: Na<sup>+</sup>-D-Glukose Kotransporter; T8A4: Kernmembranantigen; ID2C3: Villin) (BIRK et al., 1990)

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-PK<sub>1</sub>-Zelllinie und untersuchte damit die Freisetzung renaler Bürstensaummembranproteine in den Zellkulturüberstand unter dem Einfluß der Nephrotoxine HgCl<sub>2</sub> 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 (ALTMANNSEBERGER 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 Antitumorstimmung 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 IgG<sub>1</sub> 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 <sup>131</sup>J markierten Antikörper bei 3 von 15 Nierenzellkarzinompatienten eine partielle Remission erreicht werden (KRANENBORG et al., 1995). Diagnostisch eignet sich der mit <sup>131</sup>J 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 <sup>131</sup>J ebenfalls sehr gute Aufnahmeraten 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 <sup>111</sup>In-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 Aufnahmeraten 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 Immunogenizität auszuschalten (BORREBACK, 1989). Andererseits können von murinen Antikörpermolekülen mittels Pepsin- oder Papainverdau Fragmente erzeugt werden. Diese F(ab')<sub>2</sub> 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 "Megalín"

Aufgrund der subzellulären Lokalisierung und des Molekulargewichtes von gp400 und des sog. Heymann-Nephritis-Antigens gp330/Megalín könnte eine Identität beider Proteine vermutet werden. Das apparente Molekulargewicht des Megalíns 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 Affinitäts-techniken zur Proteinisolierung an (CALTON, 1984). Die Kombination von Chromatographiemethoden und Immunaaffinitäts-techniken 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 IgG<sub>1</sub> 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 mizellaren Konzentration (cmc), seiner Aggregationszahl und des Molekulargewichtes der gebildeten Mizelle. Hierbei ist die kritische mizellare Konzentration 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<sup>R</sup> 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 mizellare Konzentration als auch ein geringes mizellares Molekulargewicht wichtig (HJELMELAND und CHRAMBACH, 1984). Ionische Detergenzien haben generell eine hohe kritische mizellare Konzentration 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 (RENSWOUE 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. Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-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 (RENSWOUE 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.