

4 Methoden

4.1 Präparation der Endosomenfraktion des Nierencortex

Die Präparation endozytotischer Vesikel aus dem Cortex von Schweinenieren erfolgte mittels einer Kombination aus Differential- und Dichtegradientenzentrifugation, modifiziert nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990). Alle Präparationsschritte nach Organentnahme wurden bei 4 °C durchgeführt. Eine Übersicht der Präparationstechnik ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

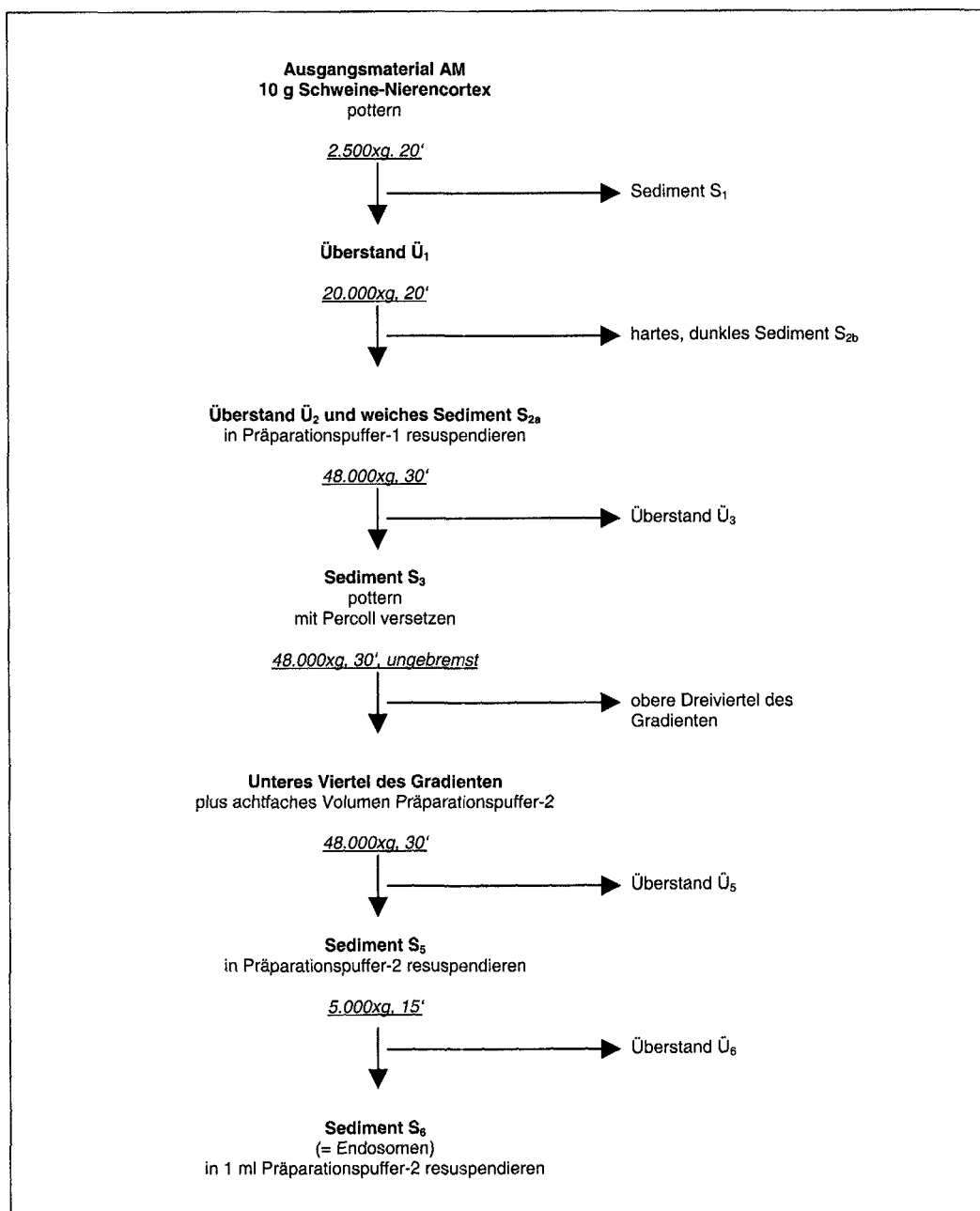


Abb. 4.1 Endosomenpräparation aus dem Cortex von Schweinenieren

Die Schweinenieren wurden im örtlichen Schlachthof den frischgeschlachteten Tieren entnommen und in eiskalter 0,9 %iger (w/v) NaCl-Lösung in das Labor transportiert. 10 g Nierencortex wurden in 40 ml frisch angesetztem, eiskaltem Präparationspuffer-1 mit einer Schere grob zerkleinert und durch 12 Hübe in einem motorgetriebenem Teflon-Glas-Homogenisator bei 1200 rpm homogenisiert. Das Homogenat wurde mit weiteren 40 ml Präparationspuffer-1 versetzt und bei $2.500 \times g$ für 20 Minuten abzentrifugiert. Das Sediment S_1 wurde verworfen und der Überstand \ddot{U}_1 erneut für 20 Minuten bei $20.000 \times g$ zentrifugiert. Der Großteil dieses Überstandes \ddot{U}_2 wurde abgenommen und der Rest dazu verwendet, das weiche Sediment zu resuspendieren. Hierbei blieb ein hartes, braunes Sediment zurück. Der gesamte Überstand \ddot{U}_2 wurde einer erneuten Zentrifugation bei $48.000 \times g$ für 30 Minuten unterzogen. Das hieraus resultierende Sediment S_3 sollte auf einem Percoll-Dichtegradienten weiter aufgetrennt werden. Hierzu wurde dieses in 20 ml Präparationspuffer-1 aufgenommen und durch 30 Hübe in einem Teflon-Glas-Homogenisator bei 1.200 rpm homogenisiert. Zum Homogenat wurden 16 % (w/w) unverdünntes Percoll hinzugegeben, das Ganze gut gemischt und erneut bei $48.000 \times g$ für 30 Minuten zentrifugiert. Um den sich bildenden Gradienten nicht zu vermischen, wurde die Zentrifuge diesmal im Auslaufen nicht gebremst. Die obersten Dreiviertel des Gradienten wurden verworfen, und das untere Viertel, in dem sich der Großteil der endozytotischen Vesikel befand, wurde mit dem achtfachen Volumen des Präparationspuffers-2 versetzt, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Der darauf folgende Zentrifugationsschritt bei $48.000 \times g$ über 30 Minuten diente dazu, das Percoll-Material abzutrennen: Dieses setzte sich als hartes, glasiges Sediment ab. Der Überstand \ddot{U}_5 wurde verworfen und das weiche Membransediment S_5 vom harten Percollsediment abgenommen und in 20 ml Präparationspuffer-2 resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation bei $5.000 \times g$ für 15 Minuten wurde der Überstand \ddot{U}_6 verworfen und die endosomale Fraktion im Sediment S_6 zurückbehalten. Das Sediment S_6 wurde in 1 ml Präparationspuffer-2 aufgenommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Der durchschnittliche Proteingehalt dieser Fraktion lag bei ca. 20 mg/ml.

4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach LOWRY et al. (1951)

Die zu bestimmenden Proben wurden mit aqua bidest. so verdünnt, daß sie mit ihrer geschätzten Proteinkonzentration unter 1 mg/ml lagen. Als Standard wurde BSA in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet, als Leerwert diente aqua bidest. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung vorgenommen.

Je 50 µl der zu untersuchenden Probe, des Standards und des Leerwerts wurden mit 1 ml 10 %iger (w/v) TCA 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei $12.000 \times g$ in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand dekantiert und das gefällte Protein in 100 µl einer Lösung aus 0,9 % (w/v) SDS in 1 N NaOH bei leichtem Schütteln für 10 Minuten bei 37 °C alkalisiert. Anschließend wurde 1 ml einer Lösung aus 0,04 % (w/v) Na^+ -Tartrat und 0,02 % (w/v) CuSO_4 in 2 % (w/v) Na_2CO_3 hinzugefügt. Nach zehnminütiger Inkubation bei

Raumtemperatur erfolgte die Entwicklung nach Zusatz von 100 µl Folin-Reagenz (Folin-Ciocalteus Phenolreagenz 1:2 verdünnt in aqua dest.) bei 37 °C für 30 Minuten. Die Extinktionsmessung erfolgte im Eppendorf-Photometer bei 578 nm in Küvetten der Schichtdicke 1 cm. Die Proteinkonzentrationen (Pk) wurden nach folgender Formel berechnet:

$$Pk_{\text{Probe}} [\text{mg/ml}] = Pk_{\text{Standard}} [\text{mg/ml}] \times \frac{E_{\text{Probe}} - E_{\text{Leerwert}}}{E_{\text{Standard}} - E_{\text{Leerwert}}}$$

4.3 Aminosäurenanalyse

Die Aminosäurezusammensetzung eines Proteins bzw. der Aminosäuregehalt einer Proteinlösung kann durch Aminosäurenanalyse ermittelt werden. Hierbei wird das Protein zuerst einer vollständigen sauren Hydrolyse unterworfen. Die freigesetzten Aminosäuren werden nach geeigneter Derivatisierung durch RP-HPLC aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgt durch einen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Derivate mit einem Standard bekannter Aminosäurenkonzentrationen (KELLNER et al., 1994).

Zur Säurehydrolyse wurde 6 N Salzsäure, suprapur, eingesetzt, die mit 0,02 % 2-Mercaptoethanol als Antioxidanz versetzt wurde (NG et al., 1987). 1 ml dieser Lösung wurde auf den Boden der Hydrolysegefäße pipettiert. Die zuvor getrockneten Proben wurden im Teflonständer in den Reaktionsraum gebracht. Die Hydrolyse erfolgte unter Vakuum in der Gasphase bei 110 °C für 24 Stunden (MOORE und STEIN, 1963). Die Proben wurden danach entnommen und in 20 µl 0,5 M Boratpuffer, pH 7,7, aufgenommen. Die Vor-Säulen-Derivatisierung der Aminosäuren erfolgte mit 20 µl einer 2,5 mM Lösung aus 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC) in Aceton (EINARSSON et al., 1987). Nach zehn Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl einer 12 mM Adamantanlösung in aqua bidest. abgestoppt. Die daraus resultierenden 42 µl wurden mit aqua bidest. auf 210 µl verdünnt, wobei 21 µl hiervon, also 10 %, in die HPLC-Anlage injiziert wurden. Der Gradient wurde wie folgt gefahren:

- A: 50 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 4,8, 18 % Acetonitril, 3 % Isopropanol
- B: 100 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 4,8, 60 % Acetonitril

2 Minuten: 100 % A
 30 Minuten: bis 100 % B
 3 Minuten: 100 % B

Die Extinktion der derivatisierten Aminosäuren wurde bei 263 nm gemessen. Der zur Quantifizierung herangezogene Standard (SIGMA AA-S-18)) enthielt jede Aminosäure in einer Konzentration von 2 pMol.

4.4 Festphasen-Radioimmunoassay

4.4.1 Jodierung des Antikörpers

Die Jodierung von Antikörpern mit ^{125}J erfolgte nach der Chloramin-T-Methode, modifiziert nach GREENWOOD und Mitarbeitern (1963). Unmittelbar vor Gebrauch wurden folgende Lösungen frisch angesetzt:

Chloramin-T-Lösung	4 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung	4 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5
KJ-Lösung	34 mg/ml in aqua bidest.

Für die Jodierungsreaktion wurden jeweils 20 µl der IgG-Antikörperfraktion aus einem Kaninchen-anti-Ziege-Antiserum eingesetzt, dessen Konzentration zuvor auf 2 mg/ml in aqua bidest. eingestellt wurde. Dieses Antiserum wurde mit 50 µl 0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, vermischt und anschließend 74 MBq $\text{Na}[^{125}\text{J}]$ (20 µl) zugegeben. Durch die Zugabe von 10 µl Chloramin-T-Lösung als oxidierendes Agens wurde die Jodierungsreaktion gestartet und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung abgestoppt: Natriumdisulfit verhindert einen weiteren Einbau von ^{125}J -Atomen in das Protein, indem es verbleibendes ^{125}J zu Jodid reduziert. Nach Zugabe von 50 µl KJ-Lösung wurde das jodierte Protein vom verbleibenden freien Jod mittels Gelfiltration abgetrennt. Als Säulenmaterial wurden 7 ml Sephadex G-25 f in 1 % (w/v) BSA in PBS-A verwendet. Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf die Säule aufgegeben und die Säule mit 5 ml 1 % BSA (w/v) in PBS-A gespült. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 0,5 ml aufgefangen und im γ -Counter die aktive Fraktion bestimmt. Diese jodierte Immunglobulinfraktion wurde bei 4 °C maximal drei Wochen gelagert und im Radioimmunoassay als letztes Glied der Antikörperkaskade eingesetzt.

In der Autoradiographie zum Nachweis geblotteter Proteine (3.7.1) wurde jodiertes Protein A verwendet. Die Jodierung erfolgte wie beschrieben, es wurden ebenfalls 40 µg Protein eingesetzt.

4.4.2 Durchführung des Radioimmunoassays

Die Durchführung des Radioimmunoassays erfolgte modifiziert nach BIRK und Mitarbeitern (1991). Die zu untersuchenden Proben werden mittels eines Mikrofiltrationsapparates

(BioDot-Apparat), der den simultanen Auftrag von 96 Proben auf ein definiertes, 7 mm² großes Membranareal (ein Dot) erlaubt, auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Als Eichkurvenmaterial wurde Schweinenierencortex-Homogenat in einer Verdünnungsreihe von 2 bis 0,03125 µg/Dot aufgetragen. Probe und Eichkurve wurden vor dem Auftragen mit SDS in PBS-A auf eine Endkonzentration von 0,0025 % (w/v) SDS gebracht. Als Leerwert diente PBS-A. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt, das Auftragsvolumen betrug 250 µl. In der Regel wurde 1 µg Protein pro Dot aufgetragen.

Nach schwerkraftbedingtem Einziehen der Proben wurden die auf der Nitrocellulose gebundenen Proteine zweimal mit 300 µl PBS-A unter Anlegen eines Vakuums gewaschen. Danach wurde die Nitrocellulosemembran aus der Apparatur entfernt und zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen eine Stunde in Blockpuffer (10 % (v/v) NKS, 0,5 % (v/v) Tween-20 in PBS-A) bei 37 °C inkubiert.

Die membrangebundenen Antigene wurden nun mit den laboreigenen monoklonalen Antikörpern N4A4 bzw. L4D6 inkubiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden diese Klonüberstände zuvor in einem Festphasen-Radioimmunoassay mit einer Eichkurve subklassenidentischer Myelomzell-Immunglobuline verglichen. Die monoklonalen Antikörper wurden in Blockpuffer in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Dieser Blockpuffer enthielt nur 0,05 % (v/v) Tween-20 und wurde in allen weiteren Schritten eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 30 Minuten bei 37 °C und anschließend 16 Stunden bei 4 °C. Parallelansätze wurden zur Bestimmung der unspezifischen Bindung mit dem Kontrollantikörper Myeloma IgG₁ in gleicher Konzentration inkubiert.

Nach jeder Antikörper- bzw. Antiseruminkubation wurde die Nitrocellulose zweimal für fünf Minuten mit Waschpuffer (0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS-A) gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden danach mit Blockpuffer über fünf Minuten abgesättigt.

Die Detektion gebundener Immunglobuline erfolgte durch sequentielle Inkubation (jeweils eine Stunde bei 37 °C) mit verschiedenen speziesspezifischen Antiseren. Die verwendeten Antiseren wurden zuvor 10 Minuten bei 12.000 x g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand im Radioimmunoassay eingesetzt:

- anti-Maus-IgG-Antiserum vom Kaninchen, 1:5000 in Blockpuffer
- anti-Kaninchen-Ig-Antiserum von der Ziege, 1:1000 in Blockpuffer
- [¹²⁵J]- anti-Ziege-IgG-Antiserum vom Kaninchen, 0,5 x 10⁶ cpm/ml in Blockpuffer

Abschließend wurde die Nitrocellulose dreimal für fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen und danach getrocknet.

4.4.3 Auswertung

Die Quantifizierung der pro Dot membrangebundenen Radioaktivität erfolgte im MATRIX 96 β -Counter. Dieses Gerät erlaubt die simultane Messung von 96 Proben, wobei die räumliche Anordnung der Zählrohre dem Aufbau des BioDot-Apparates entsprechen. Die gewonnenen Meßdaten wurden unmittelbar in das Software-Programm RIASMART übernommen und folgendermaßen ausgewertet:

Nachdem von jedem Meßwert in cpm der Leerwert abgezogen wurde, erfolgte die Verrechnung der unspezifischen Bindung. Hierzu wurden für jede Probe der Bindungswert des Myeloma-Antikörpers von den Bindungsdaten der spezifisch bindenden monoklonalen Antikörpern subtrahiert.

Die mitgeführte Eichkurve aus Schweinenierencortex-Homogenat wurde mittels eines nicht-linearen Kurven-fitting-Programms (polynomiale Gleichung 'SPLINE', RIASMART-Programm) charakterisiert. Mittels dieser Eichkurvengleichung wurden die zuvor hinsichtlich ihrer unspezifischen Bindung bereinigten Meßdaten in Schweinenierencortex-Homogenat-Einheiten (SHE) umgerechnet. Dabei wurde eine SHE als diejenige Antigenmenge definiert, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat vorhanden ist. Die Enddaten stellen den Mittelwert aus drei Parallelbestimmungen dar.

4.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

4.5.1 Herstellung der Gele

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von LAEMMLI (1970) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte über Flachgele in vertikalen Gelelektrophoresekammern. Die Gele waren jeweils 14 x 18 cm groß und 0,75 mm dick. Wegen des hohen Molekulargewichtes des gesuchten Proteins wurde der besseren Auflösung wegen ein 7,5 %iges Trenngel eingesetzt:

Trenngel (7,5 % T, 2,6 % C)

30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	15,3 ml
0,75 M TRIS-HCl, pH 8,8	31,5 ml
aqua bidest.	14,9 ml
10 % (w/v) SDS	630 μ l
10 % (v/v) TEMED	300 μ l
10 % (w/v) APS	370 μ l

Das Trenngel wurde in der Gelgießkammer GE-2/4 LS (Pharmacia) gegossen und mit einer schwereren Lösung unterschichtet. Die schwere Lösung bestand zu gleichen Teilen aus 0,75

M TRIS-HCl, pH 8,8 und Glycerin und wurde mit einer Lösung aus 1 % (w/v) Bromphenolblau angefärbt. Während der Polymerisationszeit von einer Stunde wurde das Gel mit 200 µl wassergesättigtem 1-Butanol überschichtet.

Bevor das 5 %ige Sammelgel gegossen werden konnte, mußte die Trenngeloberfläche gut mit 0,75 M TRIS-HCl, pH 8,8, 1:2 mit aqua bidest. verdünnt, gespült werden, um jegliche Reste von 1-Butanol zu entfernen.

Sammelgel (5 % T, 2,6 % C)

30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	5 ml
0,25 M TRIS-HCl, pH 6,8	15 ml
aqua bidest.	10 ml
10 % (w/v) SDS	310 µl
10 % (v/v) TEMED	150 µl
10 % (w/v) APS	240 µl

In der Regel wurden 14 Probenauftragsschächte vorbereitet. Lediglich für die Sequenzierung wurde ein Gel hergestellt, bei dem auf der gesamten Gelbreite Probe aufgetragen werden konnte. Nach 30 Minuten Polymerisationszeit wurde das Gel aus der Gießapparatur entfernt und direkt in die Laufkammer, in der sich bereits Puffer befand, eingehängt. Dieser Puffer bestand aus 25 mM TRIS-HCl, 190 mM Glycin sowie 0,1 % (w/v) SDS. Der Probenauftrag erfolgte direkt im Anschluß.

4.5.2 Vorbereitung der Proben

Die Proben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden mit TBS auf ein Endvolumen von 20 µl verdünnt und mit 20 µl 2 fach konzentriertem Probenpuffer versetzt. Proben mit geringerer Proteinkonzentration wurden mit TBS auf ein Endvolumen von 30 µl verdünnt und mit 10 µl 4 fach konzentriertem Probenpuffer versetzt.

Wenn Protein aus einem relativ großen Probenvolumen aufgetrennt werden sollte oder wenn sich noch Detergenzreste in der Probe befanden, wurde das Protein, wie von WESSEL und FLÜGGE (1984) beschrieben, mit unverdünntem Methanol und Chloroform ausgefällt und in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Proteinsedimente wurden in TBS aufgenommen und mit dem gleichem Volumen an 2 fach konzentriertem Probenpuffer versetzt.

Vor Auftrag wurden die Proben für 3 Minuten auf 98 °C erhitzt und 30 Sekunden bei 12.000 x g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. In der Regel wurden 20 µl Probe pro Auftragsschacht eingesetzt.

4.5.3 Elektrophorese-Laufbedingungen

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteingemische erfolgte bei konstanter Stromstärke (40 mA). Die Spannung erhöhte sich während des Laufs auf maximal 250 V. Der Elektrophorese-Laufpuffer wurde während der Elektrophorese mittels Umlaufkühlung auf 12 °C gehalten.

4.6 Gelfärbung

Nach Beendigung des Elektrophoreselaufes wurde das Sammelgel abgetrennt und das verbleibende Trenngel mit aqua bidest von den Glasplatten gelöst. Die Färbung erfolgte in Glasschalen, wobei jeweils soviel Färbelösung zugegeben wurde, daß das Gel frei schwamm (ca. 200 ml je Gel). Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Taumler durchgeführt.

4.6.1 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung

Die Coomassie-Färbemethode wurde eingesetzt, um das für die Sequenzierung aufgetrennte Protein sichtbar zu machen. Hierbei wurde auf eine Fixierung verzichtet, um im Anschluß die Peptide möglichst quantitativ aus dem Gel eluieren zu können.

<u>Färbelösung</u>	0,2 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R-250
	50 % (v/v) Methanol
	in aqua bidest.

<u>Entfärbelösung</u>	25 % (v/v) Methanol
	6 % (v/v) Essigsäure
	in aqua bidest.

Die Färbung erfolgte über 15 Minuten auf einem Taumler. Nachdem das Gel kurz in aqua bidest. gespült wurde, konnte die Entfärbelösung zugegeben werden. Nach weiteren 15 Minuten waren Proteinbanden zu erkennen. Das Gel wurde danach in aqua bidest. überführt.

4.6.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung der Proteine erfolgte in Anlehnung an HEUKESHOVEN und DERNICK (1985). Folgende Stammlösungen, aus denen bei Bedarf die benötigten Verdünnungen hergestellt wurden, wurden im voraus in aqua bidest. angesetzt:

2 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

2,5 M Na-Acetat
 1 % (w/v) AgNO₃
 10 % (w/v) Na₂CO₃
 6 % (w/v) Na₂-EDTA

Die Fixierung der Gele erfolgte für mindestens 30 Minuten in einer Lösung aus 10 % (v/v) Essigsäure und 30 % (v/v) Ethanol in aqua bidest. Um für die nachfolgende Silberfärbung das notwendige neutrale pH-Millieu zu schaffen, wurden die Gele für mindestens 2 Stunden oder auch über Nacht in einer Lösung aus 0,5 M Na-Acetat, 30 % (v/v) Ethanol, 0,125 % Glutaraldehyd und 0,2 % Na₂S₂O₃ in aqua bidest. inkubiert. Danach wurden die Gele dreimal für 5 Minuten in viel aqua bidest. gewaschen und die Färbelösung zugegeben: 0,1 % Silbernitrat und 0,2 % Formaldehyd, 37 % in aqua bidest. Die Färbung erfolgte für 30 bis 40 Minuten, woraufhin die Gele 10 Sekunden mit viel aqua bidest. gewaschen wurden. Die gefärbten Proteinbanden wurden 15 Minuten in 2,5 % Na₂CO₃ und 0,1 % Formaldehyd, 37 %, entwickelt. Um eine Überfärbung zu vermeiden, wurde die Färbereaktion mit 1,5 % Na₂-EDTA abgestoppt. Die gefärbten Gele können in dieser Lösung für mehrere Tage bei 4 °C aufbewahrt werden. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Gele fotografiert und anschließend getrocknet (Geltrockner *Biometra*, Göttingen).

4.7 Western-Blot-Technik: Elektrotransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen

Der Elektrotransfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte nach BURNETTE (1981). Unmittelbar nach Elektrophoreseende wurde von den SDS-Gelelen das Sammelgel entfernt und die verbliebenen Trenngele für 30 Minuten in Blotpuffer inkubiert (25 mM TRIS-HCl, 190 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,075 % (w/v) SDS). Der Proteintransfer erfolgte im Naßblotverfahren in einem vertikalen Puffertank mit Plattenelektroden bei 60 V über 2 Stunden. Das Packen des Blot-Sandwichs erfolgte luftblasenfrei unter Blotpuffer, um einen einwandfreien Transfer der Proteine zu gewährleisten. Ausgehend von der Anode wurde wie folgt gepackt: Schwamm - Filterpapier - SDS-Gel - Nitrocellulosemembran - Filterpapier - Schwamm. Das Blotten fand bei 4 °C statt.

Um den Proteintransfer visuell beurteilen zu können, wurden 'prestained marker' eingesetzt, die ohne Färben direkt auf der Nitrocellulose sichtbar waren. Um sicherzustellen, daß die Proteine nicht durch die Nitrocellulose 'durchgeblottet' wurden, wurde eine zweite Nitrocellulosemembran hinter die erste geschichtet. Auf dieser zweiten Nitrocellulose sollte nach Färbung mit Amidoblack kein Protein sichtbar werden. Die Amidoblackfärbung erfolgte über fünf Minuten in der Färbelösung (0,02 % (w/v) Amidoblack in 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure in aqua bidest.) und weiteren 5 Minuten in der Entfärbelösung (60 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in aqua bidest.).

4.7.1 Autoradiographie

Die Autoradiographie zum Nachweis geblotteter Antigene wurde nach BIRK und KOEPEL (1987) durchgeführt. Zu Beginn wurde die Nitrocellulose für 16 Stunden bei 37°C in PBS-A inkubiert. Unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulose sollten danach mit Blockpuffer (10 % (v/v) NKS, 0,5 % (v/v) Tween-20 in PBS-A) für 2 Stunden bei 37 °C und leichtem Schütteln abgesättigt werden. Die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C und 16 Stunden bei 4 °C. Die Antikörper wurden in PBS-A, dem 10 % (v/v) NKS, 20 % (v/v) Glycerin, 2 M Glucose und 0,5 % (v/v) Tween-20 zugefügt wurden, in einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt. Hierbei sollten Glycerin und Glucose die unspezifischen Antikörperbindungen herabsetzen. Die Nitrocellulose wurde anschließend zweimal mit Waschpuffer (0,5 % (v/v) Tween-20 in PBS-A) für jeweils fünf Minuten gewaschen und fünf Minuten in Blockpuffer abgesättigt. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte mit [¹²⁵J]-Protein A. Es wurden 0,5 x 10⁶ cpm/ml in Blockpuffer eingesetzt, die Inkubation erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die Nitrocellulose getrocknet und bei -80 °C in der Regel über 24 Stunden autoradiographiert.

4.7.2 Chemilumineszenz

Neben der Autoradiographie wurde die Chemilumineszenz-Methode mit dem 'enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection system' der Firma Amersham, Braunschweig, zur Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung angewendet. In den hier verwendeten Puffern durfte kein Natrium-Azid enthalten sein, da dies die Entwicklungsreaktion stören würde. Nach dem Proteintransfer erfolgte die Blockade der unspezifischen Proteinbindungsstellen der Nitrocellulosemembran mit Blockpuffer (10 % (v/v) NKS, 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS-A) über Nacht bei 4 °C. Die Inkubation des ersten Antikörpers (20 µg/ml in Blockpuffer) erfolgte zuerst für zwei Stunden bei 37 °C und mäßigem Schütteln und danach über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Nitrocellulosemembran einmal 20, zweimal 15 und zweimal 5 Minuten mit ausreichend Waschpuffer gewaschen (0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS-A). Als zweiter Antikörper wurden Anti-Maus-IgG (1:1000 in Waschpuffer, 2 Stunden bei Raumtemperatur, Taumler) eingesetzt, die mit einer Peroxidase konjugiert waren. Nach wiederholtem Waschen (einmal 30 Minuten, zweimal 10 und viermal 5 Minuten in Waschpuffer) wurde die Membran nach kurzem Abtrocknen in der Chemiluminollösung für eine Minute inkubiert. Hierbei katalysiert die Peroxidase die Oxidation des Luminols in Anwesenheit von H₂O₂. Unmittelbar nach Oxidation befindet sich das Luminol in angeregtem Zustand, wobei es beim Zurückkehren in seinen Grundzustand Licht emittiert. Zum Nachweis dieser Lichtemission wurde die Membran für 0,5 bis 2 Minuten einem Röntgenfilm exponiert.

4.8 Solubilisierung der Membranproteine

BIRK und Mitarbeiter (1991) postulierten, daß es sich bei dem Polypeptid mit der Masse 400.000 um ein integrales Membranprotein handelt, da dieses erst nach vollständiger Solubilisierung von der Bürstensaummembran getrennt werden konnte. Deshalb sollte ein geeignetes Detergenz gefunden werden, mit dem das Antigen in Lösung gebracht werden kann.

Hierzu wurde circa 1 ml der präparierten Endosomen des Schweinenierencortex (s. Abschnitt 4.1) mit PBS-A, dem 0,5 mM PMSF zugesetzt wurde, auf eine Proteinkonzentration zwischen 2 und 15 mg/ml eingestellt. Dem Endvolumen wurde das gleiche Volumen einer doppelkonzentrierten Detergenz-Lösung in PBS-A, 0,5 mM PMSF, zugesetzt, so daß bei halbierten Proteinkonzentration Detergenz-Endkonzentrationen zwischen 5 und 0,3 % (w/v) zur Solubilisierung eingesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte eine Stunde auf Eis. Danach wurden die nicht solubilisierten Proteine mit 105.000 x g bei 4°C für eine Stunde abzentrifugiert. Folgende Detergenzien kamen zum Einsatz: Die Gallensäuresalze Desoxycholat und Cholat, deren Abkömmling CHAPS sowie die nichtionischen Detergenzien NP-40 und Triton X-100.

Um zu entscheiden, welches Detergenz bezogen auf das gp400 die besten Solubilisierungseigenschaften aufwies, wurden neben den Überständen auch nichtzentrifugierte, identische Parallelproben im Festphasen-Radioimmunoassay (s. Abschnitt 4.4) hinsichtlich ihrer Menge an solubilisiertem Antigen untersucht. Um einheitliche Detergenzkonzentrationen im Radioimmunoassay einzusetzen, wurden alle Proben mit PBS-A, 0,5mM PMSF, auf eine Detergenzkonzentration von 0,05 % (w/v) eingestellt. Die Proteinkonzentrationen der verdünnten Fraktionen wurden mittels Proteinbestimmung nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) parallel zum Radioimmunoassay ermittelt. Die gemessenen SHEs wurden danach in Abhängigkeit von der jeweils ermittelten Proteinkonzentration korrigiert.

Die Solubilisate wurden für die sich anschließenden proteinchemischen Reinigungsverfahren eingesetzt. Welches Detergenz in welcher Konzentration hierbei zum Einsatz kam, wurde nach Messung der Antikörper-Bindung der Solubilisate im Festphasen-Radioimmunoassay entschieden.

Bei Verwendung von Cholat enthielt das in der Solubilisierung eingesetzte PBS-A mit 200 mM einen höheren NaCl-Anteil als das sonst verwendete PBS-A. Nach TZAGOLOFF und PENEFSKY (1971) sowie HELENIUS und SIMONS (1975) wird die Solubilisierungseffektivität von Salzen der Gallensäuren durch monovalente Salze gesteigert.

4.9 Präparative isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung ist vom Prinzip her eine Elektrophorese in einem pH-Gradienten und bewirkt die Trennung eines Proteingemisches aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte (pI) (NEUMEIER, 1980). Zur Anwendung kam eine präparative Isoelektrische Fokussierung in einem ca. 30 cm langen U-Rohr (Svensson-Rohr), das mit einem Zucker-Dichtegradienten gefüllt wurde. Zur Ausbildung des pH-Gradienten wurden Ampholyte mit pI zwischen 3 und 10 eingesetzt (Servalyt 3-10). Der Zucker-Dichtegradient diente der Stabilisierung des pH-Gradienten sowie der fokussierten Proteinbanden. Das verwendete U-Rohr ist in Abb. 4.2 schematisch dargestellt.

Pro Fokussierung wurden ca. 10 mg Protein einer Endosomenpräparation eingesetzt, das zuvor wie in Abschnitt 4.8 beschrieben solubilisiert wurde. Sowohl die benötigten Puffer als auch alle Geräte wurden auf 4 °C gekühlt, während der Fokussierung hielt eine Umlaufkühlung die Temperatur bei 4 °C. Zum Befüllen wurden zuerst 20 ml Kathodenlösung (s.u.) in die Säule eingebracht. Zur Ausbildung des Dichtegradienten wurden hierauf nacheinander die dichte und die leichte Lösung (s.u.) gepumpt (ca. 80 ml). Um eine Verwirbelung im Gradienten zu vermeiden, wurde darauf geachtet, daß die Lösung nicht eintropft, sondern langsam an der Säulenwand abläuft. Nachdem die Säule zu ca. einem Drittel gefüllt war, erfolgte der Probenauftrag. Hierzu wurden ca. 9 ml Solubilisat vorsichtig auf den Gradienten aufgegeben. Abschließend erfolgte die Übersichtungung mit der restlichen leichten Lösung sowie mit 15 ml Anodenlösung (s.u.).

<u>Dichte Lösung</u>	1,5 M Saccharose 2 M Harnstoff 3,8 % (v/v) Servalyt 3-10 100 µM Na ₃ VO ₄ 100 µM ZnCl ₂	<u>Leichte Lösung</u>	0,15 M Saccharose 2 M Harnstoff 3,8 % (v/v) Servalyt 3-10 100 µM Na ₃ VO ₄ 100 µM ZnCl ₂
<u>Kathodenlösung</u>	1,8 M Saccharose 2 M Harnstoff 0,24 N NaOH	<u>Anodenlösung</u>	2 M Harnstoff 87,2 mM H ₃ PO ₄

Der Aufbau des elektrischen Feldes erfolgte bei 2,0 kV, 15 W und einer nach oben unbegrenzten Stromstärke, die Fokussierungsdauer betrug 16 Stunden. Danach wurden ca. 30 Fraktionen à 4 ml am unteren Säulenende über einen Schlauch langsam ausgeleitet und der pH-Wert jeder einzelnen Fraktion bestimmt.

Zur Entfernung der Ampholyte und der Puffersalze wurden sämtliche Fraktionen mind. 24 Stunden gegen 2 x 10 l aqua bidest. bei 4 °C dialysiert.

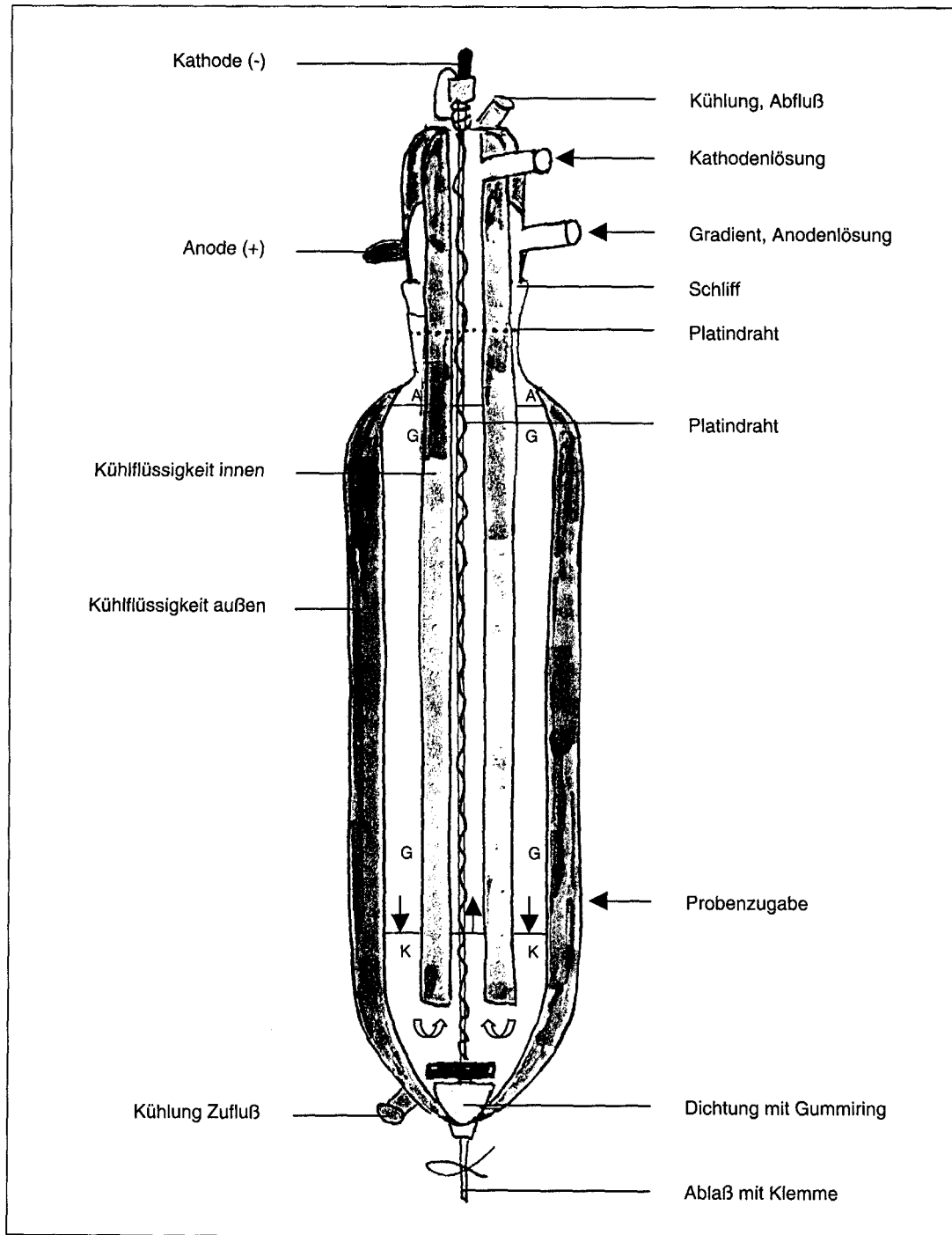


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des für die präparative isoelektrische Fokussierung verwendeten Svensson-Rohres (Abk.: A: Anodenlösung; G: Gradient; K: Kathodenlösung)

4.10 Affinitätschromatographie mit Concanavalin A

Aufgrund der vermuteten Glykokonjugate des gp400 (BERNOTAT-DANIELOWSKI et al., 1986) wurde eine Affinitätschromatographie mit Concanavalin A durchgeführt. Concanavalin

A, ein Protein der Schwertbohne, bindet spezifisch an α -D-Glukose- und α -D-Mannose-Moleküle (SUROLIA et al., 1975).

5 ml des Säulenmaterials (Con-A-Sepharose) wurden mit Laufpuffer (10 mM TRA, 10 % (w/v) Glycerin, 150 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen und anschließend mit Laufpuffer, dem 2% (w/v) Cholat zugesetzt wurden, äquiliibriert. Nach Auftrag des Solubilisates (12 mg Protein, solubilisiert mit 2 % (w/v) Cholat) wurde die Säule mit Laufpuffer plus Detergenz gewaschen, bis der an den Detektor angeschlossene Schreiber eine stabile Nulllinie zeichnete. Hiermit sollte sichergestellt werden, daß alle nichtgebundenen Bestandteile des Solubilisats quantitativ ausgewaschen wurden. Die Elution gebundener Glykokonjugate erfolgte durch einen linearen Gradienten aus α -Methyl-D-Mannosid in TRA/Cholat-Puffer in einer Konzentration von 0,2 – 1 M. Die Eluatfraktionen wurden manuell gesammelt, 16 Stunden gegen 2 x 5 l PBS-A dialysiert und nach Proteinkonzentrationsbestimmung nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) im Festphasen-Radioimmunoassay hinsichtlich ihres Antigengehaltes untersucht.

4.11 Immunaффinitätschromatographie mit monoklonalen Antikörpern

Die Affinitätschromatographie wurde mit dem 'Immunopure^R Protein G IgG Orientation Kit' der Firma Pierce durchgeführt. Da Maus IgG₁ Antikörper eine höhere Affinität für Protein G besitzen (AKERSTRÖM et al., 1985), wurde dies gegenüber Protein A vorgezogen.

4.11.1 Kopplung der Protein G-Säule mit monoklonalen Antikörpern

Bei Mäuse-Immunglobulinen können laut Herstellerangaben 6-8 mg Antikörper pro ml Säulenmaterial für die Kopplungsreaktion eingesetzt werden. Für eine Kopplung an 4 ml Säulenmaterial wurden deshalb ca. 28 mg Antikörper verwendet. Aus Gründen, die später noch erläutert werden, kam neben dem monoklonalen Antikörper N4A4 noch ein weiterer laboreigener monoklonaler Antikörper zum Einsatz: L4D6.

Entsprechende Klonüberstände (28 mg Immunglobuline waren in ca. 200 ml Klonüberstand enthalten) wurden bei 37 °C aufgetaut, über vier Tage gegen PBS-A bei 4 °C dialysiert und anschließend über ein Vakuumfiltersystem mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Jegliche primären Amine wie z.B. TRIS oder Glycin mußten vor der Kopplungsreaktion entfernt werden. Die für die Kopplung verwendeten Puffer und Reagenzien waren im Kit gebrauchsfertig enthalten:

Waschpuffer (50 mM Natriumborat, pH 8,2)

Antikörperbindungspuffer (0,2 M Triethanolamin, pH 8,2)

Blockpuffer (0,1 M Ethanolamin, pH 8,2)

Crosslinking-Reagenz Diethylpimelimidat (DMP)

Die Protein G-Säule (4 ml) wurde vor und nach dem Auftragen des monoklonalen Antikörpers mit Waschpuffer gespült. Für die kovalente Kopplung des gebundenen Antikörpers wurde DMP in 4 ml Antikörperbindungspuffer gelöst, auf die Säule gegeben und unter ständigem vorsichtigem Über-Kopf-Wenden der Säule eine Stunde inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden nach der Kopplungsreaktion mit Blockpuffer (4 ml, 10 Minuten Über-Kopf-Wenden) abgesättigt. Danach erfolgte ausgiebiges Spülen mit Waschpuffer. Die Säule wurde in PBS-A bei 4°C gelagert und konnte so mehrfach wiederverwendet werden.

4.11.2 Durchführung der Immunaффinitätschromatographie

Die Immunadsorption wurde nach SCHNEIDER und Mitarbeitern (1982) mit Modifikationen nach HUBERT und Mitarbeitern (1986) durchgeführt. Hierzu wurde das nach Abschnitt 4.8 hergestellte Solubilisat 1:10 mit PBS-A und dem an Protein G gekoppelten monoklonalen Antikörper verdünnt, so daß die Cholatkonzentration 0,5 % (w/v) betrug. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Taumler. Danach wurde das gesamte Material in die Säule gegeben und mit PBS-A, dem 0,5 % (w/v) Cholat zugesetzt wurde, gespült. Die Spülung wurde beendet, sobald der angeschlossene Schreiber eine stabile Nulllinie zeigte. Die Elution des gebundenen Antigens erfolgte mit 0,05 M Diethylamin, 0,5 % (w/v) Cholat, pH 11,5. Ca. 10 ml Eluat wurden hierbei manuell gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit PBS-A/Cholat äquilibriert und mit PBS-A vor der weiteren Lagerung gespült. Um die bei der Aminosäurenanalyse und der Sequenzierung störenden Puffersalze herauszufiltrieren, wurde die Eluatfraktion mit 2-Mercaptoethanol bis zu einer Endkonzentration von 1 % (v/v) versetzt und über Centriplus™-Konzentratoren mit einem Ausschlußvolumen von 100 kDa bis auf ein Volumen von ca 1 ml eingengt. Das Konzentrat wurde noch zweimal mit 10 ml 1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol in aqua bidest. versetzt und erneut aufkonzentriert. Die aufkonzentrierte Eluatfraktion (ca. 1 ml) wurde bis zur Aminosäurenanalyse bzw. Sequenzierung bei -80 °C gelagert.

4.12 Verdau des Proteins im SDS-Gel und Elution der Peptide aus der Gelmatrix

Der Proteinverdau im SDS-Gel sowie die anschließende Elution der Peptide aus der Gelmatrix erfolgte im proteinanalytischen Labor der Arbeitsgruppe Drs. Linder im Biochemischen Institut am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen. Hierzu wurden die Eluatfraktionen von ca. 100 Immunadsorptionen (ca. 100 ml) gepoolt und über Centriplus™-Konzentratoren auf ein Volumen von 1 ml eingengt. Das darin enthaltene Protein wurde auf drei SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung der SDS-Gele mit Coomassie-Brilliant-Blue wurden die gut sichtbaren Proteinbanden mit einem Skalpell

aus dem Polyacrylamidgel herausgeschnitten und zerkleinert. Die kleinen Gelstückchen wurden in Eppendorf-Cups gesammelt und zur Entfernung von Substanzen, die den Verdau stören könnten, mit aqua bidest. bei 4°C einige Tage gewässert. Um ein möglichst vollständiges Eindringen des Verdaupuffers in die Gelmatrix zu gewährleisten, wurden die gewässerten Gelstückchen vor dem Verdau für ca. vier Stunden in der Vakuum-Zentrifuge (Speed-Vac) getrocknet und anschließend mit 100 µl Acetonitril befeuchtet. Laut Herstellerangaben ist die Enzymaktivität in Gegenwart von schwach denaturierenden Agenzien, insbesondere 10 % Acetonitril, erhöht. Anschließend wurden die Gelstückchen mit 880 µl Verdaupuffer (25 mM TRIS-HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA) und mit 20 µl der in Verdaupuffer gelösten Endoproteinase Lys-C (0,1 µg/µl) versetzt. Die Inkubation erfolgte unter Argonbegasung bei 30 °C. Um einen möglichst vollständigen Verdau sicherzustellen, wurden die Proben nach 16 Stunden mit weiteren 550 µl Verdaupuffer, dem 10 % (v/v) Acetonitril zugesetzt wurden, sowie 25 µl gelöster Proteinase (0,1 µg/µl) versetzt. Die Inkubation erfolgte wiederum in Argonatmosphäre bei 30 °C. Nach 16 Stunden wurde der Überstand abpipettiert, die Gelstückchen mit 200 µl Verdaupuffer nachgewaschen und die gepoolten Fraktionen in der Speed-Vac auf ein Viertel des Ausgangsvolumens eingeeengt. Bis zur weiteren Analyse der Peptidfragmente wurde die Verdau-Fraktion bei -20 °C aufbewahrt.

Als Kontrolle wurden aus einem Polyacrylamidgel, auf das kein Protein aufgetragen wurde, Gelstückchen ausgeschnitten und in identischer Weise mit Verdaupuffer und Endoproteinase Lys-C versetzt und weiterbehandelt.

4.13 Auftrennung der Peptidfragmente

Die beim enzymatischen Verdau entstehenden Peptidfragmente wurden mittels RP-HPLC in einem integrierten Trennsystem, welches mit einem C-R5A-Chromatopac-Integrator ausgestattet war, aufgetrennt (LINDER et al., 1994). Als Säule diente eine Vydac-Säule (C4, Porendurchmesser 300 Å, 2,1 x 250 mm). Es wurde ein linearer Acetonitril-Gradient aufgetragen (0 - 100% B in 45 Minuten, A: 0,108% (v/v) TFA, B: 0,095% (v/v) TFA, 60% (v/v) Acetonitril). Die Flußrate betrug 200 µl/min, die Temperatur 28 °C. Die Laufmittel wurden mit Helium begast und die Proben vor Auftrag drei Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 220 nm, die Fraktionen wurden manuell gesammelt.

4.14 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

In der MALDI-TOF-Massenspektrometrie sollten die in der RP-HPLC manuell gesammelten Peptidfraktionen hinsichtlich ihrer Eignung für die Proteinsequenzierung untersucht werden. Eine Fraktion eignet sich ideal für die Sequenzierung, wenn in ihr nur ein Peptid enthalten ist. Würde ein Peptidgemisch vorliegen, könnten die Ergebnisse der Sequenzierung

fehlinterpretiert werden. Die in der Massenspektrometrie ermittelte Masse kann außerdem dazu verwendet werden, die Richtigkeit der Sequenz zu überprüfen.

Prinzip der Massenspektrometrie ist es, ein nichtflüchtiges Biopolymer in ein intaktes, ionisiertes Molekül in der Gasphase umzuwandeln. Bei der MALDI-MS werden die zu untersuchenden Makromoleküle zuvor in eine Matrix eingebettet, die aus kleinen organischen Molekülen besteht, welche bei der Wellenlänge des Lasers absorbieren (= matrix assisted laser desorption ionization: MALDI). Die Bildung der gasförmigen Ionen wird durch kurze intensive Laserimpulse induziert. Die Matrix absorbiert die Energie des Lasers und überträgt diese auf das Biopolymer, welches somit relativ schonend, meist als Ganzes, verdampft wird (HILLENKAMP et al., 1991). Zur Detektion wird MALDI meist mit TOF (time of flight) gekoppelt: Die Ionen werden im elektrischen Feld beschleunigt, wobei die Zeit bis zum Eintreffen am Detektor gemessen wird. Aufgrund individueller masseabhängiger Geschwindigkeiten werden die Ionen während ihres Fluges getrennt (BAHR et al., 1994).

Die vorliegenden Massenspektren wurden auf einem Vision 2000-Gerät der Firma Finnegan MAT im 'positive-ion reflectron mode' erzeugt. Die Ionisierung erfolgte über einen pulsierenden Stickstoff-Laser (Wellenlänge 337 nm, Leistungsdichte 10^6 W cm^{-2}). Zur Kalibrierung wurden Angiotensin und bovines Insulin als externe Standards eingesetzt. Die ausgewählten Fraktionen (0,5 µl) wurden mit Matrixlösung (10 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure in 0,1 % (v/v) TFA und 30 % (v/v) Acetonitril, 1 µl) gemischt und für die Massenspektrometrie direkt auf dem Probenhalter gemischt und an der Luft getrocknet.

4.15 Peptidsequenzierung

Die Peptidfragmente, die nach massenspektrometrischer Beurteilung für eine Sequenzierung geeignet erschienen, wurden mittels Edman-Abbau auf einem 'pulsed-liquid-phase sequencer' sequenziert (EDMAN, 1950). Der eigentlichen Sequenzierung nach LINDER und Mitarbeitern (1994) wurde ein modifiziertes, zusätzliches Waschprogramm vorgeschaltet (Applied Biosystem SDS-wash cycle).