

## 6 Diskussion

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

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

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

### 6.1 Präparation von Endosomen des Nierencortex

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

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

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

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

## **6.2 Solubilisierung des N4A4-Antigens**

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

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

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

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

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

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

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

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

### **6.3 Präparative isoelektrische Fokussierung**

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

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

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

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

#### **6.4 Affinitätschromatographie mit Concanavalin A**

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

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

#### **6.5 Immunaффinitätschromatographie**

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

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

Die gerichtete Kopplung des Antikörpers an ein Immunglobulin-bindendes Protein (ELIASSON et al., 1989) ist vorteilhafter als eine ungerichtete Kopplung an Cyanbromid-aktivierte Sepharose (MARCH et al., 1974). Bei der gerichteten Kopplung bindet der Antikörper das Säulenmaterial über seinen Fc-Teil, während die Fab-Domäne das Antigen ungehindert binden kann. Aufgrund der Tatsache, daß ein muriner IgG<sub>1</sub> eine höhere Affinität zu Protein G besitzt als zu Protein A (AKERSTRÖM et al., 1985), wurde Protein G als Affinitätsmedium ausgewählt. Um zu vermeiden, daß der Antikörper bei den Elutionsbedingungen zusammen mit dem Antigen von der Protein G Säule abgelöst wird, wurde dieser kovalent an das Protein G Material gekoppelt (REEVES et al., 1981). In Anlehnung an HUBERT und Mitarbeiter (1986) erfolgte die Inkubation mit den solubilisierten Proteinen über einen ausgedehnten Zeitraum von ca. 16 Stunden. Die Elution des Antigens erfolgte mit einer basischen Diethylaminlösung (SCHNEIDER et al., 1982). Andere Autoren setzten stark saure Lösungen zur Antigenelution ein (TSUCHIDA und SATO, 1982). Da Cholat bei sauren Bedingungen präzipitiert (RENSWOUE und KEMPF, 1984), verbot sich diese Möglichkeit im vorliegenden Ansatz von vorneherein.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 6.8 Alternative Vorgehensweisen

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

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

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

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

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

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