

## 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 (ALTMANNSEBERGER 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 schlußendlich in reiner Form vorliegen, um es weitergehenden Untersuchungen wie der Aminosäuresequenzanalyse zuführen zu können.

### 3 Material

#### 3.1 Allgemeine Materialien

Beriglobin<sup>R</sup>, N-Protein-Standard SY: *Behringwerke AG*, Marburg.

2-Mercaptoethanol, Natriumdodecylsulfat (SDS), Tetramethyldiamin (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-Kälber-Serum (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 (Na<sub>2</sub>-EDTA, Titriplex<sup>R</sup> 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-Plätzchen, *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 (rotiphoese Gel 30), Glycin, 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[ <sup>125</sup> 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 <sub>4</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
------------	--

	1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,4
<u>PBS-A</u>	PBS, zusätzlich 0,02 % (w/v) $\text{NaN}_3$
<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><math>\beta</math>-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>Glyceraldehyd-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.*

$\gamma$ -Counter Minaxi  $\gamma$ -5530: *Packard Instruments B.V.*, Frankfurt / M.  
 Nitrocellulose, 0,45  $\mu$ 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<sup>R</sup> Protein G IgG Orientation Kit Nr. 44896, *Pierce*, Rockford, USA  
 Centriplus<sup>TM</sup> 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*