

**Epitopkartierung monoklonaler Antikörper
gegen den humanen 46 kDa Mannose-6-phosphat Rezeptor,
die die Ligandbindung hemmen**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl-Biol. Bettina Trotte

geboren am 21. 03. 1968 in Springe

Hannover 1998

Referent

PD. Dr. W. Müller

Korreferent

Prof. Dr. K. von Figura

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.1998

Vincent van Gogh schreibt:

..... Hinaussteuern auf das hohe Meer, das müssen wir auch tun,
wollen wir etwas fangen, und wenn es manchmal geschieht,
daß wir die ganze Nacht gearbeitet haben und nichts erreichten,
dann ist es gut, doch nicht aufzugeben,
sondern in der Morgenstunde erneut das Netz auszuwerfen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Funktionelle Bedeutung der Lysosomen	1
1.2	Synthese und Transport der lysosomalen Enzyme	1
1.3	Mannose-6-phosphat Rezeptoren (MPR)	2
1.3.1	Intrazelluläre Verteilung der MPR 46	3
1.3.2	Transport, Sortierung und Internalisierung des MPR 46	3
1.3.2.1	Transportwege des MPR 46	3
1.3.2.2	Intrazelluläre Sortierung und Zirkulation des MPR 46	4
1.3.2.3	Internalisierung des MPR 46 an der Plasmamembran	6
1.3.3	Proteinstruktur des MPR 46	7
1.3.4	Genomische Organisation des MPR 46	11
1.3.5	Struktur und biochemische Eigenschaften der Ligandbindungsstelle	11
1.4	Monoklonale Antikörper	12
1.4.1	Struktur und Funktion von Antikörpern	12
1.4.2	Herstellung von monoklonalen Antikörpern	13
1.5	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.2	Verbrauchsmaterial	20
2.1.3	Chemikalien	21
2.1.4	Detergenzien	22
2.1.5	Proteine, Proteaseinhibitoren und Proteinstandards	22
2.1.6	Peptide	23
2.1.7	Enzyme, Nukleotide	23
2.1.8	Phosphomannan (PM)-Sepharose-Säule	24
2.1.9	Kits zur Bearbeitung von DNA und Protein	24
2.1.10	Antikörper	25
2.1.10.1	Primärantikörper	25
2.1.10.2	Sekundärantikörper	26
2.1.11	Vektoren, DNA-Standards	27
2.1.12	Oligonukleotide	28
2.1.13	Bakterienstämme	30
2.1.14	Medien zur Anzucht von prokaryonten Zellen	30
2.1.15	Zelllinien	30
2.1.16	Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryonten Zellen	31
2.1.17	Antibiotika	32
2.1.18	Radioaktive Substanzen	32
2.1.19	Häufig verwendete Puffer	32
2.1.20	EDV	33
2.2	Methoden	33
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	34
2.2.1.1.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	34
2.2.1.1.2	Plasmid-Präparation mit Qiagen	35
2.2.1.2	Präzipitation mit Ethanol	36
2.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	36
2.2.1.4	Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol oder Chloroform	37

2.2.1.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
2.2.1.6	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	38
2.2.1.7	Mutagenese mit QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	38
2.2.1.8	Sequenzierung von Plasmid-DNA	41
2.2.1.9	Herstellung von Transformations-kompetenter Zellen	43
2.2.1.10	Transformation kompetenter Zellen	43
2.2.1.11	Anlegen einer Glycerinkultur	44
2.2.2	Zellbiologische Methoden	44
2.2.2.1	Zellkultur	44
2.2.2.1.1	Kulturbedingungen	44
2.2.2.1.2	Passagieren von Zellen	44
2.2.2.1.3	Gefrierkonservierung von Zellen	45
2.2.2.1.4	Revitalisierung von Zellen	45
2.2.2.1.5	Stabile Transfektion	46
2.2.2.2	Infektion der Insektenzellen mit dem Baculovirus	47
2.2.3	Arbeiten mit radioaktiven Isotopen	48
2.2.3.1	Metabolische Markierung mit ³⁵ S-Methionin und Cystein	48
2.2.3.2	Radioaktive Markierung von Proteinen mit Jodogen	49
2.2.3.3	Fixierung von SDS-Polyacrylamidgelen und Auswertung am Phosphoimager	50
2.2.3.4	<i>In vitro</i> Transkription und Translation	50
2.2.4	Immunochemische Methoden	51
2.2.4.1	Indirekte Immunfluoreszenz	51
2.2.4.2	Immunpräzipitation	53
2.2.4.2.1	Immunpräzipitation von humanen MPR 46 aus ³⁵ S-markierten Zellen	53
2.2.4.2.2	Immunpräzipitation von ¹²⁵ I-MPR 46 mit monoklonalen Antikörpern	56
2.2.4.3	Westernblot-Analyse	56
2.2.4.3.1	Proteintransfer von Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membran	56
2.2.4.3.2	Immundetektion	57
2.2.4.4	Slot-Blot/Dot-Blot und Fixierung der Proteine auf der Nitrocellulosemembran	59
2.2.4.5	ELISA	60
2.2.5	Biochemische Methoden	63
2.2.5.1	Extraktion der MPR 46 aus eukaryontischen Zellen	63
2.2.5.2	Bindungstest der MPR an Phosphomannan-Sepharose	63
2.2.5.2.1	Analytische Phosphomannan-Bindung	65
2.2.5.2.2	Präparative Reinigung von MPR 46 über die PM-Sepharose	66
2.2.5.3	Quervernetzung des MPR 46	67
2.2.5.4	Peptidreinigung	68
2.2.5.4.1	HPLC-Reinigung	68
2.2.5.4.2	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-MS)	68
2.2.5.4.3	Reinigung von Peptiden über C18 Cartridge	69
2.2.5.4.4	Reinigung von Peptiden über Sephadex G10	69
2.2.5.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	70
2.2.5.6	Silberfärbung nach Ansorge	72
2.2.5.7	Alkylierung von Proteinen	73

2.2.5.8	TCA-Fällung von Proteinen	74
2.2.5.9	Enzymtests	74
2.2.5.9.1	PNGase F	74
2.2.5.9.2	Endoglykosidase H	75
2.2.5.10	Proteinbestimmung	75
2.2.5.10.1	Proteinbestimmung nach Peterson	75
2.2.5.10.2	Bradford-Test	76
2.2.5.10.3	Bio-Rad DC Protein Test	77
2.2.5.11	Konzentrierung von Proteinlösungen	78
3	Ergebnisse	79
3.1	Monoklonale Antikörper gegen den MPR 46 und Kontrollantikörper	79
3.2	Inhibition der Ligandbindung des MPR 46 durch mAk	81
3.3	Humanspezifität der monoklonalen Antikörper	93
3.4	Epitopkartierung von monoklonalen Antikörpern mittels Maus/ Mensch-Chimären	95
3.4.1	Vergleich der DNA- und Aminosäuresequenz des MPR 46 von Mensch und Maus und Darstellung der Chimären	95
3.4.2	Stabile Transfektion und Expression der Chimären	101
3.4.3	Bindung und Aufreinigung der chimären MPR 46 an die PM-Sepharose	106
3.4.3.1	Überprüfung der Ligandbindungsfähigkeit der MPR-46-Chimären durch PM-Sepharose	106
3.4.3.2	Aufreinigung der chimären MPR 46 mittels PM-Sepharose	108
3.4.4	Epitopkartierung von mAk mittels ELISA	111
3.5	Erkennung von spezifischen Aminosäuresequenzen durch mAk	121
3.5.1	Erkennung des alkylierten MPR 46 durch mAk	121
3.5.2	Erkennung des nicht-glykosylierten MPR 46	124
3.5.3	Erkennung von spezifischen Aminosäuresequenzen	127
4	Diskussion	129
4.1	Inhibition der Ligandbindung durch mAk gegen den MPR 46	129
4.2	Epitopkartierung der mAk durch die Maus/Mensch-Chimären und Peptidanalyse	131
4.2.1	Herstellung der Chimären und Bindung der Chimären an die PM-Sepharose	131
4.2.2	Epitopanalyse	132
4.3	Korrelation der Inhibitionsdaten und Epitopkartierung	135
5	Zusammenfassung	139
6	Literaturverzeichnis	140

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzthiozolinsulfonat]
AP1	Adaptorkomplex 1
AP2	Adaptorkomplex 2
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ARF1	Adenosindiphosphat-Ribosylierungsfaktor
ASA	Arylsulfatase A
BHK	Baby-Hamster-Niere
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cmp	Impulse pro Minute (counts per minutes)
DABCO	Diazobicyclooctan
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung aus Desoxyribonukleotiden
DOC	Desoxycholat
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiotreithol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo H	Endoglykosidase H
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
F _{ab}	antigenbindendes Fragment
F _c	kristallines Fragment
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	foetales Kälberserum
Glc6P	Glukose-6-Phosphat
h	Stunde(n)

HBS	HEPES-gepufferte Kochsalzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
kb	Kilo Base
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
M	Molar
mAk	monoklonale(r) Antikörper
Man6P	Mannose-6-phosphat
MEF	Maus-embryonale-Fibroblasten
min	Minute(n)
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
MPR	Mannose-6-phosphat Rezeptor
MPSV	Myeloproliferatives Sarcoma-Virus
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
p. a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	PBS mit 0,05% Tween 20
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	Peptid: N-Glykosidase F aus <i>Flavobacterium meningosepticum</i>
rmp	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure

TE	TRIS/HCl-EDTA-Puffer
TFA	Trifluoressigsäure
TEMED	N, N, N; N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UTR	untranslatierter Bereich
UV	ultraviolett
v	Volumen
w	Gewicht
wt	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung

Bei einigen Begriffen wurden die englischen Fachtermini verwendet, wie Blot, da auch in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung dieser Begriffe unüblich ist.

Epitop Mapping of Monoclonal Antibodies that Inhibit Ligand Binding of 46 kDa Mannose 6-phosphate Receptor

The 46 kDa mannose 6-phosphate receptor (MPR 46) binds newly synthesized lysosomal enzymes in the trans Golgi network and mediates their transfer to the endosomal compartment. We show that monoclonal antibodies and corresponding F_{ab}-fragments against the luminal domain of MPR 46 efficiently or partly inhibit its binding to phosphomannan. For epitope mapping of these human-specific antibodies we used a series of chimeric constructs containing increasing portions of the N-terminal domain of mouse MPR 46 linked to the C-terminal portion of the human receptor and peptides of the human MPR 46. The inhibition of the ligand binding correlated in the great with position of the postulated epitops with regard to the ligand binding site with the aim of the threedimensional structure of the luminal domain of the bovine MPR 46.

Slogan: mannose 6-phosphate receptor, epitop mapping of monoclonal antibodies, ligand binding site

Epitopkartierung monoklonaler Antikörper gegen den humanen 46 kDa Mannose-6-phosphate Rezeptor, die die Ligandbindung hemmen

Der 46 kDa Mannose-6-phosphate Rezeptor (MPR 46) bindet neu synthetisierte lysosomale Enzyme im trans Golgi Netzwerk und transportiert sie zu den endosomalen Kompartimenten. Wir zeigten, daß monoklonale Antikörper und ihre korrespondierenden F_{ab}-Fragmente gegen die luminale Domäne des MPR 46 effizient oder teilweise die Bindung an das Phosphomannan hemmten. Für die Epitopkartierung der humanspezifischen, monoklonalen Antikörper wurden eine Serie von Chimären konstruiert, bei denen vom humanen MPR 46 ein zunehmender Anteil der N-terminalen Domäne des humanen Rezeptors durch den murinen ersetzt wurde. Die Einteilung der monoklonalen Antikörper bezüglich der Inhibition der Ligandbindung und der postulierten Epitope wurde durch die dreidimensionale Struktur im großen und ganzen bestätigt.

Schlagworte: Mannose-6-phosphat Rezeptor, Epitopkartierung monoklonale Antikörper, Ligandbindungsstelle

1 Einleitung

1.1 Funktionelle Bedeutung der Lysosomen

Lysosomen sind membranumgebene Organellen eukaryonter Zellen, deren Morphologie heterogen ist und deren Dichte von Zelltyp zu Zelltyp variiert. Lysosomen bauen zelleigene und zellfremde Makromoleküle zu Monomeren ab. Diese Monomere, wie z.B. Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, werden dann ins Cytosol zurücktransportiert und können zum Aufbau zelleigener Stoffe genutzt werden. Der Abbau der Makromoleküle erfolgt durch Hydrolasen, von denen circa 50 Stück bekannt sind. Die Zusammensetzung und die Konzentration der Hydrolasen sind zelltypabhängig. Ihr optimaler pH-Bereich liegt bei 4,5-5,0 (Ohkuma und Poole 1978). Dieser pH-Bereich wird im Lumen der Lysosomen durch eine ATP-getriebene Protonenpumpe der lysosomalen Membran erhalten (Cuppoletti *et al.* 1987).

Die Bedeutung der Lysosomen wird ersichtlich durch die Existenz vieler lysosomaler Speicherkrankheiten, für die zwei unterschiedliche Störungsmechanismen verantwortlich sind. Der eine betrifft die Biosynthese der Enzyme (Neufeld *et al.* 1975) und der andere den Transport der Enzyme vom Synthesort, dem rauhen Endoplasmatischen Retikulum (RER), zum Wirkort den Lysosomen (Hickmann und Neufeld 1972). Die Erforschung dieser Krankheiten führte zu vielen Erkenntnissen über die Transportvorgänge innerhalb der Zelle.

1.2 Synthese und Transport der lysosomalen Enzyme

Die löslichen lysosomalen Enzyme und sekretorischen Proteine werden am RER synthetisiert und haben eine N-terminale topogene Signalsequenz von 15-30 überwiegend hydrophoben Aminosäureresten. Spezielle Proteine erkennen diese Signalsequenz und transferieren die lysosomalen Enzyme und sekretorischen Proteine durch Translokationsporen in das ER-Lumen. Im ER werden die Enzyme und Proteine kotranslational über N-glykosidische Bindung mit Zuckerseitenketten versehen, wobei Dolicholpyrophosphat als Überträger fungiert. Die Verknüpfung erfolgt an ausgewählten Asparaginseitengruppen, deren Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr ist. Die Zuckerseitenkette besteht anfänglich aus drei Glukose-, neun Mannose- und zwei N-Acetylglukosaminresten (Kornfeld und Mellmann 1989). Es werden die drei terminalen Glukosereste und ein terminaler Mannoserest

abgespalten (Kornfeld und Kornfeld 1985). Die Enzyme gelangen über Transportvesikel vom ER zum trans-Golgi Apparat, dort findet eine weitere Prozessierung der Zuckerseitenketten vom mannosereichen zum komplexen Typ statt. Der komplexe Typ ist charakteristisch für sekretorische Proteine. Lysosomale Enzyme besitzen mannosereiche und komplexe Seitenketten (von Figura und Hasilik 1986).

Die mannosereichen Zuckerseitenketten der lysosomalen Enzyme werden mit einem Mannose-6-phosphat-Signal versehen, so daß sie nicht wie die sekretorischen Proteine sezerniert werden. Die Bildung des Mannose-6-phosphat-Signals hängt von der selektiven Erkennung löslicher lysosomaler Enzyme durch die Acetylglukosaminyl-1-Phosphotransferase und der N-Acetylglukosaminidase ab. Einige Mannose-Reste werden am C6-Atom durch die N-Acetylglukosaminyl-1-Phosphotransferase phosphoryliert (Hasilik *et al.* 1980, Reitmann und Kornfeld 1981, Waheed *et al.* 1982). Die Acetylglukosaminyl-1-Phosphotransferase überträgt ein N-Acetylglukosamin-1-phosphat auf den Mannoserest, so daß ein Phosphodiester entsteht. Schließlich wird das N-Acetylglukosamin durch die α -N-Acetylglukosaminidase abgespalten, so daß ein Mannose-6-phosphat entsteht. Dieses Signal ist wesentlich für die Erkennung und Bindung von spezifischen Rezeptoren an die Enzyme, die dann zu den endosomalen Kompartimenten transportiert werden (von Figura und Hasilik 1986). Durch die pH-Veränderung in den endosomalen Kompartimenten werden die Enzyme von den Rezeptoren freigesetzt, und die Rezeptoren gelangen zurück zum trans-Golgi-Netzwerk (TGN) oder zur Plasmamembran.

1.3 Mannose-6-phosphat Rezeptoren (MPR)

Es wurden bisher zwei verschiedene MPR in eukaryonten Zellen gefunden, die aufgrund ihres Molekulargewichts von 46 kDa als MPR 46 und von 300 kDa als MPR 300 bezeichnet wurden. Der MPR 300 wurde erstmals von Sahagian *et al.* (1981) in Rinderleber und der MPR 46 von Hoflack und Kornfeld (1985) in Mauszellen (P388D1) nachgewiesen. Der MPR 300 wird auch kationenunabhängiger Rezeptor und der MPR 46 kationenabhängiger Rezeptor genannt. Die Bindungsaffinität des MPR 46 zu seinen Liganden konnte *in vitro* durch den Einsatz von divalenten Kationen gesteigert werden, während dies beim MPR 300 nicht der Fall war (Hoflack und Kornfeld 1985).

Bis heute konnten diese Rezeptoren in allen Geweben nachgewiesen werden mit Ausnahme bestimmter Tumorzelllinien, die den MPR 46, aber nicht den MPR 300 exprimieren (Gabel *et*

al. 1983, Mainferme *et al.* 1985). Die beiden Rezeptoren sind notwendig für die korrekte Sortierung löslicher Enzyme innerhalb der Zelle (Kasper *et al.* 1996, Munier-Lehmann *et al.* 1996).

1.3.1 Intrazelluläre Verteilung der MPR

Die MPR sind durch ihre Sortierungsfunktion intrazellulär in verschiedenen Kompartimenten zu finden. Die intrazelluläre Verteilung wurde durch subzelluläre Fraktionierung und Immunoelektronenmikroskopie untersucht. Es befinden sich 40-60% in den endosomalen Membranen, 20-40% am TGN und 10-20% an der Plasmamembran (Geuze *et al.* 1985, Brown *et al.* 1986, Griffith *et al.* 1988, Geuze *et al.* 1989, Bleekemolen *et al.* 1988, Klumpermann *et al.* 1993). Klumpermann *et al.* (1993) zeigte in anderen Zelllinien, den Baby-Hamster-Nieren- (BHK) und humanen Hepatom-Zellen (HepG2), daß ein Hauptanteil beider Rezeptoren im TGN und zu einem geringeren Teil in endosomalen Kompartimenten zu finden ist. Es wurden keine MPR 46 in den lysosomalen Membranen gefunden (Sahagian und Kornfeld 1983, Gartung *et al.* 1985, Klumpermann *et al.* 1993).

MPR 46 und MPR 300 besitzen eine weitgehend übereinstimmende intrazelluläre Verteilung (Bleekemolen *et al.* 1988). In transfizierten BHK-Zellen, die die beiden Rezeptoren überexprimieren, konnten Klumpermann *et al.* (1993) zeigen, daß es innerhalb der endosomalen Membranen zu einer partiell lateralen Segregation kommt. Der MPR 300 kommt vorwiegend in den vakuolären Endosomen und der MPR 46 in assoziierten, tubulären, vesikulären Endosomen (ATV's) vor.

Nur wenige MPR konnten in dem ER und den Golgi-Stapeln nachgewiesen werden (Klumpermann *et al.* 1993, Geuze *et al.* 1988, Bleekemolen *et al.* 1988).

1.3.2 Transport, Sortierung und Internalisierung des MPR 46

1.3.2.1 Transportwege des MPR 46

Der MPR 46 zirkuliert zwischen TGN, Endosomen und der Plasmamembran (Abb. 1) (Sahagian und Neufeld 1983, von Figura und Hasilik 1987, Kornfeld und Mellman 1989).

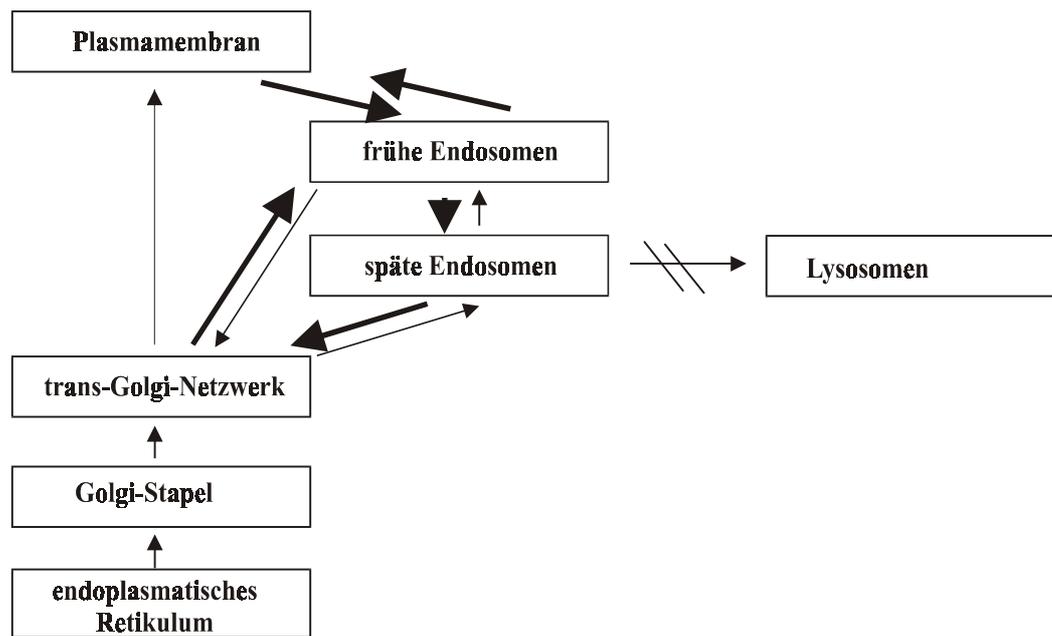


Abb. 1: Rezirkulation des MPR 46

Die fetten Pfeile symbolisieren die vermutliche Hauptzirkulationsrichtung (Hille-Rehfeld 1995).

Der MPR 46 wird im RER synthetisiert und in Transportvesikeln über die cis-, mid-Cisternen des Golgi-Apparates zum TGN transportiert. Im Bereich des trans Golgi-Apparates findet die Bindung der lysosomalen, löslichen Enzyme an den MPR 46 statt (Lazzarino und Gabel 1988). Vom TGN gelangt der MPR 46 mit dem Enzym über Clathrin-beschichtete Vesikel zu den Endosomen (Campbell *et al.* 1983, Geuze *et al.* 1985, Lemansky *et al.* 1987). Clathrin besteht aus einem Komplex aus drei schweren und drei leichten Ketten, die sich zu einem Triskelion formieren. Nach dem Verlust der Clathrinbeschichtung verschmelzen die Vesikel mit frühen endosomalen Membranen (Diesner *et al.* 1993). Durch den sauren pH-Wert findet in den endosomalen Kompartimenten die Dissoziation von Ligand und Rezeptor statt (Geuze *et al.* 1985). Der MPR 46 rezirkuliert von den Endosomen zum TGN oder zur Plasmamembran und von dort wieder zu den Endosomen (Brown *et al.* 1986, Matovcik *et al.* 1990).

1.3.2.2 Intrazelluläre Sortierung und Zirkulation des MPR 46

Der Transport zwischen den Zellorganellen wird über mutiple Sortierungssignale in der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 vermittelt. Die Sortierung der löslichen lysosomalen

Enzyme vom TGN zu den frühen Endosomen erfolgt durch Clathrin-beschichtete Vesikel. Die Sortierung und Bildung der Vesikel erfordert verschiedene cytosolische Komponenten. Der Adaptorkomplex AP1, ein cytosolischer Faktor, bindet an die Sortierungssignale des MPR 46. Das Clathrin, ein weiterer cytosolischer Faktor, bindet an den Adaptorkomplex AP1. Das Clathrin kann nicht direkt an den MPR 46 binden (Pearse und Robinson 1990, Ahle *et al.* 1988). AP1 ist ein heterotetramerer Komplex aus zwei großen Untereinheiten (γ und β') und zwei kleinen (μ_1 und σ_1). Die Bindung an das Clathrin erfolgt über die β' -Untereinheit und die an den Rezeptor vermutlich über die β' und μ_1 -Untereinheit (Ahle *et al.* 1988, Ahle und Ungewickell 1989, Gallusser und Kirchhausen 1993). Das Heranführen des AP1 an den Rezeptor erfolgt durch den ADP-Ribosylierungs-Faktor 1 (ARF1), eine kleine GTPase (Stammes und Rothman 1993, Traub *et al.* 1993). ARF1 reguliert die Bindung Rezeptor, AP1 und Clathrin (Robinson und Kreis 1992, Wong und Brodsky 1992, Le Borgne *et al.* 1996). AP1 erkennt eine stark saure Sortierungssequenz $^{239}\text{Glu-Ser-Glu-Glu-Arg}^{243}$ in der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 (Mauxion *et al.* 1996, Abb. 2). Weiter fand Höning *et al.* (1997) zwei Sequenzen, 212-228 und 234-252, die hohe Affinität zu AP1 aufweisen. Letztere beinhaltet die saure Sequenz von Mauxion und ein Di-Leucin-Motiv. Das Di-Leucin-Motiv war aber nicht essentiell für die AP1-Bindung nach Höning *et al.* (1997). Dieses Di-Leucin-Motiv $^{246}\text{His-Leu-Leu-Pro-Met}^{252}$ ist für die Sortierung in Richtung Endosomen notwendig (Johnson und Kornfeld 1992, Mauxion *et al.* 1996, Abb. 2).

Der MPR 46 rezirkuliert in der Zelle zwischen TGN, Endosomen und Plasmamembran (Abb. 1). Dieses hat für die Zelle zum Vorteil, daß ein Rezeptor mehrmals lysosomale Enzyme transportieren kann. In der Transmembrandomäne und der cytoplasmatischen Domäne sind Rückführungssignale enthalten. Das Tryptophan 204, sowie die Sequenz 219-224 sind an der Rückführung beteiligt (Rohrer *et al.* 1995, Schweizer *et al.* 1997, Abb. 2). Außerdem ist für die Rezirkulation das Cystein 219 in der cytoplasmatischen Region wichtig, welches palmitoyliert werden kann und kritisch für die Zirkulation des MPR 46 und notwendig für die korrekte Sortierung von Cathepsin D ist (Schweizer *et al.* 1996).

Schulze-Garg *et al.* (1995) fanden durch Mikroinjektion von peptidspezifischen Antikörpern heraus, daß die Aminosäuren 224-238 der cytoplasmatischen Region wichtig für den Rücktransport von den Endosomen zum TGN sind. Eine Blockierung dieser Sequenz führt zu einer Akkumulation des MPR 46 in Endosomen, die nicht durch die klassischen, endosomalen Marker charakterisiert werden konnten.

Außer zu den frühen Endosomen transportieren die MPR die lysosomalen Enzyme zur Plasmamembran, wo sie zu 50-70% sezerniert werden (Chao *et al.* 1990). Der MPR 46 ist im Gegensatz zum MPR 300 jedoch nicht in der Lage die Liganden an der Plasmamembran zu binden und zu internalisieren. Die Ligandbindung und die Internalisierung sind folglich unabhängig voneinander (Stein *et al.* 1987c, Watanabe *et al.* 1990, Ma *et al.* 1991).

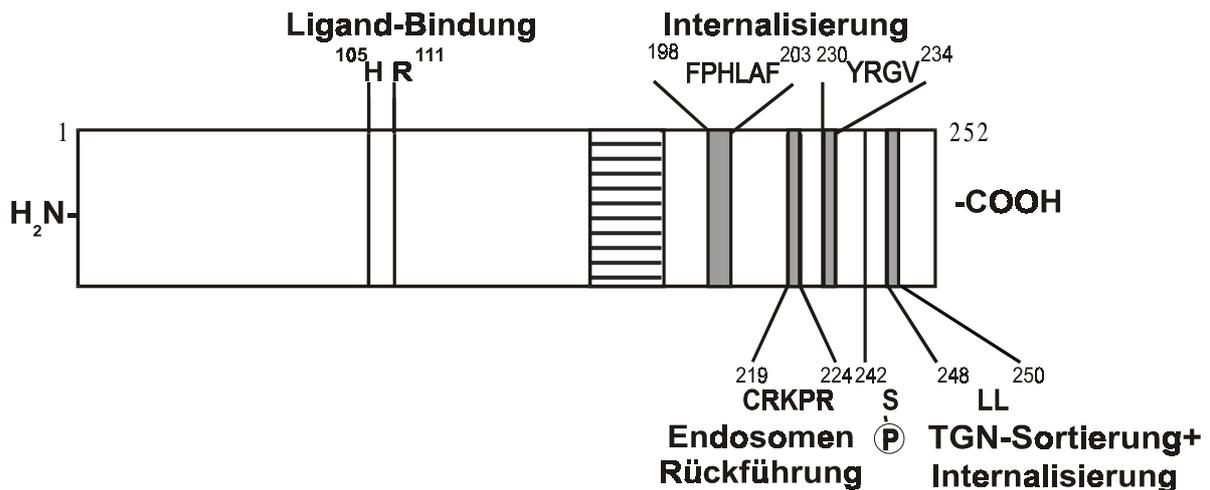


Abb. 2: Wichtige Aminosäuremotive für die Ligandbindung und Sortierung des MPR 46

Die reife Aminosäuresequenz des MPR 46 (252 Aminosäuren), ein Typ I Transmembranprotein, wurde dargestellt. Der Membrananker wurde als gestreiftes Rechteck abgebildet, die N-terminale Domäne ist der luminaire Teil und die C-terminale Domäne der cytoplasmatische Teil des MPR 46.

1.3.2.3 Internalisierung des MPR 46 an der Plasmamembran

Der MPR 46 wird an der Plasmamembran internalisiert. Der Transport erfolgt auch hier wie beim TGN über Clathrin-beschichtete Vesikel. Als cytosolischer Faktor wird der heterotetramere Adaptorkomplex AP2 (Pearse und Robinson 1990) und evtl. Dynamin, eine GTPase, (Takei *et al.* 1995, Hinshaw und Schmid 1995) benötigt. AP2 besteht aus zwei großen (α und β_2) und zwei kleinen Untereinheiten (μ_2 und σ_2). Die Bindungsstelle für Clathrin wurde auf der β_2 -Untereinheit (Gallusser und Kirchhausen 1993) und für den Rezeptor auf der μ_2 - oder β_2 -Untereinheit lokalisiert (Ohno *et al.* 1995, Beltzer und Spiess 1991).

Für eine schnelle Internalisierung sind mehrere Signalsequenzen notwendig, sie wurden in 2 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe beinhaltet die Tyrosin-abhängigen Signale. Das Tyrosin befindet sich auf einer exponierten Haarnadelstruktur: einem β -turn oder tight turn (Ktistakis

et al. 1990, Bansol und Gierach 1991, Eberle *et al.* 1991). Johnson *et al.* (1990) fanden beim bovinen MPR 46 ein schwaches Tyrosinsignal $^{230}\text{Tyr-Arg-Gly-Val}^{234}$, welches zu 30% die Internalisierungsrate beiträgt. 70% der Internalisierungsrate werden durch ein starkes Signal $^{198}\text{Phe-Pro-His-Leu-Ala-Phe}^{203}$ verursacht (Abb. 2). Dieses Signal gehört zu der zweiten Gruppe, den Tyrosin-unabhängigen Signalen. Beide Signale müssen vorhanden sein, um den MPR 46 internalisieren zu können.

Zu den Tyrosin-unabhängigen Signalen gehört außerdem das Di-Leucin-Motiv distal der cytoplasmatischen Region, welches ein Sortierungssignal am TGN zu dem Endosomen und ein Internalisierungssignal an der Plasmamembran ist (Übersichtsartikel Sandoval und Bakke 1994, (Abb. 2)). Das Di-Leucin-Motiv soll ein Bestandteil einer größeren Sekundärstruktur mit benachbarten sauren Aminosäuren sein (Pond *et al.* 1995, Motta *et al.* 1995).

Ein weiteres Internalisierungssignal befindet sich proximal der cytoplasmatischen Domäne $^{192}\text{Ala-Lys-Gly-Met-Glu-Gln-Phe}^{198}$ (Denzer *et al.* 1997).

1.3.3 Proteinstruktur des MPR 46

Der MPR 46 sowie der MPR 300 sind Typ I Transmembranproteine. Ihre Aminosäuresequenzen bestehen aus einer Signalsequenz, die für die Translokation notwendig ist, und der Sequenz des reifen Rezeptors (Tabelle 1, Abb. 3).

Tabelle 1: Proteinstruktur der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (Pohlmann *et al.* 1987, Köster *et al.* 1991, Dahms *et al.* 1987, , Morgan *et al.* 1987, Oshima *et al.* 1988, Lobel *et al.* 1987/88)

	MPR 46			MPR 300	
	Mensch	Maus	Rind	Mensch	Rind
Aminosäuresequenz	277	278	279	2491	2499
Signalsequenz	26	27	28	40	44
luminale Domäne	159			2264	2269
Transmembrandomäne	25			23	23
cytoplasmatische Domäne	67			164	163

Die Sequenz des MPR 46 ist hochkonserviert und zwischen Mensch und Maus zu 93% identisch, wobei die Identität der cytoplasmatischen Domänen 100% beträgt. Die luminale Domäne des MPR 46 vom Rind ist 1,8 Angström groß und besteht vom N-Terminus her aus

einer α -Helix und 9 β -Faltblattstrukturen, von denen die ersten vier und die letzten fünf zu Stapeln antiparallel zusammenliegen (Roberts *et al.* 1998).

Die luminaire Domäne des MPR 300 besteht aus 15 Wiederholungseinheiten (Abb. 3), die untereinander eine Identität von 14-28% aufweisen (Morgan *et al.* 1987, Oshima *et al.* 1988, Lobel *et al.* 1987, Lobel *et al.* 1988, MacDonald *et al.* 1988). Die Wiederholungseinheiten sind 14-37% identisch zu der luminalen Domäne des MPR 46 (Dahms *et al.* 1987).

Glykosylierung:

Der MPR 46 ist ein Glykoprotein mit fünf potentiellen N-Glykosylierungsstellen, von denen vier mit komplexen und mannosereichen Zuckerseitenketten besetzt sind (Wendland *et al.* 1991a). Die molekulare Masse des Peptids beträgt circa 29 kDa, und durch seine Glykosylierung erreicht der MPR 46 eine apparente Molekülmasse von 43-46 kDa (Stein *et al.* 1987b, Hoflack und Kornfeld 1985). Der Kohlenhydratanteil beträgt somit 30-40%. Die N-Glykosylierung ist nicht essentiell für die Ligandbindungsfähigkeit (Wendland *et al.* 1991a), jedoch wird die Ligandbindungskonformation *in vitro* nach dem Herauslösen des MPR 46 aus der Membran durch die Glykosylierung stabilisiert (Wendland *et al.* 1991a, Hille *et al.* 1989). Die N-Glykosylierung erleichtert die Faltung des neusynthetisierten Polypeptids (Zhang und Dahms 1993), insbesondere die Glykosylierung des Asparagin 87 im MPR 46.

Cysteinreste:

Für die Tertiärstruktur des Proteins sind 3 Disulfidbindungen verantwortlich (Lobel *et al.* 1988). Sie wurden im humanen, murinen und bovinen MPR 46 gefunden. Diese hochkonservierten Disulfidbindungen des MPR 46 sind auch im MPR 300 erhalten (Lobel *et al.* 1988, Wendland *et al.* 1991a). Die Cysteine befinden sich alle in der luminalen Domäne, und die Bindungen finden zwischen den Cysteinen 6-52, 106-119 und 141-153 statt (Wendland *et al.* 1991a).

Die zwei Cysteinreste (Cystein 215/219) in der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 können reversibel über eine Thioesterbindung mit der Fettsäure Palmitinsäure verknüpft und zur Membranverankerung genutzt werden (Schweizer *et al.* 1996).

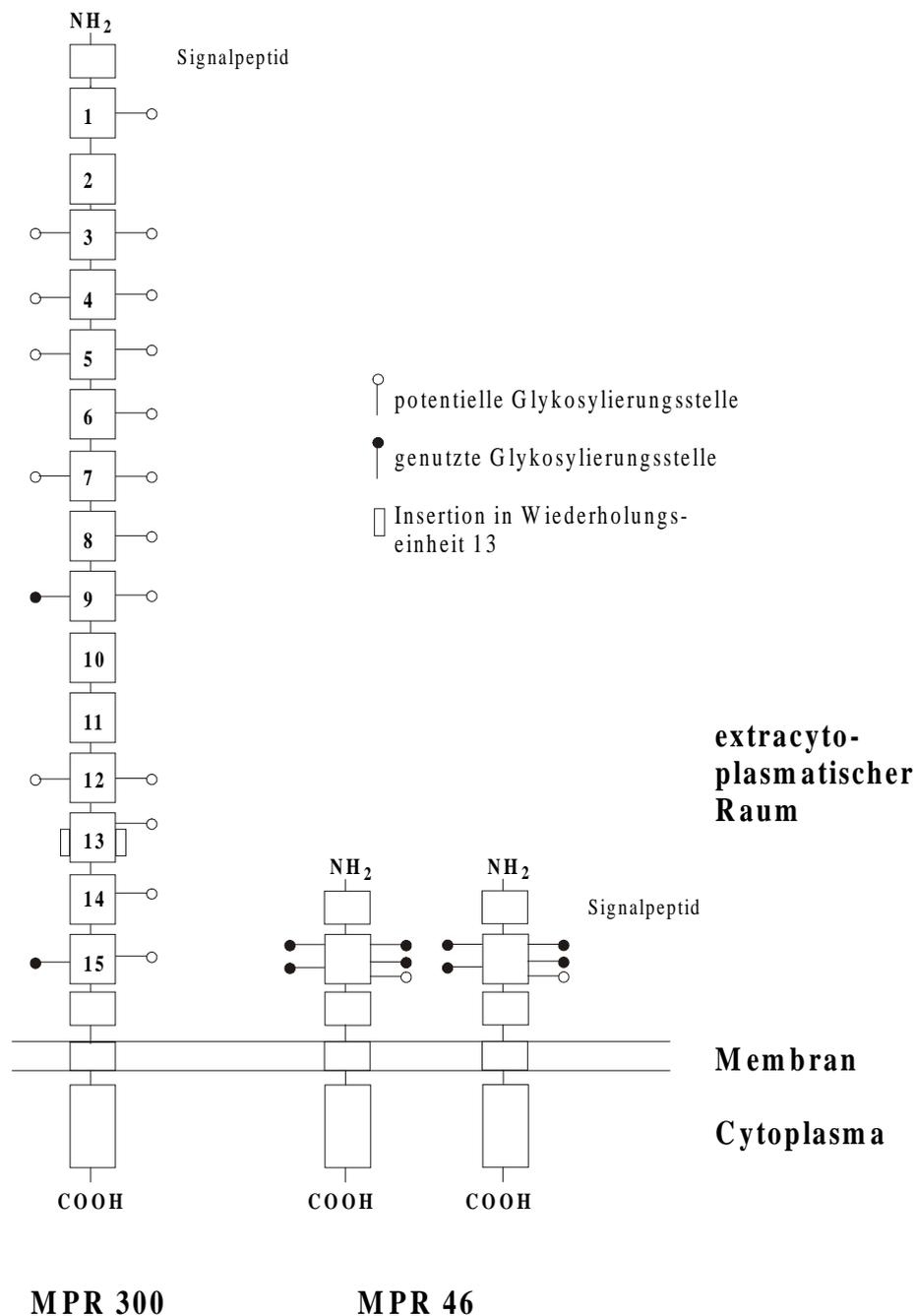


Abb. 3: Schematische Darstellung der beiden Mannose-6-phosphat Rezeptoren (Dahms *et al.* 1987)

Die Wiederholungseinheiten des MPR 300 sind durchnummeriert und sind untereinander stark identisch. Sie weisen eine starke Identität zur luminalen Domäne des MPR 46 auf. Die Hauptform des MPR 46 ist vermutlich ein Dimer (Stein *et al.* 1987a, Dahms und Kornfeld 1989, Li *et al.* 1990, Punnonen *et al.* 1996), während der MPR 300 wahrscheinlich als Monomer vorliegt (Dahms *et al.* 1987).

Phosphorylierung:

In der cytoplasmatischen Domäne befindet sich außerdem eine Caseinkinase II Phosphorylierungsstelle an Position Serin 242 (Hemer *et al.*, 1993, Körner *et al.* 1994). Es findet während der Zirkulation des Rezeptors in der Zelle eine fortwährende Phosphorylierung und Dephosphorylierung statt (Hemer *et al.* 1993, Creek und Sly 1983). Die Dephosphorylierung findet durch die Phosphatase 2A (Braulke und Mieskes 1992) und wenig effizient durch die Phosphatase 2C statt (Körner *et al.* 1994). Welche Bedeutung die Phosphorylierung ausübt, ist noch nicht genau bekannt, die Stabilität des Rezeptors, die Zelloberflächenexpression und die Transportaktivität sind nicht von der Phosphorylierung abhängig (Hemer *et al.* 1993).

Quartärstruktur:

Der MPR 46 liegt in der Membran als Monomer, zum größten Teil als Homodimer und zu einem geringen Teil als Tetramer vor (Stein *et al.* 1987a, Dahms und Kornfeld 1989, Li *et al.* 1990, Punnonen *et al.* 1996, Waheed und von Figura 1990). Die Dimere sind nicht-kovalent verknüpft.

In vitro konnte gezeigt werden, daß die oligomeren Formen mit steigender Oligomerisierung eine höhere Bindungsfähigkeit zum Liganden haben als das Monomer. Die erhöhte Bindungsfähigkeit könnte in der Erhöhung der Avidität oder der Affinität liegen. In Lösung kommt der MPR 46 als Homodimer/Tetramer vor (Stein *et al.* 1987a, Dahms und Kornfeld 1988, Waheed und von Figura 1990). Die Oligomerstruktur ist abhängig von 4 Faktoren: der Anwesenheit der Liganden, der Konzentration des Rezeptors, dem pH-Wert der Lösung und der Temperatur. Die Bildung von Dimeren/Tetrameren wird durch die Liganden, eine hohe Konzentration von Rezeptoren und neutralen pH-Wert gefördert. Die Dissoziation der Oligomere wird durch Erwärmen, sauren pH-Wert, niedrige Konzentration von Rezeptoren und Fehlen der Liganden erreicht (Waheed *et al.* 1990, Waheed und von Figura 1990).

Das Verhältnis Monomer:Dimer:Tetramer bleibt jedoch *in situ* gleich, auch wenn sich die Ligand-Konzentration und/oder der pH-Wert in intrazellulären Membranen ändert, d.h. die Bindungsaktivität wird vermutlich durch Feinstrukturänderungen des MPR 46 geregelt und nicht durch das Verhältnis Monomer:Dimer:Tetramer (Punnonen *et al.* 1996).

1.3.4 Genomische Organisation des MPR 46

Das MPR 46 Gen des Menschen wurde auf Chromosom zwölf (Pohlmann *et al.* 1987) und das der Maus auf Chromosom sechs (Ludwig *et al.* 1992) lokalisiert. Die Genlänge beträgt zwölf kb (Klier *et al.* 1991). Das humane Gen besteht aus sieben Exons, wobei Exon eins die 5'untranslatierte Region, Exon zwei die Signalsequenz, Exon zwei bis fünf die luminale Domäne, Exon fünf und sechs die Transmembrandomäne, Exon sechs und sieben die cytoplasmatische Domäne und Exon sieben die 3'untranslatierte Region enthalten. Die Aufteilung der Exons und die funktionellen Domänen des Proteins stimmen nicht miteinander überein.

Die cDNA des MPR 46 wurde bisher von Mensch (Pohlmann *et al.* 1987), Maus (Köster *et al.* 1987, Ludwig *et al.* 1992, Ma *et al.* 1992) und Rind (Dahms *et al.* 1987) isoliert und sequenziert.

1.3.5 Struktur und biochemische Eigenschaften der Ligandbindungsstelle

Der MPR 46 besitzt eine Ligandbindungsstelle in seiner luminalen Domäne. Seine Bindungsaktivität erlangt er nach dem Verlassen des ER's. Untersuchungen mittels Pulse-chase-Experimenten an transfizierten BHK 21 mit humanem MPR 46 zeigten, daß der MPR 46 innerhalb von 12 min in einem Prä-Golgi-Kompartiment seine bindungsaktive Form erhält (Hille *et al.* 1989b). Experimente am MPR 46 mit chemischen Modifikationen zeigten, daß die Histidine und Arginine wichtig sind (Stein *et al.* 1987b). Wendland *et al.* (1991b) schränkten die Bedeutung der His und Arg auf das His 105 und Arg 111 ein. Diese waren in den Mutanten essentiell für die Ligandbindung (Abb. 2).

Ein Mol Rezeptormonomer bindet 1,2 Mol eines monovalenten Liganden ($KD=6-8 \times 10^{-6}$ M) und 0,5 M eines divalenten Liganden, z.B. eine mannosereiche Zuckerseitenkette mit zwei Phosphomonoestern ($KD=2 \times 10^{-7}$ M) (Tong und Kornfeld 1989, Dittler *et al.* 1991). Der Rezeptor hat eine höhere Affinität zu divalenten Liganden als zu monovalenten Liganden.

Phosphodiester können nur vom MPR 300 gebunden werden, der MPR 46 besitzt trotz der Flexibilität des Tyr 45 nicht ausreichend Platz für den Phosphodiester (Hoflack und Kornfeld 1985, Stein *et al.* 1987a, Roberts *et al.* 1998).

Die Stärke der Ligandbindung wird außerdem von divalenten Kationen beeinflusst (siehe 1.3). Hoflack und Kornfeld (1987) zeigten eine absolute Abhängigkeit der Bindung von divalenten Kationen, Tong und Kornfeld (1989) wiesen lediglich eine starke Abhängigkeit nach. Danach wird der KD um einen Faktor 4 durch divalente Kationen erniedrigt. Junghans (1988) zeigte sogar eine Ligandbindung im Beisein von Chelatkomplexbildnern. Diese Unterschiede sind

vermutlich speziesabhängig. Die Bindung an divalente Kationen wird von den Aminosäuren Asn 103, Asp 104, His 105, Glu 101 und Arg 111 koordiniert. Ohne Kationen bindet das Arg 103 an das Sauerstoffatom der Phosphatgruppe des Liganden und konkurriert mit Arg 111, also der Bindungsstelle (Roberts *et al.* 1998).

Außerdem kann die Bindungsfähigkeit durch den pH-Wert beeinflusst werden. So findet eine optimale Bindung im pH-Bereich von 6-6,3 statt. Liegt der pH-Bereich unter pH 5,5, findet eine Dissoziation von Ligand und Rezeptor statt (Hoflack *et al.*, 1987). Durch diese Eigenschaft des MPR 46 können die lysosomalen Enzyme vektorieil in der Zelle transportiert werden. Isolierte Oligosaccharide werden auch bei höherem pH-Wert von 7-7,4 gebunden (Hoflack *et al.* 1987).

1.4 Monoklonale Antikörper

1.4.1 Struktur und Funktion von Antikörpern

Vertebraten können zwischen körpereigenen und fremden Substanzen unterscheiden. Die Zerstörung der fremden Substanzen im Körper erfolgt durch die humorale und zelluläre Immunantwort. Antikörper oder Immunglobuline, die von Plasmazellen gebildet werden, gehören zu der humoralen Immunantwort. Die Plasmazellen stammen von den B-Lymphozyten ab. Das Y-förmige Immunglobulin besteht aus 3 funktionellen Teilen, einem F_c-Teil, welcher Effektorfunktion besitzt, und 2 F_{ab}-Teilen, die die Antigenbindungsstelle enthalten. Diese Bindungsstelle ist bereits vollständig determiniert, bevor das Antigen Kontakt mit dem Antikörper bekommt. Das Immunglobulin wird auf der Oberfläche der B-Lymphozyten exprimiert. Der Antigen-Antikörper-Kontakt stimuliert die B-Zelle, so daß eine Vermehrung und Veränderung der Zelle beginnt. Es entstehen Plasmazellen, die statt membrangebundene Antikörper lösliche Antikörper herstellen.

Das Immunglobulin setzt sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammen, den zwei leichten und zwei schweren Ketten, die über Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind. Jede leichte und schwere Kette besteht aus einer variablen und einer konstanten Region, wobei die variable Region die Antigenbindungsstelle enthält, und die konstante Region die Effektorfunktion ausübt. Die variablen (V) und konstanten (C) Regionen befinden sich auf getrennten Genen und werden über J- und D-Gene miteinander verbunden. Durch das Zusammensetzen der V/J/D-Gene erhält der Organismus die Möglichkeit, eine Vielzahl von möglichen Antigen determinanten zu erkennen. Die

Lymphozyten unterliegen der allelen Exklusion, d.h. nur eines der zusammengesetzten Allelpaare gelangt zur Expression, so daß eine Zelle auch nur einen spezifischen Antikörper mit einer speziellen Antigenbindungsstelle produzieren kann. Die V/J/D-Gene werden mit den C-Genen, die die verschiedenen konstanten Regionen enthalten, kombiniert. Die konstanten Regionen gehören verschiedenen Klassen bzw. Subklassen an, danach sind die Immunglobuline eingeteilt. Es gibt 5 Immunglobulinklassen IgA, IgD, IgE, IgG, IgM.

1.4.2 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

Die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern, die eine hohe Spezifität gegen ein Antigen besitzen, wurde als erstes von Köhler und Milstein 1975 durchgeführt (Abb. 4). Für diese Methode werden B-Lymphozyten und Myelomzellen fusioniert. Die B-Lymphozyten haben die Fähigkeit, Antikörper zu produzieren, und die Myelomzellen haben in Kultur eine unbegrenzte Lebensdauer.

Diese B-Lymphozyten werden aus der Milz von immunisierten Mäusen gewonnen. Die klassische Immunisierung der Mäuse erfolgte 2-5 Monate vor der Fusion durch die Injektion des Antigens und eines Adjuvants in die Maus. Das Adjuvants, z.B. komplettes oder inkomplettes Freund'sches Adjuvants, ist ein Hilfsmittel, welches die Immunantwort steigern und modifizieren kann. Diese Vorimmunisierung erreicht, daß schon eine Vielzahl verschiedener B-Lymphozyten, die Antikörper gegen das eingesetzte Antigen produzieren können, zur Verfügung stehen. Die Stimulation der Lymphozyten durch das Antigen wird durch die intraperitoneale oder intravenöse Injektion an 4-5 aufeinanderfolgenden Tagen unmittelbar vor der Gewinnung der Milzzellen erreicht.

Die Myelomzellen wachsen unbegrenzt und weisen einen bestimmten Defekt auf, meist im Nucleinsäurestoffwechsel. Der Defekt betrifft den Reserveweg in der Nucleinsäuresynthese, so daß die Zellen nur über den Hauptweg Nucleinsäuren herstellen können. Die fusionierten Zellen werden in einem Medium mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium) kultiviert. Nach der Fusion sterben die Lymphozyten, Erythrozyten und andere Zellen generell nach kurzer Zeit ab. Die nicht-fusionierten Myelomzellen sterben ab, weil sie keine Nucleinsäuren produzieren können. Der Hauptweg der Nucleinsäuresynthese wurde durch Azaguanin vergiftet und der Reserveweg ist defekt. Die fusionierten Zellen oder Hybridomzellen besitzen die genetische Information von den B-Lymphozyten und den Myelomzellen, dadurch wird der genetische Defekt der Myelomzellen durch die B-Lymphozyten komplementiert. Diese fusionierten Zellen können in HAT-Medium wachsen.

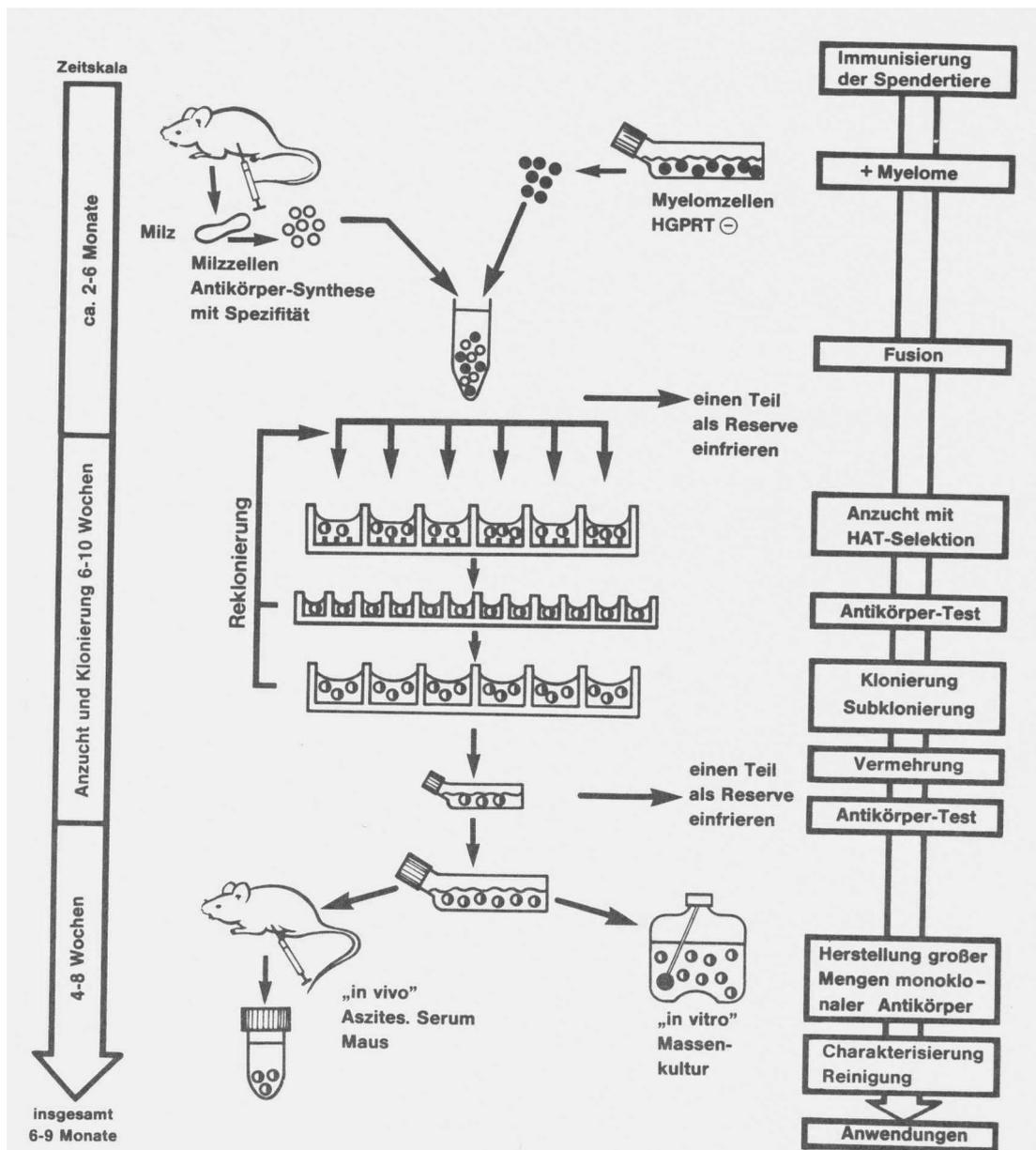


Abb. 4: Herstellung monoklonaler Antikörper

Hybridomzellen, die durch Fusion antikörperproduzierender Zellen mit Myelomzellen entstanden sind, werden durch Kultur in HAT-Medium selektiert. Die Überstände der Hybridomzellen mit den gebildeten Antikörpern werden nach der gewünschten Spezifität untersucht. Die Milzzellen wurden weiß, die Myelomzellen schwarz und die Hybridomzellen schwarz-weiß dargestellt. Die angegebenen Zeiten stellen Richtwerte dar. (nach Milstein 1980).

Nach der Fusion müssen die Hybridomzellen vereinzelt werden, indem durch Verdünnungen nur eine Zelle in einer Vertiefung einer Zellkulturplatte ausgesät wird. Die Hybridomzellen vermehren sich und bilden einen Klon. Dieser Klon produziert Antikörper, die in das Medium abgegeben werden. Die Mediumüberstände werden untersucht, indem die Antikörper auf ihre

Spezifität getestet werden. Die Untersuchung erfolgen durch verschiedene Methoden z.B. durch ELISA, RIA, Immunfluoreszenz, Zytotoxizitätsmessungen. Bei der Untersuchung muß darauf geachtet werden, daß sämtliche Immunglobulinsubklassen erfaßt werden. Klone, die Antikörper gegen das gewünscht Antigen bilden, wurden ausgewählt. Die Klone werden danach subkloniert und die Antikörperüberstände nochmals getestet.

Nach der Subklonierung werden die positiven Klone vermehrt und die Antikörper aus den Medienüberständen gereinigt. Diese Reinigung erfolgt durch Affinitäts-Chromatographie. Die aufgereinigten mAk werden schließlich durch verschiedene Methoden untersucht. Zu diesen Methoden gehören z.B. Epitopkartierung durch Peptidanalyse, Herstellung von Mutanten und Röntgenkristallographische Studien. Die Ergebnisse geben Auskunft über das Epitop bzw. die Antigen determinante, die der mAk erkennt. Das Epitop kann diskontinuierlich oder konformationsspezifisch sein, so daß Antikörper abhängig von der nativen und räumlichen Konformation des Antigens sind, oder das Epitop betrifft eine kontinuierliche oder sequentielle Determinante, so daß sie von der Aminosäuresequenz abhängig sind.

Monoklonale Antikörper können für viele verschiedene Untersuchungen in der Grundlagenforschung eingesetzt werden. Mit mAk unterschiedlicher Spezifität können Einblicke in die räumliche Struktur des Antigens erhalten werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Zum Anfang meiner Arbeit war bekannt, daß für die Ligandbindungsstelle des MPR 46 das Histidin 105 und das Arginin 111 wichtig sind. Ziel dieser Arbeit war es, auch andere wichtige Aminosäuren für die Ligandbindungsstelle zu finden. Diese Frage sollte mittels spezifischer mAk gegen die luminal Domäne des MPR 46 und durch die Kristallstruktur der luminalen Domäne des MPR 46 geklärt werden.

Als erstes sollte die Wirkung der mAk auf die Ligandbindung des MPR 46 untersucht werden. Zweitens sollten die Epitope der mAk bestimmt werden. Dazu sollten Mensch/Maus-Chimären mittels gerichteter Mutagenese hergestellt und im ELISA analysiert werden. Außerdem sollte die Reaktivität der mAk auf bestimmte Peptide getestet werden. Die Daten der Inhibition der Ligandbindung durch mAk und der Epitopkartierung sollte anschließend korreliert werden. Diese Korrelation sollte möglichst Auskunft über die wichtigen Aminosäuren der Ligandbindungsstellen geben.

Parallel zu der Epitopkartierung mittels Chimären und Peptide sollte durch eine dreidimensionale Struktur des humanen MPR 46 die Ligandbindungsstelle analysiert werden. Die Positionen der wichtigen Aminosäuren, die aus den Daten der Inhibitionsanalyse und der Epitopkartierung erhalten wurden, sollten im Hinblick auf die Ligandbindungsstelle mit dem 3-D-Modell überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage Sartorius micro	Krannich, Göttingen
Autoklav Typ Tecnoclav 50	Tecnorama, Zürich, Schweiz
Brutschrank Typ 2771	Heraeus, Osterode
Digital-pH-Meter Knick	Schütt, Göttingen
DNA-Sequenzierer 373A DNA Sequencing System	Applied Biosystem Inc., Weiterstadt
Drehrad für Eppendorfgefäße	Eigenbau, Werkstatt des Institutes
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Eigenbau, Werkstatt des Institutes
Elektrophoresekammern für Polyacrylamidgele	Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Filmentwicklungsmaschine Modell Gevomatic 60	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Flüssigkeitsszintillationszähler Modell 1900TR	Packard, Frankfurt/M.
Betastrahlenszähler (β -Counter)	
Fluoreszenzspektrophotometer F1200	Hitachi, Tokyo, Japan
Gammastrahlenszähler (γ -Counter)	Wallac, Finnland
Wizard 1470™	
Gefrierschrank, -85 °C Ultra low Freezer	News Brunswick Sc., Edison/ USA
Geltrockner, Gel Air Dry	Bio-Rad, München
Heizblock Modell Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
HPLC Millipore Waters 600 E System Controller	Waters, Millipore Corporation, Marlborough, USA
Inkubationsschüttler Modell G25	News Brunswick Sc., Edison/ USA
Jet-s Automatic Vacuum System, Tom	Schütt, Göttingen
Lyophilisator	Bachofer, Reutlingen und Christ, Osterode
Magnetrührer Ika-Combimag Reo	Schütt, Göttingen
Massenspektrometer, Kompakt Maldi III	Shimadzo, Okagaga, Japan

Membrane Vakuumpumpe ME 2

Vacuumbrand GmbH & Co,
Wertheim

Mikroskope:

Phasenkontrastmikroskop, Modell ID 03

Zeiss, Oberkochen

Inverses Mikroskop, Modell IM

Zeiss, Oberkochen

Fluoreszenzmikroskop, Modell Axiovert 100

Zeiss, Oberkochen

Fluoreszenzfilter für das Axiovert 100:

Zeiss, Oberkochen

Fluorochrom	Anregungsfilter	Farbteiler	Emissionsfilter
FITC; DTAF	BP 450-490	FT 510	LP 515-565

Konfokales Laser-Scan-Mikroskop (LSM2)

Zeiss, Oberkochen

Fluoreszenzfilter für das LSM:

Zeiss, Oberkochen

Fluorochrom	Emissionsfilter
FITC; DTAF	LP 515-565

Objektive für das LSM und das Axiovert 100:

Zeiss, Oberkochen

Plan-Neofluar 25 x/0,81 mm

Plan-Neofluar 40 x/1,3 mm

Plan-Neofluar 63 x/ 1,25 mm

Plan-Apochromat 63 x/ 1,4 mm

Plan Neofluar 100 x/ 1,3 mm

Mikroskop-Kamerasysteme:

MC 100

Zeiss, Oberkochen

CCD

Photometrics, München

Mikrowellenherd, 600 Watt

Siemens

Mini-V8 10, Gel Electrophoresis Apparatus

Gibco BRL, Eggenstein

MR 700 Microplate[®] Reader

Dynatech, Denkendorf

MS 1 Minishaker IKA[®]

Schütt, Göttingen

Multipette[®] plus

Eppendorf, Hamburg

Peristaltik-Pumpe Europump PA-ST1 basic

Schütt, Göttingen

Phosphoimager, IPR 1000

Fuji, Tokio, Japan

Semi Dry Blotter „Pegasus“	Phase, Lübeck
Slot-Blot-Kammer	Sartorius AG, Göttingen
Spannungsgeräte, LKB Bromma, Constant Power Supply 2297 Macrodriver	Schütt, Göttingen
Spektralphotometer Uvikon 932	Kontron, Eching
Steri-Kult Inkubator, 3035/200	Forma Scientific, Marietta, USA
Sterilbank, A/B3 bzw. SG 400	Baker Company, Inc., Stanford, USA
Thermocycler Gene Amp PCR 9600 bzw. 2400	Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA
Transilluminator Modell IL-400-M	Bachofer, Reutlingen
UV- Handlampe (312 nm und 254 nm)	Bachofer, Reutlingen
Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450	Branson Ultrasonic SA, Carouge- Geneve, USA
Vakuum Konzentrator Speed Vac SVC 100H	Savant Instruments, Farmingdale
Video Copy Processor	Mitsubishi, Tokio, Japan
Video-Drucker	Intas, Göttingen
Video-Kamera	Intas, Göttingen
Waage 1265 MP	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad	Eigenbau, Werkstatt des Instituts
Wipptisch Rocky	LTF Labortechnik, Wasserburg/ Bodensee
Zentrifugen:	
Biofuge pico	Heraeus, Osterode
Kühlzentrifuge Modell 5402	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge, Modell J-21 C und J2-MC	Beckmann, München
Rotoren für die Kühlzentrifuge:	Beckmann, München
JA-10 Rotor, bis 17680 x g	
JA-20 Rotor, bis 48300 x g	
Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann, München
Rotor für TL-100:	
TLA-100.3, bis 430 000 x g	

Ultrazentrifuge L-80

Beckmann, München

Ti 45 Rotor, bis 235418 x g

Ti 50 Rotor, bis 226240 x g

2.1.2 Verbrauchsmaterial

6- bzw. 24- Napf-Zellkulturplatten

Greiner, Nürtingen

C18-Cartridge

Waters, Millipore Corporation,
Marlborough, USA

Centrisart[®]

Sartorius AG, Göttingen

Chromatographiepapier 3MM CMR, 46 cm x 57 cm

Whatman

Einfrierkästen

National Lab, Mölln

Einfrierröhrchen

Nunc, Wiesbaden

Einmalkanülen

Neobject, Gelnhausen

Einmalspritzen

Braun, Melsungen

ELISA-Platten

Greiner, Nürtingen

Gelfiltrationssäulen Modell Mobicol 1; 2,5; 5 und 10 ml

Mobitec, Göttingen

Gewebekulturflaschen 25 und 75 cm²

Greiner, Nürtingen

Gewebekulturschalen 35, 60 und 100 mm Ø

Greiner, Nürtingen

Glaskolben 100 ml, 250 ml und 1000 ml

Schott, Mainz

Glasspitzröhrchen

Assistent, bezogen über Schütt,
Göttingen

Immersionsöl 518 C

Zeiss, Oberkochen

Linsenpapier MN 10B

Machery-Nagel, Düren

Nap-Sephadex G25

Pharmacia, Uppsala, Schweden

Objekträger und Deckgläser

Menzel Gläser

Parafilm[®]

America National Can[™], Neenah,
USA

Plastik-Petrischalen 9 cm Ø

Sarstedt, Nümbrecht

Probenhalter für 20 Proben

Shimadzo, Okagaga, Japan

PVDF Protein Transfer and Sequencing Membrane,

Schleicher & Schuell,

Westran[®]

New Hampshire, England

Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2,0 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Reversed Phase HPLC Ultraphere[™]

Beckmann, München

Röntgenfilm, XAR-5	Kodak, Stuttgart
Sterilfilter Minisart NML, Ø 0,45 µm, 0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen
Sterile Plastikröhrchen 10 ml	Greiner, Nürtingen
Sterile Plastikröhrchen 50 ml	Sarstedt, Braunschweig
Qiagen-Säulen für DNA-Präparation	Diagen, Düsseldorf
27 G-Einmal-Insulin-Spritzen, steril	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Perkin-Elmer Cetus, Norwal, USA
Sephadex G-10	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Zentrifugenbecher:	Nalgene, München
JA-10 Polypropylen	
JA-20 Polypropylen	

2.1.3 Chemikalien

Acetonitril	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma, Deisenhofen
Agarose für DNA-Gelelektrophorese	Gibco/BRL., Eggenstein
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
p-Cumarsäure	Sigma, Deisenhofen
Diazobicyclooctan	Aldrich, Deisenhofen
Disuccinimidylsuberat	Pierce, Rockford, USA
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Glucose-6-phosphat (Natriumsalz)	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff, ultrarein	Roth, Karlsruhe
Indol-2-carbonsäure	Aldrich, Deisenhofen
Jodogen	Pierce, Rockford, USA
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Fluka, Deisenhofen
Magermilchpulver	Nähr-Engel, Darmstadt
Mannose-6-phosphat (Natriumsalz)	Sigma

Mannose-6-phosphat (Bariumsalz)	Sigma
Mowiol	Calbiochem, Frankfurt
Neutravidin	Pierce, Rockford, USA
Pansorbin-Zellen (hitzeinaktivierte <i>Staphylococcus aureus</i> Zellsuspension)	Calbiochem, Frankfurt
para-Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Poly-l-lysine	Sigma, Deisenhofen
Wasser, für HPLC	Merck, Darmstadt
Wasser, nukleasefrei	Merck, Darmstadt

Alle herkömmlichen Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) im Reinheitsgrad pro analysis bezogen.

2.1.4 Detergenzien

Nonidet-P 40 (NP-40)	Sigma, Deisenhofen
N-Octylglucosid	Biomol, Hamburg
Saponin	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

2.1.5 Proteine, Proteaseinhibitoren und Proteinstandards

Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
LMW-Marker:	Laborproduktion

Marker	molekulare Masse= M_r in kDa	Menge ($\mu\text{g/ml}$)	Firma, Ort
Phosphorylase B	97,4	83,0	Sigma, Deisenhofen
BSA	66,0	63,0	Serva, Heidelberg

Marker	molekulare Masse= M _r in kDa	Menge (µg/ml)	Firma, Ort
Ovalbumin	45,0	125,0	Sigma, Deisenhofen
Carboanhydrase	29,0	21,0	Sigma, Deisenhofen
Trypsininhibitor	20,1	100,0	Sigma, Deisenhofen
Cytochrom C	12,4	100,0	Sigma, Deisenhofen

Pepstatin A

Sigma, Deisenhofen

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

Serva, Heidelberg

Prestained Protein Molecular Weight Markers

Calbiochem, Frankfurt

Rinderserumalbumin (BSA)

Biomol, Hamburg

RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor

Promega, Madison, USA

2.1.6 Peptide

Bezeichnung	Aminosäuresequenz	Modifikation	Herkunft
humaner MPR 46 - 64-76	L-V-Q-I-N-K-S-N-G-K-E-T-V	biotinyliert am N-Terminus (Leucin)	Firma Jerini, Berlin
humaner MPR 46 - 38-51	V-G-Q-G-S-D-T-Y-I-Y-I-F-R-V	biotinyliert am N-Terminus (Valin)	Firma Jerini, Berlin
LAP-Tail Lysosomale alkalische Phosphatase	R-M-Q-A-Q-P-P-G-Y-R-H-V-A- D-G-E-D	biotinyliert am N-Terminus. (Arginin)	Dr. Bernhard Schmid, Institut Biochemie II, Göttingen

2.1.7 Enzyme, Nukleotide

Endoglykosidase H von *Streptomyces plicatus*

Boehringer, Mannheim

Peptid: N-Glykosidase F (PNGase F)

Boehringer, Mannheim

rekombinant aus *E. coli*

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase, native	Stratagene GmbH, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Bad Schwalbach
RNase A	Boehringer, Mannheim
Ultrapure dNTP Set	Pharmacia, Freiburg

2.1.8 Phosphomannan (PM)-Sephrose-Säule

Die Phosphomannan-Sephrose wurde in unserer Arbeitsgruppe PD. Dr. A. Hille-Rehfeld und der ehemaligen Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Pohlmann nach der Literatur Bretthauer *et al.* 1973 und Cuatrecasas 1970 hergestellt.

1 ml Mobicolsäulen	mit 200 µl oder 300 µl PM-Sephrose
2,5 ml Mobicolsäule	mit 1ml PM-Sephrose
10 ml Mobicolsäulen	mit 9 ml PM-Sephrose

2.1.9 Kits zur Bearbeitung von DNA und Protein

ABI PRISM Dye Terminator Cycle, Sequencing Ready Reaction (No. 402079)	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
ECL-Kit	Amersham, Braunschweig
QIA-Plasmid Midi Kit	Diagen, Hilden
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene GmbH, Heidelberg
SuperSignal® Substrate, Western Blotting	Pierce, Rockford, USA
TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega, Madison, USA

2.1.10 Antikörper

2.1.10.1 Primärantikörper

Antigen	immuni- sierte Spezies	Bezeichnung	Aufbereitung	Herkunft
MPR 46, human, luminale Domäne	Maus, mono- klonal	38 Antikörper 2B2, 2B6, 2C5, 3A5, 3C5, 5B2, 6B2, 9A2, 9B1, 9D2, 10B1, 10C3, 10C6, 11B2, 11B6, 14D4, 15A1, 15B6, 15C4, 15C5, 18B4, 18C4, 19A4, 20B4, 21D3, 24B1, 25A2, 25A4, 25B1, 25C1, 25C4, 25D2, 25D5, 26A3, 26A5, 26D6, 27A5, 30A3	affinitäts- gereinigt	Laborbestand: hergestellt von J. Wenk, N. Krüger, K. Schreiber, A. Hille-Rehfeld
MPR 46, human, luminale Domäne	Kaninchen, polyklonal	GI-4a	Serum	Wenk <i>et al.</i> 1991
		GI-6b/4b	Serum präabsorbiert an Ziegen-Ig	
MPR 46, human, cyto- plasmatische Domäne	Kaninchen, polyklonal	MSCI-III-7b	Serum	Klumpermann <i>et al.</i> 1993
		MSCI	affinitäts- gereinigt	
Arylsulfatase A, human	Maus, monoklonal	11B5	affinitäts- gereinigt	Sommerlade <i>et al.</i> 1994
Arylsulfatase A, human	Maus, monoklonal	19-16-3	affinitäts- gereinigt	von Prof. Dr. V. Gieselmann zur Verfügung gestellt

Antigen	immuni- sierte Spezies	Bezeichnung	Aufbereitung	Herkunft
LAP-Tail, human	Kaninchen, polyklonal	anti-LAP-tail	Serum	Hinners <i>et al.</i> 1998 (eingereicht)
MPR 46 Peptid 186-200	Kaninchen, polyklonal	anti-MPR 46 186-200	affinitäts- gereinigt	Nadimpalli <i>et al.</i> 1991
MPR 46 Peptid 211-227	Kaninchen, polyklonal	anti-MPR 46 211-227	affinitäts- gereinigt	Nadimpalli <i>et al.</i> 1991
MPR 46 Peptid 223-237	Kaninchen, polyklonal	anti-MPR 46 223-237	affinitäts- gereinigt	Nadimpalli <i>et al.</i> 1991
MPR 46 Peptid 233-251	Kaninchen, polyklonal	anti-MPR 46 233-251	affinitäts- gereinigt	Nadimpalli <i>et al.</i> 1991
Präimmun	Maus		Serum	Laborbestand
			affinitäts- gereinigt	

2.1.10.2 Sekundärantikörper

Ziege anti Kaninchen IgG, FITC-konjugiert

Medac, Hamburg

Ziege anti Kaninchen IgG, Meerrettich-Peroxidase
(HRP)-gekoppelt

Dianova, Hamburg

Kaninchen anti Maus IgG

Nordic Immunology, Tilburg,
Niederlande

Kaninchen anti Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase
(HRP)-gekoppelt

Dianova, Hamburg

2.1.11 Vektoren, DNA-Standards

Vektor/Standard	Beschreibung	Referenz
pGem-2-2	Transkriptionsvektor mit SP6-Promotor und humaner MPR 46 Sequenz, die an der untranslatierten 5' Region verkürzt ist	Hille <i>et al.</i> , 1989
pGK hygro	Eukaryonter Expressionsvektor mit Hygromycin-Resistenzgen	Mortensen <i>et al.</i> , 1991
pMPSVHE	Eukaryonter Expressionsvektor mit dem Promotor für den myeloproliferativen Sarcomavirus (MPSV)	Artelt <i>et al.</i> , 1988
pMPRSVE MPR 46 C9'122	Eukaryonter Expressionsvektor mit dem Promotor für den myeloproliferativen Sarcomavirus (MPSV) mit der cDNA für den humanen MPR 46, verkürzt um 123 bp in 5' untranslatierten Region	Denzer <i>et al.</i> , 1997
pSV2 pac	Eukaryonter Expressionsvektor mit Puromycin-Resistenzgen	Vara <i>et al.</i> , 1986
pVL1393MPR46 M14	Expressionsvektor für Baculoviren mit der <i>Bam</i> H1/ <i>Bam</i> H1 geschnittenen Sequenz des MPR 46 aus pBHE MPR 46	med. Doktorarbeit 1995 Jobst Felix Max Landgrebe
λ - <i>Hind</i> -Standard	DNA-Fragmente: 135, 560, 2030, 2320, 4360, 6680, 9410, 23130	Gibco/BRL, Eggenstein
DNA-Ladder	DNA-Fragmente: 516, 1018, 1635, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180	Gibco/BRL, Eggenstein

2.1.12 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die Mutagenesen und für die Sequenzanalysen wurden von der Firma NAPS in Göttingen bezogen.

Bezeichnung	Lese- rich- tung	Position im pMPSV MPR 46 C9'122	Sequenz, angegeben in 5'-3'Richtung
		Position im Insert die erste Base des reifen MPR 46 = Nr.1	
AHR 1	3'-5'	284-262	CAGCATGATCCAATTACTTCC
AHR 2	5'-3'	262-284	GGAAGTAATTGGATCATGCTG
AHR 3	3'-5'	<i>Bam</i> H1+Stop+ 495-478	GGATCCCTAGATGGAACCCACAC TGAG
AHR 5	3'-5'	369-352	GGTGTGTCGATTGCAGGA
Seq 3'UTR5'	3'-5'	852-838	GAGATGAGGGACTGG
MPR-MM-1a	5' →3'	(-7)-24	CTGGCAGATAGAAGAAAAATCTT GCGACTTG
MPR-MM-1b	3' →5'	24-(-7)	CAAGTCGCAAGATTTTTCTTCTAT CTGCCAG
MPR-MM-2a	5' →3'	32-63	GAAAAGGATAAAGAGTCAAAGA ACGAGTTGGC
MPR-MM-2b	3' →5'	63-32	GCCAACTCGTTCTTTGACTCTTTA TCCTTTTC
MPR-MM-3a	5' →3'	49-78	CAAAGAACGAGGTGGCTCTACTG GAGAGGC
MPR-MM-3b	3' →5'	78-49	GCCTCTCCAGTAGAGCCACCTCG TTCTTTG
MPR-MM-4a	5' →3'	62-88	GCTCTACTGGAGAGGCTGAGACC ACTG
MPR-MM-4b	3' →5'	88-62	CAGTGGTCTCAGCCTCTCCAGTA GAGC

Bezeichnung	Lese- richt- ung	Position im pMPSV MPR 46 C9'122	Sequenz, angegeben in 5'-3'Richtung
		Position im Insert die erste Base des reifen MPR 46 = Nr.1	
MPR-MM-5a	5' → 3'	123-152	G TTCAGACACATACAGCTACATC TTCAGGG
MPR-MM-5b	3' → 5'	152-123	CCCTGAAGATGTAGCTGTATGTG TCTGAAC
MPR-MM-6a	5' → 3'	159-185	CGGGAAGCTAGCAACCACTCTTC TGGG
MPR-MM-6b	3' → 5'	185-159	CCCAGAAGAGTGGTTGCTAGCTT CCCG
MPR-MM-7a	5' → 3'	201-233	CAACAAAAGTAATGACAAGGAG ACAGTGGTAG
MPR-MM-7b	3' → 5'	233-201	CTACCACTGTCTCCTTGTCATTAC TTTTGTTG
MPR-MM-8a	5' → 3'	226-255	CAGTGGTAGGGAGAATCAACGA GACTCAC
MPR-MM-8b	3' → 5'	255-226	GTGAGTCTCGTTGATTCTCCCTAC CACTG
MPR-MM-9a	5' → 3'	366-393	CACACCCTAGAGGCCAATTTTAA CCCTG
MPR-MM-9b	3' → 5'	393-366	CACGGTTAAAATTGGCCGCTAGG GTGTG
		Position im Vektor	
RP 23	5'-3'	im pMPNVHE	TCAGGTCCCGGATCGGAATT

2.1.13 Bakterienstämme

E. coli CMK 603: thr, leu, thi, sup E, T^R, T5^R, rec BCR⁻, M⁺, lac ZΔM15,
[F⁻, lacI^q ZΔM15 pro⁺]

E. coli XL1-blue: F⁻::Tn10, proA⁺B⁺, lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1, endA1, gyrA96(Nal^r), thi,
hsdR17 (r_k⁻, m_k⁻), supE44, relA1, lac
(Bullock *et al.* 1987)

2.1.14 Medien zur Anzucht von prokaryonten Zellen

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Hefe Extrakt
5 g NaCl

wurden in 800 ml dest. Wasser gelöst, auf pH 7,5 eingestellt,
anschließend mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und
autoklaviert.

LB-Ampicillin-Agarplatten:

Zur Bakterienanzucht wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren Agar in einer Endkonzentration von 1,5% zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf 50°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugefügt. Der Agar wurde in 9 cm Ø Petrischalen gegossen, bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend bei 4°C gelagert.

2.1.15 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
BHK 21	Baby-Hamster Nierenfibroblasten	Macpherson & Stoker, 1962
BHK-MPR-46	BHK-21 stabil transfiziert mit humanem MPR 46	Chao <i>et al.</i> , 1990

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
MEF-MPR-	embryonale Mausfibroblasten, defizient für murinen MPR 46 und murinen MPR 300	Pohlmann <i>et al.</i> , 1995
MEF-MPR 46	MPR-defiziente embryonale Mausfibroblasten stabil transfiziert mit der cDNA des humanen MPR 46	Kasper <i>et al.</i> 1996
MEF-MPR +	embryonale Mausfibroblasten	D. Kasper <i>et al.</i> 1996
LTK C5	L-Zellen mit einer Thymidinkinasedeletion stabil transfiziert mit der cDNA des murinen MPR 46	von Prof. Dr. R. Pohlmann hergestellt
High five (H5)	Trichoplusia ni 5 B 1-4	Stratagene, Heidelberg

2.1.16 Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryonten Zellen

PBS (für Zellkultur):

150	mM	NaCl
120	mM	KCl
10	mM	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
0,002 %		Phenolrot (pH-Indikator)

Dulbeccos (DMEM) Seromed/Biochrom Berlin

Glutamax GIBCO/BRL, Eggenstein

Foetales Kälberserum (FKS) GIBCO/BRL, Eggenstein

Insect-X-Press
proteinfreies Medium Biowhittaker, Heidelberg

Trypsin-EDTA-Lösung: GIBCO/BRL, Eggenstein

0,05 % (w/v) Trypsin

0,02 % (w/v) EDTA

in modifizierter Puck's Salzlösung

TMN-FH Insect Medium Sigma, Deisenhofen

mit L-Glutamin, ohne

Natriumbicarbonat

2.1.17 Antibiotika

Ampicillin

Serva, Heidelberg

Geneticin[®] (G418, Neomycin)

Gibco/BRL, Eggenstein

Hygromycin B, p.a.

Calbiochem, Frankfurt

Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)

Seromed/Biochrom, Berlin

(10 000 U bzw. 10 000 µg/ml)

Puromycin p.a.

Sigma, Deisenhofen

2.1.18 Radioaktive Substanzen

L-[³⁵S]-Methionin wässrige Lösung,

Amersham-Buchler, Braunschweig

1000 Ci/mmol

L-[³⁵S]-Methionin und -Cystein,

Amersham-Buchler, Braunschweig

wässrige Lösung, 1000 Ci/mmol

[¹²⁵J] Natriumjodid, trägerfrei,

Amersham-Buchler, Braunschweig

in NaOH-Lösung pH 7-11, 100 mCi/ml

2.1.19 Häufig verwendete Puffer

PBS: 150 mM NaCl

10 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,4

PBST: 0,05 % Tween 20 in PBS

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.1.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Das Verfahren nach Sambrook *et al.* (1989) wurde zur Isolierung kleiner DNA-Mengen verwendet, bei denen der Reinheitsgrad keine Rolle spielt. Dieses Verfahren wurde leicht abgeändert, indem die Phenol/Chloroformextraktion weggelassen wurde.

Lösungen:	Lösung I:	50	mM	Glukose
		25	mM	Tris/HCl pH 8,0
		10	mM	EDTA pH 8,0
	Lösung II:	0,2	M	NaOH
		1	%	SDS
	Lösung III:	3	M	Natriumacetat pH 4,8

3-5 ml LB-Medium mit Ampicillin wurden per Impföse mit Einzelkolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Drehrad inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 2 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 12000 x g 30 min bei 4°C in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 100 µl kalter Lösung I resuspendiert. Die Bakterien wurden mit 200 µl Lösung II lysiert, vorsichtig gemischt und kurz auf Eis gestellt. Anschließend wurde mit 150 µl kalter Lösung III neutralisiert, gut gemischt und 3-5 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gemisch bei 12000 x g bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand mit der DNA wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml 100% Ethanol p.a. versetzt, 5 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, 3 min bei RT gelassen und anschließend bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert, das DNA-Sediment wurde getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen. Zur Kontrolle wurde die DNA einer Spaltung mit Restriktionsendonukleasen unterworfen. Hierzu wurden 25-50% des Ansatzes eingesetzt. Die Analyse erfolgte in einer Agarosegelelektrophorese.

2.2.1.1.2 Plasmid-Präparation mit Qiagen

Plasmidpräparationen wurden nach Vorschrift des Herstellers Qiagen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

Lösungen:	P1:	50	mM	Tris/HCl pH 8,0
		10	mM	EDTA
		100	µg/ml	RNase A
	P2:	0,2	M	NaOH
		1	%	SDS
	P3:	3	M	Kaliumacetat pH 5,5
	QBT:	750	mM	NaCl
		50	mM	MOPS pH 7,0
		15	%	Ethanol
		0,15	%	Triton X-100
	QC:	1	M	NaCl
		50	mM	MOPS pH 7,0
		15	%	Ethanol
	QF:	1,25	M	NaCl
		50	mM	Tris/HCl pH 8,5
		15	%	Ethanol

Es wurden 100 ml einer Bakterienkultur mit einer OD_{600} von größer als 1 bei 8500 x g und 4°C sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde in 4 ml P1 resuspendiert. Nun wurden 4 ml P2 zu dem Gemisch hinzugefügt, vorsichtig vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde mit 4 ml kaltem P3 neutralisiert und 15 min auf Eis gestellt. Inzwischen wurde eine Qiagen-Plasmid Prep Tip 100 -Säule mit 4 ml QBT equilibriert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz bei 30000 x g und 4°C zentrifugiert und der klare Überstand auf die equilibrierte Säule gegeben, dabei bindet die Plasmid-DNA an das Silikagel-Anionenaustauscher-

Säulenmaterial. Nach dem Auftrag wurde die Säule zweimal mit 10 ml QC gewaschen, die Plasmid-DNA mit 5 ml QF eluiert und in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Die Plasmid-DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und das Präzipitat bei 4400 x g und 4°C für 45 min zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 50-100 µl H₂O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde durch eine Messung der OD_{260nm} bestimmt.

Für die *in vitro* Transkription und Translation wurde die DNA nochmals mit 7 M Ammoniumchloridlösung gefällt. Dabei wurde nach der Isopropanolfällung wie oben zentrifugiert, das Präzipitat in 500 µl Wasser aufgenommen und mit 166 µl 7 M Ammoniumchloridlösung und 1 ml 100% Ethanol versetzt. Nun wurde der Ansatz gemischt und bei -80°C oder auf Trockeneis 30 min inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert, das DNA-Sediment mit 70% Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 100 µl Wasser aufgenommen. Zum Schluß erfolgte die Konzentrationsbestimmung durch eine Messung der OD_{260nm}.

2.2.1.2 Präzipitation mit Ethanol

Die DNA-Lösung wurde mit Na-Acetat bis zu einer Endkonzentration von 0,3 M und 2 Volumen Ethanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte in 20 Minuten bei -70°C oder über Nacht bei -20°C. Die DNA wurde durch 10 Minuten Zentrifugation bei 12000 x g sedimentiert, anschließend mit 70% Ethanol gewaschen und erneut 5 Minuten zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde abschließend bei RT oder im Vakuumkonzentrator getrocknet.

2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Photometrische Analyse:

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm in einer Quarzküvette gegen TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) bzw. H₂O. Eine OD_{260nm} entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 31 µg/ml Oligonukleotiden.

Ethidiumbromid-Fluoreszenzmessung im Agarosegel:

Für kleine DNA-Mengen empfiehlt sich diese Methode zur Konzentrationsbestimmung. In zwei benachbarten Spuren wurden die zu quantifizierende DNA-Probe und 400 ng eines λ -*Hind*-Standard in einem 1%igen Agarosegel (0,5 μ g Ethidiumbromid pro ml) aufgetragen und aufgetrennt. Die Fluoreszenz-Intensität der DNA-Probe und des Standards (die 2,3-kb-Bande enthält 20 ng) wurden auf einem UV-Transilluminator verglichen, und die DNA-Konzentration der Probe wurde abgeschätzt.

2.2.1.4 Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol oder Chloroform

Zur Inaktivierung von Enzymen sowie zur Entfernung von Proteinen aus DNA-Präparationen wurden diese mit einem Volumen Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol oder Chloroform versetzt, gemischt und durch zweiminütige Zentrifugation bei 12000 x g die Phasentrennung wiederhergestellt. Die wässrige DNA-haltige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt.

2.2.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Aufgrund der Fähigkeit von bakteriellen Restriktionsendonukleasen, doppelsträngige DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen zu schneiden, wurden sie für analytische und präparative Zwecke eingesetzt.

Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Eine Unit entspricht der Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 μ g Lambda-Phagen-DNA in einer Stunde zu schneiden.

Reaktionsansatz:	0,5-10 μ g	DNA
	1 μ l	geeigneter 10 x Puffer (nach Herstellerangabe)
	5-20 U	Restriktionsendonuklease
	ad 10 μ l	H ₂ O

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend ein Aliquot im Agarosegel analysiert. Präparative Spaltungen wurden in größeren Volumina und mit entsprechend größerer Enzymmenge durchgeführt. Als Reaktionspuffer wurde das New England Biolabs (NEB) Puffer-System verwendet.

NEB 3: 50 mM Tris/HCl (pH8) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT + 100 mM NaCl (für die Restriktionsenzyme: *EcoRI*, *BamHI*, *NdeI*, *PstI*)

NEB 4: 50 mM Tris/HCl (pH8) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT + 50 mM KOAc (für das Restriktionsenzym: *SmaI*)

Alle angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen.

2.2.1.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Trennung, Reinigung und Analyse von DNA-Fragmenten benutzt. DNA wandert aufgrund ihrer negativen Ladung im Gel bei angelegter Spannung von der Kathode zur Anode, wobei ihre Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional dem dekadischen Logarithmus ihre Molekularmasse ist (Helling *et al.*, 1974).

Abhängig von der Fragmentgröße betrug die Agarose-Konzentration 1% oder 2% (w/v). Die erforderliche Menge Agarose wurde in 1 x TAE durch Erhitzen gelöst und nach dem Abkühlen auf etwa 55°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt. Die handwarme Lösung wurde in einen horizontalen Gelträger gegossen und bei RT abgekühlt. Das erstarrte Gel wurde in eine mit 1 x TAE gefüllte Elektrophoresekammer überführt, die Proben mit Ficoll-Marker (0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol, 15% Ficoll) versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Unter UV-Licht wurden die DNA-Fragmente durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid sichtbar. Auf dem UV-Transilluminator mit einem Videosystem wurden die Agarosegele zur Dokumentation aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

2.2.1.7 Mutagenese mit QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit

Die Mutagenese wurde mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene durchgeführt.

Dieses Kit kann für eine oder mehrere Punktmutationen und für Deletionen oder Insertionen von einzelnen oder mehreren Aminosäuren verwendet werden.

Für die PCR wird ein ungeschnittener, doppelsträngiger DNA-Vektor mit dem Insert, zwei komplementäre Oligonukleotidprimer mit der jeweiligen Mutation, die *Pfu*-DNA Polymerase und ein dNTPmix benötigt. Der DNA-Vektor mit dem Insert wird amplifiziert, dabei gelangt

die Mutation durch die Oligonukleotidprimer in das Insert. Es entsteht ein unterbrochener DNA-Strang, so daß nur die parenteralen DNA-Stränge bei jeder Amplifikationsrunde abgelesen werden können. Nur der parenterale DNA-Strang ist methyliert, so daß dieser nach der Amplifikation durch *DpnI*, eine Endonuklease, verdaut werden kann. Die mutierte DNA liegt ringförmig und doppelsträngig vor und kann damit in die Bakterien transformiert werden, ohne daß die Bakterien die DNA verdauen (Abb. 9).

PCR:

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten unter Verwendung von thermostabiler DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* YT 1 (*taq*) (Saiki *et al.*, 1988).

Die PCR basiert auf den drei Schritten, die für jede DNA-Synthese nötig sind:

1. Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge
2. Annealing = Bindung von Oligonukleotid-Primern an beide Einzelstränge
3. Extension = Synthese der DNA ausgehend von den gebundenen Primern

Bei dieser Mutagenese wurde statt der *Taq*-DNA-Polymerase die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Sie wird aus *Pyrococcus furiosus* gewonnen. Sie ist auch thermostabil und hat im Vergleich zur *Taq*-DNA-Polymerase eine 3' zu 5'-Exonuklease-Aktivität, so daß ihre Fehlerrate bei der Amplifikation geringer ist.

Als Template wurde DNA verwendet, die mit der Plasmid-Präparation nach Qiagen gewonnen wurde.

dNTP-Mix:	dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 25 mM
10 x Reaktionspuffer:	100 mM KCl
	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
	200 mM Tris/HCl pH 8,8
	20 mM MgSO ₄
	1 % Triton X-100
	1 mg/ml nukleasefreies BSA
<i>Pfu</i> DNA Polymerase:	2,5 U/µl

PCR-Ansatz:	5-50	ng	ds DNA-Template
	5	μ l	10 x Reaktionspuffer
	je 125	ng	Oligonukleotidprimer 1 und 2
	0,5-1	μ l	100 mM dNTPmix
	ad 50	μ l	H ₂ O HPLC Reinheitsgrad
	+ 1	μ l	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l)

PCR-Programm für den Thermocycler:

Zyklen:	1.	95	°C	30 sec
	2. 12-18 Zyklen:	30	sec	96 °C Denaturierung
		1	min	55 °C Annealing
		2	min/kb (Template)	68 °C Extension

Die Zyklenzahl richtete sich nach der Mutationsanzahl und sollte möglichst gering gehalten werden, damit die Fehlerrate der *Pfu* DNA-Polymerase verringert wurde.

Punktmutation	12 Zyklen
einzelne Aminosäure-Austausche (Triplets)	16 Zyklen
mehrfache Aminosäure-Austausche	
Deletionen oder Insertionen	18 Zyklen

Nach der Amplifikation wurde der Ansatz auf 37°C abgekühlt.

Endonukleaseverdau:

Nach der Abkühlung wurde der Ansatz mit 1 μ l *DpnI* (10 U/ μ l) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der Amplifikation wurde die Größe des Plasmids in einem 1%igen Agarosegel überprüft. Es wurde ein Fünftel des PCR-Ansatzes eingesetzt.

Transformation:

Nach erfolgreicher Amplifikation wurde 1 μ l *DpnI*-verdauter PCR-Ansatz in superkompetente XL1-Blue oder CMK 603 transformiert (2.2.1.13).

2.2.1.8 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Doppelstrang-DNA wurde mit einem DNA-Sequenzierungsgerät (Modell 373A, ABI) durchgeführt. Es wurde die *Taq*-Cycle-Sequencing Methode des Herstellers Applied Biosystems angewandt, die auf der Methode nach Sanger *et al.* (1977) aufgebaut ist. Statt radioaktiv-markierter wurden jedoch fluorochrom-gekoppelte Didesoxynukleotide zum Kettenabbruch eingesetzt. Vorteilhaft in diesem System sind die vier eingesetzten unterschiedlichen Fluorochrome, so daß nur eine Probe auf dem Sequenzgel aufgetragen wurde. Die Auswertung des Sequenzierungsgels erfolgt mit Hilfe eines Computers. Die Fluorochrome werden durch einen 40 mW Argon-Laser (488 nm und 514 nm) angeregt, die Fluoreszenzsignale durch das Detektorsystem gelesen und mit den Programmen Collection und Analysis die DNA-Sequenz in Chromatogrammform dargestellt.

Sequenzierungsreaktion:	Premix	4,0	µl
	DNA-Template (dsDNA)	0,5-1,0	µg
	Primer	3-10	pmol
	H ₂ O	ad 20	µl

Es wurden 25 Reaktionszyklen in einem Perkin Elmer Cetus Thermocycler Modell 9600 durchgeführt:

Denaturierung	15	sec	96°C
Annealing	15	sec	50°C
Extension	4	min	60°C

Die Proben wurden nach Beendigung der Reaktion auf 4°C abgekühlt. Die DNA-Lösung wurde mit 2 µl 3 M Natriumacetat und 50 µl Ethanol versetzt und gemischt. Das DNA-Präzipitat wurde bei 12000 x g 20 min sedimentiert, der Überstand verworfen, das Sediment mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen, nochmals bei 12000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment im Vakuumkonzentrator getrocknet. Schließlich wurde das DNA-Sediment in 4 µl Formamid/EDTA, pH 8,0 (5:1) aufgenommen, 2 min bei 90°C denaturiert, 5 min auf Eis abgekühlt und zügig auf ein 6% Polyacrylamidgel aufgetragen.

Vor dem Probenauftrag wurde ein Vorlauf von mindestens 30 Minuten durchgeführt. Die Elektrophorese fand in 1 x TBE-Puffer bei 1300 Volt statt.

2.2.1.9 Herstellung von Transformations-kompetenter Zellen

E. coli vom Stamm CMK 603 wurden nach der Methode von Nishimura *et al.*(1990) für die Aufnahme von DNA aus dem umgebenden Medium kompetent gemacht, dadurch wird eine Aufnahme von fremder DNA erleichtert.

Lösung A:	0,2	% (w/v)	D-Glukose
	10	mM	MgSO ₄ in LB-Medium
Lösung B:	36	% (v/v)	Glycerin
	12	% (w/v)	Polyethylenglykol (PEG) MW 6000
	12	mM	MgSO ₄ in LB-Medium

Beide Lösungen wurden sterilfiltriert.

100 ml Lösung A wurden mit 1 ml Vorkultur CMK 603 angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert bis eine OD_{600nm} von 0,4-0,6 erreicht war. Die Zellsuspension wurde 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 4°C mit 8000 rpm in einem JA 10-Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment vorsichtig in 1 ml kalter Lösung A resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 5 ml Lösung B vermischt und zum Schluß auf Eis in 100 µl Aliquots portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.1.10 Transformation kompetenter Zellen

100 µl kompetente Zellen (CMK 603) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 ng Vektor-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz oder 1 µl Mutageneseansatz versetzt und für 30 min auf Eis gestellt. Nach dieser Inkubation erfolgte ein Temperaturschock bei 37°C für 4 min und danach auf Eis für 20 min. Die Bakterien wurden nun mit 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum gemischt und für weitere 30-60 min bei 37°C belassen. 100-400 µl des Transformationsansatzes wurden auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mit den erhaltenen Kolonien wurden 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Diese Vorkultur wurde für die Plasmid-Präparationen und zum Anlegen von Glycerinkulturen verwendet.

2.2.1.11 Anlegen einer Glycerinkultur

Vorkulturen in LB-Medium mit einer OD_{600nm} von größer als 1 wurden mit 0,25 Volumen 80% Glycerin versetzt und bei $-80^{\circ}C$ aufbewahrt. Aus der Glycerinkultur kann direkt eine Vorkultur angeimpft werden.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur

2.2.2.1.1 Kulturbedingungen

Die adhärennten Säugerzellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO_2 bei $37^{\circ}C$ und Insektenzellen ohne CO_2 bei $27^{\circ}C$ kultiviert. Medien und Lösungen wurden auf $37^{\circ}C$ oder $27^{\circ}C$ vorgewärmt, wenn nicht anders angegeben.

Es wurden folgende Medien verwendet:

DMEM + 5% FKS + 1 x Penicillin/Streptomycin für BHK21

DMEM + 10% FKS + 1 x Penicillin/Streptomycin für MPR-defiziente embryonale Mausfibroblasten

DMEM + 10% FKS + 1 x Penicillin/Streptomycin für LTK⁻C5

Medien für stabil transfizierte Zellen enthielten zusätzlich 5 µg/ml Puromycin (BHK) bzw. 500 µg/ml Hygromycin B (MEF), 0,5 mg/ml G418 (LTK⁻C5).

2.2.2.1.2 Passagieren von Zellen

Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05% (w/v) Trypsin
0,02% (w/v) EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung

EDTA: 0,02% (w/v) EDTA in PBS

1. Die adhärennten Säugerzellen wurden mit PBS gespült, um inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsinaktivität zu verhindern. Nach dem Absaugen des PBS wurden 0,5-1,5 ml Trypsin-Lösung auf die LTK^{C5}-Zellen oder EDTA-Lösung für die BHK-Zellen oder MEF aufgebracht und bis zu 5 min bei RT inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde im inversen Mikroskop kontrolliert. Die Ablösungsreaktionen wurden durch Zugabe von Medium gestoppt, die Zellen vereinzelt und in entsprechender Verdünnung ausgesät.
2. Das Passagieren von Insektenzellen erfolgte durch Abspülen der adhärennten Zellen mit einem Mediumstrahl. Nach dem Ablösen wurden die Zellen vereinzelt und in entsprechender Verdünnung (1:3 bis 1:5) ausgesät.

2.2.2.1.3 Gefrierkonservierung von Zellen

Einfriermedium: 10% DMSO in Zellkulturmedium, 4°C
bei -20 °C lagern
häufiges Frieren und Tauen des Mediums vermeiden,
da oxidiertes DMSO als Zellgift wirkt.

Die Zellen wurden je nach Zelltyp durch Trypsin, EDTA oder Spülen abgelöst und die Suspension in der Labofuge sedimentiert für 5 min bei 1000 x g. Das Zellsediment wurde in eiskaltem Einfriermedium schonend aufgenommen und in beschriftete und vorgekühlte Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst bei -70°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.1.4 Revitalisierung von Zellen

Einfrierröhrchen wurden dem Stickstofftank entnommen, 1 min in der Hand angewärmt und anschließend im Ethanolbad bei 37°C aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellen wurden im 4 ml kaltem Medium (4°C) aufgenommen und in der Labofuge 5 min bei 1000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellsediment in 5 ml warmem Medium (37°C) ohne Selektionsantibiotika schonend resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde standardmäßig das Medium gewechselt, um restliches DMSO, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen sowie Selektionsantibiotika einzuführen.

2.2.2.1.5 Stabile Transfektion

Stabile Transfektionen wurden nach der Calcium-Phosphat-Methode (Chen und Okayama, 1987) durchgeführt.

Lösungen: CaCl₂ 2,5 M

HBS (2fach): 50 mM HEPES
1,5 mM Na₂HPO₄
0,28 M NaCl

Glycerolschock: 15% Glycerin (w/v) in DMEM + 10% FKS

Stabile Transfektion von MPR-defizienten embryonalen Mausfibroblasten:

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer Dichte von 5×10^5 Zellen auf einer 10 cm Gewebeschale ausgesät. Vier Stunden vor Zugabe der DNA wurde das Medium gewechselt. Zur Herstellung des Präzipitats wurden 20 µg des zu transfizierenden Plasmids (aus einer Qiagenpräparation), 2 µg des Selektionsplasmids pGKhygro (Mortensen *et al.*, 1991) und 250 µl 2,5 M CaCl₂ mit H₂O auf 500 µl aufgefüllt und gemischt. Dieses Gemisch wurde langsam in 500 µl 2xHBS unter Luftzufuhr eingetropt. Zur Ausbildung des DNA-Calcium-Phosphat-Präzipitats wurde bei RT für 30 min inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Nach 3 h Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einem Glycerolschock für 3 min unterworfen. Die Zellen wurden mit zweimal PBS gewaschen und für 24 Stunden in frischem Medium inkubiert.

Stabile Transfektion von BHK-21:

Die Vorgehensweise entspricht der oben für MPR-defiziente embryonale Mausfibroblasten beschriebenen. Es wurden jedoch nur 4×10^5 Zellen auf einer 10 cm oder 2×10^5 Zellen auf einer 6 cm Gewebekulturschale ausgesät und anschließend 20 oder 10 µg Plasmid-DNA und 2 oder 1 µg des Selektionsplasmids pSV2 pac zur Transfektion verwendet.

Selektion der stabil transfizierten MPR-defiziente embryonale Mausfibroblasten-Zellklone:

24 Stunden nach dem Glycerolschock wurde das alte Medium gegen hygromycinhaltiges (100 µg/ml Hygromycin B) ausgetauscht. Am zweiten Tag wurde die Hygromycinkonzentration auf 250 µg/ml und am dritten Tag auf 500 µg/ml erhöht, dadurch sterben die nicht-transfizierten Zellen ca. 90% ab. Vor jedem Medienwechsel wurde sehr gründlich mit PBS zweimal gewaschen, um die toten Zellen zu entfernen. Nach etwa 10-14 Tagen konnten Einzelklone auf eine 24-Napf-Gewebekulturplatte überführt werden.

Selektion der stabil transfizierten BHK-21-Zellklone:

Einen Tag nach der Transfektion wurde mit der Selektion stabil transfizierter Zellen begonnen, indem das Medium mit 1 µg/ml Puromycin versetzt wurde. An dem folgenden Tag wurde zweimal sehr sorgfältig mit PBS gewaschen und die Zellen mit frischem Medium, welches 2 µg/ml Puromycin enthält, versorgt. Jeden Tag wurden die Zellen gewaschen und von den toten Zellen befreit. Nach circa 10 Tagen waren resistente Zellklone sichtbar, einen Tag vor dem Überführen der Zellklone wurde die Puromycinkonzentration auf 5 µg/ml erhöht. Die verbliebenen Zellklone wurden in eine 24-Napf-Gewebekulturplatte überführt.

2.2.2.2 Infektion der Insektenzellen mit dem Baculovirus

Das Baculovirus mit der fremden DNA (cDNA der extracytoplasmatischen Domäne des humanen MPR 46= lösliche MPR 46) infiziert die Insektenzellen, so daß die fremde DNA in die Zellen gelangt. In den Insektenzellen wird die DNA translatiert und der lösliche MPR 46 ins Medium abgegeben.

Die Wirkung der Virusverdünnung auf die Insektenzellen wurde in einer Verdünnungsreihe von 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} getestet. Hierbei starben am ersten Tag die Insektenzellen bei einer Verdünnung von 10^{-2} und 10^{-3} . Die 10000fache Verdünnung zeigte eine starke Infektion der Zellen, die Zellkerne waren zum großen Teil vergrößert, hier starben die Zellen am zweiten Tag. Die 100000fache Verdünnung zeigte eine geringe Infektionsrate. Die Auswertung der löslichen MPR 46-Produktion wurde nach zwei Tagen in einem Sandwich-ELISA (Kapitel 2.2.4.5.1) getestet. Es zeigte sich eine Optimumskurve, wobei die Verdünnung 10^{-4} das Optimum war. Für die weiteren Versuche wurde eine 10000fache Verdünnung eingesetzt.

High five-Zellen wurden aus einer konfluenten Flasche mit serumfreiem X-Press-Medium ab gespült, bei 400 x g für 5 min zentrifugiert und in 5 ml serumfreiem Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauerkammer ermittelt und $7,5 \times 10^6$ Zellen in eine 75 cm²-Gewebekulturflasche in 10 ml serumfreiem Medium ausgesät. Die Zellen wurden 3 Stunden bei 27°C inkubiert und anschließend mit 100 µl 1:100 Virusverdünnung (10^{-4}) pV1393MPR46M14 vom 22.05.1997 versetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von 3-8 Tagen. Der Überstand wurde abgenommen und nach Protokoll 2.2.5.2.2 aufgereinigt.

2.2.3 Arbeiten mit radioaktiven Isotopen

2.2.3.1 Metabolische Markierung mit [³⁵S]-Methionin und Cystein

(Variierte Methode von Lemansky *et al.*, 1985)

Radioaktiv-markiertes Methionin/Cystein wird von der Zelle aufgenommen und zur Proteinsynthese genutzt.

Hungermedium: Methionin- und Cystein- freies MEM

Markierungslösung: 0,04 Vol. dialysiertes FKS (hitze-inaktiviert)
15-100 µCi ³⁵S-Methionin und -Cystein (10µCi/µl)

Für die Markierung wurden die Zellen am Vortag in der benötigten Dichte ausgesät. Die Zellen wurden mit 2 x 2 ml PBS gewaschen, um nicht-radioaktives Methionin und Cystein von den Zellen und den Wänden der Petrischale zu entfernen. Die Zellen wurden für 20 min in Hungermedium im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für eine 3 cm Schale wurden 1 ml Hungermedium benötigt. Die Markierungslösung wurde dem Hungermedium zugeführt. Nach der Markierung von mindestens 5 Stunden wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 x 0,5 ml PBS gewaschen und anschließend in 2 x 500 µl PBS mit dem Gummispatel abgeschabt. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 x g sedimentiert und in geeignetem Homogenisationspuffer aufgenommen. Vor und nach Markierung der Zellen wurde die Aktivität im Medium durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt, um die Inkorporation von ³⁵S-Methionin und -Cystein zu überprüfen. Die Homogenate wurden zur Immunpräzipitation oder zur Membranextraktion eingesetzt.

2.2.3.2 Radioaktive Markierung von Proteinen mit Jodogen

Lösungen:	Jodogen:	1	mM	Jodogen (0,8 mg in 577 μ l CH_2Cl_2 lösen und 1:3 in CH_2Cl_2 verdünnen)
	Elutionspuffer:	1	mg/ml	KJ
		0,05	%	BSA in 10 mM PBS
		0,05	%	Triton X-100
	Boratpuffer:	20	mM	Borsäure mit NaOH auf pH 8,0 titriert
		0,05	%	Triton X-100
	β ME:	20	mM	β -Mercaptoethanol
	^{125}J :	100	μCi	Na^{125}J (100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)
	Protein:	5	μg	MPR 46 aus humaner Plazenta
	Man6P:	0,1	M	Mannose-6-phosphat Natriumsalz in H_2O

Für die Jodierung mußten zunächst Glasspitzröhrchen mit Jodogen beschichtet werden. Hierzu wurde ein Glasspitzröhrchen schräg in einen Rotator eingespannt, 80 μ l der Jodogenverdünnung zugegeben und im Stickstoffstrom unter Rotation vom CH_2Cl_2 befreit. Beschichtete Glasspitzröhrchen konnten auf Vorrat generiert werden, da sie bei -20°C circa 8 Wochen haltbar sind.

Vor Jodierungsbeginn wurde eine NAPTM-Fertigsäule mit Sephadex G-25 mit 25 ml Elutionspuffer equilibriert. Der MPR 46 wurde mit Aceton (-20°C) über Nacht gefällt, bei 12000 x g zentrifugiert und das Präzipitat mit 70 % Aceton (-20°C) gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Präzipitat bei RT getrocknet und in Boratpuffer aufgenommen und 1 mM Man6P hinzugefügt. Das Man6P stabilisierte den MPR 46. Zu dem Protein wurde das ^{125}J gegeben und mit Boratpuffer + Triton X-100 auf 60 μ l aufgefüllt. Dieser Jodierungsansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert und anschließend in das Iodogenröhrchen überführt. Nach 8 min Inkubation unter Rotation auf Eis wurde der Ansatz

in ein drittes Röhrchen, in dem 10 µl βME vorgelegt wurde, transferiert. Das βME stoppte die Jodierungsreaktion. Das Jodogenröhrchen wurde mit 150 µl Boratpuffer gespült und die Lösung auch in das dritte Röhrchen überführt. 300 µl Elutionspuffer wurde zum Ansatz gegeben, 2 µl des Gesamtansatzes gezählt und der restliche auf die Säule gegeben. Durch die Gelfiltration wurde freies von proteingebundenem ^{125}J abgetrennt. Das jodierte Protein wurde in 10 x 0,5 ml-Fractionen mit Elutionspuffer eluiert. Das freie ^{125}J bleibt auf der Säule. Die Fractionen wurden im Gammastrahlenszähler (Szintillationszähler) gezählt und die Fractionen, die das jodierte Protein enthielten, zusammengeführt. Das Jodierungsprodukt wurde bei 4°C gelagert.

2.2.3.3 Fixierung von SDS-Polyacrylamidgelen und Auswertung am Phosphoimager

Die Polyacrylamidgele aus radioaktiven Versuchen, z.B. Immunpräzipitationen wurden nach der SDS-PAGE in 50% Methanol und 10% Essigsäure für 30-120 min fixiert und für 30-120 min gewässert. Anschließend wurden die Gele zwischen zwei Folien im Geltrockner Typ G1200 getrocknet. Der farbige Marker und die Ecken des Geles wurde nach dem Trocknen radioaktiv markiert. Freie Photonen aus vorherigen Versuchen oder der Umgebung werden von einem Screen in 15 min gelöscht. Das Gel wurde mit dem Screen in einer lichtisolierten Kammer für 15 Stunden bis 4 Tage exponiert. Die Auswertung der Fluorographie erfolgte mittels des Phosphoimagers IPR 1000 und den Programmen Image Reader V1.4E und Image Gauge 3.0. Der Nachweis der Fluoreszenz konnte außerdem auch mittels Röntgenfilm erfolgen.

2.2.3.4 *In vitro* Transkription und Translation

Die *in vitro* Transkription und Translation wurde nach dem Promega Protokoll TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Februar 1995) durchgeführt. Es wurden die Kit-Bestandteile, das RNasin[®] Ribonuklease Inhibitor, ^{35}S -Methionin und nukleasefreies Wasser benutzt.

Kurz vor dem Gebrauch wurden die Substanzen aufgetaut und sofort nach der Entnahme wieder bei -70°C oder -20°C eingefroren. Das Plasmid pGEM2-2 besitzt den SP6-Promotor, dieser wird von der TNT[®] RNA Polymerase SP6 zur Transkription genutzt.

Reaktionsansatz:	1	μl	TNT [®] Kaninchen-Retikulozytenlysat
	0,08	μl	TNT [®] Reaktionspuffer
	0,04	μl	TNT [®] RNA Polymerase SP6
	0,04	μl	1 mM Aminosäure Mix minus Methionin
	0,16	μl	³⁵ S-Methionin (10 μCi/μl)
	0,04	μl	RNasin [®] Ribonuklease Inhibitor (40 U/μl)
	20-40	ng	pGEM2-2 (aufgereinigt nach Qiagen und nachträglich mit Ammoniumchlorid gefällt)
	ad	2	μl nukleasefreies Wasser

Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 30°C inkubiert und anschließend sofort mit 2 x Probenpuffer mit Mercaptoethanol (siehe SDS-PAGE) versetzt oder der Ansatz wurde zur Immunpräzipitation eingesetzt. Im ersten Fall wurde bei 95°C inkubiert, zentrifugiert und durch einen SDS-PAGE analysiert. Für die Immunpräzipitation wurde der Ansatz mit 1-4 μg mAk in 100 μl PBST versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 4°C wurden 2 μg Kaninchen-anti-Maus-IgG und 30 μl Pansorbinsuspension (das Pansorbin wurde zweimal mit PBS gewaschen) hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei 4°C auf dem Drehrad. Anschließend wurde eine Minute zentrifugiert, das Sediment aufgewirbelt und mit 1 ml PBST aufgenommen. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, dann nochmals zentrifugiert und das Sediment mit 1 x Probenpuffer mit Mercaptoethanol versetzt, bei 95°C 5 min gekocht, zentrifugiert und die Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach dem Punkt 2.2.3.3 weiter gearbeitet.

2.2.4 Immunchemische Methoden

2.2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Durchführung erfolgte nach einem variierten Protokoll, es wurde das PBS durch Ca-Mg-PBS ersetzt. (Hille *et al.*, 1992).

Lösungen:	10	mM	PBS, pH 7,4
	Ca-Mg-PBS		0,9 mM CaCl ₂ und 0,5 mM MgCl ₂ in PBS
	3	%	Paraformaldehyd in PBS (w/v)
	50	mM	NH ₄ Cl in PBS

0,1 %	Saponin in PBS
20 %	Mowiol (w/v) in 30 % Glycerin (w/v) in PBS
200 mg/ml	DABCO in PBS

Polylysinbeschichtung von Deckgläschen:

Sterile Deckgläschen wurden in eine Petrischale gelegt und mit einer 0,1 mg/ml Polylysinlösung bedeckt. Die Deckgläschen wurden bei 37°C für 30-60 min inkubiert, die Polylysinlösung abgesaugt und 2 x mit bidest., sterilen Wasser gewaschen. Vor der Aussaat der Zellen wurden die Deckgläschen mit PBS einmal gespült.

Intrazelluläre Färbung:

Je nach Zellart wurden circa 150-300 Zellen auf Polylysin beschichteten oder unbeschichteten Deckgläschen in 24-Napf-Zellkulturplatten ausgesät und 1-3 Tage wachsen gelassen. Vor der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit 1 ml Ca-Mg-PBS oder PBS (37°C) gespült und anschließend 30 min bei RT mit 200 µl Paraformaldehydlösung inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei RT. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS gespült und 10 min mit 1 ml 50 mM NH₄Cl inkubiert, um überschüssiges Aldehyd zu entfernen. Die Ammoniumchloridlösung wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch 5-15 minütige Inkubation mit 0,1% Saponin. Alle weiteren Schritte erfolgen auch in 0,1% Saponin, weil die Permeabilisierung reversibel ist.

Der erste Antikörper (α MSCI-III-7b- Kaninchenserum) wurde 1:200 in 0,1% Saponin verdünnt und anschließend für 2 min in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. 20-30 µl der Antikörperverdünnung wurden als Tropfen auf einen Streifen Parafilm pipettiert und die Deckgläser mit den Zellen nach unten auf den Tropfen gelegt. Eine mit feuchtem Filterpapier ausgekleidete Petrischale wurde als Verdunstungsschutz darüber gelegt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über 1-2 Stunden. Die Deckgläschen wurden in die 24-Napf-Zellkulturplatte überführt und dreimal 5 min mit 0,1% Saponin gespült. Der Sekundärantikörper (FITC-konjugierter Ziege-anti-Kaninichen IgG) wurde 1:200 in 0,1 % Saponin verdünnt und zentrifugiert. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte, wie für den Primärantikörper beschrieben, für 30-60 min unter Lichtabschluß, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Nach dieser Inkubation wurden die Deckgläschen wieder in die 24-Napf-Zellkulturplatte überführt, dreimal 5 min mit 0,1% Saponin, zweimal mit PBS und einmal mit H₂O gespült. Die mit FITC markierten Immunfluoreszenzpräparate

wurden in Mowiol mit DABCO (1 Volumen DABCO und 3 Volumen Mowiol) eingebettet, damit wurde ein schnelles Ausbleichen durch Oxidation verhindert. Die Präparate polymerisierten über Nacht im Dunkeln bei RT aus und wurden anschließend im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie:

Das Prinzip der Laser-Scan-Mikroskopie beruht darauf, daß einzelne fluoreszierende Punkte im Präparat in den Fokus eines Lasers gebracht werden und diese so mit einer hohen Energie angeregt werden. Der Laser wird auf eine Ebene (z-Ebene) im Präparat fokussiert und durch die Ablenkung des Lasers in der x- und y-Ebene mittels eines Spiegels können schrittweise dicht nebeneinanderliegende Punkte im Präparat angeregt werden. Auf diese Weise wird eine definierte Ebene im Präparat abgetastet. Das vom fluoreszierenden Präparat emittierte Licht fällt durch das Objektiv des Mikroskops und durch eine dem Photodetektor vorgeschaltete Lochblende mit veränderbarer Größe. Das Schließen dieser Lochblende bewirkt, daß nur solche Bildpunkte auf dem Detektor abgebildet werden, die in der Fokusebene des Lasers (beziehungsweise des Objektivs) liegen, also konfokale Bilder erzeugt werden können. Die entstehenden Bilder werden in einem internen Computer digitalisiert und auf einem hochauflösenden Bildschirm dargestellt. Die Bilder werden entweder direkt vom Bildschirm mit einer Kamera abfotografiert oder aber in Form von Bilddateien im TIF-Format (Tagged Image File Format) abgespeichert und auf Photopapier ausgedruckt. Für FITC-Anregung wurde ein Argon-Laser verwendet.

2.2.4.2 Immunpräzipitation

In einer Immunpräzipitation bindet die Pansorbinsuspension Antikörper. Proteine, die von den Antikörpern gebunden wurden, können somit aus einer Proteinlösung isoliert werden.

2.2.4.2.1 Immunpräzipitation von humanem MPR 46 aus ³⁵S-markierten Zellen

Acetatpuffer:	0,1	M	NaAc pH 6,0
	0,2	M	NaCl
	1	mM	PMSF
	1	mM	EDTA
	5	mM	JAA

Tritonpuffer:	0,5	%	Triton X-100	
	50	mM	Imidazol pH 7,0	
	150	mM	NaCl	
	1	mM	PMSF	
	1	mM	EDTA	
	5	mM	JAA	
Wasch-Immunomix (IMM):	10	mM	NaPi, pH 7,4	
	150	mM	NaCl	
	1	%	Triton X-100	
	0,5	%	Na-Deoxycholat	
Präzipitations-IMM:	Wasch-IMM mit	0,2	%	SDS
		10	%	BSA
		1	mM	PMSF
		1	mM	EDTA
		5	mM	JAA
Neufeld-Puffer:	10	mM	Tris/HCl, pH 8,5	
	0,6	M	NaCl	
	0,1	%	SDS	
	0,05	%	NP-40	

Wasch-IMM mit 2 M KCl

1/10 verdünntes PBS

Aufarbeitung der Zellen:

Die metabolisch mit ^{35}S -Methionin und -Cystein markierten Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen, mit 2 x 500 μl PBS abgeschabt und für 5 min bei 1000 x g sedimentiert. Das Zellsediment von einer 3 cm Zellkulturplatte wurde in 1,0 ml Acetatpuffer resuspendiert und durch 3 x 10 sec Ultraschall homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 100000 x g für 30 min

zentrifugiert. Das Acetatsediment wurde in 350 µl Tritonpuffer aufgenommen und durch 3 x 10 sec Ultraschall homogenisiert. Nach 10 min Inkubationszeit auf Eis wurde der Ansatz bei 100000 x g für 20 min zentrifugiert. Der Membranextrakt mit dem gelösten MPR 46 wurde in die Immunpräzipitation eingesetzt.

Präinkubation:

Die Pansorbinsuspension wurde bei 12000 x g zentrifugiert und in PBS resuspendiert, dieser Vorgang wurde 2 x wiederholt.

350 µl Membranextrakt wurde mit 640 µl Präzipitations-IMM, 2 µl Präimmunserum oder 10 µg Präimmun-Ig und 40 µl gewaschener Pansorbin-Suspension versetzt. Der Ansatz wurde 60 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert, danach 10 min bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals mit 40 µl gewaschener Pansorbin-Suspension versetzt. Nach einer Inkubation auf dem Drehrad über Nacht wurde das Pansorbin bei 100000 x g und 4°C für 20 min sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Immunpräzipitation:

Der zweite Überstand nach der Präinkubation wurde mit 10 µg affinitätsgereinigtem anti-MSCI IgG und 15 µl gewaschener Pansorbinsuspension oder mit 2 µl anti-MPR 46 Antiserum und 40 µl gewaschener Pansorbinsuspension versetzt und für 1 h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz 45 sec bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pansorbinsediment wurde gewaschen mit je 1 ml der folgenden Lösungen - Neufeld-Puffer, IMM 2 M KCl, IMM und 1 mM PBS - dabei wurde nach jeder Zentrifugation erst das Sediment aufgewirbelt, in der Lösung aufgenommen und schließlich zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Sediment aufgewirbelt und in 60 µl Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol aufgenommen. Die Suspension wurde bei 95°C 5 min denaturiert, so daß die Elution vom Pansorbin erfolgen konnte und der Antigen-Antikörper-Komplex zerstört wurde. Nach der Denaturierung wurde zentrifugiert und die Proben durch SDS-PAGE analysiert.

2.2.4.2.2 Immunpräzipitation von ^{125}J -MPR 46 mit monoklonalen Antikörper

10 ng ^{125}J -MPR-46 wurden mit einem 100-400fachen Überschuss an Antikörper immunpräzipitiert. 10 ng ^{125}J MPR 46 in 10 μl PBST wurden mit 1-4 μg monoklonalem Antikörper in 90 μl PBST versetzt und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 1 μg Kaninchen-anti-Maus IgG und 15 μl mit PBS gewaschenes Pansorbin (siehe 2.2.4.2.2) pro 1 μg mAk gegeben und 1 Stunde bei 4°C auf dem Drehrad rotiert. Anschließend wurde eine Minute bei 12000 x g zentrifugiert und viermal mit 1 ml PBST gewaschen, d.h. das Pansorbinsediment mit den Antikörpern wurde aufgewirbelt, mit Lösung gemischt, zentrifugiert und der Überstand jedesmal abgesaugt. Zum Schluß erfolgte eine Messung des Pansorbinsediments im Szintillationszähler.

Als positive Kontrolle und zur Normierung der Werte diente eine Präzipitation mit 10 μg affinitätschromatographisch gereinigtem anti-MSCI, der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist. Es wurde kein Kaninchen-anti-Maus IgG hinzugegeben.

2 μg anti-Arylsulfatase A, der irrelevante Antikörper, wurden gleichfalls wie oben beschrieben, behandelt und diente als Negativkontrolle

2.2.4.3 Westernblot-Analyse

2.2.4.3.1 Proteintransfer von Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membran

Proteine werden durch Elektroelution aus dem Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert.

Kathodenpuffer:	40	mM	ϵ -Aminocapronsäure pH 9
	20	mM	Tris/HCl pH 9
	20	%	Methanol p.a.

Anodenpuffer:	75	mM	Tris/HCl pH 7,4
	20	%	Methanol p. a.

Für den Proteintransfer aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulose- oder PVDF-Membran wurden 3 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer getränkt und auf die untere

anodische Glaskohlenstoffelektrode luftblasenfrei geschichtet. Die PVDF-Membran wurde 1 min in Methanol p.a. equilibriert, anschließend wurde diese oder die Nitrocellulosemembran mit Kathodenpuffer benetzt und auf die Anodenpuffer-getränkte Filterpapierschicht luftblasenfrei gelegt. Auf die Membran wurde das Polyacrylamidgel, welches vorher 15 min in Kathodenpuffer equilibriert wurde luftblasenfrei gelegt. Auf das Gel wurden danach 3 Lagen mit Kathodenpuffer getränkten Filterpapier geschichtet. Die zweite Glaskohlenstoffelektrode wurde aufgelegt, und der Transfer erfolgte mit 1 mA/cm^2 für 1 Stunde bei großen Gelen und für 30 min bei Minigelen. Der „prestained Marker“ wurde nach dem Transfer mit Kugelschreiber markiert. Die Westernblotmembran wurde zweimal mit PBS gespült.

2.2.4.3.2 Immunodetektion

Proteine auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membran wurden durch spezifische Antikörper und diese durch Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper detektiert. Die Peroxidase der Sekundärantikörper setzte ein spezifisches Substrat um, so das eine Chemilumineszenz entstand.

Blotto:	5 % Magermilchpulver in PBST	
SNT:	0,05 %	SDS
	0,9 %	NaCl
	0,5 %	Triton X-100
Primärantikörper in PBST:	50µg/ml	affinitätsgereinigte monoklonale Antikörper oder affinitätsgereinigte IgGs aus Seren
	1:200	anti-MSCI-III-7b-Kaninchenserum
	1:200	anti-MPR 46 GI-4a
Sekundärantikörper in PBST:	1:2000 oder 1:10000	Ziege-anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase
	2 µg/ml	Kaninchen-anti-Maus

1. Pierce SuperSignal Substrat-Kit

2. Entwicklungsreagenz:

Zusammensetzung nach Tikkanen R (nicht veröffentlicht).

Lösung I:	100	µl	250 mM Luminol in DMSO
	44	µl	90 mM p-Cumarsäure in DMSO
	1	ml	Tris/HCl pH 8,5
	8,85	ml	H ₂ O

Lösung II:	6	µl	30% H ₂ O ₂
	1	ml	Tris/HCl pH 8,5
	9	ml	H ₂ O

3. ECL-Kit

Allgemeine Behandlung der Nitrocellulose- oder PVDF-Membran:

Waschen:	zweimal 5 min mit PBS
Blocken:	30-60 min bei RT oder über Nacht bei 4°C mit Blotto
Waschen:	zweimal mit PBST
1. Antikörper:	1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C
Waschen:	5 min mit PBST
	viermal 5 min mit SNT
	5 min mit PBST
2. Antikörper:	1 h bei RT
Waschen:	5 min mit PBST
	viermal 5 min mit SNT
	5 min mit PBST
	5 min PBS
Entwicklung:	1 min mit Pierce SuperSignal-Substrat, ECL-Kit oder Entwicklungsreagenz (Tikkanen)
Exposition:	10 sec- 15 min

MPR 46 geblottet auf Nitrocellulose zur Detektion mit den monoklonalen Antikörpern:

Waschen:	zweimal 5 min mit PBST
Blocken:	30-60 min bei RT oder über Nacht bei 4°C mit Blotto
Waschen:	zweimal mit PBST
1. Antikörper:	2 h bei RT
Waschen:	dreimal 5 min mit Blotto dreimal 5 min mit PBST
2. Antikörper:	Kaninchen-anti-Maus 2 µg/ml 1 h bei RT
Waschen:	dreimal 5 min mit Blotto dreimal 5 min mit PBST
3. Antikörper:	Ziege-anti-Kaninchen-HRP 1:10000 1 h bei RT
Waschen:	dreimal 5 min mit Blotto dreimal 5 min mit PBST 5 min PBS
Entwicklung:	1 min mit Pierce SuperSignal-Substrat, ECL-Kit oder Entwicklungsreagenz (Tikkanen)
Exposition:	10 sec- 15 min

Chemilumineszenzentwicklung:

Die beiden Lösungen aus dem Pierce SuperSignal Substrat-Kit/ECL-Kit oder Lösung I und II wurden 1:1 kurz vor der Verwendung gemischt. Die Membran wurde 1 min mit dem Gemisch inkubiert, die Membran herausgenommen, mit Whatmanpapier kurz getrocknet und zwischen zwei Folien gelegt. Anschließend wurde mit dem CCD-Camera-System oder einem Röntgenfilm exponiert. Die Signalstärke war bei den Pierce SuperSignal Substrat-Kit und Entwicklungslösungen nach dem Rezept von Tikkanen stärker, so daß das ECL-Kit, welches erst benutzt wurde, von diesen Lösungen ersetzt wurden. Das Pierce SuperSignal Substrat-Kit zeigte geringer Signale, aber weniger Hintergrund als das Entwicklungsreagenz (Tikkanen).

2.2.4.4 Slot-Blot/Dot-Blot und Fixierung der Proteine auf der Nitrocellulosemembran

Proteine wurden nativ auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und auf der Membran fixiert.

Slot-Blot und Fixierung der Nitrocellulosemembran mit para-Formaldehyd:

Die Nitrocellulosemembran wurde in PBS equilibriert, in die Slot-Blot-Kammer eingebaut und das Vakuum angeschlossen. Die Taschen der Kammer wurden mit 50 µl PBST vorgewaschen, die Proteinlösung in einem Volumen von 50 µl in PBST aufgetragen und mit 250 µl PBST nachgespült. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran aus der Kammer genommen und für 30 min mit 1% para-Formaldehydlösung in PBS fixiert, zweimal mit PBS gespült und die überschüssigen Aldehyde mit 50 mM Ammoniumchlorid in PBS entfernt. Nach 10 min wurde wieder zweimal mit PBS gespült. Die Immundetektion erfolgte nach dem Punkt 2.2.4.3.2.

Dot-Blot und Fixierung der Nitrocellulosemembran mit Essigsäure/Isopropanol:

Auf eine trockene Nitrocellulosemembran wurden 1-5 µl Proteinlösung aufgetropft und trocknen gelassen. Zur Stabilisierung der Proteine auf der Membran wurden die Proteine auf der Membran fixiert (Jahn R. *et al.* 1984). Die Membran wurde in 10 % (v/v) Essigsäure und 25% Isopropanol für 15 min fixiert, anschließend mit dest. Wasser gespült und 5 min in Trispuffer (200 mM NaCl/ 50 mM Tris/HCl pH 7,4) vorinkubiert. Nach der Vorinkubation erfolgte die Immundetektion nach Punkt 2.2.4.3.2.

2.2.4.5 ELISA

Platten: ELISA-Platten von Greiner

Lösungen: Beschichtungspuffer: 25 mM Tris/HCl pH 7,0

Detergenz: 0,4 mM N-Octylglukosid

Blotto: 5 % Magermilchpulver
0,05 % Tween 20
in PBS

Substratpuffer: 50 mM Citrat-Phosphatpuffer, pH 4,3
(50 mM Citronensäure wurden mit 50 mM Na₂PO₄-
Lösung auf einen pH-Wert von 4,3 eingestellt.)

HRP-Substrat:	40 mM ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzthiozolinsulfonat])
Substratlösung:	10 ml Substratpuffer 250 µl 40 mM ABTS 6 µl 3 % H ₂ O ₂

Pro Napf wurden immer 50 µl Beschichtungslösung, Antikörperlösung in Blotto, Peptidlösung in PBST, 200 µl Blotto und 100 µl Substratlösung eingesetzt. Die Messung der Farbreaktion erfolgt bei 405 nm mit den ELISA-Reader und wurde mit 490 nm abgeglichen.

1. Detektion des humanen und der chimären MPR 46:

Die einzusetzende Menge an aufgereinigten MPR 46 wurde ermittelt, indem steigende Mengen MPR 46 mit dem affinitätsgereinigten polyklonalen Serum gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 detektiert wurden.

Beschichtung:	MPR 46 verdünnt in Beschichtungspuffer und 0,4 mM Octylglukosid 4 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C mit
Waschen:	zweimal mit PBS
1. Antikörper:	50 µg/ml mAk oder affinitätsgereinigter anti-MSCI 1-2 h bei 37°C
Waschen:	dreimal mit PBST
2. Antikörper:	HRP konjugierter Antikörper 1:2000 1 h bei 37°C
Waschen:	fünfmal mit PBST
Entwicklung:	mit Substratlösung
Exposition:	5 min bis mehreren Stunden

In einigen Fällen wurde der MPR 46 nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper, mit Kaninchen-anti-Maus IgG 2 µg/ml und anschließend mit dem HRP-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG 1:2000 detektiert. Die Waschungen zwischen den Inkubationen und die Entwicklung wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

2. Detektion von Peptiden:

Beschichtung:	6 µg/ml Neutravidin in Beschichtungspuffer 4 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C
Waschen:	zweimal mit PBS
Peptidlösung:	1 ng- 1µg Peptid in PBST 15-60 min bei 37°C
Waschen:	dreimal mit PBST
1. Antikörper:	50 µg/ml mAk oder affinitätsgereinigter anti-MSCI 1-2 h bei 37°C
Waschen:	dreimal mit PBST
2. Antikörper:	HRP konjugierter Antikörper 1:2000 1 h bei 37°C
Waschen:	fünfmal mit PBST
Entwicklung:	mit Substratlösung
Exposition:	5 min bis mehreren Stunden

3. Sandwich-ELISA:

Beschichtung:	0,02 mg/ml mAk 27A5 (mAk gegen die lumminale Domäne des MPR 46) in Beschichtungspuffer 4 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C
Waschen:	zweimal mit PBS
löslicher MPR 46:	0,5-5 ng löslicher MPR 46 (luminale Domäne) oder 1-4 µl Überstand aus 2.1.1.1 2-3 h bei 37°C
Waschen:	dreimal mit PBST
1. Antikörper:	1:100 GI 4a/ GI 6b (anti-MPR46 präadsorbiert an Ziegen IgG) 1 h bei 37°C
Waschen:	dreimal mit PBST
2. Antikörper:	HRP-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG 1:2000 1 h bei 37°C
Waschen:	fünfmal mit PBST
Entwicklung:	mit Substratlösung

Exposition: 5-30 min

2.2.5 Biochemische Methoden

2.2.5.1 Extraktion des MPR 46 aus eukaryontischen Zellen

Acetatpuffer: 0,1 M Na-Acetat pH 6,0
0,2 M NaCl

Extraktionspuffer: 50 mM Imidazol/HCL pH 6,0, 6,5, 7,0 oder
NaPi pH 6,0, 6,5,7,0
150 mM NaCl
0,05 % Triton X-100

Eukaryontische Zellen von einer 3,5; 6 oder 10 cm Gewebekulturplatte wurden zweimal mit PBS gespült und mit zweimal 0,5; 1 oder 2 ml PBS abgeschabt, bei 1000 x g und 4°C 5 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 0,4-1 ml Acetatpuffer aufgenommen und 3 x 10 sec mit Ultraschall behandelt. Das Homogenat wurde bei 100000 x g und 4°C 20 min zentrifugiert und der Überstand restlos verworfen. Das Acetatsediment wurde in 100; 400 µl oder 1 ml Extraktionspuffer resuspendiert. Nach 3 x 10 sec Ultraschall wurde der Extrakt 1 h auf Eis inkubiert und anschließend bei 100000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Membranextrakt wurde abgenommen und für SDS-PAGE oder PM-Sepharosebindungen eingesetzt. Das Tritonsediment wurde verworfen.

2.2.5.2 Bindungstest der MPR an Phosphomannan-Sepharose

Phosphomannan ist ein synthetischer Ligand des MPR 46. Der MPR 46 bindet somit an eine Phosphomannan (PM)-Sepharose-Säule.

Säulenregeneration: a) 0,1 M NaHCO₃ pH 8,3
1 M NaCl
0,05 % Triton X-100
b) 2 M KCl in dest. Wasser
0,05 % Triton X-100

c)	0,1 M	NaAc pH 4,0
	1 M	NaCl
	0,05 %	Triton X-100
d)	0,05% Triton X-100 in dest. Wasser	
Equilibrierungspuffer 1 :	50 mM	Imidazol/HCL pH 6,0/6,5/7,0
	150 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	5 mM	Na-β-Glycerophosphat
Equilibrierungspuffer 2:	Equilibrierungspuffer 1 mit	
	0,05 %	Triton X-100
	0,5 mg/ml	BSA
Equilibrierungspuffer 3:	Equilibrierungspuffer 1 mit	
	0,05 %	Triton X-100
	10 μg/ml	BSA
Equilibrierungspuffer 4 :	50 mM	NaPi pH 6,0/6,5/7,0
	150 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	5 mM	Na-β-Glycerophosphat
	0,05 %	Triton X-100
Waschpuffer:	Equilibrierungspuffer 1 mit 0,05% Triton X-100	
Man6P-Puffer 1:	10 mM Mannose-6-phosphat (Bariumsalz) in Equilibrierungspuffer 1	
Man6P-Puffer 2:	10 mM Mannose-6-phosphat (Bariumsalz) in Equilibrierungspuffer 2	

Man6P-Puffer 3:	1 mM Mannose-6-phosphat (Bariumsatz) in Equilibrierungspuffer 3
Man6P-Puffer 4:	10 mM Mannose-6-phosphat-Na-Salz in Equilibrierungspuffer 4
Glc6P-Puffer 1:	5 mM Glucose-6-phosphat-Na-Salz in Equilibrierungspuffer 2
Glc6P-Puffer 2:	1 mM Glucose-6-phosphat-Na-Salz in Equilibrierungspuffer 2
MgCl ₂ :	1 M MgCl ₂ : in dest. Wasser
Na-β-GP:	250 mM Natrium-β-Glycerophosphat in dest. Wasser
PBS mit 0,02% Azid	

2.2.5.2.1 Analytische Phosphomannan-Bindung

Regeneration und Equilibrierung der PM-Sepharose:

Die 200 µl oder 300 µl Phosphomannan-Sepharose-Säulen wurden mit 3 ml Säulenregenerierungspuffer a), 5 ml Puffer b) und 5 ml Puffer d), 3 ml Puffer c), 3 ml und 5 ml Equilibrierungspuffer 2 oder 3 regeneriert und equilibriert, dabei wurde nach dem zweiten und letzten Schritt jeweils der pH-Wert überprüft.

1. Bindung von radioaktiv markierten humanem ³⁵S-MPR 46:

Aus den ³⁵S-markierten Zellen wurde der MPR 46 extrahiert (Protokoll 2.2.5.1). Der Membranextrakt wurde mit 1/100 Volumen 1 M MgCl₂ zur Verbesserung der Bindungseigenschaft versetzt und auf die PM-Sepharose-Säule geladen. Die PM-Sepharose war vorher mit dem Equilibrierungspuffer 2 equilibriert.

Der Säulenlauf wurde bei 4°C durchgeführt. Nach einer 15minütigen Inkubation wurde die Säule mit je zweimal 800 µl Equilibrierungspuffer 2, Glc6P-Puffer 1, 10 mM Man6P-Puffer 2 und dem Regenerationspuffer a) eluiert. Die Säule wurde neutral gewaschen, wie oben erwähnt regeneriert und mit PBS und 0,02% Azid gelagert.

Die Immunpräzipitation des MPR nach dem PM-Sepharoselauf erfolgte nach dem Standardprotokoll, jedoch wurde im Immunomix das NaPi durch Tris/HCl ersetzt, damit eine Präzipitation von Mg-Phosphat vermieden wurde.

2. Bindung von radioaktiv markiertem ¹²⁵J-MPR 46 aus humaner Plazenta:

Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. 10 ng ¹²⁵J-MPR 46 wurden in 10 µl Equilibrierungspuffer 3 aufgenommen und mit 1-5 µg Antikörper in 10 µl Equilibrierungspuffer 3 gemischt. Das Gemisch wurde 1 Stunde bei 4°C inkubiert und im Szintillationszähler gezählt. Die Probe wurde auf die mit Equilibrierungspuffer 3 equilibrierte PM-Sepharose aufgetragen und das Reaktionsgefäß einmal mit 50 µl Equilibrierungspuffer 3 gespült und ebenfalls aufgetragen. Der Säulenlauf wurde wie unter Punkt 1 durchgeführt. Es wurden jedoch die Puffer: Equilibrierungspuffer 3, Glc6P-Puffer 2 und Man6P-Puffer 3 verwendet.

Nach dem Säulenlauf wurde eine TCA-Fällung der Eluate durchgeführt. Je 320 µl der Fraktionen 1-3, 4-6, 7-9, 10 + 11 und 320 µl Bindungspuffer wurden vereinigt und mit 155 µl 72% TCA zu einer Endkonzentration von 10% versetzt. Das TCA-Gemisch wurde gemischt und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde 15 min bei 12000 x g und 4°C das Präzipitat sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt, nochmals zentrifugiert und der restliche Überstand abgenommen. Der Ansatz wurde vorher und das Sediment nach der Präzipitation im Gamma-Counter gezählt. Das Präzipitat wurde in 90 µl 1 M Tris-Lösung und 45 µl Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol gelöst, 5 min bei 95°C gekocht, zentrifugiert und 60 µl auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.2.5.2.2 Präparative Reinigung von MPR 46 über die PM-Sepharose

Regeneration und Equilibrierung der PM-Sepharose:

Die Säulen wurden mit je 10 Volumen Säulenregenerierungspuffer a), d), c), d) regeneriert und mit 10 Volumen Equilibrierungspuffer 1 oder 4 equilibriert.

1. Aufreinigung des löslichen MPR 46:

Die Reinigung wurde bei 4°C durchgeführt und die Flußrate betrug 60 ml/h für eine 9 ml PM-Säule. Der Überstand von infizierten H5-Insektenzellen (Protokoll 2.2.2.2) wurde mit 1/100 Volumen 1 M MgCl₂ und 1/50 Volumen 250 mM Na-β-Glycerophosphat versetzt und auf einen pH-Wert von 6,5 mit Imidazol-Base eingestellt. Danach wurde der Kulturüberstand bei 100000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die PM-Sepharose gegeben. Anschließend wurden mit 100 Volumen Waschpuffer und 10 Volumen Equilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 4 x 0,5 Volumen Man6P-Puffer 1. Die Regeneration der PM-Sepharose erfolgte wie oben beschrieben und am Schluß wurde die Säule mit 10 Volumen PBS mit 0,02% Azid nachgespült und abgestellt. Die Eluate wurden im Sandwich-ELISA analysiert.

2. Aufreinigung des membranständigen MPR 46:

Für diese Aufreinigung wurde ein Extraktionspuffer und ein Equilibrierungspuffer verwendet, der NaPi anstatt Imidazol enthält, damit die anschließende Quervernetzung des membranständigen Rezeptors nicht durch die Amide gestört wurde.

Ein Membranextrakt (Protokoll 2.1.1.1), der von 5-10 10-cm-Gewebekulturplatten hergestellt wurde, wurde mit 1/100 Volumen 1 M MgCl₂ und 1/50 Volumen Na-β-GP versetzt. Der Membranextrakt wurde dreimal auf eine mit Equilibrierungspuffer 4 equilibrierte 1-ml-PM-Sepharose aufgetragen. Die Säule wurde mit 20 Volumen Equilibrierungspuffer 4 gewaschen und mit 5 x 1 Volumen Man6P-Puffer 4 eluiert. Die Regeneration erfolgte wie oben beschrieben, anschließend wurde die PM-Sepharose in PBS und 0,02% Azid abgestellt. Die Man6P-Eluate wurden im ELISA und Westerblot analysiert.

2.2.5.3 Quervernetzung des MPR 46

Proteine werden über die Aminogruppen miteinander verbunden.

Lösungen: 30 mM Disuccinimylsuberat (DSS) in DMSO

1 M Tris/HCl pH 7,4

Der MPR 46 wurde mit 30 mM DSS zu einer Endkonzentration von 0,6 mM versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Quervernetzung wurde mit 1 M Tris/HCl pH 7,4 zu 50 mM Endkonzentration versetzt und gestoppt.

2.2.5.4 Peptidreinigung

2.2.5.4.1 HPLC-Reinigung

HPLC (High performance liquid chromatography) ist eine hochauflösende Flüssigkeitschromatographie, die zur Reinigung von Peptiden und kleinen Proteinen genutzt wird.

500 µg ungereinigtes Peptid in 0,1% TFA wurden auf einer Reversed Phase HPLC Ultraphere™ aufgetragen, dabei treten die hydrophoben Anteile der Peptide mit einer an das Trägermaterial (Kieselgel (SO₂)_n) gebundenen hydrophoben Matrix in Wechselwirkung. Die Elution erfolgte mit Hilfe eines Gradienten mit steigender organischer Lösungsmittelkonzentration (0,1% TFA zu 90% Acetonitril in 0,1 % TFA), dabei wurde die OD_{215nm} gemessen. Die Gipelfraktionen wurden gesammelt und die Masse der enthaltenen Peptide in den Fraktionen bestimmt. Die Fraktionen mit dem Peptid wurden im Vakuumkonzentrator lyophilisiert.

2.2.5.4.2 Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Das Prinzip der MALDI-Massenspektrometrie von Peptiden besteht darin, die in einer Matrix eingebetteten Peptide in möglichst schonender Weise durch Laser-Beschuß im Vakuum in die Gasphase zu überführen, zu ionisieren und anschließend in Richtung einer Kathode zu beschleunigen. Die Flugzeit der Peptide bis zum Auftreffen auf den Detektor wird gemessen und ist der Molekülmasse direkt proportional. Aufgrund der Absorption der optischen Strahlung des Lasers durch eine Matrix werden ihre Moleküle angeregt und es kommt zur Freisetzung der Matrixmoleküle in die Gasphase, wobei die Peptide gleichfalls in die Gasphase übertreten. Die Ionisierung der Peptide erfolgte durch bisher nicht genau bestimmte physikalische und photochemische Prozesse während der Desorption.

Das gelöste Peptid wurde gemeinsam mit der Matrix (20 mg/ml Indol-2-carbonsäure in Aceton) auf einen V2A-Stahl-Träger kristallisiert, dabei sollte die Matrix eine starke

Absorption im Bereich der benutzten Laserwellenlänge und eine hohe ionisierende Reaktivität besitzen.

2.2.5.4.3 Reinigung von Peptiden über C18 Cartridge

Durch die C18-Reinigung erfolgt eine Trennung von Salz und Peptid. Die C18-Cartridge wurde mit 2 ml Methanol p.a., 5 ml bidest. Wasser und 5 ml 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) vorgespült. Die Flüssigkeiten durchtropften die Säule per Schwerkraft. 10 - 30 mg Peptid aus einem Syntheseansatz wurden in 1 ml 0,1% TFA gelöst und auf die C18-Cartridge geladen. Nach dem Auftrag wurde die Säule mit 30 ml 0,1% TFA gewaschen und dabei 1,5 ml Waschfraktionen gesammelt. Mit 30-70% Acetonitril in 0,1% TFA wurde das Peptid in 5 x 1 ml- Fraktionen eluiert. Von den Eluaten wurde die Extinktion bei 280 nm gegen 0,1% TFA bestimmt und die peptidhaltigen Fraktionen auf 0,5 ml in einem Vakuumkonzentrator eingengt. Das Peptid wurde lyophilisiert, so daß das Acetonitril entfernt wurde. Das Lyophilisat wurde in 1 ml bidest. Wasser aufgenommen und wieder lyophilisiert.

2.2.5.4.4 Reinigung von Peptiden über Sephadex G10

Das Sephadex G10-Material fungiert als Molekularsieb, so daß verschieden große Stoffe voneinander getrennt werden können. Bei der Peptidreinigung werden die im Peptidlyophilisat enthaltenen Salze vom Peptid getrennt.

Säulenpuffer: 1 % DMSO
 5 mM NaOH pH 10,7

5 g Sephadex G10-Pulver wurden mit 10 ml bidestillierten Wasser versetzt und 2 h bei RT quellengelassen. Der Ansatz wurde alle 15 min geschüttelt. 10 ml gequollenes Sephadex G10-Material wurde in eine 10 ml Mobitecsäule gefüllt.

Die Säule wurde mit 10 Volumen Puffer equilibiert. Das Peptid wurde in Säulenpuffer gelöst und aufgetragen. Schließlich wurde mit 20 x 0,5 ml Säulenpuffer eluiert. Die OD_{280nm} wurde von den Eluaten bestimmt und damit festgestellt in welchen Fraktionen das Peptid enthalten ist. Die Peptidfraktionen wurden in der Masse analysiert. Die Säule wurde mit 10 Volumen bidestilliertem Wasser und PBS und 0,02% Azid regeneriert.

2.2.5.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli *et al.*, 1970)

Durch die SDS-PAGE werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel fungiert dabei als Molekularsieb.

Lösungen:	Trenngelpuffer:	1,5	M	Tris/HCl pH8,8
		0,4	%	SDS (w/v)
	Sammelgelpuffer:	0,5	M	Tris/HCl pH 6,8
		0,4	%	SDS (w/v)
	Acrylamidlösung:	30	%	Acrylamid (w/v)
		0,8	%	Bisacrylamid (w/v) in H ₂ O
	APS:	10	%	rekristallisiertes Ammoniumpersulfat in H ₂ O
	Anodenpuffer:	50	mM	Tris/HCl
		192	mM	Glycin in H ₂ O pH 6,8
	Kathodenpuffer:	1	%	SDS (w/v)
		0,001	%	Bromphenolblau in Anodenpuffer
	10-fach Laufpuffer für Minigele	1	%	SDS
		0,25	M	Tris
		14,4	%	Glycin
	2 x Probenpuffer	250	mM	Tris/HCl pH 6,8
		2	%	SDS (w/v)
		20	%	Glycerin

2 x Probenpuffer	250	mM	Tris/HCl pH 6,8
+SH	2	%	SDS (w/v)
	20	%	Glycerin
	20	mM	DTT
3 x Probenpuffer mit	9	%	SDS
β -Mercaptoethanol	187,5	mM	Tris/HCl pH 6,8
	30	%	Glycerin
	10	%	β -Mercaptoethanol

	Trenngel 10% oder 12,5%		Sammelgel 4%	
	große Gele	Minigele	große Gele	Minigele
Acrylamidlösung (ml)	10,5 oder 13,1	1,34 oder 1,67	1,3	0,23
Trenngelpuffer (ml)	7,5	1	-	-
Sammelgelpuffer (ml)	-	-	2,5	0,23
10 % APS (μ l)	250	40	100	20
TEMED (μ l)	25	4	10	2
H ₂ O	ad 30 ml	1,65 oder 1,31 ml	ad 10 ml	1 ml

Die Elektrophorese wurde in einem System mit vertikal ausgerichteten Platten durchgeführt (Größe der Glasplatte für große Gele und Minigele: 160 mm x 18 cm, 1 mm Spacer; 7,2 cm x 10 cm und 8,2 cm x 10 cm, Spacer 0,5 mm). Die Glasplatten wurden von unten mit 1%iger Agarose verschlossen. Das frisch gemischte Trenngel wurde zwischen die Glasplatten gegossen und sofort mit H₂O überschichtet. Nach 30 min Polymerisation bei RT wurde das Wasser abgegossen. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingefügt. Nach 20 Minuten Polymerisation wurde der Probenkamm entfernt, die Probenaschen mit H₂O gespült, um Gelreste aus den Taschen zu entfernen. Die Proben wurden 1:1 mit 2 x Probenpuffer oder 1:3 mit 3 x Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol

gemischt. Das Volumen der Proben lag für ein großes Gel zwischen 60-150 µl oder für Minigele zwischen 10-20 µl. Die Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend zentrifugiert. Die Proben wurden auf die großen Gele aufgetragen und mit Kathodenpuffer überschichtet. Anschließend wurde die obere Kammer an die Gele montiert und mit Kathodenpuffer gefüllt. Die Apparatur wurde in eine mit Anodenpuffer gefüllte Kammer gestellt und ein Strom von 50 mA bei 4°C für 2-3 Stunden angelegt. Die Minigele wurden in eine mit Laufpuffer gefüllte Minigelkammer gestellt und die Proben (0,001% Bromphenolblau zu gesetzt) mit einer Hämmlenspritze in die Taschen gefüllt. Es wurde ein Strom von 50-100 mA bei RT für 1-1 ½ Stunden angelegt.

2.2.5.6 Silberfärbung nach Ansorge

W. Ansorge (1985)

Silbernitrat wird in die Proteine eingelagert. Durch die Fällung des Silbers werden die Proteine im Polyacrylamidgel sichtbar.

Lösungen:	Fixierer:	50	%	Methanol
		12	%	TCA
		2	%	CuCl ₂ x H ₂ O in H ₂ O
	Lösung A:	5	%	Ethanol
		2,5	%	Essigsäure in H ₂ O
	KMnO ₄ in H ₂ O	0,01	%	
	Ethanol	10	%	
	AgNO ₃ in H ₂ O	0,01	%	
	K ₂ CO ₃ in H ₂ O	5	%	

Entwickler:	1	%	K ₂ CO ₃
	0,02	%	35 % Formaldehyd, stabilisiert (v/v) in H ₂ O

Die Silberfärbung eines Polyacrylamidgels erfolgte bei RT und auf einem Kipp- oder Horizontalschüttler. Die erste Angabe bezieht sich auf große Polyacrylamidgele, die zweite Angabe in Klammern gibt die Zeit für die Färbung bei Minigelen an.

Die Polyacrylamidgele wurden für eine Stunde oder über Nacht fixiert. Die Fixationslösung wurde mit der Lösung A herausgespült und 15 min in dieser belassen. Danach erfolgte eine 15 (10) minütige Inkubation in 0,01% KMnO₄, zweimaliges Spülen für 1 min mit Wasser und eine weitere Inkubation von 15 min mit Lösung A. Anschließend wurden die Gele 15 (10) min in 10% Ethanol, 15 (10) min Wasser und 30 (10) min in 0,01% AgNO₃ inkubiert, dabei lagerte sich das Silbernitrat in den Proteinen an. Das restliche lösliche Silbernitrat wurde mit Wasser herausgespült und das Gel 2 min mit 5% K₂CO₃ vorbehandelt. Anschließend wurden die Gele für 5 min oder länger in den Entwickler überführt, das Silbernitrat fiel aus. Nachdem die Proteinbanden gut sichtbar waren, wurde die weitere Färbung der Proteinbanden mit Lösung A für 10 min gestoppt und zweimal mit Wasser 30 (15) min gewaschen. Danach wurden die Gele zwischen zwei Folien im Gelrockner Typ G1200 oder auf Filterpapier getrocknet.

2.2.5.7 Alkylierung von Proteinen

Bei dieser Methode wurden die Proteine denaturiert und die Cysteinreste mit Jodacetamid gekoppelt, so daß das Protein keine Disulfidbindung mehr bilden kann. Das Protein bleibt linear.

Die Proteinprobe wurde in 2 x Pobenpuffer + SH verdünnt oder mit einer DTT-Stammlösung zu einer Endkonzentration von 10 mM DTT versetzt. Die Denaturierung und Reduktion erfolgte für 5 min bei 95°C. Nach dem Abkühlen auf 37°C wurde der Probe 0,5 M Jodacetamidlösung im 5 molaren Überschuß zum DTT dazugegeben und das Gemisch 15 min bei 37°C inkubiert, dabei wurden die Proteine alkyliert. Anschließend wurde zentrifugiert und die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.2.5.8 TCA-Fällung von Proteinen

Proteine können durch TCA aus einer Lösung denaturiert werden. Die Löslichkeit des denaturierten Proteins wird reduziert und das Protein fällt aus. Ist das Volumen einer Proteinlösung für bestimmte Versuche zu groß, wie z.B. für eine SDS-PAGE, so können die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt werden.

Die Proteinlösung wurde mit einer 40%igen TCA zu einer Endkonzentration von 20% versetzt. Die Suspension wurde 1 h auf Eis oder über Nacht bei 4°C inkubiert, danach in einer Eppendorfszentrifuge bei 12000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Präzipitat mit 1 ml 95% Ethanol gewaschen, nochmals bei 12000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die restliche Flüssigkeit an den Gefäßwänden nochmals herunterzentrifugiert und abgesaugt. Das Proteinpräzipitat wurde bei RT für circa 5 min getrocknet und zum Schluß in Probenpuffer aufgenommen. Die Lösung wurde Ultraschall behandelt, 5 min bei 95°C inkubiert und 5 min zentrifugiert.

2.2.5.9 Enzymtests

2.2.5.9.1 PNGase F

PNGase F (Peptid:N-Glykosidase F) spaltet die Bindung zwischen N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydraten und Asparagin.

Denaturierungspuffer:	5	%	SDS
	10	%	β-Mercaptoethanol
Reaktionspuffer:	0,5	M	NaCitrat pH 7,5 oder
	0,4	M	NaPi pH 7,4
Detergenz:	10	%	N-Octylglukosid
PNGase F:	25000	Units/mg	Enzymprotein

5 µg löslicher MPR 46 wurde mit 5 µl Denaturierungspuffer versetzt und zu 50 µl mit Wasser verdünnt. Das Protein wurde 10 min bei 95°C denaturiert. Der Ansatz wurde abgekühlt auf 37°C und mit 10 µl Reaktionspuffer, 10 µl 10% N-Octylglukosid und 28 µl H₂O versetzt. Das

DOC:	0,15 %	Natriumdesoxycholat
TCA:	72 %	Trichloressigsäure (w/v)
CTC:	0,1 %	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
	0,2 %	Na-K-Tartrat
		in 10 % NaCO ₃ -Lösung
		(Das Kupfersulfat und das Na-K-Tartrat wurde in 40 ml Wasser gelöst und unter Rühren wurden 50 ml 20%ige Natriumcarbonat-Lösung hinzugegeben und schließlich auf 100 ml aufgefüllt)
Reagenz A:	CTC: H ₂ O:0,8 M NaOH: 10% SDS 1:1:1:1 (v:v:v:v)	
Reagenz B:	Folin-Reagenz: H ₂ O 1:5 (v:v)	

Die Proteinbestimmung erfolgte in Doppelwerten. In Reaktionsgefäße wurden Proteinlösung (1-50 µl) und der BSA-Standard (0; 2,5; 5; 10; 15 µl) gegeben und mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt. Diese Proteinlösungen wurden mit 50 µl DOC versetzt, gemischt und bei RT inkubiert. Nach 10 min wurde 50 µl TCA hinzugegeben, gemischt und 5 min auf Eis gestellt. Das Proteinpräzipitat wurde bei 12000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und das Proteinsediment in 300 µl H₂O und 300 µl Reagenz A gelöst. Die Proben wurden gemischt und nach 10 minütiger Inkubation mit 150 µl Reagenz B versetzt. Der Ansatz wurde gut gemischt und 30-120 min bei RT inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 750 nm gegen Wasser. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels einer Eichgrade der Standardwerte.

Richtwert: 1 µg Protein ≈ OD_{750nm}=0,05

Linearitätsbereich: 2,5-20 µg Protein

2.2.5.10.2 Bradford-Test

(Bradford, 1976)

Diese Proteinbestimmung kann für Proteinlösungen ohne Detergenz und mit niedriger Salzkonzentration verwendet werden.

Lösungen: BSA-Standard: 1 mg/ml BSA in H₂O

Bradford-Reagenz von Roth

Die Proteinbestimmung erfolgte in Doppelwerten. 0; 2,5; 5; 10; 15 µl BSA-Standard und die Proteinlösungen wurden mit H₂O auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Der Ansatz wurde sofort gemischt und 15-60 min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte bei 595 nm und die Proteinkonzentration wurde durch eine Eichgerade der Standardwerte ermittelt.

Richtwerte: 1 µg Protein \approx OD_{595nm}=0,07

Linearitätsbereich: 2,5-20 µg Protein

2.2.5.10.3 Bio-Rad DC Protein Test

Der Bio-Rad DC Protein Test beruht auf der kolorimetrischen Konzentrationbestimmung von mit Detergenz oder hohem Salzgehalt gelösten Proteinen. Proteine reagieren mit dem Kupfer in der alkalischen Lösung und das Folinreagenz reduziert die Kupfer-behandelten Proteine, dabei entsteht eine blaue Farbe, deren Absorption zwischen 750-405 nm liegt.

Bio-Rad DC-Kit: Nr. 500-0116

Reagenz A alkalische Kupfertartrat-Lösung

Reagenz B verdünntes Folin-Reagenz

Reagenz S SDS-haltige Lösung

Die Bestimmung wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt und anschließend bei 630 nm im ELISA-Reader-Meßgerät gemessen.

Die Proteinkonzentrationen wurden in Doppelbestimmungen ermittelt. 0, 2,5; 5; 10; 15 µl einer Standardlösung (1 µg/µl in H₂O) wurden mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Aliquots der zu messenden Probe und ein Nullwert wurden mit dem Puffer, in dem das Protein gelöst war, auf 20 µl aufgefüllt. 1 ml Reagenz A wurde mit 20 µl Reagenz S versetzt, gemischt und 25 µl dieser Lösung zu jeder Probe gegeben. Anschließend wurde in jeden Napf der Mikrotiterplatte 200 µl Reagenz B gefüllt und 15 min inkubiert. Danach erfolgte die Messung. Die

Proteinkonzentration wurde mittels einer Eichgeraden bestimmt, wobei der Wasser-Nullwert von den Standardwerten und der Puffer-Nullwert von den Proben abgezogen wurde.

Richtwert: 1,0 $\mu\text{g Protein} \approx \text{OD}_{630\text{nm}}=0,1$

Linearitätsbereich: 0,5-10 $\mu\text{g/ml Proteinlösung}$

2.2.5.11 Konzentrierung von Proteinlösungen

Konzentrierung mit Hilfe der Ultrahülse:

Die Ultrahülsen wurden in Ethanol gelagert und vor Gebrauch mit bidestilliertem Wasser für 15 min equilibriert. Die Ultrahülsen hatte ein Ausschlußvolumen von 10 000 kDa. Sie wurde mit 0,1 M Glycin pH 7,4 gefüllt und das Vakuum angeschlossen. Durch diesen Vorgang wurde die Ultrahülse mit Glycin abgesättigt und der Proteinverlust verringert. Nach 15 min wurde die Glycinlösung entfernt und die Proteinlösung hineingegeben und das Vakuumsystem wieder angeschlossen. Die Filtration durch die semipermeablen Membran erfolgte bei 4°C.

3 Ergebnisse

3.1 Monoklonale Antikörper gegen den MPR 46 und Kontrollantikörper

Für meine Arbeit standen mir 38 mAk gegen den MPR 46 aus unserem Labor zur Verfügung (Tab. 2). Alle mAk binden an die luminaire Domäne des MPR 46. Die mAk stammen aus drei verschiedenen Immunisierungen von Mäusen. Es wurde einmal mit dem nativen MPR 46 aus humaner Plazenta und zweimal mit modifiziertem MPR 46 immunisiert. Die Modifizierung des Rezeptors wurde durch die Quervernetzung mit Disuccinimidylsuberat durchgeführt. Aus der Immunisierung mit dem nativen, nicht-modifizierten Rezeptor und der anschließenden Fusion stammen die Antikörper 10C6 und 21D3. Aus den beiden Immunisierungen mit dem modifizierten Rezeptor stammen die restlichen Antikörper.

Die Antikörper wurden mittels ELISA mit isotypspezifischen Antikörpern charakterisiert. Die mAk gehören den Subklassen IgG1, IgG2a/b und IgG3 an. Der Isotyp muß für routinemäßige Methoden bekannt sein, damit z.B. die richtigen Sekundärantikörper eingesetzt werden können, die das IgG effizient erkennen.

Für weitere Versuche wurden verschiedene Kontrollantikörper eingesetzt. Ein Kontrollantikörper war der polyklonale Antikörper anti-MSCI. Anti-MSCI erkennt die hochkonservierte cytoplasmatische Domäne des MPR 46, z.B. des Menschen oder der Maus. In den folgenden Kapiteln wurde anti-MSCI als polyklonaler Antikörper bezeichnet. Ein weiterer Kontrollantikörper ist ein polyklonaler Antikörper, der gegen die luminaire Domäne des MPR 46 gerichtet ist. Dieser Antikörper wurde als anti-luminal-spezifischer Antikörper bezeichnet. Ein irrelevanter Antikörper, der anti-ASA, wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Dieser irrelevante Antikörper erkennt die Arylsulfatase A, aber nicht den MPR 46.

Tabelle 2: Verfügbare monoklonale Antikörper gegen den MPR 46

Die mAk entstammen aus 3 Fusionen, die von J. Wenk, N. Krüger, K. Schreiber und A. Hille-Rehfeld durchgeführt wurden. Die Immunisierung der Mäuse erfolgte mit dem nativen oder modifizierten (quervernetzten) Rezeptor (MPR 46 bzw. MPR 46 QV). Der Isotyp wurde mittels ELISA mit Antikörpern festgestellt.

mAk	Antigen	Isotyp	mAk	Antigen	Isotyp
2B2	MPR 46 QV	IgG2aκ	15C5	MPR 46 QV	IgG1κ
2B6	MPR 46 QV	IgG2bκ	18B4	MPR 46 QV	IgG2bκ
2C5	MPR 46 QV	IgG1κ	18C4	MPR 46 QV	IgG1κ
3A5	MPR 46 QV	IgG2aκ	19A4	MPR 46 QV	IgG1κ
3C5	MPR 46 QV	IgG1κ	20B4	MPR 46 QV	IgG1κ
5B2	MPR 46 QV	IgG1κ	21D3	MPR 46	IgG3κ
6B2	MPR 46 QV	IgG2bκ	24B1	MPR 46 QV	IgG1κ
9A2	MPR 46 QV	IgG1λ	25A2	MPR 46 QV	IgG1λ
9B1	MPR 46 QV	IgG2bκ	25A4	MPR 46 QV	IgG1κ
9D2	MPR 46 QV	IgG1κ	25B1	MPR 46 QV	IgG1λ
10B1	MPR 46 QV	IgG1κ	25C1	MPR 46 QV	IgG1κ
10C3	MPR 46 QV	IgG1κ	25C4	MPR 46 QV	IgG1κ
10C6	MPR 46	IgG1κ	25D2	MPR 46 QV	IgG1λ
11B2	MPR 46 QV	IgG1κ	25D5	MPR 46 QV	IgG2aκ
11B6	MPR 46 QV	IgG1κ	26A3	MPR 46 QV	IgG1κ
14D4	MPR 46 QV	IgG1κ	26A5	MPR 46 QV	IgG1κ
15A1	MPR 46 QV	IgG1κ	26D6	MPR 46 QV	IgG2aκ
15B6	MPR 46 QV	IgG2bκ	27A5	MPR 46 QV	IgG1κ
15C4	MPR 46 QV	IgG1κ	30A3	MPR 46 QV	IgG1κ

3.2 Inhibition der Ligandbindung des MPR 46 durch mAk

Die Ligandbindung des MPR 46 soll durch eine Affinitätschromatographie durchgeführt werden. Der MPR 46 bindet dabei an eine Phosphomannan(PM)-Sephrose. Das Phosphomannan ist ein synthetischer Ligand, der an einen Träger (Sephrose) immobilisiert wurde. Zur Vereinfachung der Quantifizierung der Bindung wurde ein jodierter Rezeptor für die Ligandbindung verwendet. Ziel ist es, die Wirkung der mAk auf die Ligandbindung zu testen.

Für diese Untersuchung muß sichergestellt sein, daß der MPR 46 mit den mAk maximal beladen wird. Deshalb wurden Vorversuche durchgeführt, in denen eine konstante Menge MPR 46 mit einer steigenden Menge mAk titriert wurde (Abb. 5). Die Immunsorption mit den mAk oder dem polyklonalen Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist, zeigte einen Sättigungsverlauf. Der irrelevante Antikörper konnte in keiner getesteten Konzentration den MPR 46 immunpräzipitieren. Für alle mAk lag der Sättigungsbereich bei einem 100-200fachen Überschuß an mAk zum MPR 46. Einzig der 15C4 erreichte die Sättigung erst mit einem 400fachen Überschuß.

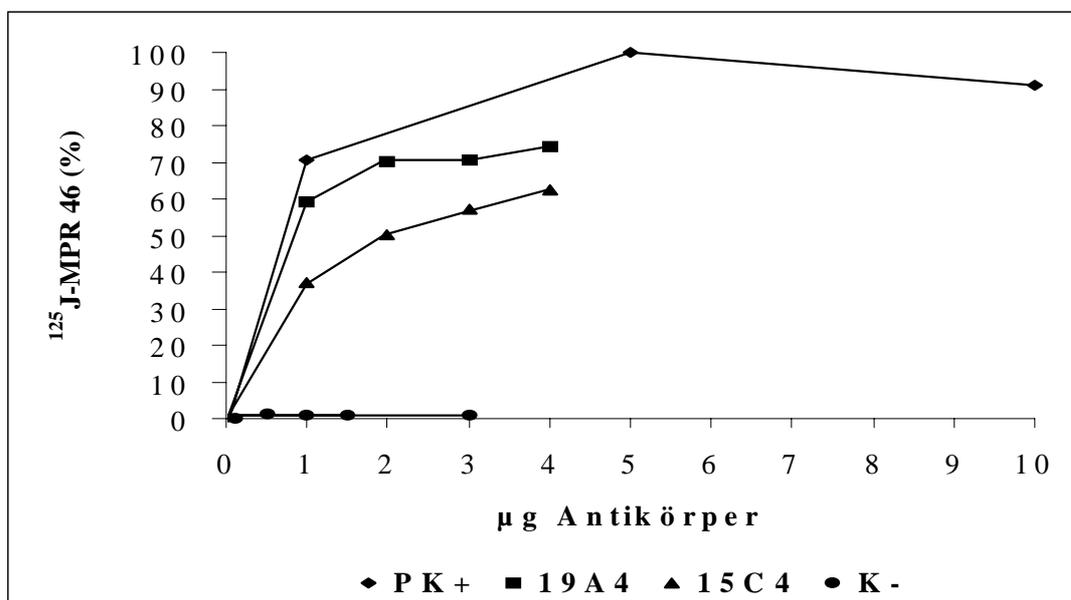


Abb. 5: Titration der Immunsorption von MPR 46 durch mAk

10 ng ^{125}J -MPR 46 wurden mit 100-1000fachem Überschuß an mAk für 1 h auf Eis, anschließend für 1 h bei 4°C mit Kaninchen-anti-Maus IgG und Pansorbin inkubiert, zentrifugiert und das Präzipitat gewaschen. Die Quantifizierung des ^{125}J -MPR 46 erfolgte vor und nach der Immunpräzipitation im Szintillationszähler. Die

maximale Fällung des ^{125}J -MPR 46 vom polyklonalen Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist, wurde als 100% gesetzt.

Tabelle 3: Effizienz der Fällung des ^{125}J -MPR 46 durch mAk

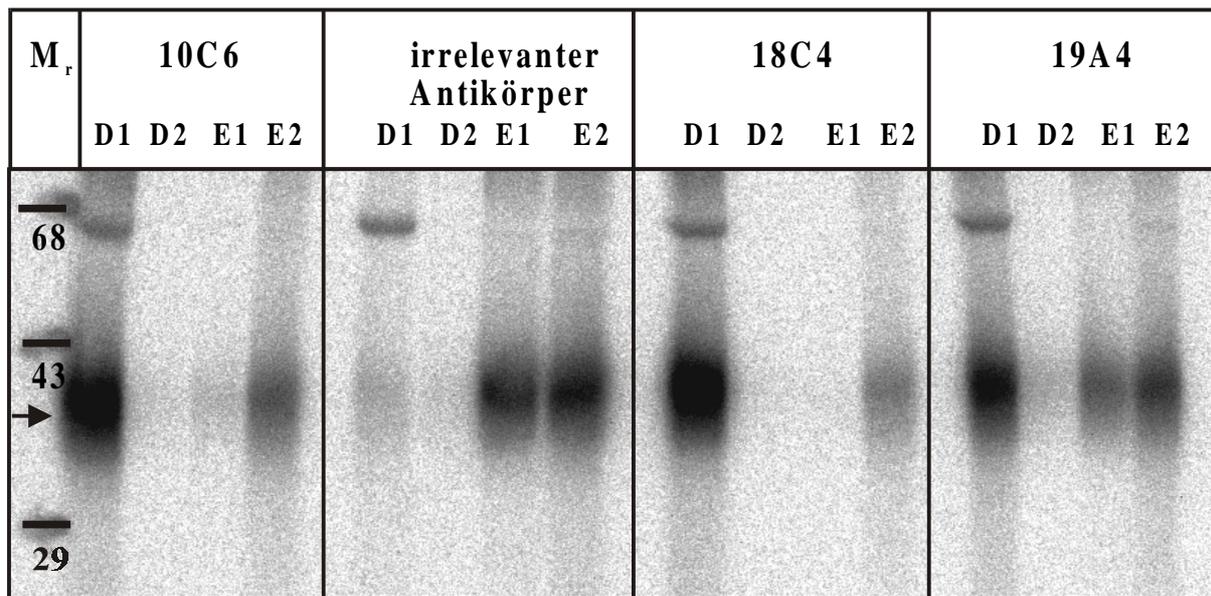
10 ng ^{125}J -MPR 46 wurden mit 100-400fachem mAk-Überschuß durch indirekte Immunsorption an Pansorbin immunpräzipitiert. Das Pansorbinsediment wurde gewaschen und in reduzierendem Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol aufgenommen und in einem 10%igen SDS-PAGE analysiert. Das Gel wurde im Phosphoimager ausgewertet. Die ^{125}J -MPR-46-Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die Normierung erfolgte durch einen polyklonalen Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne oder die luminale Domäne des MPR 46 gerichtet war, die sich in der Immunpräzipitation kaum unterschieden, als 100%.

mAk	Fällung des ^{125}J -MPR 46 (%)	mAk	Fällung des ^{125}J -MPR 46 (%)	mAk	Fällung des ^{125}J -MPR 46 (%)
2B2	86,4	11B2	37,3	25A2	35,6
2B6	0,25	11B6	31,6	25A4	69,5
2C5	53,2	14D4	34,7	25B1	59,0
3A5	95,0	15A1	60,0	25C1	36,1
3C5	32,8	15B6	64,9	25C4	71,6
5B2	20,3	15C4	62,6	25D2	37,5
6B2	72,4	15C5	38,2	25D5	2,7
9A2	35,0	18B4	59,2	26A3	43,7
9B1	59,7	18C4	35,4	26A5	28,0
9D2	39,1	19A4	71,7	26D6	75,3
10B1	48,8	20B4	45,8	27A5	34,0
10C3	23,7	21D3	82,6	30A3	40,3
10C6	86,6	24B1	66,3		

In Tabelle 3 wurde die Effizienz der Fällung des jodierten Rezeptors durch einen Überschuß an Antikörper für alle mAk aufgeführt. Die Immunpräzipitation des polyklonalen Antikörpers wurde als 100% gesamte MPR 46-Fällung gesetzt. Die Antikörper können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Vier der Antikörper 2B2, 3A5, 10C6 und 21D3 präzipitierten den MPR 46 annähernd so gut wie der polyklonale Antikörper. Sie präzipitierten zwischen 82-95%. Die Fällung der meisten mAk lag zwischen 20 und 80%. Zwei Antikörper, 2B6 und

25D5, fällten den Rezeptor unter 5%. Eine Immunsorption des 25D5 nur mit der luminalen Domäne des MPR 46, dem löslichen Rezeptor, zeigte aber eine zweifach stärkere Fällung im Vergleich mit dem 10C6. Der 10C6 fällte den gesamten Rezeptor genauso gut wie den löslichen Rezeptor. Der 2B6 wurde bezüglich seiner inhibitorischen Wirkung auf die Ligandbindung nicht getestet, da er den Rezeptor nur gering fällte. Alle anderen konnten für die weiteren Versuche eingesetzt werden.

Der Test zur Hemmung der Ligandbindung wurde wie oben erwähnt mit einem Überschuß an mAk durchgeführt. Der Rezeptor wurde mit dem mAk inkubiert und anschließend auf eine PM-Sepharose aufgetragen. Danach wurde die Säule mit Equilibrierungspuffer pH 7,0 (D1) und 1 mM Glc6P (D2) gewaschen. Das Glc6P ist ein Stereoisomer des Liganden, dadurch sollte unspezifisch gebundener MPR 46 von der PM-Sepharose abgewaschen werden. Anschließend wurde der MPR 46 durch 1 mM Man6P (E1), einem freien Liganden, von der PM-Sepharose eluiert. Hochaffin gebundener MPR 46 wurde durch Natriumacetat pH 4 (E2) durch Konformationsänderung des MPR 46 eluiert. In der Abbildung 6a wurden einige dieser Versuche zur Inhibition der Ligandbindung dargestellt. Der irrelevante Antikörper hatte dabei keine Wirkung auf die Ligandbindungsstelle. Der MPR 46 hat in diesem Versuchsansatz zu 97% an die PM-Sepharose gebunden. Im Vergleich zum irrelevanten Antikörper hatte der 10C6 und der 18C4 eine starke inhibitorische Wirkung auf die Ligandbindung. Es wurden in diesem Versuch (Abb. 6b) nur noch 21,7% beim 10C6 und 13,8% beim 18C4 an die Säule gebunden. Dies bedeutet, der größte Teil des Rezeptors war nicht mehr in der Lage, an die PM-Sepharose zu binden. Der mAk 19A4 zeigt ein Beispiel für eine partielle Inhibition, denn hier konnte 52,4% im Durchfluß und 47,6% MPR 46 in den gebundenen Fraktionen gefunden werden.



6a)

mAk	MPR 46 in den PM-Sepharose-Eluaten (% Gesamt)					
	D1	D2	D1+D2	E1	E2	E1+E2
10C6	76,8	1,5	78,3	2,0	19,7	21,7
irrelevanter mAk	2,3	0,7	3,0	44,3	52,7	97,0
18C4	86,2	0	86,2	1,3	12,5	13,8
19A4	46,7	5,7	52,4	17,4	30,1	47,5

6b)

Abb. 6a und 6b: Inhibition der Ligandbindung des MPR 46 durch mAk

6a) 10 ng ^{125}J -MPR 46 aus humaner Plazenta wurden mit einem 200fachen Überschuß an mAk 1 h auf Eis inkubiert und anschließend auf eine PM-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Equilibrierungspuffer pH 7 (D1) und 1 mM Glc6P-Puffer (D2) gewaschen und der MPR 46 mit 1 mM Man6P-Puffer (E1) und Natriumacetatpuffer pH 4 (E2) eluiert. Die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden durch TCA gefällt und in einer SDS-PAGE analysiert. Die Auswertung erfolgte am Phosphoimager. Die relative Masse (M_r) von Standardproteinen ist links angezeigt in kDa. Der Pfeil zeigt auf die MPR-46-Bande.

6b) Aus dem SDS-Gel von Abb. 6a wurden die ^{125}J -MPR-46-Banden ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die Impulse pro Minute (cpm) der ^{125}J -MPR-46-Banden aus den beiden Wasch- (D1/D2) und den beiden Elutionsfraktionen (E1/E2) wurden als 100% Gesamt- ^{125}J -MPR-46 definiert.

Es wurde in mehreren Versuchen die Wirkung der mAk auf die Ligandbindung getestet. In Vorversuchen konnte für einige Antikörper eine Präferenz für bestimmte Formen des MPR 46

gezeigt werden. So erkannten der 15C5 und der 30A3 den tetrameren und der 25D5 den löslichen Rezeptor besser als den monomeren MPR 46. Für diese wurden die Versuche mit der bevorzugten Form des MPR 46 durchgeführt, damit die mAk die beste Möglichkeit hatten, an den Rezeptor zu binden.

Die Versuche mit den irrelevanten Antikörpern zeigten ähnliche Resultate, wie eine PM-Sepharose-Bindung des MPR 46 ohne Inkubation mit einem Antikörper (Tab. 4, Negativkontrollen). Die irrelevanten Antikörper hatten demnach keinen Einfluß auf die PM-Sepharose-Bindung. Die Negativkontrollen, der irrelevante Antikörper oder polyklonale Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne gerichtet ist, hatten 3-49% MPR 46 im Durchfluß, also 51-97% MPR 46 an die PM-Sepharose gebunden. Danach wurden die mAk je nach Stärke der Inhibition der Ligandbindung in drei Gruppen eingeteilt. Die Beurteilung der einzelnen Antikörper richtete sich nach dem Mittelwert des MPR 46 im Durchfluß.

- keine signifikante Inhibition (weniger als 50% MPR 46 im Durchfluß) z.B. 15A1
- partielle Inhibition (50-80% MPR 46 im Durchfluß) z.B. 19A4
- starke Inhibition (mehr als 80% MPR 46 im Durchfluß) z.B. 18C4

Die nicht signifikant inhibierenden mAk haben vermutlich nicht in der Nähe der Ligandbindungsstelle gebunden. Der 24B1 und 25B1 sind Grenzfälle, da Einzelversuchswerte von über 50% MPR 46 (24B1-52%, 25B1-55%) im Durchfluß erhalten wurden. Die Mittelwerte des MPR 46 im Durchfluß liegen jedoch im Bereich der nicht-signifikanten Inhibition. Für diese beiden Antikörper wurden 6 bzw. 7 Versuche durchgeführt, so daß die Einzelversuche vernachlässigt werden können. Die stark inhibierenden mAk binden vermutlich in direkter Nähe zur Ligandbindungsstelle und die partiell inhibierenden mAk etwas weiter von dieser entfernt, aber noch in sterischer Nähe. Von 37 mAk gehören 8 Antikörper in die nicht-signifikant inhibierende, 15 in die partiell inhibierende und 14 in die stark inhibierende Gruppe.

Ein Antikörper kann durch seine Größe sterisch die Ligandbindung mehr oder weniger verhindern, je nachdem welche Ausrichtung der gebundene Antikörper einnimmt. Deshalb sollten F_{ab} -Fragmente von den Antikörpern hergestellt und ihre Wirkung auf die Ligandbindung getestet werden. Die Spaltung der mAk mit Papain war für die meisten mAk sehr schwierig, sie gelangt nur bei denen der Subklasse IgG2b. Es wurde hier der 15B6 exemplarisch untersucht. Die F_{ab} -Fragmente des 15B6 inhibierten die PM-Sepharose-Bindung ähnlich dem des divalenten IgGs (Tab. 4). Die Ligandbindungsstelle muß demnach näher an

der Bindungsstelle des mAk liegen, wenn die F_{ab} -Fragmente durch ihre geringere Größe genauso gut wie das IgG inhibieren konnten.

Tabelle 4: Inhibition der Ligandbindung des MPR 46 durch mAk

Die Versuchsdurchführung erfolgte, wie unter Abbildung 6 beschrieben. D1 und D2 wurden als Durchfluß zusammengefaßt. Für alle Antikörper wurde der Schwankungsbereich (höchster und niedrigster Wert) der insgesamt durchgeführten Versuche angegeben. Für mAk, bei denen mehr als zwei Versuche durchgeführt wurden, wurde eine Standardabweichung (SW) hinzugefügt. Es wurden verschiedene Formen des MPR 46 in die Inhibitionsversuche eingesetzt, diese wurden mit m für den gesamten Rezeptor, s für die luminale Domäne des Rezeptors und m4 für das Tetramer dargestellt. Für den 15B6 wurde der Inhibitionsversuch auch mit F_{ab} -Fragmenten, die durch die IgG-Spaltung mit Papain gewonnen wurden, getestet.

Anti- körper	MPR 46	¹²⁵ J-MPR 46 in den Eluaten der PM-Sepharose						Ver- suchs- an- zahl
		Durchfluß		Mannose-6- Phosphat		pH 4		
		(% gesamt)						
		Mittel- wert + SW	Bereich	Mittel- wert + SW	Bereich	Mittel- wert + SW	Bereich	
starke Inhibition (>80% im Durchfluß)								
2C5	m	95,2	93,4-97,0	1,0	0,5-1,5	3,0	1,9-4,1	2
9B1	m	85,0	79,1-90,9	9,8	6,5-13,1	5,7	3,2-8,2	2
9D2	m	82,5	81,1-83,9	1,8	1,0-2,6	15,8	15,0-16,6	2
10B1	m	86,7	81,6-91,8	0,9	0,6-1,2	12,4	7,0-15,8	2
10C6	m	87,1 ±6,5	80,6-96,1	4,8 ±5,9	0,2-27,2	8,3 ±4,9	0,1-19,7	17
	s	82,6	81,8-83,4	14,9	14,7-15,1	2,6	2,1-3,1	2
	m4	96,0		2,0		1,0		1
11B6	m	86,4	85,4-87,4	2,4	1,8-3,0	11,2	10,8-11,6	2
15C4	m	89,4	88,0-90,8	2,5	2,4-2,6	8,1	6,4-9,6	2
18C4	m	90,4	86,3-94,5	1,3	1,3	8,1	3,7-12,5	2

Anti- körper	MPR 46	¹²⁵ J-MPR 46 in den Eluaten der PM-Sepharose						Ver- suchs- an- zahl
		Durchfluß		Mannose-6- Phosphat		pH 4		
		(% gesamt)						
		Mittel- wert + SW	Bereich	Mittel- wert + SW	Bereich	Mittel- wert + SW	Bereich	
25A2	m	89,2	84,8-93,6	6,7	3,4-10,0	4,2	3,1-5,3	2
25A4	m	86,1	85,8-86,4	1,8	1,2-2,4	12,7	11,1-14,3	2
25C1	m	90,2	82,0-98,4	2,4	2,4	11,4	7,0-15,8	2
26A3	m	89,0	85,2-92,8	4,7	3,3-6,1	6,3	3,8-8,8	2
26A5	m	92,7	91,5-93,9	1,0	0,5-1,5	6,3	5,6-7,0	2
26D6	m	86,5	85,6-87,4	4,5	4,4-4,6	9,0	5,2-12,8	2
	s	90,3	89,4-91,2	4,5	3,9-5,1	5,2	4,8-5,6	2
partielle Inhibition (50-80% im Durchfluß)								
2B2	m	77,0	64,2-89,9	8,0	1,4-14,6	15,0	8,7-21,3	2
3A5	m	67,0 ±9,1	48,8-77,1	27 ±9,4	18,5-44,5	6,0 ±1,6	2,0-6,7	7
3C5	m	56,3	56,2-56,4	40,4	40,2-40,6	3,4	3,2-3,6	2
6B2	m	78,0	88,0-98,0	10,5	5,8-15,2	11,2	5,9-16,5	2
9A2	m	66,4 ±11,3	65,1-67,7	11,9 ±9,0	2,9-20,9	21,6 ±6,0	15,6-27,6	3
10C3	m	61,3	57,0-65,6	13,9	8,5-19,3	24,8	23,7-25,9	2
11B2	m	54,2 ±15,5	34,7-72,5	9,2 ±3,6	6,0-14,3	36,5 ±12,1	21,4-51,0	3
14D4	m	76,0 ±7,7	66,1-85,0	5,6 ±13,2	1,8-9,7	18,4 ±7,1	13,3-28,5	3
15B6-IgG	m	75,0 ±8,6	66,0-88,5	14,0 ±5,8	5,4-21,3	11,0 ±2,9	3,7-13,8	4
-F_{ab}	m	79,4	76,0-82,8	16,5	14,5-18,5	4,4	3,7-5,1	2

Anti-körper	MPR 46	¹²⁵ J-MPR 46 in den Eluaten der PM-Sepharose						Versuchsanzahl
		Durchfluß		Mannose-6-Phosphat		pH 4		
		(% gesamt)						
		Mittelwert + SW	Bereich	Mittelwert + SW	Bereich	Mittelwert + SW	Bereich	
18B4	m	72,6	66,6-78,6	16,8	13,3-20,3	10,7	8,2-13,2	2
19A4	m	55,1	52,4-57,8	19,3	17,4-21,2	25,5	20,9-30,1	2
20B4	m	75,1	64,5-85,7	15,5	10,7-20,3	10,7	8,2-13,2	2
21D3	m	63,2	62,8-63,6	27,1	25,7-28,5	9,0	8,1-9,9	2
25C4	m	55,9	54,6-57,2	18,3	17,7-18,9	26,0	18,7-33,7	2
27A5	m	64,6	56,6-72,6	25,4	21,6-29,2	10,0	5,8-14,2	2
	m4	51,0		36,0		13,0		1
keine signifikante Inhibition (<50% im Durchfluß)								
5B2	m	45,7	45,2-46,2	50,2	50,1-50,3	4,7	3,7-5,7	2
	m4	25,4		67,6		7,0		1
15A1	m	37,0 ±4,1	32,1-42,5	53,0 ±11,0	39,7-64,8	10,0 ±7,0	2,6-17,8	4
15C5	m4	21,6		72,4		6,1		1
24B1	m	40,0 ±11,8	17,5-55,0	51,0 ±12,4	40,4-75,9	9,0 ±5,5	4,3-18,2	7
25B1	m	39,0 ±10,6	18,5-51,8	54,0 ±14,5	36,5-78,0	8,0 ±7,6	1,6-19,2	6
25D2	m	36,5	28,4-44,6	40,8	34,1-47,5	22,7	21,5-23,9	2
25D5	s	27,5		63,8	63,3-64,3	8,7	7,9-9,5	2
30A3	m4	34,3		61,4		4,3		1

Anti- körper	MPR 46	¹²⁵ J-MPR 46 in den Eluaten der PM-Sepharose						Ver- suchs- an- zahl
		Durchfluß		Mannose-6- Phosphat		pH 4		
		(% gesamt)						
		Mittel- wert + SW	Bereich	Mittel- wert + SW	Bereich	Mittel- wert + SW	Bereich	
Negativkontrollen								
αMSCI	m	17,0 ±6,7	8,3-29,2	62,0 ±13,6	40,1-74,2	21,0 ±8,5	13,8-30,7	5
αASA	m	28,7 ±13,4	3,0-48,7	52,7 ±14,7	24,7-76,0	18,6 ±20,2	4,0-60,6	12
	s	20,4	20,3-20,5	75,8	75,6-76,0	3,8	3,7-3,9	2
	m4	18,0		70,0		12,0		1
ohne Anti- körper	m	30,7		37,9		31,4		1

Der Vermutung, daß eine partielle Immunpräzipitation des MPR 46 durch die mAk auch zu einer partiellen oder nicht-signifikanten Inhibition führte, steht entgegen, daß einige mAk z.B. 2C5, 9D2 trotz einer partiellen Fällung stark inhibierten. Es wurde deshalb dieses Problem untersucht. Die partielle Inhibition könnte also bedeuten, daß die mAk, dessen Epitop in der Nähe der Ligandbindungsstelle liegt, geringe Affinität besitzen oder daß das Epitop so weit von der Ligandbindungsstelle entfernt liegt, daß die Hemmung nur unvollständig ist. Bei niedrigaffinen mAk könnte im ungünstigsten Fall trotz Antikörperüberschuß ein Teil des MPR 46 nicht von mAk besetzt werden. Bei der Bindung an die PM-Sepharose würde diese antikörperfreie Population der Rezeptormoleküle ungehindert an den immobilisierten Liganden binden, so daß gegebenenfalls eine hemmende Wirkung des mAk unterschätzt würde. Daher wurde für ausgewählte, unvollständig hemmende mAk untersucht, ob diese mAk in der gebundenen (spezifisch eluierten) Fraktion nachweisbar sind. Diese Fragestellung

wurde mit zwei Methoden untersucht, einmal der Nachweis der Antikörper durch indirekte Immunsorption an Pansorbin und der Nachweis des MPR-Antikörper-Komplexes durch Quervernetzung in den Fraktionen.

Für die Methode der Immunpräzipitation wurde der Rezeptor mit dem Antikörper inkubiert, eine PM-Sepharose-Bindung durchgeführt und eluiert. Von den Fraktionen des Durchflusses und der Man6P-Eluate wurde ein Teil für die TCA-Fällung eingesetzt, um die gesamte Menge MPR 46 in den betreffenden Fraktionen zu erhalten. Mit dem anderen Teil der Fraktionen wurde eine Immunsorption durchgeführt, um den antikörperbeladenen MPR 46 in den betreffenden Fraktionen zu immunpräzipitieren. Der Vergleich zwischen gesamten MPR 46 (TCA-fällbar) und antikörperbeladenen MPR 46 (Immunsorption) zeigte, daß prozentual gleiche Mengen MPR 46 im Durchfluß und Eluat gefunden wurden (Tab. 5). In der spezifisch eluierten Fraktion wurde also nicht freier Rezeptor, sondern an den Antikörper gebundener Rezeptor gefunden.

Tabelle 5: Bindung der partiell inhibierenden mAk an den Rezeptor

10 ng ¹²⁵J-MPR 46 aus humaner Plazenta wurden mit einem 100fachen Überschuß an mAk oder 1000fachen Überschuß an polyklonalen Antikörper (PK+), der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist, 1 h auf Eis inkubiert und anschließend auf eine PM-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Equilibrierungspuffer pH 7 (D) und 1 mM Glc6P-Puffer gewaschen und der MPR 46 mit 1 mM Man6P-Puffer (E) und Natriumacetatpuffer pH 4 eluiert. Ein Teil der Fraktionen D und E wurden TCA-gefällt, damit wurde der gesamte MPR 46 in diesen Fraktionen erhalten. Die Proben wurden durch eine SDS-PAGE analysiert. Die Auswertung erfolgte durch einen Röntgenfilm. Die MPR-46-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Der andere Teil der Fraktionen wurde durch indirekte Immunsorption an Pansorbin immunpräzipitiert. Das Pansorbinpräzipitat wurde im Szintillationszähler gezählt. Der MPR 46 aus den ungebundenen und gebundenen Fraktionen wurde als 100% gesetzt. Die Berechnung erfolgte einmal für den gesamt-fällbaren MPR 46 (TCA) und einmal für den antikörperbeladenen MPR 46 (IP).

Antikörper	PK+		3A5		10C6		15A1		25B1	
	TCA	IP	TCA	IP	TCA	IP	TCA	IP	TCA	IP
	% MPR 46									
Durchfluß	10,7	12,7	48,0	42,2	93,2	93,7	31,0	23,9	30,0	23,4
Man6P-Eluat	89,9	87,3	52,0	57,8	6,8	6,2	69,0	76,1	70,0	76,6

In der zweiten Methode wurde eine Quervernetzung mit DSS durchgeführt, wobei sich die NH₂-Gruppen der Proteine verbunden haben. Der Rezeptor wurde mit dem irrelevanten Antikörper inkubiert und anschließend quervernetzt, danach konnten nur die oligomeren Formen des MPR 46 (Dimer, Tetramer) gefunden werden (Abb. 7, Spur K-). Gleiche Ergebnisse wurden bei einer Quervernetzung ohne einen Antikörperzusatz erhalten (Waheed *et al.* 1990). Eine Inkubation mit einem spezifischen Antikörper, 3A5, und anschließender Quervernetzung zeigen in Spur 1 wieder die oligomeren Formen des Rezeptors, aber auch hochmolekulare Aggregate (K). Diese sind ein Hinweis auf die MPR-Antikörper-Komplexe. Mit einem spezifischen Antikörper konnten also die Komplexe gezeigt werden. In Verbindung mit dem Bindungstest, in dem eine Vorinkubation des Rezeptors mit dem Antikörper, eine PM-Sepharose-Bindung, eine Elution des MPR 46 und anschließend eine Quervernetzung durchgeführt wurde, zeigten sich die erwarteten Ergebnisse. Für den mAk 10C6, der stark die Ligandbindung inhibierte, konnte das hochmolekulare Aggregat fast nur im Durchfluß nachgewiesen werden. Für den 3A5, der partiell inhibierte, konnte das hochmolekulare Aggregat circa in einem Verhältnis von 1:1 im Durchfluß und Man6P-Eluat gefunden werden. Die Restbindung ist damit nicht durch unvollständige Antikörperbeladung des MPR 46 zu erklären. Ein partiell inhibierender Antikörper bindet demnach an den Rezeptor und kann die Ligandbindung teilweise sterisch behindern.

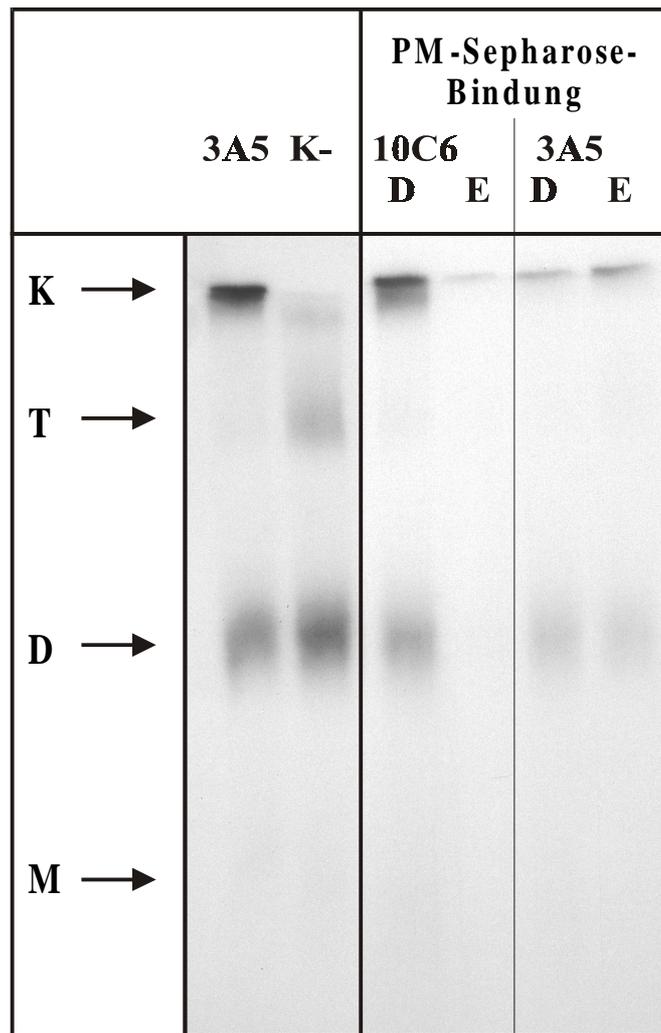


Abb. 7: Quervernetzung des MPR-46-Antikörper-Komplexes in den PM-Sepharose-Fraktionen

10 ng ^{125}J -MPR 46 aus humaner Plazenta wurden mit einem 100fachen Überschuß an Antikörper 1 h auf Eis inkubiert und anschließend auf eine PM-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Equilibrierungspuffer pH 7 (D) und 1 mM Glc6P-Puffer gewaschen und der MPR 46 mit 1 mM Man6P-Puffer (E) und Natriumacetatpuffer pH 4 eluiert. Die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden mit DSS quervernetzt und durch TCA gefällt. Die Proben wurden in einem SDS-PAGE analysiert und das ^{125}J durch einen Röntgenfilm detektiert. Für die Kontrollen (3A5, irrelevanter Antikörper=K-) wurden 10 ng jodierter Rezeptor ebenfalls mit einem 100fachen Überschuß inkubiert. Diese Ansätze wurden direkt quervernetzt und TCA gefällt. Die Pfeile deuten auf das M= Monomer, D= Dimer, T= Tetramer des MPR 46 und das K = hochmolekulare Aggregat.

3.3 Humanspezifität der monoklonalen Antikörper

Speziesspezifisch reagierende mAk können durch chimäre Antigene untersucht werden, die unterschiedliche Anteile der Proteinsequenzen zweier Spezies enthalten (Sommerlade *et al.* 1994). Die Mäuse, von denen die Milzzellen unserer Fusionen entstammen, wurden alle mit einem humanen Antigen immunisiert. Die mAk sind alle gegen die luminaire Domäne des MPR 46 gerichtet. Weiter unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen von Mensch und Maus nur in wenigen Aminosäuren, deshalb sollten die Epitope der mAk mittels Maus/Mensch-Chimären des MPR 46 bestimmt werden. Zuerst mußte abgesichert werden, daß die mAk in einem Test zwischen menschlichem und Maus-MPR-46 unterscheiden können.

Es wurde der humane rekombinante Rezeptor aus BHK-Zellen (BHK-MPR-46), der murine rekombinante MPR 46 aus LTK-Zellen (LTK^{C5}) und der endogene Mausrezeptor aus MEF (MEF-MPR⁺) mittels tritonhaltiger Membranextraktion gewonnen. Die extrahierten Rezeptoren wurden miteinander im Slot-Blot verglichen. Der polyklonale Antikörper erkannte sowohl den humanen sowie den murinen Rezeptor, da er gegen die cytoplasmatische Domäne gerichtet ist. Deshalb erfolgte eine Standardisierung der Menge MPR 46 in den Membranextrakten durch den polyklonalen Antikörper. Gleiche Mengen MPR 46 wurden nun miteinander verglichen (Abb. 8). Der polyklonale Antikörper detektierte, wie schon erwähnt den humanen und murinen Rezeptor und der irrelevante Antikörper konnte keinen der Rezeptoren detektieren. Die ausgewählten mAk in Abbildung 8 detektieren den humanen MPR 46, aber nicht den rekombinanten und den endogenen Mausrezeptor. Die 18 im Slot-Blot getesteten mAk sind humanspezifisch (2B2, 3A5, 5B2, 6B2, 9B1, 10C3, 10C6, 15A1, 15C5, 19A4, 20B4, 21D3, 24B1, 25B1, 26A3, 27A5, 30A3). Diese 18 mAk zeigten alle ein eindeutiges positives Signal für den humanen Rezeptor und kein Signal für den murinen Rezeptor. Weitere mAk wurden im Westernblot getestet (nicht gezeigt). Für diese war eine Detektion des Mausrezeptors nicht nachweisbar.

Die mAk sind alle humanspezifisch. Die mAk können differenzieren zwischen der MPR-46-Aminosäuresequenz des Menschen und der Maus, damit können die speziesspezifisch reagierenden mAk durch Maus/Mensch-Chimären untersucht werden.

	MPR 46		
	Mensch	Maus rekomb.	Maus endogen
PK+			
K-			
26A3			
27A5			
10C3			
19A4			

Abb. 8: Speziespezifität ausgewählter mAk anti-MPR 46

Es wurde der humane Rezeptor aus BHK-MPR-46, der rekombinante Mausrezeptor aus LTK^{C5} und der endogene Mausrezeptor aus MEF-MPR⁺ mit Triton X-100 extrahiert. Standardisierte Mengen MPR 46 (15 µg BHK MPR 46, je 30 µg LTK^{C5} und MEF MPR 46+ Membranextrakt) wurden auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen. Nach dem Auftrag wurden die Proteine mit pFA auf der Membran fixiert. Die Proteine wurden mit den mAk gegen den humanen MPR 46 (20 µg/ml), dem irrelevantem Antikörper (K-=20µg/ml) und mit dem polyklonalen Serum (PK+=anti-MSCI=1:200), der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist, detektiert. Als Sekundärantikörper diente ein Peroxidase-gekoppeltes Ziege-anti-Maus IgG oder Ziege-anti-Kaninchen IgG. Die Chemilumineszenz wurde durch einen Röntgenfilm detektiert.

3.4 Epitopkartierung von monoklonalen Antikörpern mittels Maus/Mensch -Chimären

Alle untersuchten mAk anti-MPR-46 differenzierten zwischen der Maus- und der humanen Aminosäuresequenz, deshalb sollen Chimären des MPR 46 zwischen Maus und Mensch hergestellt werden. Diese Chimären sollten schließlich für die Epitopkartierung der mAk genutzt werden.

3.4.1 Vergleich der DNA- und Aminosäuresequenz des MPR 46 von Maus und Mensch und Darstellung der Chimären

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des reifen MPR 46 von Maus und Mensch zeigt, daß sich die Sequenzen in der luminalen Domäne nur in 16 Aminosäuren, in der Transmembrandomäne in 3 Aminosäuren und in der cytoplasmatischen Domäne gar nicht unterscheiden (Abb. 9). Die Aminosäuren der humanen Sequenz wurden vom N-Terminus ausgehend gegen Maus-Aminosäuren ausgetauscht. Dieser Aminosäureaustausch wurde mittels „QuikChange™ Site Directed Mutagenesis“ durchgeführt.

Durch die Methode „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis“ wird eine Mutagenese mit einer oder mehreren Punktmutationen durchgeführt (Abb. 10). Dazu wird ein supercoiled doppelsträngiges Plasmid (pMPSV MPR 46) eingesetzt. Es kann der gleiche Vektor für die Mutagenese und für die Transfektionen in eukaryonte Zellen benutzt werden. Diese Methode erfordert kein umklonieren in entsprechende Vektoren. Weiter werden zwei komplementäre Primer (Abb. 11), die die Punktmutationen tragen, verwendet. Die eingesetzte *Pfu*-DNA-Polymerase ist in der Lage, das gesamte Plasmid zu replizieren und verwendet zum Starten die Oligonukleotide mit den Mutationen. Durch die 3'-5'Exonuklease-Aktivität ist die Fehlerrate beim Ablesen geringer als bei der herkömmlichen *Taq*-DNA-Polymerase, der die 3'-5'Exonuklease-Aktivität fehlt. Die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet immer nur die parenterale DNA bei jeder Amplifikationsrunde, somit würde ein Fehler in einer Amplifikationsrunde nicht potenziert werden. Die Tochterstränge liegen nach der Amplifikation genickt vor, d.h. das Plasmid ist unterbrochen am Start- und Endpunkt. Die entstandenen Tochterstränge können sich in der Annealingsphase der PCR zusammenlagern. Nach der PCR wird der Ansatz mit *DpnI*, einer Endonuklease, versetzt. *DpnI* baut methylierte oder halbmethylierte DNA, somit nur die parenterale DNA, ab. Das mutierte,

zurückgebliebene Plasmid liegt doppelsträngig und genickt vor. Das Plasmid wird in *E. coli* transformiert, wobei die Bakterien die DNA nicht abbauen, obwohl die DNA nicht völlig geschlossen vorliegt. Das Plasmid liegt jedoch nicht linearisiert vor, sondern in supercoiled Form, wobei jeder Tochterstrang am Start- und Endpunkt einen Bruch hat. Die Bakterien reparieren den Bruch und amplifizieren das Plasmid.

	↓ ∇	
hu	-MFPFYSCWR T GLLLLLLL L A-VAVRESWQ T EEK T CDLVGEK G KE	15
mu	-**** S G **** E ***** L A ***** I **** S ***** D **	
hu	S E K E L A L V K R L K P L F NKS F E S T V G Q S D T Y I Y I F R V C R E A G NHT	59
mu	* K N * V ** L E ** R *** *** ***** S ***** S **S	
hu	S G A G L V Q I NKS N G K E T V V G R L NET H I F NGS N W I M L I Y K G G D E Y	102
mu	***** *** * D ***** I *** *** *** *****	
hu	D N H C G K E Q R R A V V M I S C N R H T L A D N F N P V S E E R G K V Q D C F Y L F E M	147
mu	***** A *****	
hu	D S S L A C S P E I S H L S V G S I L L V T F A S L V A V Y V V G G F L Y Q R L V V G A K G M	195
mu	***** V ***** <u>*****I*****I</u> *****	
hu	E Q F P H L A F W Q D L G N L V A D G C D F V C R S K P R N V P A A Y R G V G D D Q L G	239
mu	*****	
hu	E E S E E R D D H L L P M	252
mu	*****	

Abb. 9: Aminosäuresequenz des MPR 46 aus Mensch und Maus

Die Sequenz des MPR 46 von Mensch (hu) und Maus (mu) ist im Ein-Buchstaben-Code dargestellt (Pohlmann *et al.* 1987, Köster *et al.* 1989). Die identischen Positionen in der Maussequenz im Vergleich zur humanen Sequenz wurden durch einen Stern, unterschiedliche durch den entsprechenden Aminosäurebuchstaben abgebildet. Die Aminosäuren des MPR 46 sind vom N- zum C-Terminus numeriert, dabei ist die erste Aminosäure die des reifen MPR 46. Die Schnittstelle der Signalpeptidase ist durch einen Pfeil und der Aminoterminus der reifen Form des MPR 46 mit einem offenen Dreieck markiert. Der unterstrichene Sequenzbereich stellt die Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne und die Quadrate die potentiellen N-Glykosylierungsstellen dar.

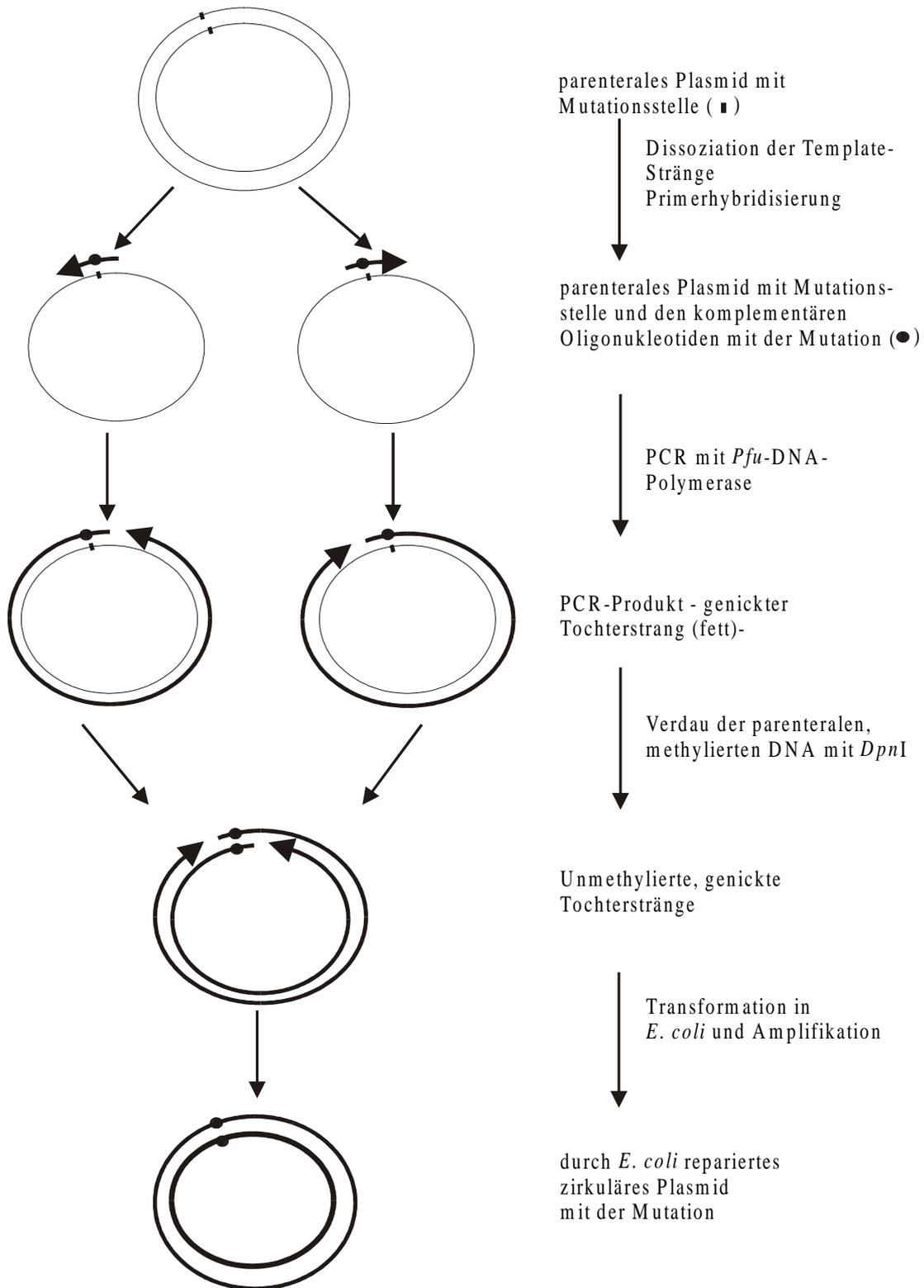


Abb. 10: Prinzip der gezielten Mutagenese mit QuikChange™

MPR 46 human Oligo MM1	⁻⁷ C TGG CAG ACA GAA GAA AAA ACT TGC GAC TTG ²⁴ ⁻⁷ C TGG CAG ATA GAA GAA AAA TCT TGC GAC TTG ²⁴ T1I T5S
MPR 46 MM1 Oligo MM2	³² GAA AAG GGT AAA GAG TCA GAG AAA GAG TTG GC ⁶³ ³² GAA AAG GAT AAA GAG TCA AAG AAC GAG TTG GC ⁶³ G13D E17K K18N
MPR 46 MM2 Oligo MM3	⁴⁹ CA AAG AAC GAG TTG GCT CTA GTG AAG AGG C ⁷⁸ ⁴⁹ CA AAG AAC GAG GTG GCT CTA CTG GAG AGG C ⁷⁸ L20V V23L K24E
MPR 46 MM3 Oligo MM4	⁶² GCT CTA CTG GAG AGG CTG AAA CCA CTG ⁸⁸ ⁶² GCT CTA CTG GAG AGG CTG AGA CCA CTG ⁸⁸ K27R
MPR 46 MM4 Oligo MM5	¹²³ GT TCA GAC ACA TAC ATC TAC ATC TTC AGG G ¹⁵² ¹²³ GT TCA GAC ACA TAC AGC TAC ATC TTC AGG G ¹⁵² I46S
MPR 46 MM5 Oligo MM6	¹⁵⁹ CGG GAA GCT GGC AAC CAC ACT TCT GGG ¹⁸⁵ ¹⁵⁹ CGG GAA GCT AGC AAC CAC TCT TCT GGG ¹⁸⁵ G56D T59S
MPR 46 MM6 Oligo MM7	²⁰¹ C AAC AAA AGT AAT GGG AAG GAG ACA GTG GTA G ²³³ ²⁰¹ C AAC AAA AGT AAT GAC AAG GAG ACA GTG GTA G ²³³ G72D
MPR 46 MM7 Oligo MM8	²²⁶ CA GTG GTA GGG AGA CTC AAC GAG ACT CAC ²⁵⁵ ²²⁶ CA GTG GTA GGG AGA ATC AAC GAG ACT CAC ²⁵⁵ L80I
MPR 46 MM8 Oligo MM9	³⁶⁶ CAC ACC CTA GCG GAC AAT TTT AAC CCT G ³⁹³ ³⁶⁶ CAC ACC CTA GAG GCC AAT TTT AAC CCT G ³⁹³ D126A

Abb. 11: Verwendete Oligonukleotide für die gerichtete Mutagenese

Für jede Runde der Mutagenese wurde die Sequenz der parenteralen DNA mit der Mutationsstelle (MPR 46 human, -MM1 bis -MM8) im Vergleich mit den Oligonukleotiden (Oligo MM1-MM9) angegeben. Die Basenaustausche wurden in dicken Buchstaben in einem Quadrat dargestellt. Die Numerierung der cDNA des MPR 46 beginnt mit der ersten Base des Kodon für den reifen MPR 46. MM1 bis MM9 geben die Chimären von Abb. 11 an.

anteilig aus verschiedenen großen Teilen muriner und humaner Aminosäuresequenz. Die humane Sequenz wurde vom N-Terminus ausgehend zunehmend durch die Mausequenz ersetzt.

Für die erste Mutagenese wurde die humane cDNA als Template-DNA verwendet. Zwei Basenpaare wurden ausgetauscht, dabei enthielten die verwendeten Oligonukleotide die Basenaustausche (Abb. 11). Die zwei veränderten Kodons führten zu zwei Aminosäureaustauschen. Die amplifizierte DNA mit der Mutation aus der ersten PCR-Runde wurde in der zweiten Runde der Mutagenese als Template eingesetzt, so daß zu den ersten Basen-Veränderungen weitere vom N-Terminus ausgehend hinzugefügt wurden. Je 1-3 Basenpaare wurden bei den PCR-Runden ausgetauscht bzw. 1-3 Aminosäuren. Der Anteil der Mausequenz der luminalen Domäne des MPR 46 wurde durch jede Mutagenese vergrößert. Nach der letzten Mutagenese wurde eine fast vollständige luminale Mausequenz bis auf Aminosäure 157 erhalten. In Abbildung 12 wurden die hergestellten chimären MPR 46 im Vergleich mit der humanen und murinen Aminosäuresequenz der luminalen Domäne des Rezeptors dargestellt.

Diese Mutagenesemethode war hoch effizient. Es wurden nach der ersten Mutationsrunde 18 und nach allen anderen Mutagenesen 6 Minipräparationen durchgeführt, wobei 77% die richtige Plasmidgröße von 5,43 kb in einem Agarosegel zeigten. Das MPR-46-Insert wurde jeweils an der Mutationsstelle nach jeder Mutageneserunde und nach der letzten Mutagenese vollständig sequenziert. Das MPR-46-Insert lag nach 9 Mutagenesen fehlerfrei vor.

Außerdem konnte nach der Verwendung des Plasmids für verschiedene Methoden gesagt werden, daß auch das Ampicillinresistenzgen, der Replikationsstartpunkt und der Promotor funktionsfähig waren.

Die chimären MPR 46 wurden in ein eukaryontes Expressionssystem eingeführt.

3.4.2 Stabile Transfektion und Expression der Chimären

Die chimären Konstrukte wurden in eukaryonten Zellen zur Expression gebracht. Anschließend konnten die chimären MPR 46 auf ihre Funktionalität geprüft und zur Epitopkartierung durch mAk genutzt werden.

MPR-defiziente embryonale Mausfibroblasten (MEF-MPR-) waren durch Transfektion mit SV40-Virus immortalisiert worden. In diese Fibroblasten und in BHK-21-Zellen wurde die cDNA von den MPR 46 Maus/Mensch-Chimären im Expressionsvektor pMPSVHE (Artelt *et al.*, 1988) (Abb. 13) stabil transfiziert. Die MPR-defiziente embryonale Mausfibroblasten-Zelllinie war für uns die wichtigere, da aber die MEF schlechter zu transfizieren sind, wurde zur Sicherheit eine zweite Zelllinie mit dem Vektor transfiziert. Die Mutagenese, sowie die Transfektion in eukaryonte Zellen erfolgte, wie schon erwähnt, mit dem gleichen Vektor. Die beiden Zelllinien können nach der Calcium-Phosphat-Methode effizient transfiziert werden. Die MEF-MPR- wurden mit dem Plasmid pGKhygro (Mortensen *et al.* 1991) für das Selektionsantibiotikum Hygromycin B und die BHK 21 mit dem Plasmid pSV2 pac (Vara *et al.*, 1986) für das Selektionsantibiotikum Puromycin kotransfiziert. Beide Antibiotika wirken schnell und zuverlässig selektiv. Die erhaltenen Chimären wurden mit Zelltyp und fortlaufender Nummer gekennzeichnet z.B. MEF MM7-10 für embryonale Mausfibroblasten mit MPR 46 Maus/Mensch-Chimäre 7 Klon 10.

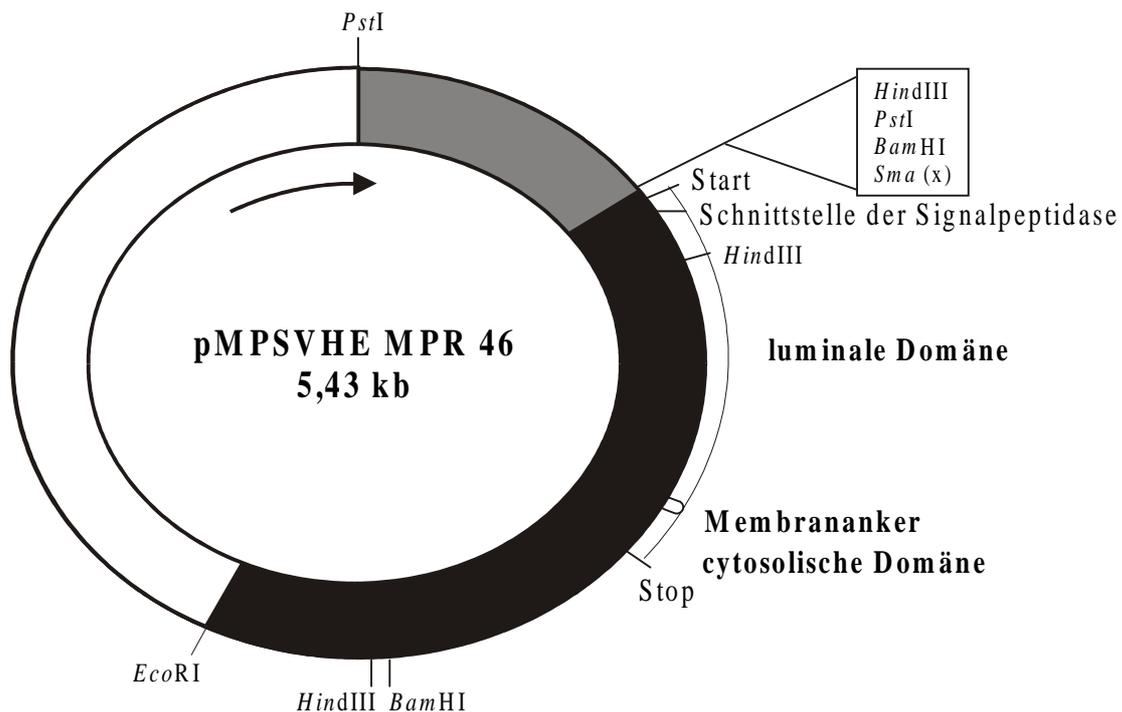


Abb. 13: Plasmidkarte des Expressionsvektors pMPSVHE MPR 46

Der Expressionsvektor enthält den Promotor des Myeloproliferativen-Sarcoma-Virus (grauer Bereich), den Polylinker (umrahmt), sowie die DNA des humanen MPR 46, die durch den schwarzen Bereich dargestellt wurde. Der Pfeil zeigt die 5'-3' Richtung im Vektor an. Die cDNA enthält 22 bp der 5' untranslatierten Region (UTR), gefolgt von 836 bp des kodierenden Bereiches (Start- bis Stopkodon) und 1584 bp des 3' UTR. Die wichtigen Restriktionsschnittstellen wurden angegeben, die *Bam*HI und *Eco*RI-Schnittstelle wurde zur Orientierungskontrolle genutzt.

Nach der Transfektion wurden die Klone auf ihre Expression und Lokalisation des MPR 46 in der Zelle untersucht. Es sollte eine Auswahl unter den Klonen getroffen werden. Die Klone mit der besten Expression und richtigen Lokalisation wurden für die weiteren Versuche ausgewählt. Die Expression und Lokalisation des transfizierten MPR 46 wurden durch intrazelluläre Färbung mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem polyklonalen Serum, deren Antikörper gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist, untersucht. In den positiven Kontrollzellen, BHK 21 mit dem endogenen MPR 46 und BHK-MPR-46 mit dem überexprimierten humanen MPR 46, war der MPR 46 perinukleär lokalisiert. Dieses ist ein Hinweis auf die Lokalisation im TGN und in den Endosomen. Die intrazelluläre Färbung von MEF-MPR- mit dem polyklonalen Serum war -wie erwartet- negativ. Als zweite

Negativkontrolle diente die Färbung der BHK-MPR-46 mit einem Präimmunkaninchen-Serum. Auch diese Kontrolle zeigte keine Färbung. Die Chimären zeigten die gleiche subzelluläre Verteilung, wie die Kontrollzellen (Abb. 14). Die eingeführten Mutationen zeigten somit keinen Hinweis auf einen veränderten Transport in den transfizierten Zellen. Um die Expressionshöhe zu bestimmen, wurden 3-5 Klone jeder Chimäre ausgewählt. Die chimären MPR 46 aus den Zellklonen wurden extrahiert und gleiche Mengen Membranextrakt im Westernblot analysiert.

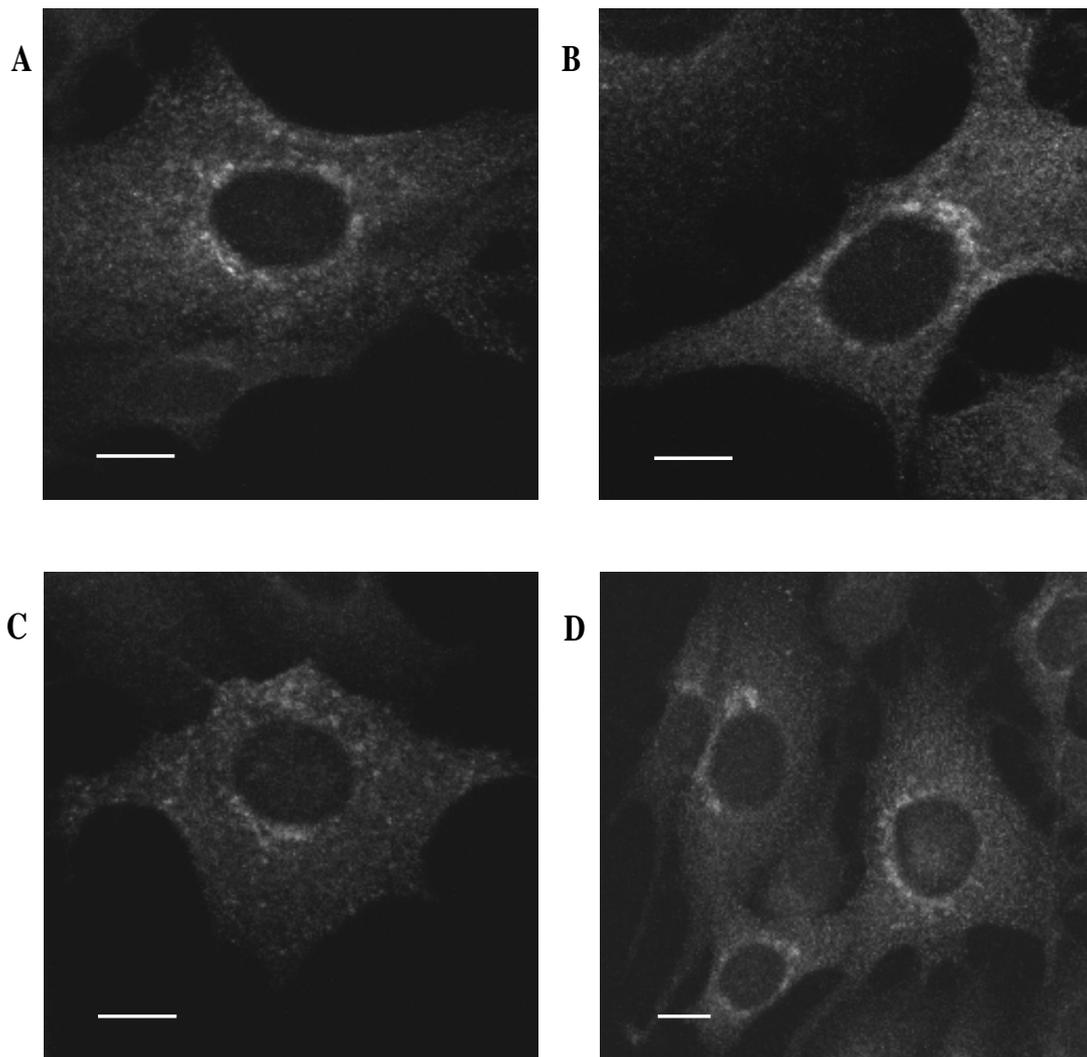


Abb. 14: Subzelluläre Verteilung des MPR 46 in BHK-MPR-46 und den Chimären BHK-MM1-9, MM4-1, MM8-12

Stabil transfizierte BHK-Zellen, die den humanen MPR 46 (A), MPR 46 MM1 (B), MM4 (C) und MM8 (D) überexprimierten, wurden für circa 24 Stunden kultiviert und anschließend mit pFA fixiert. Nach der

Permeabilisierung der Zellen mit Saponin wurde der MPR 46 mit dem polyklonalen Serum, welches gegen die cytoplasmatische Domäne gerichtet ist, und dem Sekundärantikörper dem FITC-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen IgG dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop hergestellt. Eine Schnittserie (~0,5 µm Dicke) wurde durch digitale Bildbearbeitung übereinander gelegt. (Balken = 10 µm)

Die Klone der Chimären zeigten eine starke Variationsbreite in ihrer Expression. Der Klon mit der höchsten Expression wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Es wurden die Klone BHK MM1-9, MM2-16, MM3-2, MM4-1, MM5-3, MM6-12, MM7-10, MM8-12, MM9-3 und MEF MM1-9, MM2-8, MM3-1, MM4-8, MM5-7, MM6-5, MM7-10, MM8-1 und MM9-5 ausgewählt.

Die Expression der Chimären wurde mit der Expressionshöhe des humanen MPR 46 aus BHK-MPR-46 verglichen. Aus einem BHK-MPR-46-Membranextrakt konnten circa 13 ng MPR 46 pro mg Membranextrakt herausgelöst werden. Die Expression der Chimären variiert je nach Mutante und Zellart. Die Expression bei den transfizierten BHK-Zellen lag meist höher als die in den transfizierten MEF-Zellen. In Abbildung 15 liegt die Expression des MPR 46 bei den Chimären MEF MM1/MM2/MM3 und MM5 zwischen einem Fünftel und einem Viertel der Höhe der BHK-MPR-46, die den humanen Rezeptor überexprimierten.

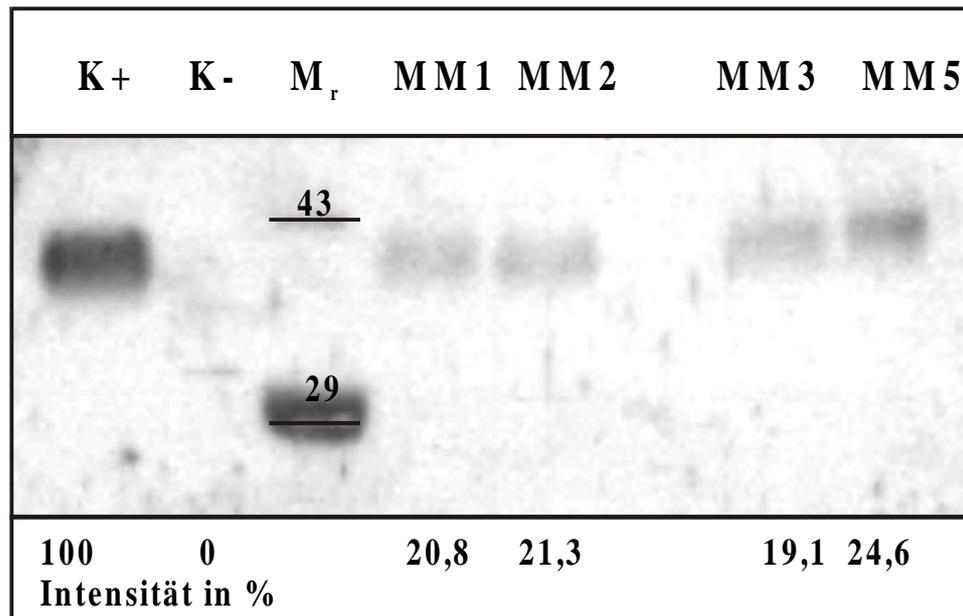


Abb. 15: Vergleich der Expressionshöhen der Chimäre MM1, MM2, MM3, MM5 und des humanen MPR 46.

Aus stabiltransfizierten MEF-MPR- mit der cDNA MPR-46-MM1, -MM2, -MM3 oder -MM5, MEF-MPR- (K-) und stabiltransfizierten BHK 21 (K+) mit dem humanen MPR 46 wurden die Rezeptoren mit 0,5% tritonhaltigem Extraktionspuffer pH 7,0 extrahiert. 7,5 µg des Membranextraktes wurde auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf PVDF-Membran transferiert. Der MPR 46 wurde mit dem polyklonalen Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist, und dem HRP-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG dargestellt. Die Expressionshöhe der positiven Kontrolle beträgt circa 13 ng MPR 46/mg Membranextrakt. Die molekulare Masse (M_r) der Standardproteine wurde in der Mitte in kDa angegeben. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgt mittels CCD-Kamera und die Quantifizierung mit dem Computerprogramm WinCam 2.2.

Aus zwei Gründen sollte der Rezeptor aufgereinigt werden. Die Rohextrakte aus unterschiedlich stark exprimierten Zellen lieferten unterschiedlich starken Hintergrund und außerdem sollte nur ein vernünftig gefalteter MPR 46 untersucht werden. Deshalb wurde untersucht, ob die chimären MPR 46 die Fähigkeit besaßen, Liganden zu binden.

3.4.3 Bindung und Aufreinigung der chimären MPR 46 an die PM-Sepharose

Die Ligandbindungsfähigkeit der chimären MPR 46 wurde in diesem Kapitel überprüft. Die Bindung der chimären MPR 46 an die PM-Sepharose sagt aus, daß der MPR 46 in der Lage ist, lysosomale Enzyme, also Liganden, zu binden. Die Faltung im Bereich der Ligandbindungsstelle wurde damit gleichzeitig überprüft.

3.4.3.1 Überprüfung der Ligandbindungsfähigkeit der MPR-46-Chimären durch PM-Sepharose

Die Ligandbindungsfähigkeit der MPR-46-Chimären an PM-Sepharose wurde hier gezeigt am Beispiel der stabil transfizierten BHK-Zellen mit den chimären MPR 46. Die Zellen wurden radioaktiv markiert und die chimären MPR 46 durch eine Membranextraktion mit Triton X-100 gewonnen. Der Membranextrakt wurde anschließend auf eine analytische PM-Sepharosesäule gegeben. Die PM-Sepharose wurde gewaschen und der MPR 46 mit Man6P eluiert. Die Wasch- und Eluatfraktionen wurden mit dem polyklonalen Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist, durch indirekte Immunsorption an Pansorbin immunpräzipitiert. In Abbildung 16 wurden die Fraktionen eines PM-Sepharoselaufs der Chimäre BHK-MM1 im Vergleich mit dem BHK-MPR-46 abgebildet. Der humane Rezeptor aus den BHK-MPR-46 konnte effizient an die PM-Sepharose binden. Auch die Eluate vom Säulenlauf der Chimäre zeigten, daß der MPR 46 zum großen Teil an die PM-Sepharose gebunden hatte. Für den chimären MPR-46-MM1 kann damit gesagt werden, daß er funktionsfähig und damit die Ligandbindungsstelle richtig gefaltet ist.

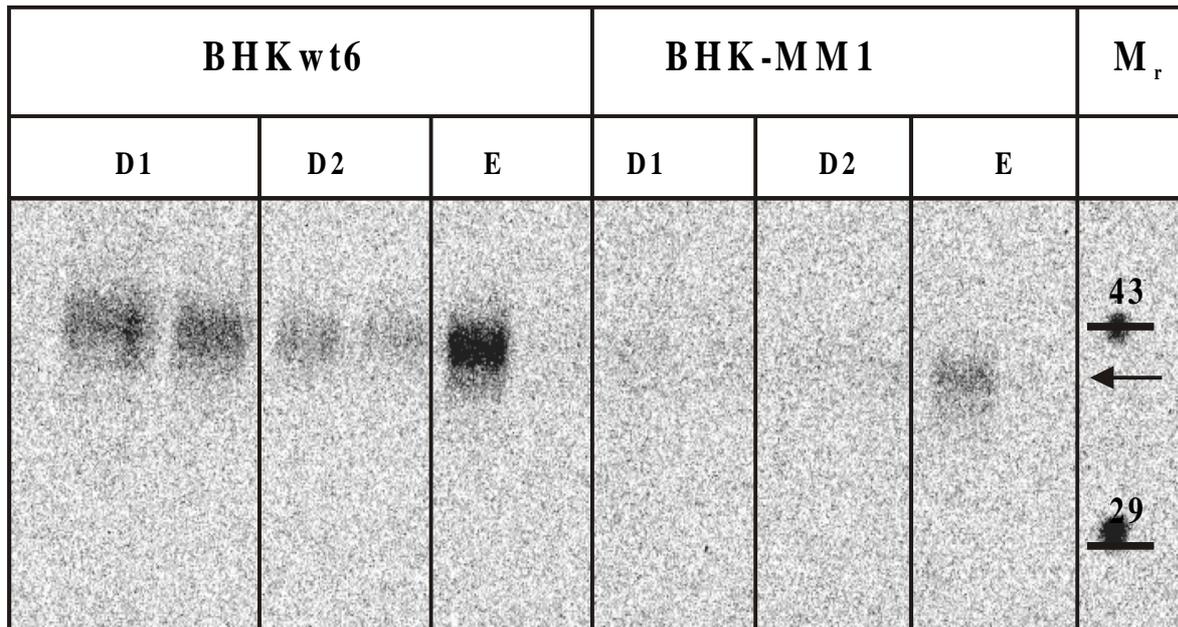


Abb. 16: Überprüfung der Ligandbindungsfähigkeit der MPR-46-Chimären durch PM-Sepharose

Der MPR 46 wurde aus ^{35}S -Methionin/Cystein-markierten-BHK-MPR-46 und -BHK-MM1 mittels einer Membranextraktion mit 0,5% tritonhaltigem Extraktionspuffer pH 7 extrahiert. Der Membranextrakt wurde auf eine PM-Sepharosesäule gegeben und je zweimal mit 4 Volumen Equilibrierungspuffer pH 7,0 (D1), mit Glc6P-Puffer (D2) gewaschen und mit Man6P-Puffer (E) eluiert. Der MPR 46 wurde mit dem polyklonalen Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist, durch Immunsorption an Pansorbin immunpräzipitiert und durch eine reduzierende SDS-PAGE analysiert. Die fluorographische Auswertung erfolgte mittels Phosphoimager. Die molekulare Masse (M_r) der Standardproteine wurde rechts in kDa dargestellt.

Die Chimären BHK-MM2 bis 8 konnten ebenfalls an die PM-Sepharose binden. Die Chimären BHK-MM9 und MEF-MM9 hatten eine extrem niedrige Expression, so daß eine Analyse der Ligandbindung nicht zweifelsfrei ausgewertet werden konnte. Es wurde mit den Chimären MM1 bis 8 weitergearbeitet.

Anhand der densitometrischen Auswertung der Fluorogramme mittels des Programms Image Gauge 3.0 konnten die prozentualen Verhältnisse der drei Fraktionen für den humanen und für die chimären MPR 46 errechnet werden (Tabelle 6). Die PM-Sepharose-Bindung der Chimären MM1/2 und MM5-8 lag im Bereich der PM-Sepharose-Bindung des humanen MPR 46 (37-53%). Lediglich die Werte der Chimären MM3 (24,7%) und MM4 (32,2%) lagen niedriger. Bei der Chimäre MM3 wurde ein Lysin gegen ein Aspartat und bei der Chimäre MM4 ein Lysin gegen ein Arginin ausgetauscht. Die Aminosäureaustausche könnten sich in

zwei verschiedenen Weisen ausgewirkt haben. Erstens könnten sie zu kleinen Konformationsänderungen im MPR 46 geführt haben und die Bindung des MPR 46 von diesen Chimären war deshalb schlechter. Zweitens könnte der Austausch einer basischen gegen eine saure Aminosäure dazu geführt haben, daß die Pufferbedingungen nicht mehr optimal waren. Für die ELISA-Analyse waren aber nur geringe Mengen MPR 46 notwendig, so daß keine Optimierung der Pufferbedingungen durchgeführt wurde.

Tabelle 6: Bindungsfähigkeit der Maus/Mensch-MPR 46 an PM-Sepharose im Vergleich mit dem humanen MPR 46

Die Ligandbindung der chimären MPR 46 wurde wie unter Abb. 16 beschrieben durchgeführt. Die fluorographische Auswertung erfolgte mittels Phosphoimager. Die Quantifizierung der MPR-46-Banden erfolgte mit dem Programm Image Gauge 3.0. Der Hintergrund wurde von den Intensitätswerten abgezogen. Die Summe der Intensitäten aus den Fraktionen Durchfluß 1/ 2 und Man6P-Elution wurde als 100% gesetzt. Für den humanen Rezeptor wurde die Standardabweichung angegeben.

MPR 46 aus stabil transfizierten BHK	Fraktionen in %		
	Durchfluß 1	Durchfluß 2	Elution
humaner MPR 46	39,8±9,7	14,9±0,9	45,2±8,3
MPR-46-MM1	37,9	12,5	49,6
MPR-46-MM2	25,9	22,2	51,9
MPR-46-MM3	63,7	11,7	24,7
MPR-46-MM4	47,2	20,7	32,2
MPR-46-MM5	48,4	13,5	38,1
MPR-46-MM6	47,2	12,2	40,6
MPR-46-MM7	45,4	16,8	37,9
MPR-46-MM8	32	24,2	43,6

3.4.3.2 Aufreinigung der chimären MPR 46 mittels PM-Sepharose

Für die Epitopanalyse müssen die chimären MPR 46 frei von endogenem MPR 46 sein, deshalb wurden für die Aufreinigung der chimären MPR 46 die MEF- und nicht die BHK-Zellen genutzt. Während einiger Vorversuche zeigte sich, daß die Standardbedingungen der

Extraktion des MPR 46 nicht optimal waren. Die Bedingungen sollten deshalb optimiert werden. Ursprünglich wurden nach dem Aufbrechen der Membran die Membranen in einem kleinen Volumen 0,5% Triton-X-100-Puffer für eine 10 cm Gewebekulturplatte extrahiert. Der Ansatz wurde mit tritonfreiem Puffer aufgefüllt, so daß eine Endkonzentration von 0,05% Triton X-100 vorlag. Es wurde wenig MPR 46 extrahiert, der größte Teil blieb im Membranpellet zurück (Abb. 17). Erst nach einer zweiten Extraktion konnte der MPR 46 fast vollständig aus der Membran gelöst werden. Das Protokoll wurde verändert, indem die Tritonkonzentration oder/und das Volumen erhöht wurde. Eine zweite Extraktion wurde anschließend zur Kontrolle durchgeführt. Es wurde keine vollständige Extraktion des MPR 46 mit geringem Volumen und hoher Tritonkonzentration (wie schon erwähnt) oder hohem Volumen und geringer Tritonkonzentration erreicht. Ein großer Teil wurde erst bei der zweiten Extraktion herausgelöst (siehe Abb. 17 die ersten beiden Spalten 0,5*% und 0,05% Triton X-100). Nur wenn die Tritonkonzentration und das Volumen erhöht wurden, war die erste Extraktion ergiebiger (siehe Abb. 17 Spalte mit 0,25% oder 0,5% Triton X-100). Für das neue Protokoll wurde 1 ml 0,5% Triton X-100 für die Membranextraktion verwendet.

M _r	Triton X-100											
	0,5*%			0,05%			0,25%			0,5%		
	Ü1	Ü2	P	Ü1	Ü2	P	Ü1	Ü2	P	Ü1	Ü2	P
43												
29												

Abb. 17: Optimierung der Membranextraktionsbedingungen aus BHK-MPR-46

BHK-MPR-46-Zellen mit dem humanen Rezeptor wurden in 10 cm Gewebekulturplatten (4 Platten) 2-3 Tage bei 37°C und 0,5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und in Acetatpuffer pH 6,0 mit Ultraschall lysiert. Das Membransediment einer Platte wurde in 100 µl 0,5% tritonhaltigen Extraktionspuffer pH 7,0 oder mit je 1 ml 0,05%, 0,25% und 0,5% tritonhaltigem Extraktionspuffer pH 7,0 aufgenommen und für 1 h auf Eis extrahiert. Erstere wurde auf 1 ml mit tritonfreiem Extraktionspuffer pH 7,0 aufgefüllt (in der Abbildung durch einen Stern gekennzeichnet). Alle wurden zentrifugiert und der erste Membranextrakt (Ü1) abgenommen, das Membransediment nochmals wie zuvor extrahiert und zentrifugiert. Der zweite Membranextrakt (Ü2) wurde abgenommen. Die Membranextrakte wurden mit TCA gefällt. Das TCA-Sediment und das Membransediment

wurden in reduzierendem Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol aufgenommen. Gleiche Verhältnisse von Pellet, Überstand 1 und 2 wurden im 10%igen SDS-PAGE und anschließendem Westernblot analysiert. Der MPR 46 wurde mit dem polyklonalen Serum, der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist, und HRP-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG dargestellt. Die Chemilumineszenz wurde mittels CCD-Kamera gemessen. Die molekulare Masse (M_r) der Standardproteine wurde links in kDa angegeben.

Die präparativen Reinigungen der chimären MPR 46 und des humanen MPR 46 wurden bei einem pH-Wert von 6,5 durchgeführt. Um Verunreinigungen mit dem humanen Rezeptor oder anderen Chimären zu vermeiden, wurde die PM-Sepharose gründlich regeneriert und Kontrollelutionen mit Man6P durchgeführt. Diese Leerelutionen waren frei von MPR 46, d.h. die chimären und der humane MPR-46-Aufreinigungen wurden nicht von anderen Rezeptoren verunreinigt. Die Analyse der Man6P-Eluate im Westernblot und Silbergel zeigten aber einige andere Kontaminanten. Eine Proteinbestimmung wurde deshalb nicht durchgeführt, sondern die MPR 46 über den polyklonalen Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne gerichtet ist, im ELISA standardisiert.

3.4.4 Epitopkartierung von mAk mittels ELISA

Die aufgereinigten Rezeptoren aus BHK-MPR-46, die den humanen Rezeptor überexprimierten, und aus den MPR-Chimären konnten für die Epitopkartierung durch die mAk im ELISA eingesetzt werden. Die Aufreinigung erfolgte in einem NaPi-Puffer und nicht in einem Imidazol-Puffer, denn die Man6P-Eluate sollten quervernetzt werden. Die Quervernetzung mit Disuccinimidylsuberat mußte in einem aminfreien Puffer durchgeführt werden. Eine laborinterne Beobachtung von K. Schreiber und A. Hille-Rehfeld zeigte, daß ein quervernetzter Rezeptor besser an die ELISA-Platten gebunden werden kann. Außerdem zeigten einige mAk mit dem quervernetzten MPR 46 bessere Signale im ELISA im Vergleich zum nicht-modifizierten Rezeptor. In Abbildung 18 wurden exemplarisch der quervernetzte Rezeptor und der nicht modifizierte Rezeptor der MPR-46-MM3-Chimäre im Westernblot dargestellt. Die Detektion erfolgte mit dem polyklonalen Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist. Nach der Quervernetzung und Auftrennung in einem reduzierenden Polyacrylamidgel lag der chimäre MPR-46-MM3 vorwiegend in der Form des Dimers, wenig in der Form des Tetramers vor, dieses war nach der Literatur zu erwarten (Waheed *et al.* 1990). Der nicht-modifizierte Rezeptor lag in dem Gel vorwiegend in der monomeren Form vor. Alle anderen quervernetzten Rezeptoren lagen ebenfalls vorwiegend als Dimer oder vorwiegend als Tetramer vor (nicht gezeigt).

Nach der Quervernetzung wurde der Rezeptor im ELISA getestet. Die chimären und der humane MPR 46 wurden mit dem polyklonalen Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist, standardisiert. Es wurde von allen Rezeptoren eine Eichgerade hergestellt (nicht gezeigt). Damit die Standardisierung auch genau war, mußte ausgeschlossen werden, daß die cytoplasmatische Domäne degradiert war. Die chimären und der humane Rezeptor zeigten nach Detektion mit peptidspezifischen Antikörpern (anti-MPR 46 242-251, 223-237, 211-227, 186-200) gegen die cytoplasmatische Domäne genauso starke oder stärkere Signale im ELISA als der polyklonale Antikörper (nicht gezeigt). Die cytoplasmatische Domäne war nicht degradiert. Für den Vergleich der chimären und des humanen MPR 46 durch die mAk wurde schließlich die Menge der jeweiligen Eluatfraktion eingesetzt, die die gleichen Extinktionshöhen mit dem polyklonalen Antikörper in der Eichgerade zeigten.

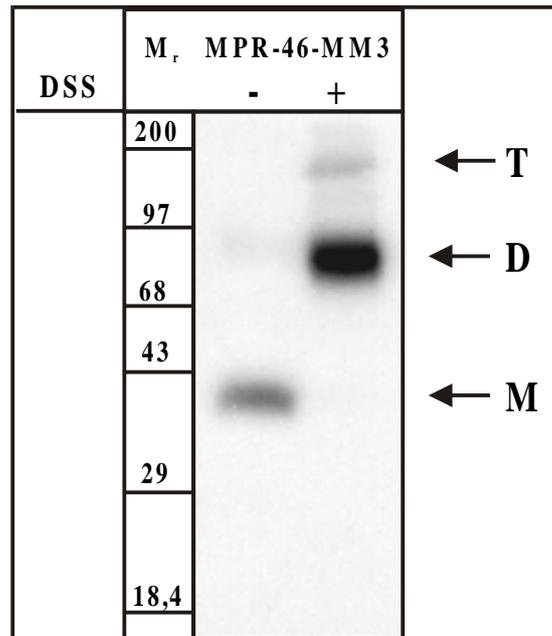
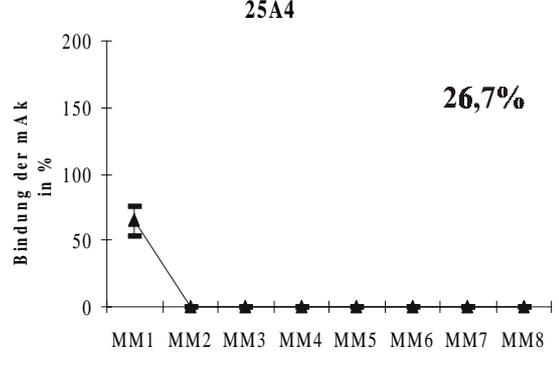
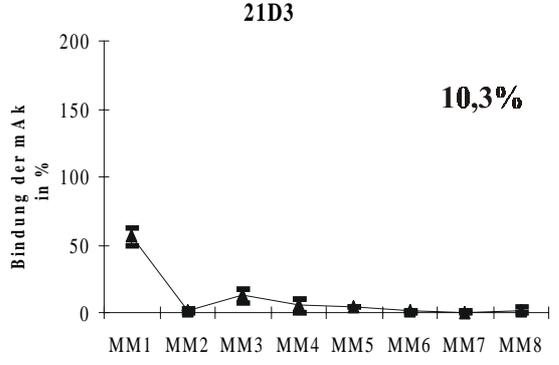
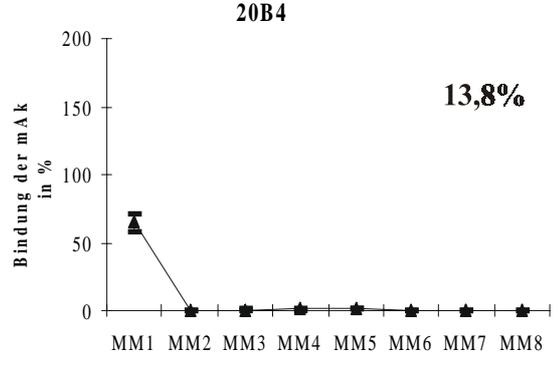
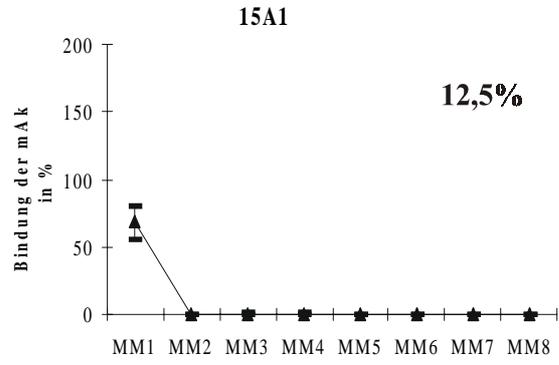
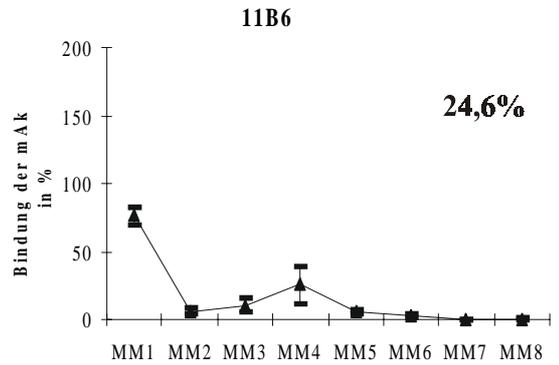
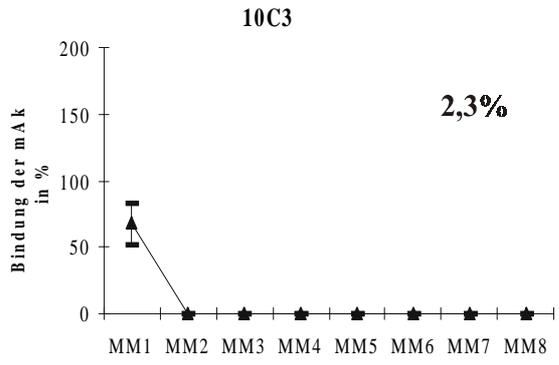
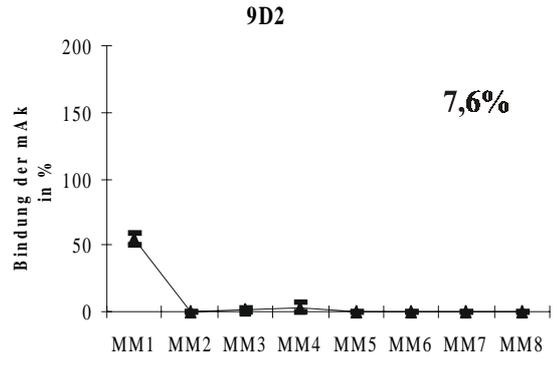
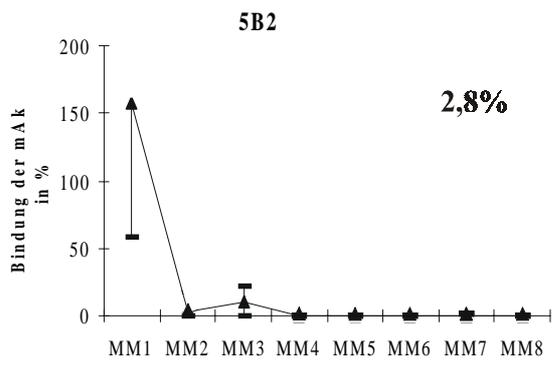


Abb. 18: Oligomere Formen des chimären MPR-46-MM3 nach der Quervernetzung

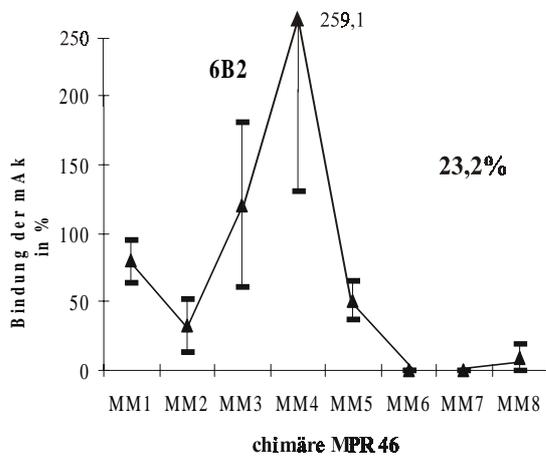
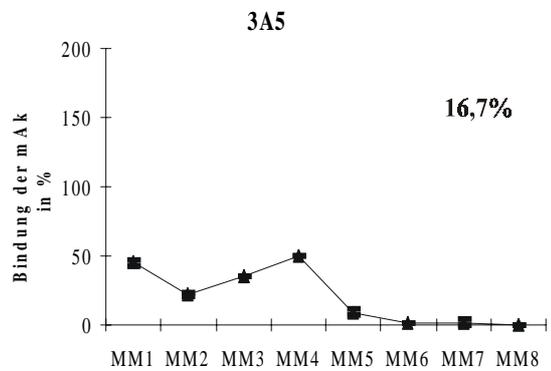
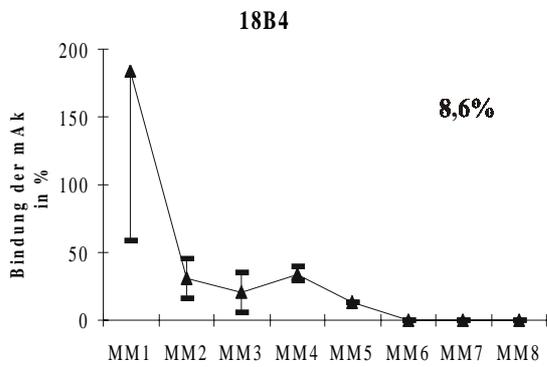
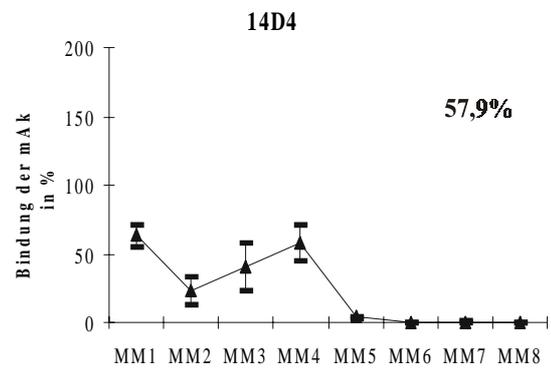
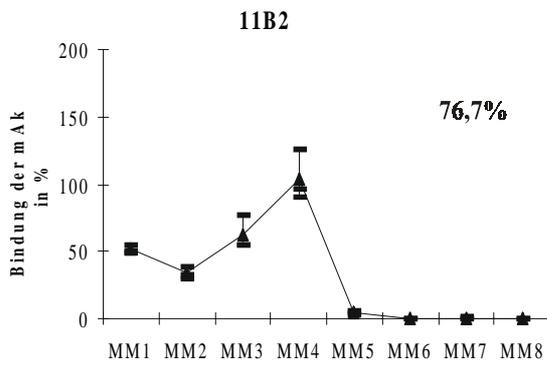
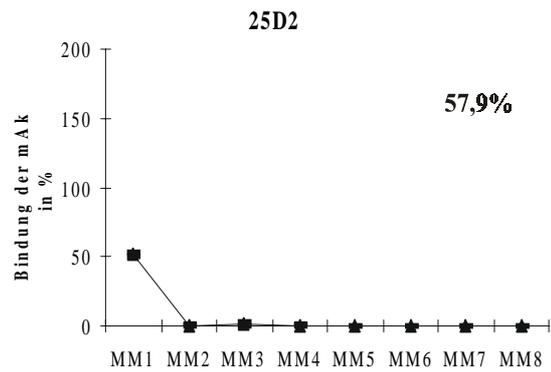
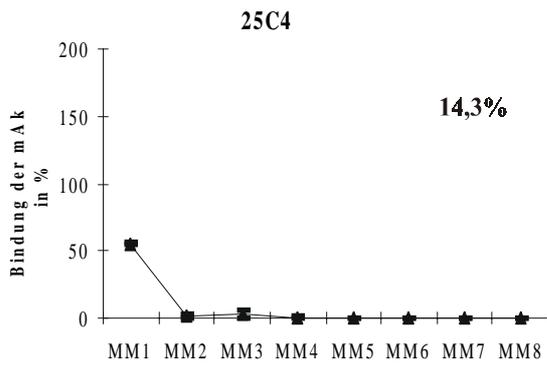
Das Man6P-Eluat wurde mit 30 mM DSS zu einer Endkonzentration von 0,6 mM versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Quervernetzung wurde mit 1 M Tris/HCl pH 7,4 zu 50 mM beendet. 20 µl quervernetzter Rezeptor wurde mit reduzierendem Probenpuffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Westernblot. Der MPR 46 wurde mit dem polyklonalen Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist, und dem HRP-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG dargestellt. Die Chemilumineszenz wurde in der CCD-Kamera detektiert. Die molekulare Masse (M_r) der Standardproteine wurde links in kDa angegeben. Die Pfeile kennzeichnen die oligomeren Formen des MPR 46 (M=Monomer, D=Dimer, T=Tetramer).

Für jeden Versuch wurden der polyklonale Antikörper als Positivkontrolle und der irrelevante Antikörper als Negativkontrolle eingesetzt. Die Extinktionshöhe der Negativkontrolle wurde von allen anderen Werten abgezogen. Einzelne mAk zeigten unterschiedliche Signale mit dem humanen Rezeptor. Für einen Vergleich der Antikörper untereinander wurde das mit dem polyklonalen Antikörper erzielte Signal des humanen Rezeptors als 100% gesetzt. Für den Vergleich der chimären MPR 46 wurde das mit den mAk erzielte Signal für den humanen Rezeptor als 100% gesetzt. Dieses wurde in Abbildung 19 anhand von Liniendiagrammen dargestellt. Jedes Diagramm zeigt für jeden mAk die Reaktivität mit dem humanen MPR 46 (Zahl) und den chimären MPR 46 (Linien).

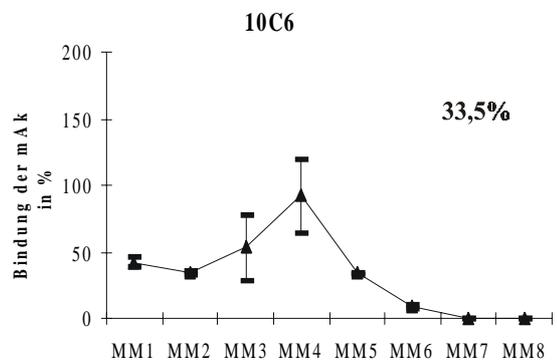
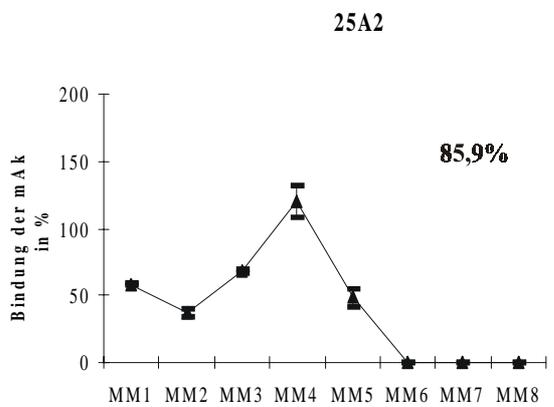
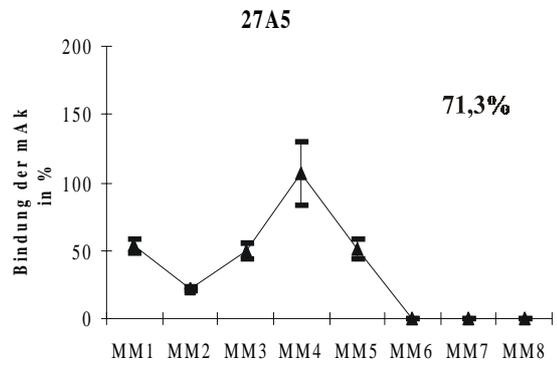
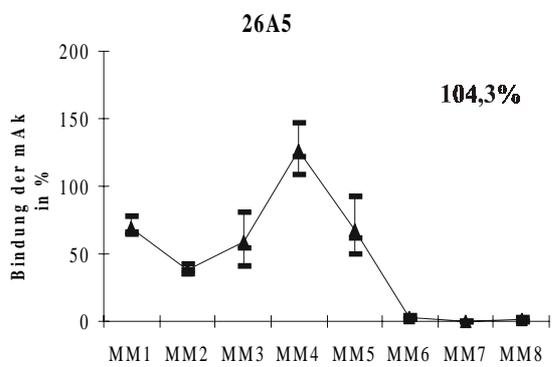
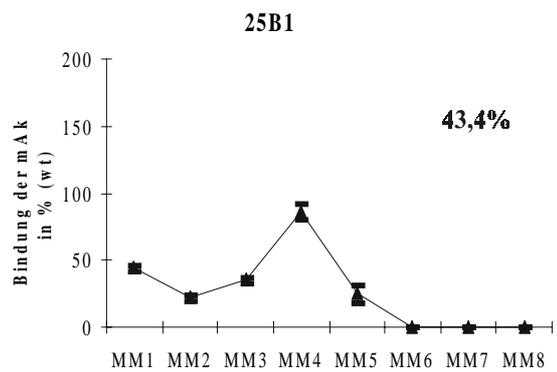
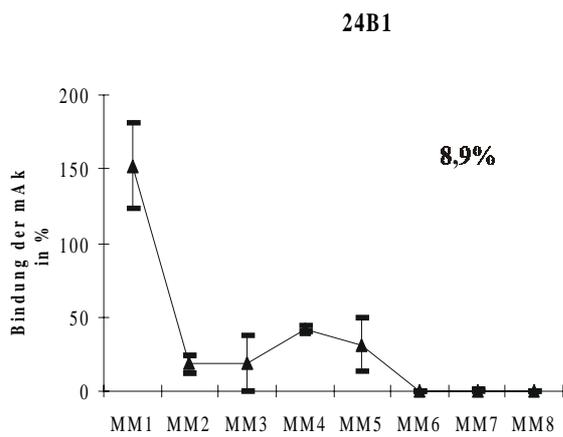
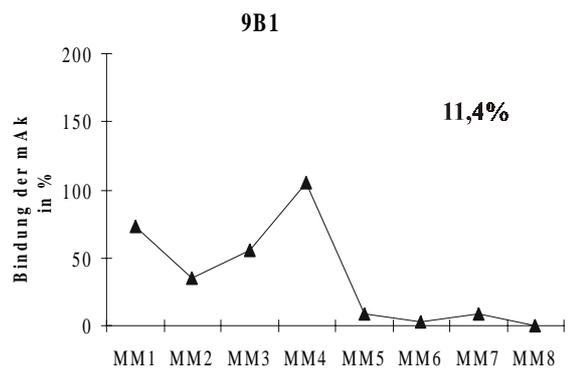
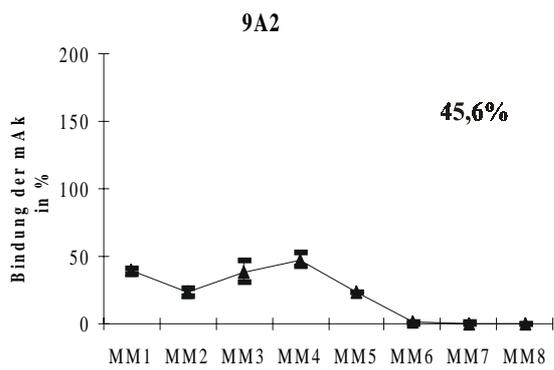


chimäre MPR 46

chimäre MPR 46

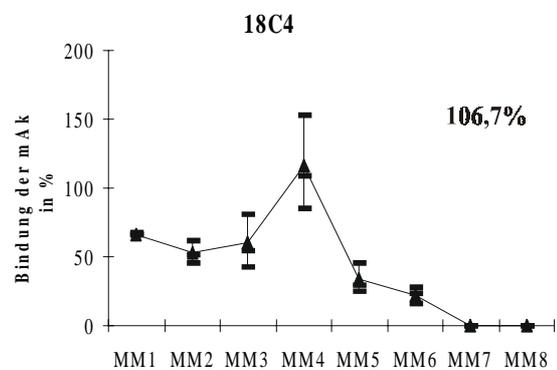
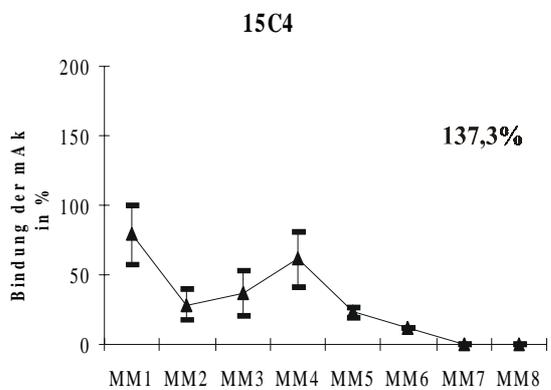
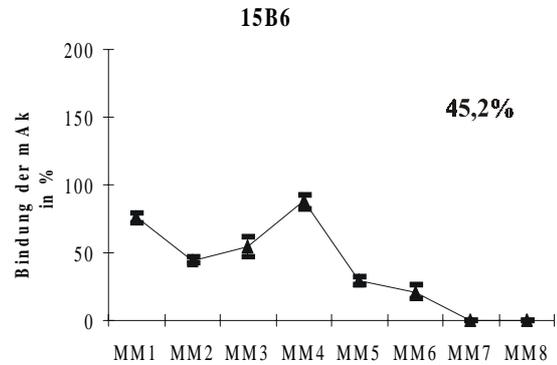
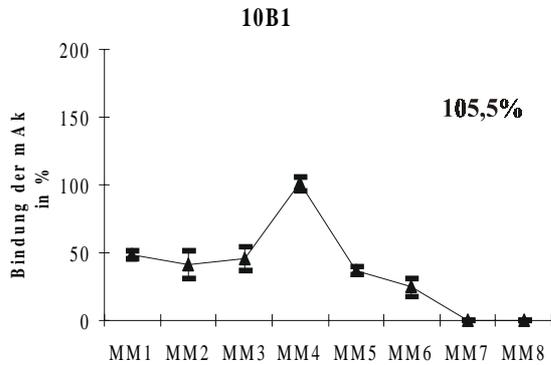
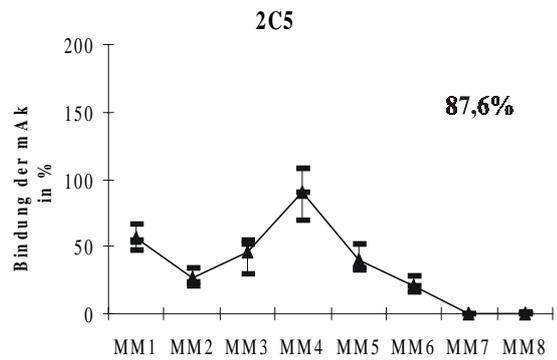
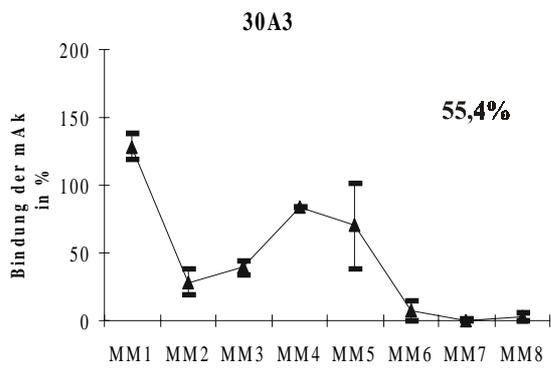
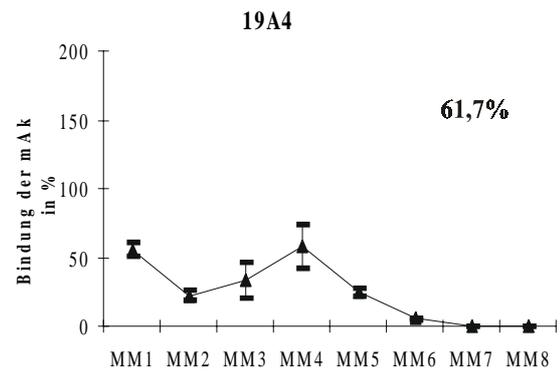
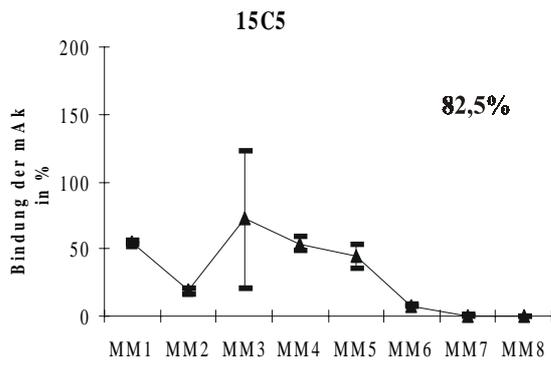


chimäre MPR 46



chimäre MPR 46

chimäre MPR 46



chimäre MPR 46

chimäre MPR 46

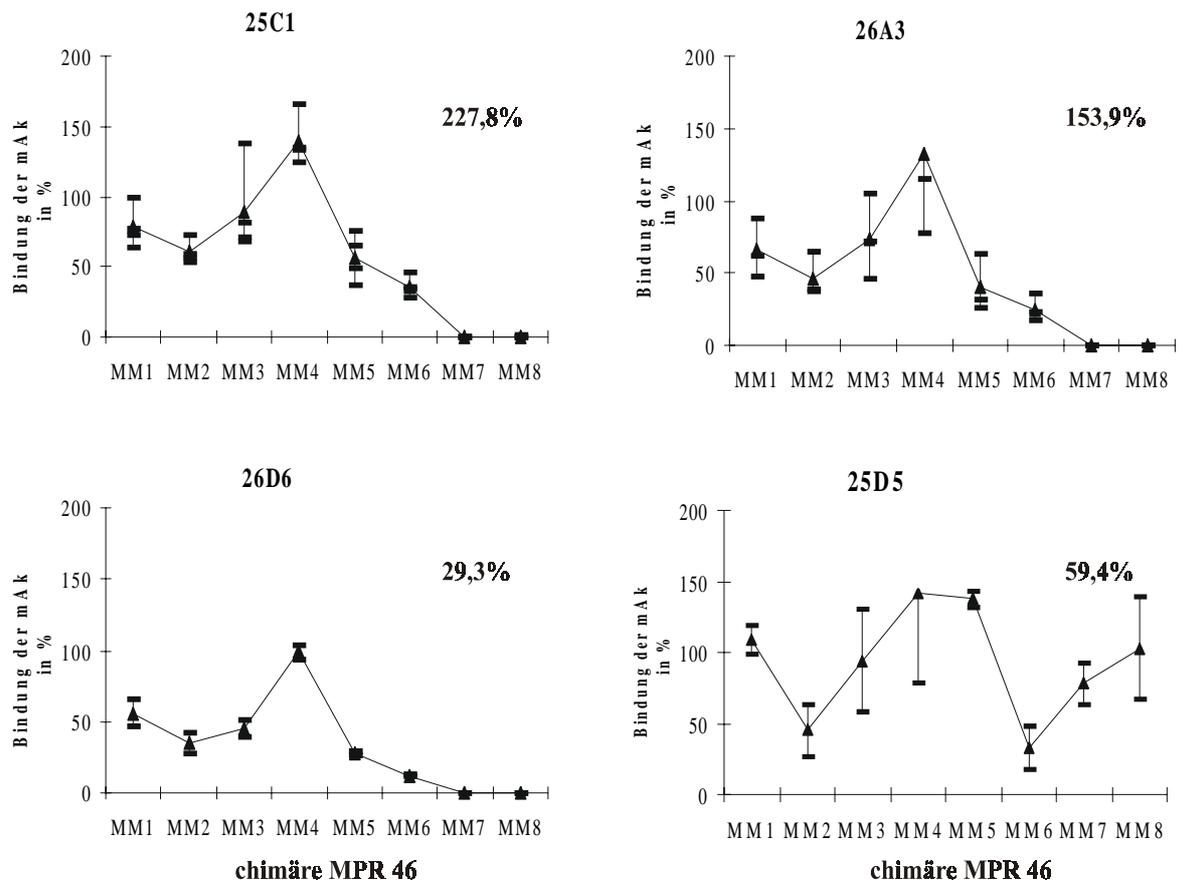


Abb. 19: Bindung der mAk an die chimären MPR 46

Die Bindung der mAk an die chimären MPR 46 wurden im Vergleich mit der Bindung an den humanen MPR 46 durch ELISA ermittelt. Die standardisierten Mengen humaner und chimärer MPR 46 wurde im ELISA eingesetzt. Als Sekundärantikörper dienten das HRP-gekoppelte Ziege-anti-Maus-IgG oder Kaninchen-anti-Maus-IgG und HRP-gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen-IgG. Für einen Vergleich der Antikörper untereinander wurde das mit dem polyklonalen Antikörper erzielte Signal des humanen Rezeptors als 100% gesetzt (Zahl). Die Bindung jedes mAk an den humanen MPR 46 wurde als 100% gesetzt. Es wurden die Mittelwerte (Linie) und Einzelwerte von 1-4 Versuchen dargestellt

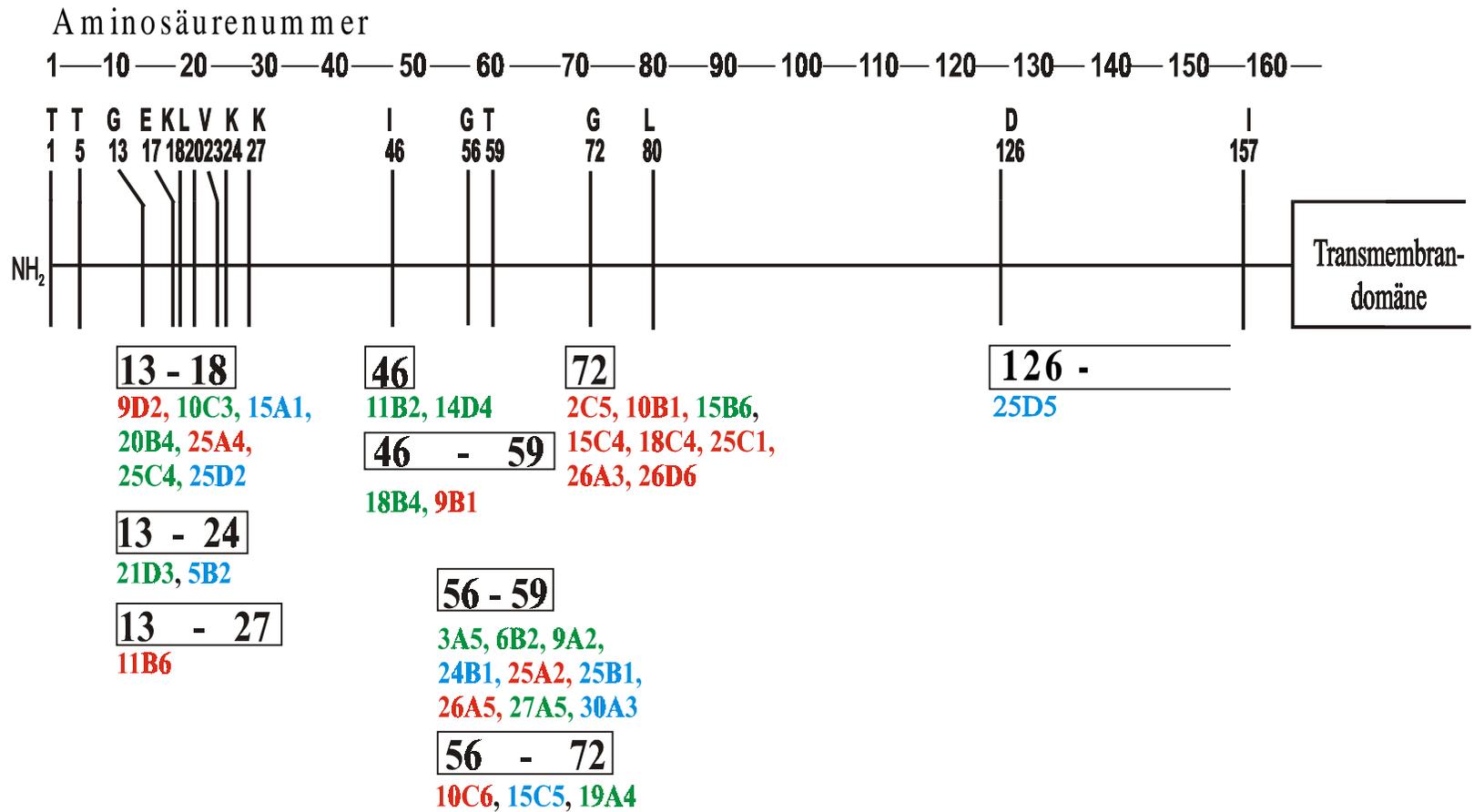


Abb. 20: Epitope der mAk gegen den MPR 46

Ein Vergleich der Bindung der mAk an die chimären MPR 46 und an den humanen MPR 46 wurde durch ELISA erstellt (siehe Abb. 19). Die eingeführten Aminosäuren, die bei einem chimären MPR 46 zu einem Abbruch der Bindung des mAk führte, wurden als Epitop postuliert. Lag die Abnahme der Bindung der mAk bei mehreren chimären MPR 46 noch zwischen 5 und 10%, so wurde ein größeres Epitop angegeben. Die postulierten Epitope wurden in den Rechtecken dargestellt. Die mAk wurden in verschiedenen Farben eingeteilt, rot für die starke, grün für die partielle, blau für die nicht-signifikante Inhibition der PM-Sepharose-Bindung.

Die Diagramme zeigen, daß die mAk für einige der chimären MPR 46 keine oder nur noch schwache Extinktion zeigten. Sieben mAk erkannten nur den chimären MPR-46-MM1, sie brachen nach der zweiten Chimäre ab. Sie haben das postulierte Epitop um die Aminosäuren 13-18, dazu gehört z.B. der Antikörper 15A1 (Abb. 20). Drei mAk zeigten keinen klaren Abbruch der Bindung der chimären MPR 46, diese zeigten noch Signale zwischen 5-20%. Deshalb wurden zwei Antikörper, der 21D3 und der 5B2, das postulierte Epitop um die Aminosäuren 13-24 und dem 11B6 das postulierte Epitop um die Aminosäuren 13-27 zugeordnet. Die Antikörper dieser drei postulierten Epitope erkannten im Westernblot keinen reduzierten Rezeptor (nicht gezeigt). Sie besitzen vermutlich ein diskontinuierliches Epitop. In dieser Gruppe befinden sich sowohl stark, partiell und nicht-signifikant inhibierende Antikörper zu fast gleichen Teilen. Die Epitope dieser mAk liegen vermutlich so, daß die mAk je nach Bindung an den MPR 46 die Ligandbindung sterisch beeinflussen können. Die Ligandbindungsstelle liegt vermutlich nicht in direkter Nähe der Epitope.

Vier mAk erkannten noch die Chimäre MM4 oder noch schwach die Chimäre MM5. Der 11B2 und der 14D4 haben ihr postuliertes Epitop um die Aminosäure 46 und der 18B4 und 9B1 um die Aminosäure 46-59 (Abb. 20). Diese Antikörper inhibieren die Ligandbindung partiell oder stark. Diese postulierten Epitope liegen vermutlich in der Nähe der Ligandbindungsstelle.

Die Chimäre MM4 wurde von vielen mAk im Vergleich zu den anderen Chimären sehr stark detektiert. Unklar ist es, wie diese starke Detektion zu bewerten ist. Möglicherweise ist diese starke Detektion eine kleine Konformationsänderung des MPR 46, verursacht durch den Aminosäureaustausch, der Grund, so daß diese Chimäre besser erkannt wurde. 20 mAk zeigten noch Signale für die Chimären MM5 und 6, jedoch waren diese Signale reduziert im Vergleich zur Chimäre MM4. Nur Signale, die eine Bindung von mehr als 20% zeigten, wurden als relevant bezeichnet. Die mAk wurden dem jeweiligen Epitopen zugeordnet.

12 mAk erkannten noch die Chimäre 5 und evtl. schwach die Chimäre 6 (5-10%). 9 mAk wurde das postulierte Epitop um die Aminosäuren 56-59 und drei mAk das postulierte Epitop um die Aminosäuren 56-72 zugeordnet. 25% der mAk konnten die Ligandbindung stark, 42% partiell und 33% nicht-signifikant inhibieren. Die Ligandbindung liegt vermutlich in der Nähe der Ligandbindungsstelle, so daß der Antikörper je nach Bindung an das Epitop die Ligandbindung inhibieren kann oder nicht.

Acht mAk konnte dem postulierten Epitop um die Aminosäure 72 zugeordnet werden, sie erkannten noch die Chimäre MM6, aber nicht mehr die Chimäre MM7. Sieben dieser Antikörper inhibierten die Ligandbindung stark, d.h. das Epitop liegt so nahe der Ligandbindungsstelle, daß die Antikörper vermutlich in jeder Position die Ligandbindung sterisch beeinflussen können.

Als einziger Antikörper erkennt der 25D5 die Chimären MM7 und MM8. Sein Epitop liegt vermutlich nach der Aminosäure 126, deshalb wurde dieses postulierte Epitop in der Abbildung 20 als offenes Rechteck dargestellt. Der 25D5 inhibierte die Ligandbindung nicht signifikant, das Epitop liegt entfernt von der Ligandbindungsstelle.

Diese postulierten Epitope der mAk sollten durch Aminosäuresequenzanalyse bestätigt werden.

3.5 Erkennung von spezifischen Aminosäuresequenzen durch mAk

Die postulierten Epitope aus der Chimärenanalyse sollten durch Peptidbindungen eindeutig bestätigt werden. Die mAk müssen auf ihre Tauglichkeit für die Peptidanalyse getestet werden, deshalb müssen sie eine lineare Aminosäuresequenz erkennen können. Eine Vorauswahl ergab sich durch die Westernblotanalyse, da die mAk, die die postulierten Epitope um die Aminosäuren 13-18, 13-24, 13-27 haben, den reduzierten Rezeptor nicht erkannten. Die anderen mAk sollten durch den Vergleich von nativem mit reduziertem, alkyliertem Rezeptor in der Immunpräzipitation getestet werden. Anschließend sollten die Peptide ausgewählt und die Bindung der mAk an die Peptide untersucht werden.

3.5.1 Erkennung des alkylierten MPR 46 durch mAk

Für den Vergleich der Immunpräzipitation von nativem mit reduziertem, alkyliertem Rezeptor wurde der jodierte MPR 46 verwendet. Dieser jodierte Rezeptor wurde mit DTT reduziert und anschließend durch Jodacetamid alkyliert. Das Jodacetamid bindet an die Cysteinreste, so daß diese nicht wieder Disulfidbrücken untereinander bilden können. Die Aminosäuresequenz des MPR 46 lag nach Alkylierung linear vor.

Eine konstante Menge nativer oder reduzierter und alkylierter Rezeptor wurden mit den mAk inkubiert. Anschließend erfolgte eine Immunsorption. In Abbildung 21 wurde für ausgewählte Antikörper die Immunpräzipitation des nativen und des reduzierten, alkylierten Rezeptors gegenübergestellt. Einige mAk erkannten den reduzierten, alkylierten Rezeptor im Vergleich zum nativen, nicht mehr. Andere konnten den reduzierten und alkylierten Rezeptor immunpräzipitieren.

Die Quantifizierung der Immunpräzipitation erfolgte durch die Messung im Szintillationszähler. Es wurde die prozentuale Fällung des nativen MPR 46 und des reduzierten, alkylierten MPR 46 vom Angebot des jodierten Rezeptors berechnet (Tabelle 7). Danach wurde der Quotient aus nativem und reduziertem, alkyliertem Rezeptor ermittelt. Keiner der mAk erkannte den reduzierten Rezeptor genausogut wie den nativen Rezeptor. 11 mAk erkannten den linearisierten Rezeptor nicht, sie hatten einen Quotienten von über 30%. Diese mAk haben vermutlich ein diskontinuierliches Epitop, dazu gehört z.B. der 25A2 und der 9A2. 12 mAk hatten einen Quotienten zwischen 2 und 30%. Die Antikörper 15C4, 19A4, 26D6 und 27A5 erkannten den reduzierten und alkylierten Rezeptor 10-15 mal schlechter und

der 11B2 29 mal schlechter als den nativen Rezeptor. Die restlichen sieben mAk hatten einen Quotienten zwischen 2,9 und 10%. Diese 12 mAk haben vermutlich ein kontinuierliches Epitop, evtl mit Ausnahme des 11B2, der sehr schlecht immunpräzipitierte. Diese mAk konnten für die Peptidanalyse eingesetzt werden.

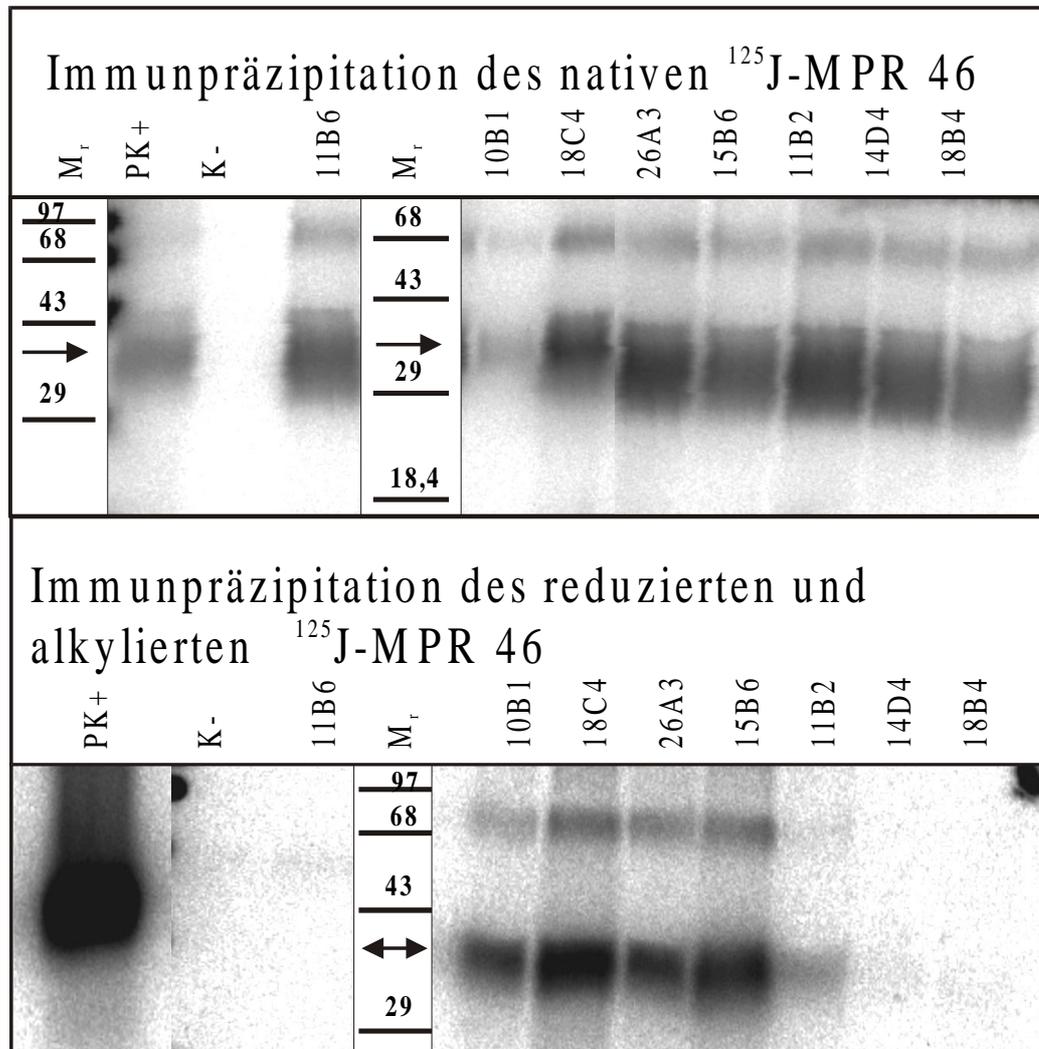


Abb. 21: Erkennung des reduzierten und alkylierten ¹²⁵J-MPR 46 durch mAk

10 ng nativer oder reduzierter und alkylierter ¹²⁵J-MPR 46 wurden mit 2 µg mAk (Spur K- und der mAk 11B6= irrelevanter mAk) oder 10 µg polyklonalen Antikörper (Spur PK+), der gegen die cytoplasmatische Domäne gerichtet ist, durch indirekte Immunsorption an Pansorbin immunpräzipitiert. Das gewaschene Pansorbinsediment wurde in reduzierenden Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol aufgenommen und durch SDS-PAGE analysiert. Die Detektion erfolgte mittels Phosphorimager. Die molekulare Masse (Mr) der Standardproteine wurde in der Mitte und links in kDa dargestellt. Die Pfeile zeigen auf den MPR 46.

Tabelle 7: Vergleich der Erkennung des nativen oder reduzierten und alkylierten ¹²⁵J-MPR 46 durch mAk

10 ng nativer oder reduzierter, alkylierter ¹²⁵J-MPR 46 wurden mit 2-4 µg mAk oder 10 µg anti-MSCI durch indirekte Immunsorption immunpräzipitiert. Es folgte eine Messung des ¹²⁵J vor und nach der Immunpräzipitation im Szintillationszähler. Es wurden die prozentuale Fällung des nativen und reduzierten, alkylierten Rezeptors vom Angebot des jodierten Rezeptors berechnet.

mAk	Erkennung des nativen MPR 46 (%)	Erkennung des red. alkyl. MPR 46 (%)	Quotient aus Erkennung nativen/red. alkyl. MPR 46
anti-ASA= irrelevanter Ak	1,2	0,7	1,7
3A5	47,9	1,3	36,8
6B2	45,6	0,7	65,1
9A2	52,5	0,8	65,6
9B1	28,4	0,9	31,6
10B1	54,8	6,4	8,6
10C6	63,9	1,2	53,3
11B2	50,2	1,7	29,5
11B6	26,0	0,6	43,3
14D4	58,4	1,5	38,9
15B6	57,5	11,3	5,1
15C4	25,1	2,4	10,5
15C5	33,4	3,8	8,8
18B4	57,9	1,6	36,2
18C4	38,5	12,5	3,1
19A4	44,6	2,9	15,4
24B1	39,0	0,7	55,7
25A2	57,5	0,8	71,9

mAk	Erkennung des nativen MPR 46 (%)	Erkennung des red. alkyl. MPR 46 (%)	Quotient aus Erkennung nativen/red. alkyl. MPR 46
25C1	58,9	20,0	2,9
26A3	25,8	6,4	4,0
26A5	59,2	1,0	59,2
26D6	57,8	3,8	15,2
27A5	22,3	1,6	13,9
30A3	5,8	1,0	5,8

3.5.2 Erkennung des nicht-glykosylierten MPR 46

Die mAk, die eine lineare Aminosäuresequenz erkannten, hatten ihr vermutliches Epitop im Aminosäurebereich 46-72. Dieser Bereich enthält aber zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen, wobei nur das erste Asparagin 57 genutzt wird. Ein für die Peptidanalyse mit den mAk genutztes synthetisches Peptid würde nicht glykosyliert sein. Es mußte deshalb sichergestellt sein, daß die mAk in der Lage sind, einen nicht-glykosylierten Rezeptor zu erkennen. Hierzu wurde eine *in vitro* Transkription und Translation des humanen MPR 46 mit TNT[®] Kaninchen-Retikulozytenlysat und TNT[®] RNA-Polymerase SP6 durchgeführt. Der nicht-glykosylierte Rezeptor ist circa 29 kDa groß. Er wurde nach der *in vitro* Transkription und Translation mit den polyklonalen Antikörpern gegen die cytoplasmatische und gegen die luminale Domäne des MPR 46 immunpräzipitiert. Diese erste Immunpräzipitation wurde durchgeführt, um die Kaninchen-Retikulozyten und andere Proteine aus dem *in vitro* Translationsansatz zu entfernen, da die Proteine bei der 95°C-Behandlung für die Reduktion des MPR 46 ausfallen würden. Der nicht-glykosylierte Rezeptor sollte reduziert und alkyliert werden, um eine lineare Aminosäuresequenz zu erhalten. Das Pansorbinpräzipitat wurde resuspendiert und mit DTT reduziert. Anschließend wurde eine Alkylierung mit Jodacetamid durchgeführt. Der Ansatz wurde im Szintillationszähler gezählt. Für weitere Versuche wurde eine zweite Immunpräzipitation mit den mAk durchgeführt. In der Abbildung 22 zeigt die Spur A das Angebot an nicht-glykosylierten, reduzierten und alkylierten MPR 46. Nach der zweiten Immunpräzipitation mit

dem irrelevanten Antikörper (Spur K-) wurde eine schwache Bande erhalten. Diese ist durch hydrophobes Verhalten des irrelevanten Antikörpers zum nicht-glykosylierten, reduzierten und alkylierten Rezeptor zu erklären. Dieser Hintergrundwert wurde später bei der Auswertung der Quantifizierung abgezogen. Die mAk 15B6, 26D6 und 19A4 zeigten eine stärkere MPR 46-Bande als der irrelevante Antikörper. Sie erkennen somit den nicht-glykosylierten Rezeptor.

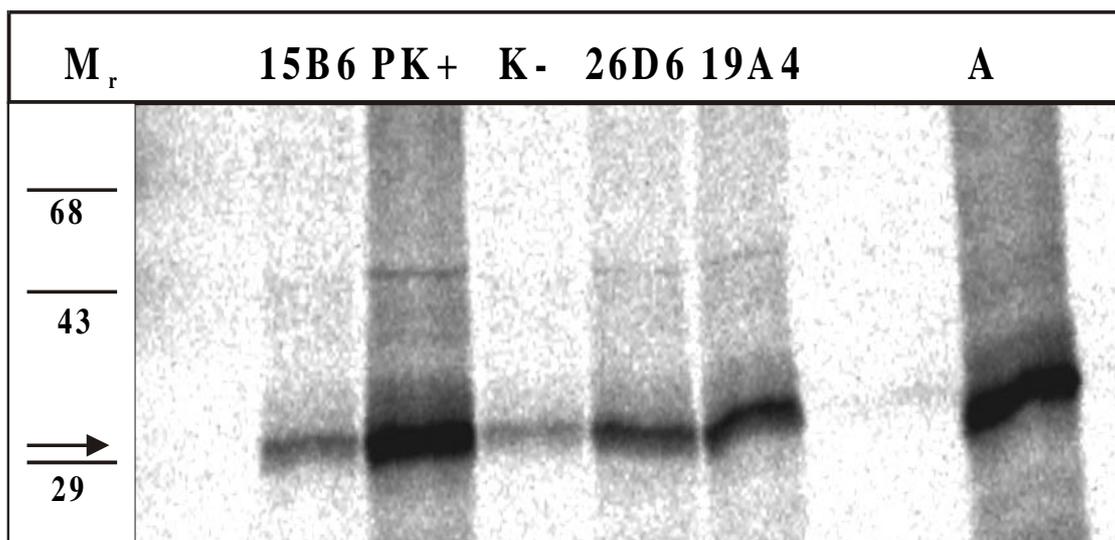


Abb. 22: Erkennung des nicht-glykosylierten humanen MPR 46 durch mAk

600 ng pGEM2-2 wurden in einem 100 μ l *in vitro* Transkriptions- und Translationsansatz eingesetzt. Der Ansatz wurde mit je 10 μ g der polyklonalen Antikörper gegen die cytoplasmatische und gegen die luminal Domäne des MPR 46 2h auf Eis inkubiert und durch indirekte Immunsorption mit Pansorbin immunpräzipitiert. Das gewaschene Pansorbinpräzipitat wurde in 50 μ l PBS+0,1% SDS+10mM DTT aufgenommen und 5 min bei 95°C reduziert. Nach dem Abkühlen wurde der nicht-glykosylierte MPR 46 mit 50 mM JAA für 15 min bei 37°C alkyliert und mit 1% NP-40 versetzt. 20000 cpm des alkylierten Rezeptors (Spur A) wurde mit 2 μ g mAk (Spur K-= irrelevanter Antikörper, Spur 1=15B6, Spur 2=26D6, Spur 3= 19A4) oder 10 μ g polyklonaler Antikörper (Spur PK+), der gegen die cytoplasmatische Domäne gerichtet ist, durch indirekte Immunsorption mit Pansorbin immunpräzipitiert. Das Pansorbinpräzipitat wurde in reduzierenden Probenpuffer aufgenommen und in einer SDS-PAGE analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Phosphoimager. Die molekulare Masse (M_r) für die Standardproteine wurde links in kDa dargestellt. Der Pfeil zeigt den nicht-glykosylierten MPR 46.

Für die Berechnung der Bindung des mAk an den nicht-glykosylierten, reduzierten und alkylierten MPR 46 wurde die Immunpräzipitation des polyklonalen Antikörpers als 100% gesetzt. (Tabelle 8). Nur 6 mAk (10B1, 11B2, 18C4, 19A4, 26A3, 26D6) von 12 mAk

konnten den nicht-glykosylierten, reduzierten und alkylierten Rezeptor erkennen, d. h. sie erkannten die lineare nicht-glykosylierte Aminosäuresequenz des MPR 46. Für viele andere mAk lag die Fällung unter 2%, dazu gehörten die mAk 27A5, 15C4, 15C5, 30A3. Die Antikörper 15C5, 19A4, 27A5 und 30A3 haben ihr postulierte Epitop um die Aminosäuren 56-59, in dem die N-Glykosylierungsstelle liegt. Nur der 19A4 erkannte den nicht-glykosylierten, reduzierten und alkylierten Rezeptor. Die anderen drei mAk erkannten den Rezeptor nicht, dieses könnte ein Hinweis auf das postulierte Epitop sein, da die mAk nur einen glykosylierten Rezeptor erkannten. Weiterhin bedeutete dies für uns, daß wir kein Peptid mit diesem Aminosäurebereich bestellten, da 75% der relevanten Antikörper den Bereich nicht positiv identifizieren könnten. Nur ein glykosyliertes Peptid könnte dieses Epitop für die mAk bestätigen. Dieses kam aber aus technischen und Kostengründen nicht in Betracht.

Tab. 8: Erkennung des nicht-glykosylierten humanen MPR 46 durch mAk

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter der Abbildung 22 beschrieben. Die Auswertung erfolgte mit dem Phosphoimager und die Quantifizierung mit dem Programm Image Gauge 3.0. Die Immunpräzipitation mit dem polyklonalen Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist, wurde als 100% gesetzt.

Antikörper	Bindung des nicht-glykosylierten MPR 46 (% vom polyklonalen Antikörper)	Antikörper	Bindung des nicht-glykosylierten MPR 46 (% vom polyklonalen Antikörper)
10B1	57,3	19A4	33,3
11B2	10,3	25C1	5,1
15B6	6,0	26A3	30,3
15C4	1,2	26D6	21,8
15C5	0,6	27A5	2,1
18C4	20,4	30A3	1,1

3.5.3 Erkennung von spezifischen Aminosäuresequenzen

Nach den Vorversuchen betreffend der Tauglichkeit der mAk für die Peptidanalyse und vor allem nach dem Interesse für bestimmte Aminosäurebereiche wurden zwei Peptide ausgewählt. Das erste Peptid sollte das postulierte Epitop um die Aminosäure 72 enthalten, da hier 90% der mAk die Ligandbindung des MPR 46 stark inhibieren konnten. Das zweite Peptid sollte das postulierte Epitop um die Aminosäure 46 enthalten, welchem zu 75% partiell inhibierende mAk zugeordnet wurden. Kürzlich wurde die dreidimensionale Struktur der extracytoplasmatischen Domäne des bovinen MPR 46 veröffentlicht (Roberts *et al.* 1998, Abb. 23). Nach der Topologie der Struktur des MPR 46 wurde schließlich die Aminosäuresequenz der beiden Peptide festgelegt. Das erste Peptid hat die Aminosäuresequenz $^{64}\text{L-V-Q-I-N-K-S-N-G-K-E-T-V}^{76}$, welches das Glycin 72 enthält. Es beinhaltet das dritte β -Faltblatt und die Schleife nach dem dritten β -Faltblatt. Das zweite Peptid, welches das Isoleucin 46 enthalten sollte, hat die Aminosäuresequenz $^{38}\text{V-G-Q-G-S-D-T-Y-I-Y-I-F-R-V}^{51}$. Es enthält die Aminosäureschleife nach dem ersten β -Faltblatt und das zweite β -Faltblatt. Beide Peptide sind am N-Terminus biotinoyliert, beim Peptid 38-51 das Valin 38 und beim Peptid 64-76 das Leucin 64. Das Peptid konnte durch die Biotinylierung mittels Neutravidin an die ELISA-Platten gebunden werden.

12 mAk, die eine linearisierte Aminosäuresequenz erkannten, wurden im ELISA auf ihre Bindung an die Peptide getestet. Die ELISA-Platten wurden mit Neutravidin beschichtet. An das Neutravidin wurde das Peptid gebunden. Die Peptide wurden mit den mAk und dem HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus IgG detektiert. Als Kontrolle wurden die gleichen Ansätze ohne Peptid durchgeführt.

**getestete mAk: 10B1, 11B2, 15B6, 15C4, 15C5, 18C4, 19A4, 25C1, 26A3,
 26D6, 27A5, 30A3**

Einzig der mAk 15B6 zeigte Signale für die Peptide. Die Signale mit dem Peptid 64-76 lagen reproduzierbar nur geringfügig über der Negativkontrolle. Das Peptid 38-51 mit der Aminosäure 46 wurde sehr gut erkannt (Abb. 24). Nach der Chimärenanalyse hatte der 15B6 das postulierte Epitop um die Aminosäure 72. Da diese beiden Aminosäurebereiche im 3-D-Modell direkt nebeneinanderliegen, könnte der 15B6 ein großes, diskontinuierliches Epitop besitzen.

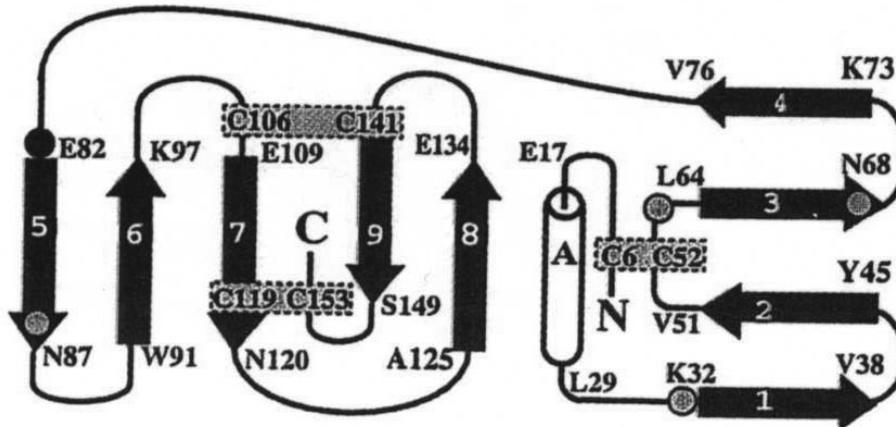


Abb. 23: Topologie der extracytoplasmatischen Domäne des bovinen MPR 46 mit 4 Substitutionen der Asn zu Glu (Roberts *et al.* 1998)

Die β -Faltblätter sind als schwarze Pfeile und die α -Helix als Zylinder dargestellt. Die Disulfidbrücken sind als graue Rechtecke abgebildet. Die grauen Kreise repräsentieren die vier N-Glykosylierungsstellen, die von Asn zu Glu substituiert wurden, und der schwarze Kreis die N-Glykosylierungsstelle, die erhalten blieb. Die Numerierung basiert auf der reifen Proteinsequenz. Die β -Faltblattstrukturen sind vom N-Terminus numeriert und beginnen mit 1, die α -Helix ist mit A gekennzeichnet. Die Aminosäuren am Anfang und Ende der Sekundärstrukturen sind gekennzeichnet.

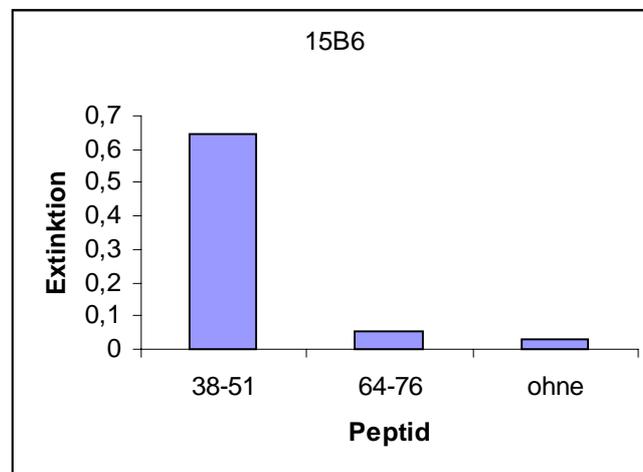


Abb. 24: Erkennung der Aminosäuresequenz $^{38}\text{V-G-Q-G-S-D-T-Y-I-Y-I-F-R-V}^{51}$ durch den monoklonalen Antikörper 15B6

Eine ELISA-Platte wurde mit 6 μg Neutravidin pro Loch beschichtet. 1 μg Peptid 38-51 oder 64-76 wurden an das Neutravidin gebunden. Die Detektion erfolgte nun mit dem Primärantikörper 15B6 in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ und dem Sekundärantikörper HRP-gekoppeltes Ziege-anti-Maus IgG. Die Messung der Substratumsetzung erfolgt nach 1 $\frac{1}{2}$ bis 2 h.

4 Diskussion

Die Ligandbindungsstelle des MPR 46 wurde in meiner Arbeit untersucht. Am Anfang meiner Arbeit war bekannt (Wendland *et al.* 1991b), daß das Histidin 105 und das Arginin 111 essentiell für die Ligandbindung sind, nicht aber wichtig für die Konformation des MPR 46. Ich wollte durch eine Epitopkartierung und die Feststellung der Wirkung der mAk auf die Ligandbindungsstelle die Entfernung antigener Epitope im Verhältnis zur Ligandbindungsstelle abschätzen. Parallel dazu sollte die luminal Domäne des humanen MPR 46 kristallisiert werden. Beide Methoden sollten Auskunft über die dreidimensionale Struktur des MPR 46 geben.

4.1 Inhibition der Ligandbindung durch mAk gegen den MPR 46

Die Wirkung der mAk auf die Ligandbindung des MPR 46 sollte durch eine Vorinkubation des Rezeptors mit den mAk und anschließender PM-Sepharose-Bindung getestet werden.

Für die Inhibition der Ligandbindung durch mAk mußte sichergestellt sein, daß möglichst viel MPR 46 mit mAk besetzt ist. Es mußte also ein Überschuß an mAk eingesetzt werden. Dieser Überschuß wurde durch Titration des mAk in der Immunsorption mit konstanter Menge MPR 46 bestimmt. Der Überschuß der mAk wurde solange erhöht bis eine Sättigung eintrat. Diese Sättigung wurde bei den meisten mAk bei einem 100-200fachen Überschuß zum MPR 46 erreicht. Nur ein mAk, der 15C4, erforderte einen 400fachen Überschuß. Dieser große Überschuß an einzusetzenden mAk sagt indirekt aus, daß die KD der Antikörper gering ist. Hochaffine Antikörper besitzen eine KD von 10^{-9} - 10^{-12} M. Die KD vom 15B6 wurde am Biacore auf $1,18 \times 10^{-7}$ M bestimmt (Daten von Höning zur Verfügung gestellt). Anhand der Immunpräzipitationsdaten konnte die KD der anderen mAk auf 10^{-8} - 5×10^{-8} M geschätzt werden. Diese mAk gehören nicht zu den hochaffinen Antikörpern.

Um die Wirkung der mAk auf die Ligandbindung zu untersuchen, wurde der MPR 46 mit den mAk im 100-400fachen Überschuß inkubiert und anschließend eine PM-Sepharose-Bindung durchgeführt. Eine direkte Bindung des MPR 46 an die PM-Sepharose betrug circa 70%. Zum Vergleich wurden PM-Sepharose-Bindungen durchgeführt, bei denen der MPR 46 mit einem irrelevanten Antikörper vorinkubiert wurde. 51-93% MPR 46 wurden an die PM-Sepharose gebunden. Die Bindung ohne Antikörper lag also im gleichen Bereich.

Ein mAk zeigte eine nicht-signifikante Inhibition, wenn die Bindung des MPR 46 nicht unter den der Kontrollen (50% PM-Sepharose-Bindung des MPR 46) lag. Z.B. konnte nach der Inkubation mit dem mAk 15A1 noch 61% MPR 46 an die PM-Sepharose binden. Das Epitop der nicht-signifikant inhibierenden Antikörper liegt vermutlich von der Ligandbindungsstelle entfernt.

Eine starke Inhibition der Ligandbindung wurde bei den mAk gezeigt, bei denen zwischen 80-100% MPR 46 im Durchfluß gefunden wurden, also weniger als 20% an die PM-Sepharose gebunden hatte. Beispielsweise konnte der mAk 18C4 10,6% MPR 46 an die PM-Sepharose binden. Ihr Epitop liegt vermutlich in direkter Nähe der Ligandbindungsstelle. Die Antikörper können eine Ligandbindung sterisch inhibieren.

Einige mAk hatten zwischen 20-50% MPR 46 an die PM-Sepharose gebunden. Ein Beispiel ist der 19A4, der 44,8% MPR 46 gebunden hatte. Diese mAk inhibieren die Ligandbindung partiell. Die partielle Inhibition könnte durch eine geringe Affinität eines mAk, dessen Epitop in der Nähe der Ligandbindungsstelle liegt, hervorgerufen werden. Eine weitere Möglichkeit ist, daß das Epitop so weit von der Ligandbindungsstelle entfernt liegt, daß die Hemmung der Ligandbindung nur unvollständig ist. Diese beiden Theorien konnten überprüft werden, indem die gebundenen PM-Sepharose-Fractionen mit zwei unabhängigen Methoden untersucht wurden. Erstens wurden die Antikörper durch indirekte Immunsorption an Pansorbin und zweitens der MPR-Antikörper-Komplex durch Quervernetzung in den Fractionen nachgewiesen. In der ersten Methode wurde direkt aus den Eluatfractionen und dem Durchfluß eine Immunsorption an Pansorbin durchgeführt. Der MPR 46 konnte dabei sowohl im Durchfluß als auch im spezifischen Man6P-Eluat indirekt an Pansorbin gebunden nachgewiesen werden. Das Verhältnis des MPR 46 im Durchfluß zu dem Man6P-Eluat war bei einer TCA-Fällung (gesamt fällbarer MPR 46) entsprechend dem der Immunsorption (antikörpergebundener MPR 46). Der partiell inhibierende Antikörper war also am MPR 46 gebunden, als dieser an die PM-Sepharose gebunden hat. Für die zweite Methode wurden die Proteine im Durchfluß und im Man6P-Eluat quervernetzt. Durch diese Quervernetzung konnten hochmolekulare Aggregate im Durchfluß und im Man6P-Eluat nachgewiesen werden. Diese Aggregate waren größer als die tetramere Form des Rezeptors. Sie sind ein Indiz für die MPR-Antikörper-Komplexe. Die partielle Inhibition bedeutet, daß ihr Epitop so weit von der Ligandbindungsstelle entfernt ist, daß die Hemmung der Ligandbindung unvollständig ist. Unterstützt wird dieses durch die Beobachtung, daß einige mAk, z. B. der 2C5 und der 9D2 (53,2/39,1% Fällung des MPR 46), den Rezeptor nur partiell

immunpräzipitieren konnten, die Ligandbindung aber stark inhibierten (95,2/82,5% MPR 46 im Durchfluß).

Ein Antikörper ist ein großes Molekül und hat deshalb einen weiten Radius, der sterisch auf die Ligandbindung wirken kann. Fraglich war, ob ein kleineres Fragment die Ligandbindung ebenfalls inhibieren kann. Die Antikörper sollten deshalb mit Papain gespalten werden und die F_{ab}-Fragmente in die Inhibition eingesetzt werden. Diese Spaltung erwies sich bei den meisten Isotypen als schwierig, gelang aber für IgG2b und wurde exemplarisch für den 15B6 durchgeführt. Das kleine F_{ab}-Fragment des 15B6 konnte die Ligandbindung ebenso gut inhibieren wie das gesamte Immunglobulin. Die Ligandbindungsstelle liegt vermutlich näher am Epitop. Um die Entfernung des Epitops von der Ligandbindungsstelle weiter zu untersuchen, sollte eine Kokristallisation von MPR 46 und mAk durchgeführt werden.

Von Interesse war inwiefern, die Eigenschaft der mAk, die Ligandbindung stark, partiell oder nicht-signifikant zu hemmen, mit der Lage der Epitope korreliert.

4.2 Epitopkartierung der mAk durch die Maus/Mensch-Chimären und Peptidanalyse

4.2.1 Herstellung der Chimären und Bindung der Chimäre an die PM-Sepharose

Eine Herstellung von MPR 46-Chimären aus Mensch- und Maus-Aminosäuresequenz kam in Frage, weil sämtliche mAk humanspezifisch waren und die Aminosäuresequenzen der luminalen Domäne des MPR 46 sich zwischen Maus und Mensch nur in 16 Aminosäuren unterschieden. Die MPR-46-Chimären enthielten vom N-Terminus beginnend einen zunehmenden Anteil an Maus-Aminosäuresequenz (Abb. 12). Drei Methoden, die zur Herstellung von Chimären genutzt werden können, standen prinzipiell zur Auswahl. Die erste Methode beruht auf der Nutzung von Restriktionsenzymen, jedoch enthält die DNA des MPR 46 keine geeigneten Restriktionsschnittstellen. Die zweite Methode beruht auf der Phosphothioat-Methode (Nakymaye und Eckstein 1986). Hier muß Einzelstrang-DNA präpariert und die chimäre DNA umklont werden, diese Einzelstrangpräparation ist kompliziert und sehr zeitaufwendig. Die dritte Methode war die "QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis", die ich verwendet habe. Sie hat den Vorteil, daß keine Restriktionsschnittstellen benötigt werden, keine Einzelstrang-DNA präpariert werden muß und jeder Vektor verwendet werden kann. Außerdem wird eine Polymerase, die *Pfu*-DNA-Polymerase, verwendet. Sie besitzt im Vergleich zur *Taq*-DNA-Polymerase eine 3'-

5' Exonuklease-Aktivität, dadurch verringert sich die Fehlerrate beim Amplifizieren der DNA. Es wurden in einem DNA-Insert von 834 bp durch 9 Mutagenesen nacheinander je 1-3 Basenpaare ausgetauscht. Insgesamt wurden 16 Basenpaare verändert. Das Insert wurde nach der neunten Mutagenese vollständig sequenziert, es war fehlerfrei.

Nachdem die Chimären in eukaryonte Zellen stabil transfiziert und zur Expression gebracht wurden, wurde die Bindung der chimären MPR 46 an die PM-Sepharose getestet. Durch die Bindung an die PM-Sepharose wurde die Fähigkeit, Liganden zu binden, und die Faltung der chimären MPR 46 überprüft. ³⁵S-markierter MPR 46 aus transfizierten BHK-Zellen wurde bei einem pH-Wert von 7,0 unterschiedlich effizient an die PM-Sepharose gebunden. Die Chimären MM3 und MM4 konnten schlechter an die PM-Sepharose binden, als der humane Rezeptor. Alle anderen chimären Rezeptoren konnten ebensogut wie der humane Rezeptor binden. Der Austausch z.B. von einer basischen zu einer sauren Aminosäure in der Chimäre MM3 oder von einem Lysin zu einem Arginin in der Chimäre MM4 könnten zu einer kleinen Konformationsänderung geführt haben, so daß diese Mutante nicht mehr so effizient an die PM-Sepharose gebunden hat. Weiter könnten die Pufferbedingungen für die Ligandbindung der Chimäre MM3 durch die Ladungsänderung nicht mehr optimal sein. Diese Optimierung der Bindung wurde aus Zeitgründen nicht durchgeführt, denn die aufgereinigte Menge der chimären MPR 46 war ausreichend, um die Epitopanalyse mittels ELISA durchführen zu können. Alle chimären MPR 46 binden an die PM-Sepharose, die Ligandbindungsstelle der Chimären ist somit richtig gefaltet und die Funktionalität der Ligandbindung bestätigt.

4.2.2 Epitopanalyse

Eine standardisierte Menge gereinigter chimärer MPR 46 wurde an ELISA-Platten gebunden, um die Reaktivität der mAk mit den Chimären im Vergleich zum humanen Rezeptor zu testen. Die Standardisierung erfolgte mit dem polyklonalen Antikörper, der gegen die cytoplasmatische Domäne des MPR 46 gerichtet ist. Vorher wurde überprüft, ob die cytoplasmatische Domäne nicht degradiert war. Es wurden peptidspezifische Antikörper (anti-MPR 46 242-251, 223-237, 211-227, 186-200) gegen die cytoplasmatische Domäne eingesetzt. Die peptidspezifischen Antikörper decken die gesamte cytoplasmatische Domäne (Aminosäuren 185-252) des MPR 46 ab und konnten alle den MPR 46 detektierten. Ihre Bindung war sogar in einigen Fällen besser als die des polyklonalen Antikörpers, der gegen die cytoplasmatische Domäne gerichtet ist (die Werte wurden nicht gezeigt). Die cytoplasmatische Domäne war also intakt, der MPR 46 konnte mit dem polyklonalen Antikörper standardisiert werden.

Es wurde für fast alle Bereiche der luminalen Domäne des MPR 46, in denen Aminosäuren ausgetauscht wurden, mAk gefunden, die diese als postuliertes Epitop haben. Einige mAk zeigten bei der Analyse der Chimären einen deutlichen Abbruch der Erkennung der chimären MPR 46 nach einer bestimmten Mutation. Sie erkannten einen chimären MPR 46 noch gut und den nächsten chimären MPR 46 gering, d.h. nur noch unter 5%. Diese mAk besitzen ihr Epitop bei der abbrechenden Chimäre, z.B. erkannte der 15A1 die Chimäre MM1, aber nicht mehr die Chimäre MM2. In der Chimäre MM2 wurden die humanen Aminosäuren 13, 17 und 18 gegen Maus-Aminosäuren ausgetauscht, der mAk hat sein potentielles Epitop um den Aminosäurebereich 13-18. Die ELISA-Daten ergaben aber nicht bei allen mAk ein eindeutigen Abbruch der Erkennung der chimären MPR 46. Sie zeigten für mehrere Chimären ein Signal von 5-20% und erst danach einen Abbruch der Erkennung der chimären MPR 46. Ihnen wurde ein größerer Aminosäurebereich als potentielles Epitop zugewiesen (z.B. 11B6 mit dem Aminosäurebereich 13-27). Ein Epitop kann eine Größe von 6 bis 15 Aminosäuren haben (Klein 1991), deshalb könnte der gesamte Aminosäurebereich als Epitop gelten. Möglicherweise ist das potentielle Epitop aber auch nur ein Teil des oben genannten Aminosäurebereichs dieser mAk.

Die ELISA-Daten der chimären MPR 46 zeigten, daß einige mAk eine sehr gute Reaktivität für den chimären MPR 46-MM4 besaßen. Diese gute Reaktivität könnte durch den Austausch von Lysin zu Arginin verursacht worden sein. Es könnte zu einer Konformationsänderung gekommen sein, bei der die Struktur dieses Aminosäurebereichs besser exponiert sein könnte. Die Chimären MM5 und MM6 zeigten nach einem oft erhöhten Signal der Chimäre MM4 ein niedriges Signal. Diese niedrigen Signale wurden als relevant betrachtet, wenn die Bindung der mAk an die Chimären über 20% lag. Dieser Wert ist so aufgrund der Meßergebnisse gewählt, es kann jedoch nicht ganz sicher ausgeschlossen werden, daß der Abbruch der chimären MPR-Erkennung in einigen Fällen vielleicht doch schon früher erfolgt.

Die Einteilung der mAk auf bestimmte Epitope sollte durch Peptidanalyse bestätigt werden. Dafür mußte zunächst getestet werden, ob die mAk einen reduzierten und alkylierten Rezeptor erkennen. Dieses würde bedeuten, daß sie eine linearisierte Aminosäuresequenz erkennen würden. Die Antikörper, die ihr Epitop im vorderen Bereich der luminalen Domäne besitzen (Aminosäure 13-27) konnten schon im Westernblot den reduzierten MPR 46 nicht erkennen. Sie besitzen vermutlich ein diskontinuierliches Epitop. Von den 28 anderen mAk konnten 14 den reduzierten und alkylierten MPR 46 erkennen. Diese Antikörper konnten für die Peptidanalyse genutzt werden.

Es sollte eine Auswahl von Peptiden anhand der 3-D-Struktur der luminalen Domäne des bovinen MPR 46, die am Ende meiner Arbeit veröffentlicht wurde (Roberts *et al.* 1998), getroffen werden. Die Epitope um Aminosäure 46, Aminosäuren 56-59 und Aminosäure 72 waren für uns von Interesse. Anhand der Domänenaufteilung der Struktur wurden drei Peptide ausgewählt, dazu gehören die Peptide 38-51, 64-76 und ein Peptid, das u.a. die Aminosäuren 56-59 enthält. Die Domänenstruktur und die Lage der Cysteine wurde berücksichtigt, um mögliche Faltungsprobleme des Peptids zu vermeiden. Es wurde deshalb möglichst immer eine gesamte Domäne, z.B. β -Faltblattstruktur, ausgewählt. Außerdem wurden die Aminosäuresequenzen so gesetzt, daß keine Cysteine in der Peptidsequenz enthalten waren. Das Peptid mit den Aminosäuren 56-59 enthält jedoch eine genutzte N-Glykosylierungsstelle (Wendland *et al.* 1991a); synthetische Peptide sind dagegen unglykosyliert.

Die mAk wurden deshalb auf ihre Tauglichkeit, den nicht-glykosylierten, reduzierten und alkylierten MPR 46 zu erkennen, getestet. Vier mAk mit den postulierten Epitopen 56-59 und 56-72 erkannten eine lineare Aminosäuresequenz, drei von ihnen (15C5, 27A5 und 30A3) erkannten den nicht-glykosylierten Rezeptor nicht. Dieses könnte ein Hinweis auf ihr postuliertes Epitop um die Aminosäuren 56-59 bzw. 56-72 sein, denn sie benötigen die Glykosylierung für ihre Epitoperkennung. Der mAk 19A4 erkannte den nicht-glykosylierten Rezeptor, dieser hat vermutlich eher sein Epitop bei Aminosäure 72. Eine endgültige Festlegung des Epitops wäre somit eher mit einem glykosylierten Peptid möglich, welches aber nicht zur Verfügung stand. Die mAk 11B2 mit dem Epitop, welches die Aminosäure 46 enthält, und 10B1, 15B6, 18C4, 26A3, 26D6 mit dem Epitop, welches die Aminosäure 72 enthält, erkannten den nicht-glykosylierten Rezeptor, benötigen demnach keine Glykosylierung. Dieses ist ein zusätzlicher Hinweis, der ihr mögliches Epitop bestätigt, da diese keine Glykosylierungsstellen enthalten.

Die biotinylierten Peptide 38-51 und 64-76 wurden im ELISA getestet. Die ELISA-Platten wurden mit Neutravidin beschichtet, die Peptide gebunden und die Bindung der mAk an die Peptide untersucht. Nur ein Antikörper, der 15B6, zeigte ein starkes Signal für das Peptid 38-51. Der Grund, daß alle anderen mAk keines der beiden Peptide erkannten, könnte sein, daß sie ein anderes oder gegebenenfalls diskontinuierliches Epitop besitzen oder die Faltung des Peptids nicht stimmt. Die Peptide wurden zwar sorgfältig anhand der Domänenstruktur und der Lage der Cysteine ausgewählt, trotzdem könnten Probleme mit der Faltung der Peptide auftreten, wenn z.B. weitere räumliche Strukturen für die Faltung notwendig sind.

Der mAk 15B6 erkannte das Peptid 38-51 im ELISA. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Epitopkartierung der Chimärenanalyse, dort haben wir dem mAk 15B6 das potentielle

Epitop um die Aminosäure 72 zugeschrieben. Diese Daten der Epitopkartierung der chimären MPR 46 und der Peptidanalyse müssen kritisch betrachtet werden. Für den ersten Punkt stellte sich die Frage, wie die Abnahme des Signals nach dem chimären MPR-46-MM4 zu bewerten ist. Die Signalstärke des mAk 15B6 für die Chimären MM5 und MM6 liegt über 20% und die Abnahme des Signals von den chimären MPR-46-MM5 und -MM6 erbrachte eine Verringerung um ein Drittel des Signals der Chimäre 4. Folglich ist die Signalstärke gut auswertbar und der Signalabfall nicht so stark, daß die Signale nicht beachtet werden sollten. Die Peptidanalyse im ELISA ergab immer sehr gute Signale für das Peptid 38-51 und immer sehr schwache Signale für das Peptid 64-72. Letztere Werte waren zu schwach, um signifikant ausgewertet werden zu können. Eine Erklärung könnte sein, daß dieser Antikörper ein sehr großes und diskontinuierliches Epitop besitzt. Da der mAk 15B6 einen reduzierten und alkylierten Rezeptor erkennt, muß auf jeden Fall ein großer Teilbereich des Epitops eine lineare Aminosäuresequenz sein, sie könnte einen Teil des Peptids 38-51 enthalten. Dieser Teil des Epitops muß ausreichend sein, um von dem mAk 15B6 detektiert werden zu können. Der fehlende Teil des Epitops könnte die Aminosäure 72 enthalten und ausreichend sein um im ELISA den chimären MPR-46-MM6 detektieren zu können. Es wären also beide Aminosäurebereiche, um die Aminosäure 46 und um die Aminosäure 72, notwendig, um das Epitop des 15B6 zu bilden. Die Aminosäurebereiche mit den Aminosäuren 46 und 72 liegen außerdem im 3-D-Modell nahe nebeneinander (Abb. 25, Pfeil). Die Erklärung eines diskontinuierlichen Epitops für den mAk 15B6, der sein Epitop bei der Chimärenkartierung bei der Aminosäure 72 und nach Peptidanalyse bei der Aminosäure 46 hat, käme durch diese direkte Nachbarschaft der Aminosäurebereiche in Betracht.

4.3 Korrelation der Inhibitionsdaten und der Epitopkartierung

Die Daten aus den Inhibitionsversuchen und der Epitopkartierung sollten mit einer dreidimensionalen Struktur des MPR 46 korreliert werden. Es wurde daher ein Insektenzelleexpressionssystem optimiert, um die luminalen Domäne des humanen MPR 46 zu exprimieren. Aus Institutsbeständen wurde ein Baculovirus mit der DNA der luminalen Domäne des MPR 46 genutzt (erhalten von Prof. Dr. R. Pohlmann und Dr. J. Landgrebe). Der Baculovirus wurde zur Infektion der Insektenzellen eingesetzt, die schließlich den löslichen Rezeptor produzierten und ins Medium abgaben. Es wurden nach der Optimierung mg-Mengen löslicher Rezeptor aufgereinigt. Dieser wurde in Kristallographiestudien eingesetzt.

Durch die Mikroheterogenität des Rezeptors wurden keine Kristalle erhalten. Am Ende meiner Arbeit veröffentlichten Roberts *et al.* (1998) die dreidimensionale Struktur der luminalen Domäne des bovinen MPR 46. Diese Gruppe kristallisierte einen nicht vollständig glykosylierten Rezeptor. Er war nur am Asparagin 87 glykosyliert (Abb. 25), die anderen vier Asparagine wurden gegen Glutamat substituiert. Die Heterogenität dieses Rezeptors war demnach geringer. Ich nutze nun die dreidimensionale Struktur für die Interpretation meiner Inhibitions- und Epitopkartierungsdaten.

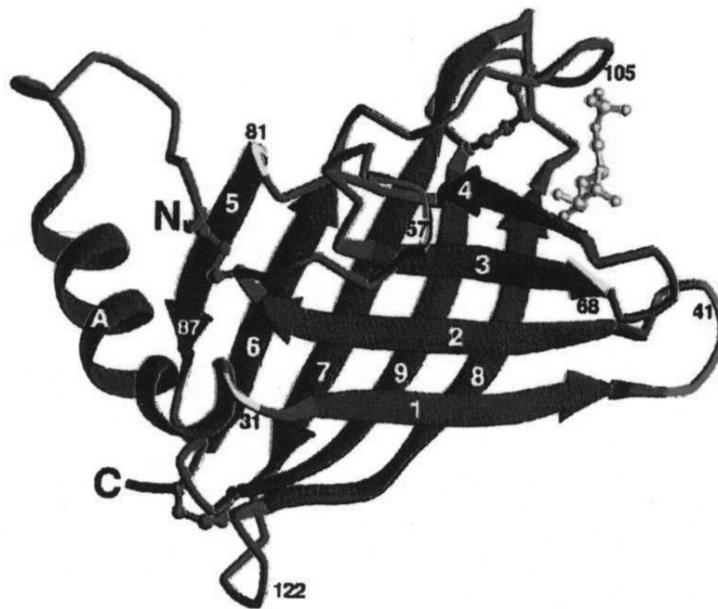


Abb. 25: Dreidimensionale Struktur der extracytoplasmatischen Domäne des bovinen MPR 46 mit 4 Substitutionen der Asn zu Glu (Roberts *et al.* 1998)

Die β -Faltblätter sind als Pfeile und die α -Helix als Zylinder dargestellt. Die Numerierung bezieht sich auf die reife Proteinsequenz. Die β -Faltblattstrukturen sind vom N-Terminus numeriert und beginnen mit 1, die α -Helix ist mit A gekennzeichnet. Die Disulfidbrücken sind als grüne Ball-Stock-Modelle dargestellt. Die fünf potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind als gelbe Streifen dargestellt. Das Mannose-6-phosphat ist als goldenes Ball-Stock-Modell abgebildet. Die pinkfarbene Schleife besitzt eine andere Elektronendichte als die anderen Strukturen. Der Pfeil zeigt auf die Schleife, die die Aminosäure 72 enthält, und das β -Faltblatt, das die Aminosäure 46 beinhaltet.

Das Epitop um die Aminosäure 72 befindet sich am Ende der Schleife zwischen dem dritten und vierten β -Faltblatt. Dieses Epitop enthält keine wichtigen Aminosäuren für die Ligandbindung, erst die Aminosäure 66 bildet eine Wasserstoffbrücke zum Mannosering. Aber diese Schleife liegt nach dem Modell in direkter Nähe des Mannose-6-Phosphats des Liganden, deshalb konnten die Antikörper dieser Gruppe die Ligandbindung stark inhibieren.

Das Epitop um die Aminosäure 46 befindet sich am Anfang der zweiten β -Faltblattstruktur. In direkter Nachbarschaft liegt das Tyrosin 45, welches eine Wasserstoffbrücke zum Mannosering herstellt und außerdem auf einer flexiblen Position liegt. Das Tyrosin bindet aber nicht an die Phosphat-Gruppe des Mannose-6-Phosphats, deshalb könnten diese mAk partiell die Ligandbindung inhibieren.

Das Epitop mit den Aminosäuren 56-59 befindet sich auf der Schleife zwischen dem zweiten und dritten β -Faltblatt, welches nach dem Modell nicht in der Nähe der Ligandbindungsstelle liegt. Hier befinden sich keine wichtigen Aminosäuren, die in Wechselwirkung mit der Mannose stehen. Erst die Aminosäure 66 bildet wieder eine Wasserstoffbrücke zum Mannosering. Die mAk mit dem postulierten Epitop um die Aminosäuren 56-59 können die Ligandbindung nicht signifikant, partiell und stark inhibieren. Die Erklärung liegt vermutlich darin, daß die mAk mehr oder weniger stark in Richtung Aminosäure 66 ihr Epitop haben und damit die Ligandbindung in unterschiedlichem Ausmaß sterisch beeinflussen können. Durch die fehlende Glykosylierung in dem 3-D-Modell ist diese Erklärung nur begrenzt gültig. Eine Glykosylierung könnte die räumliche Struktur verändern.

Die mAk mit den Epitopen 13-18,13-24 und 13-27 der luminalen Domäne konnten im Westernblot nicht den reduzierten Rezeptor detektieren. Sie besitzen vermutlich ein diskontinuierliches Epitop. In diese Gruppe gehören nicht-signifikant, partiell und stark inhibierende mAk. Die Epitope befinden sich nach dem 3-D-Modell vor der α -Helix oder im Bereich der α -Helix, die auf der abgewandten Seite der Ligandbindungsstelle liegt. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, daß die mAk nicht die Ligandbindungsstelle derselben Untereinheit inhibieren. Da sie aber vermutlich ein konformationsspezifisches Epitop besitzen, kann der Antikörper auch an anderen Stellen des MPR 46 binden und somit die Ligandbindung inhibieren. Zur Erklärung einer sterischen Inhibition durch mAk, die im Bereich 13-27 binden, käme z.B. das Dimer in Betracht. Die Monomere sind nach Roberts *et al.* (1998) so zusammengelagert, daß die Ligandbindungsstellen jedes Monomers nach außen zeigen, wobei die eine unten und die andere oben im Dimer liegt. Auf der abgewandten Seite befindet sich jeweils die Helix, d.h. die Ligandbindungsstelle des einen Rezeptors liegt neben der Helix des zweiten Monomers. Deshalb könnte ein mAk die Ligandbindung stark oder partiell inhibieren (z.B. 9D2 und 10C3).

Der mAk 25D5 erkennt alle chimären MPR 46. Sein Epitop liegt nach der Aminosäure 126, also am Ende der luminalen Domäne. In der Immunsorption erkannte der mAk 25D5 den löslichen Rezeptor besser als den Rezeptor mit dem Membrananker und der cytoplasmatischen Domäne. Er könnte also gut am Ende der luminalen Domäne binden. Das

Epitop befindet sich weit entfernt von wichtigen Aminosäuren, wie z. B. Arg 111 und His 105. Der Antikörper kann vermutlich deswegen auch nicht signifikant inhibieren. Das 3-D-Modell ist für diesen Antikörper limitierend, da nur die luminaire Domäne kristallisiert wurde und deshalb kein Membrananker vorhanden ist.

Sobald die Computerdaten von den Datenbanken freigegeben werden, sollen die Epitope in dreidimensionaler Sicht auf ihre Nähe zur Ligandbindungsstelle analysiert werden. Außerdem sollten die Antikörper in das Computerprogramm integriert werden, damit erkannt werden kann, wie weit der Radius der Antikörper ist, um die Ligandbindung sterisch beeinflussen zu können.

Die Einteilung der mAk bezüglich der Inhibition der Ligandbindung und der postulierten Epitope wurde durch die dreidimensionale Struktur im großen und ganzen bestätigt. Die Chimärenanalyse führte also zu einem aussagekräftigen Ergebnis.

5 Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper gegen die luminal Domäne des MPR 46 wurden auf ihre inhibitorische Wirkung der Ligandbindung des MPR 46 untersucht. Die mAk reagierten mit der humanen Aminosäuresequenz; nicht jedoch mit der Maus-Aminosäuresequenz. Deshalb konnte für die Epitopkartierung die Reaktivität der mAk mit Maus-/Mensch-Chimären des MPR 46 getestet werden. Die postulierten Epitope und die Hemmung der Ligandbindung wurden mit der Ligandbindungsstelle aus dem kürzlich veröffentlichten 3-D-Modell der luminalen Domäne der MPR 46 verglichen.

Der Bereich um die Aminosäure 72 liegt von allen Epitopen, die durch mAk erkannt wurden, dem Mannosering des Liganden am nächsten. Nach der Chimärenanalyse haben hier acht mAk gebunden, von denen sieben die Ligandbindung stark hemmten. Der mAk 15B6, der in diesem Bereich gebunden hat, hemmte die Ligandbindung partiell. Das Epitop um die Aminosäuren 46 befindet sich auf der Schleife zwischen dem ersten und zweiten β -Faltblatt. Das benachbarte Tyrosin 45 bildet eine Wasserstoffbrücke zum Mannosering des Liganden. Von vier mAk, die dieses Epitop erkennen, hemmten drei die Ligandbindung partiell, einer stark. Auf der Schleife zwischen dem zweiten und dritten β -Faltblatt liegt das Epitop um die Aminosäuren 56-59. Entsprechend der relativ großen Entfernung zur Ligandbindungsstelle zeigte nur ein Teil der hier bindenden mAk eine inhibitorische Wirkung. Das Epitop um die Aminosäuren 13-27 liegt vor und auf einer α -Helix, welche sich auf der zur Ligandbindungsstelle abgewandten Seite befindet. Die mAk, die dieses Epitop erkennen, zeigten einen heterogenen Effekt bezüglich der Hemmwirkung. Die Hemmwirkung der mAk korreliert also im großen und ganzen mit der Lage der postulierten Epitope in Bezug zur Ligandbindungsstelle.

Einzig der mAk 15B6 konnte von 14 mAk, die einen reduzierten und alkylierten Rezeptor erkannten, ein Peptid erkennen. Der mAk 15B6 erkannte das Peptid 38-51, wohingegen die Analyse der Chimären auf ein Epitop um die Aminosäure 72 hinweist. Da diese beiden Aminosäurebereiche im 3-D-Modell direkt nebeneinander liegen, könnte der mAk 15B6 ein großes, diskontinuierliches Epitop besitzen. Das Epitop um die Aminosäuren 56-59 enthält eine Zuckerseitenkette. Die mAk 15C5, 27A5 und 30A3 mit diesem postulierten Epitop erkannten nicht den nicht-glykosylierten, reduzierten und alkylierten Rezeptor, woraus ein zusätzlicher Hinweis für ihr Epitop resultiert.

6 Literaturverzeichnis

- Ahle, S., Mann, A., Eichelsbacher, U. and Ungewickell, E. (1988): Structural relationships between clathrin assembly protein from the Golgi and the plasma membrane. *EMBO J.* **7**: 919-929.
- Ahle, S. and Ungewickell, E. (1989): Identification of a clathrin subunit in the HA 2 adaptor protein complex. *J. Biol. Chem.* **264**, 20089-20093.
- Ansorge, W. (1985): Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **11**, 13-25.
- Artelt, P., Morelle, C., Ausmeier, M., Fitzek, M., Hauser, H. (1988): Vectors for expression in mammalian fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection. *Gene* **68**, 213-219.
- Bansal, A. and Gierasch, L. M. (1991): The NPXY *internalization* signal of the LDL receptor adopts a reverse-turn conformation. *Cell* **67**, 1195-1201.
- Beltzer, J. P. and Spiess, M. (1991): In vitro binding of the asialoglycoprotein receptor to the β adaptin of plasma membrane coated vesicles. *EMBO J.* **10**, 3735-3742.
- Bleekemolen, J. E., Stein, M., von Figura, K., Slot, J. W., Geuze, H. J. (1988): The two mannose 6-phosphate receptors have almost identical subcellular distribution in U937 monocytes. *Eur. J. Cell Biol.* **47**, 366-372.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brown, W. J., Goodhouse, J., Farquhar, M. G. (1986): Mannose 6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between Golgi complex and endosomes. *J. Cell Biol.* **103**, 1235-1247.
- Campbell, C., Fine, R. E., Squicciarini, J. and Rome, R. L. (1983): Coated vesicles from rat liver and calf brain contain cryptic mannose 6-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* **258**, 2628-2633.
- Chao, H., Waheed, A., Pohlmann, R., Hille, A., von Figura, K. (1990): Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes. *EMBO J.* **9**, 3507-3513.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.* **7**(8), 2745-2752.
- Chen, H. J., Yuan, J., Lobel, P. (1997): Systematic mutational analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor cytoplasmic tails. *J. Biol. Chem.* **272**, 3116-3123.

- Creek, K. E. and Sly, W. S. (1983): Biosynthesis and turnover of the phosphomannosyl receptor in human fibroblasts. *Biochem. J.* **214**, 353-360.
- Cuppoletti, J., Aures-Fischer, D., Sachse G. (1987): The lysosomal H⁺-pump: 8-azido-ATP inhibition and the role of chloride in H⁺-transport. *Biochem. Biophys. Acta* **899**, 276-284.
- Dahms, N. M., Lobel, P., Breitmeyer, J., Chirgwin, J. M. and Kornfeld, S. (1987): 46 kDa mannose 6-phosphate receptor; cloning, expression and homology to the 215 kDa mannose 6-phosphate receptor. *Cell* **50**, 181-192.
- Dahms, N. M., Lobel, P., Kornfeld, S. (1989): Mannose-6-phosphat receptors and lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* **264**, 121115-12118.
- Dahms, N. M. and Kornfeld, S. (1989): The cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Structural requirements for mannose 6-phosphate binding and oligomerization. *J. Biol. Chem.* **264**, 11458-11467.
- Denzer, K., Weber, B., Hille-Rehfeld, A., von Figura, K., Pohlmann, R. (1997): Identification of three internalization sequences in the cytoplasmic tail of the 46 kDa mannose 6-phosphat receptor. *Biochem. J.* **326**, 497-505.
- Diesner, F., Sommerlade, H.-J., Braulke, T. (1993): Transport of newly synthesized arylsulfatase A to the lysosome via transferrin receptor-positive compartment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 1-7.
- Distler, J. J., Guo, J. F., Jourdian, G. W., Srivastava, O. P. Hindsgaul, O. (1991): The binding specificity of high and low molecular weight phosphomannosyl receptors from bovine testes. Inhibition studies with chemically synthesized 6-O-phosphorylated oligomannosides. *J. Biol. Chem.* **266**, 21687-21692.
- Eberle, W., Sander, C., Klaus, W., Schmidt, B. von Figura, K. and Peters, C. (1991): The essential tyrosine of the internalization signal in lysosomal acid phosphatase is part of a β turn *Cell* **67**, 1203-1209.
- Gabel, C. A., Goldberg, D. E. and Kornfeld, S. (1983): Identification and characterization of cells deficient in the mannose 6-phosphate receptor: evidence for an alternate pathway for lysosomal enzyme targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 775-779.
- Gallusser, A. and Kirchhausen, T. (1993): The β 1 and β 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J.* **12**, 5237-5344.
- Gartung, C., Braulke, T., Hasilik, A., von Figura, K. (1985): internalization of blocking antibodies against mannose 6-phosphate specific receptors. *EMBO J.* **4**, 1725-1730.
- Geuze, H. J., Slot, J. W., Strous, G. J. A. M. , Hasilik, A., von Figura, K. (1985): Possible pathways for lysosomal enzyme delivery. *J. Cell Biol.* **101**, 2253-2262.
- Geuze, H. J., Stoorvogel, W., Strous, G. J. A. M. , Slot, J. W., Zijderhand-Bleekemolen, J., Mellmann, I. (1989): Sorting of mannose 6-phosphate receptors and lysosomal membrane proteins in endocytic vesicles. *J. Cell Biol.* **107**, 2491-2501.

- Griffith, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I., Kornfeld, S. (1988): The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* **52**, 329-341.
- Hanahan, D. (1983): Studies of transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 552-580.
- Hasilik, A., Klein, U., Waheed, A., Strecker, G. and von Figura, K. (1980): Phosphorylated oligosaccharides in lysosomal enzymes: Identification of α -N-acetylglucosamine(1)phospho(6)mannose diester groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7074-7078.
- Helling, R. B., Goodman, H. M. and Boyer, H. M. (1974): Analysis of endonuclease *EcoRI* fragments of DNA from lamboid bacteriophages and other viruses by agarosegel electrophoresis. *J. Virol.* **14**, 1235-1244.
- Hemer, F., Körner, C. and Braulke, T. (1993): Phosphorylation of the human 46-kDa mannose 6-phosphate receptor in the cytoplasmic domain at serine 56. *J. Biol. Chem.* **268**, 17108-17113.
- Hickmann, S. and Neufeld, E. F. (1972): A hypothesis for I-cell disease: Defective hydrolases that do not enter lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 992-999.
- Hille, A., Waheed, A. and von Figura, K. (1989): The Ligand-binding Conformation of M_r 46,000 Mannose 6-Phosphate-specific Receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 13460-13467.
- Hille, A., Waheed, A. and von Figura, K. (1990): Assembly of the Ligand-binding Conformation of M_r 46,000 Mannose 6-Phosphate-specific Receptor Takes Place before Reaching the Golgi Complex. *J. Cell Biol.* **110**, 963-972.
- Hille, A., Klumperman, J., Geuze, H. J., Peters, C., Brodsky, F. M., von Figura, K. (1992): Lysosomal acid phosphatase is internalized via clathrin-coated pits. *Eur. J. Cell Biol.* **59**, 106-115.
- Hille-Rehfeld, A. (1995): Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *BBA* **1241**, 177-194.
- Hinners, I., Moschner, J., Nolte, N., Hille-Rehfeld, A. (1998): The orientation of membrane proteins determined in situ by immunofluorescence staining. *Experimental cell research*, eingereicht.
- Hinshaw, J. E. and Schmid, S. L. (1995): Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190-192.
- Höning, S., Sosa, M., Hille-Rehfeld, A. and von Figura, K. (1997): The 46-kDa Mannose 6-Phosphate Receptor Contains Multiple Binding Sites for Clathrin Adaptors: *J. Biol. Chem.* **272**, 19884-19890.

- Hoflack, B. and Kornfeld, S. (1985): Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P338D1 macrophages and bovine liver. *J. Biol. Chem.* **260**, 12008-12014.
- Hoflack, B., Fujimoto, K. and Kornfeld, S. (1987): The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **262**, 123-129.
- Jahn, R., Schiebeler, W., Greencard, P. (1984): A quantitative dot-immunobinding assay for proteins using nitrocellulose membrane filters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1684-1687.
- Johnson, F. K., Chan, W. and Kornfeld, S. (1990): Cation-dependent mannose 6-phosphate receptor contains two internalization signals in its cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 10010-10014.
- Johnson, K. F. and Kornfeld, S. (1992): A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mouse mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function. *J. Biol. Chem.* **267**, 17110-17115.
- Junghans, U., Waheed, A. and von Figura, K. (1988): The "cation-dependent" mannose 6-phosphate receptor binds ligands in the absence of divalent cations. *FEBS Lett.* **237**, 81-87.
- Kasper, D., Dittmer, F., von Figura, K. and Pohlmann, R. (1996): Neither type of mannose-6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes. *J. Cell Biol.* **134**, 615-623.
- Klein, J. (1991): Immunologie. VCH Verlagsgesellschaft mbH
- Klier, H. J., von Figura, K., Pohlmann, R. (1991): Isolation and analysis of the human 46-kDa mannose 6-phosphate receptor gene. *Eur. J. Biochem.* **197**, 23-28.
- Klumperman, J., Hille, A., Veenendaal, T., Oorschot, V., Stoorvogel, W., von Figura, K., Geuze, H. J. (1993): Differences in the endosomal distribution of the two mannose 6-phosphate receptors. *J. Cell Biol.* **121**, 997-1010.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497.
- Körner, C., Herzog, A., Weber, B., Rosorius, O., Hemer, F., Schmidt, B. and Bräulke, T. (1994): In vitro phosphorylation of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **269**, 16529-16532.
- Kornfeld, S. and Mellman, I. (1989): The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 307-330.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985): Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
- Köster, A., Nagel, G., von Figura, K., Pohlmann, R. (1991): Molecular cloning of the mouse-46 kDa mannose 6-phosphate receptor (MPR 46). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **372**, 297-300.

- Ktistakis, N. T., Thomas, D. and Roth, M. G. (1990): Characteristics of the tyrosine recognition signal for internalization of transmembrane surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* **111**, 1393-1407.
- Laemmli, U. K.. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lazzarino, D. A. and Gabel C. A. (1988): Biosynthesis of the mannose 6-phosphate recognition marker in transport-impaired mouse lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 10118-10126.
- Le Borgne, R., Griffiths, G. and Hoflack, B. (1996): Mannose 6-phosphate receptors and ADP-ribosylation factors cooperate for high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with membranes. *J. Biol. Chem.* **271**, 2162-2170.
- Lemansky, P.; Gieselmann, V., Hasilik, A. und von Figura, K. (1984): Cathepsin D and β -hexoaminidase synthesized in the presence of 1-deoxynojirimycin accumulate in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **259**, 10125-10135.
- Lemansky, P., Gieselmann, V., Hasilik, A., von Figura, K. (1985): Synthesis and transport of lysosomal acid phosphatase in normal and I-cell fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **260**, 9023-9030.
- Lemansky, P., Hasilik, A., von Figura, K., Helmy, S. and Fishman, J. (1987): Lysosomal enzyme precursors in coated vesicles derived from the exocytotic and endocytotic pathways. *J. Cell Biol.* **104**, 1743-1748.
- Lobel, P., Dahms, N. M., Breitmeyer, J., Chirgwin, J. M. and Kornfeld, S. (1987): Cloning of bovine 215 kDa cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2233-2237.
- Lobel, P., Dahms, N. M., Kornfeld, S. (1988): Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **263**, 2563-2570.
- Ludwig, T., R  ther, U., Metzger, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Lobel, P. and Hoflack, B. (1992): Gene and Pseudogene of the Mouse Cation-dependent Mannose 6-Phosphate Receptor. *J. Biol. Chem.* **267**, 12211-12219.
- Ma, Z. M., Grubb, J. H and Sly, W. S. (1991): Cloning, sequencing and functional characterization of the murine 46 kDa mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 10589-10595.
- MacDonald, R. G., Pfeffer, S. R., Coussens, L., Tepper, M. A., Brocklebank, C. M., Mole, J. E., Anderson, J. K., Chen, E., Czech, M. P., Ullrich, A. (1988): A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose 6-phosphate. *Science* **239**, 1134-1137.
- Macpherson, I. A. and Stoker, M. G. P. (1962): *J. Virology* **16**, 147-152.

- Mainferme, F., Wattiaux, R. and von Figura, K. (1985): Synthesis, transport and processing of cathepsin C in Morris hepatoma 7777 cells and rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **153**, 211-216.
- Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L. and Plummer, T. H. (1989): Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.* **180**, 195-205.
- Matovcik, L. M., Goodhouse, J., Farquhar, M. G. (1990): The recycling itinerary of the 46 kDa mannose 6-phosphate receptor-Golgi to late endosomes-coincides with that of the 215 kDa M6PR. *Eur. J. Cell Biol.* **53**, 203-211.
- Mauxion, F., Le Borgne, R., Munier-Lehmann, H. and Hoflack, B., (1996): A casein kinase II phosphorylation site in the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor determines the high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with the membrane. *J. Biol. Chem.* **271**, 2171-2178.
- Milstein, C. (1980): Monoklonale Antikörper. *Spektrum der Wissenschaft* **12**, 96-108.
- Morgan, D. O., Edman, J. C., Standring, D. N., Fried, V. A., Smith, M. C., Roth, R. A., Rutter, W. J. (1987): Insulin-like growth factor II as a multifunctional binding protein. *Nature* **329**, 301-307.
- Mortensen, R. M., Zubiaur, M., Neer, E. J., Seidman, J. G. (1991): Embryonic stem cells lacking a functional inhibitory G-protein subunit (α_2) produced by gene targeting of both alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7036-7040.
- Motta, A., Bremnes, B., Morelli, M. A., Frank, R. W., Saviano, G. and Bakke, O. (1995): Structure-activity relationship of the leucine-based sorting motifs in the cytosolic tail of the major histocompatibility complex-associated invariant chain. *J. Biol. Chem.* **270**, 27165-27171.
- Munier-Lehmann, H., Mauxion, F., Bauer, U., Lobel, P. and Hoflack, B. (1996): Re-expression of the Mannose 6-Phosphate Receptors in Receptor-deficient Fibroblasts. Complementary function of the two Mannose6-Phosphate Receptors in lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* **271**, 15166-15174.
- Nadimpalli, S. K., Schmidt, B., von Figura, K. and Hille, A. (1991): Antibodies against the cytoplasmic tail can differentiate between the quaternary forms of the M_r 46,000 mannose 6-phosphate receptor. *FEBS Lett.* **280**, 61-64.
- Neufeld, E. F., Lim, T. W., Shapiro, L. (1975): Disorders of lysosomal metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 357-376.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., Sugino, Y. (1990): A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6169.
- Ohno, H., Stewart, J. Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., Bonifacino, J. S. (1995): Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**, 1872-1875.

- Okhuma, S. and Poole, B. (1978): Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3327-3331.
- Oshima, A., Nolan, C. M., Kyle, J. W., Grubb, J. H., Sly, W. S. (1988): The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor: cloning and sequence of the full length cDNA and expression of functional receptor in Cos cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 2553-2562.
- Pearse, B. M. F. and Robinson, M. S. (1990): Clathrin, adaptors and sorting. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 151-171.
- Peterson, G. L. (1979): A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. *Anal. Biochem.* **100**, 201-220:
- Pohlmann, R., Nagel, G., Schmidt, B., Stein, M., Lorkowski, G., Krentler, C., Cully, J., Meyer, H. E., Grzeschik, K. H., Mersmann, G., Hasilik, A. and von Figura, K. (1987): Cloning of a cDNA encoding the human cation-dependent mannose 6-phosphate specific receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5575-5579.
- Pohlmann, R., Wendland, M., Böker, C., von Figura, K. (1995): The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 27311-27318.
- Pond, L. Kuhn, L. A., Teyton, L., Schutze, M.-P., Tainer, J. A., Jackson, M. R. and Peterson, P. A. (1995): A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 27311-27318.
- Punnonen, E.-L., Wilke, T., von Figura, K. and Hille-Rehfeld, A. (1996): Oligomeric state of 46 kDa mannose 6-phosphate receptor does not change upon intracellular recycling and binding of ligand. *Eur. J. Biochem.* **237**, 809-818.
- Reitmann, M. L. and Kornfeld, S. (1981): Lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* **256**, 11977-11980.
- Roberts, D. L., Weix, D. J., Dahms, N. M. and Jung-Ja, P. K. (1998): Molecular Basis of lysosomal Enzyme Recognition: Three-Dimensional Structure of the Cation-Dependent Mannose 6-Phosphate Receptor. *Cell* **93**, 639-648.
- Rohrer, J., Schweizer, A., Johnson, K. F. and Kornfeld, S. (1995): A determinant in the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor prevents trafficking to lysosomes. *J. Cell. Biol.* **130**, 1297-1306.
- Sahagian, G. G., Distler, J., Jourdian, G. W. (1981): Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular β -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **78**, 4289-4293.
- Sahagian, G. G. and Neufeld, E. F. (1983): Biosynthesis and turnover of the mannose 6-phosphate receptor in cultured chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **258**, 7121-7128.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H. Stoffel, S., Scharf, S. J. , Higuchi, R., Horn. G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual (Second edition). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sandoval, I. V. and Bakke, O. (1994): Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol.* **4**, 292-297.
- Sanger, S., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc, Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schulze-Garg, C., Böker, C., Nadimpalli, S., von Figura, K. and Hille-Rehfeld, A. (1993): Tail-specific antibodies that block return of M_r 46,000 mannose 6-phosphate receptor to the trans Golgi network. *J. Cell Biol.* **122**, 541-551.
- Schweizer, A. Kornfeld, S. and Rohrer, J. (1996): Cysteine 34 of the cytoplasmic tail of the cation dependent mannose-6-phosphate receptor is reversibly palmitoylated and required for normal trafficking and lysosomal enzyme sorting. *J. Cell. Biol.* **132**, 577-584.
- Schweizer, A, Kornfeld S. and Rohrer, J. (1997): Proper sorting of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor in endosomes depends on a pair of aromatic amino acids in its cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14471-14476.
- Sommerlade, H. J., Hille-Rehfeld, A, von Figura, K. Gieselmann, V. (1994): Four monoclonal antibodies inhibit the recognition of arylsulphatase A by the lysosomal enzyme phosphotransferase. *Biochem. J.* **297**, 123-130.
- Stamnes, M. A. and Rothman, J. E. (1993): The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell* **73**, 999-1005.
- Stein, M., Braulke, T., Krentler, C., Hasilik, A., von Figura, K. 1987a): 46 kDa mannose 6-phosphate-specific receptor: purification, subunit composition, chemical modification. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **368**, 937-947.
- Stein, M. Braulke, T., Krentler, C., Hasilik, A., von Figura, K. (1987b): 46 kDa mannose 6-phosphate specific receptor: biosynthesis, processing, subcellular location and topology. *biol. Chem. Hoppe-Seyler* **368**, 937-947.
- Stein, M., Zijderhand-Bleekemolen, J. E., Geuze, H., Hasilik, A., von Figura, K. (1987c): M_r 46,000 mannose 6-phosphate-specific receptor: the role in targeting of lysosomal enzymes. *EMBO J.* **6**, 2677-2681.
- Takei, K., McPherson, Ps. S., Schmid, S. L. and De Camilli, P. (1995): Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP- γ S in nerve terminals. *Nature* **374**, 186-190.

- Tong, P. Y. and Kornfeld, S. (1989): Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 7970-7975.
- Tong, P. Y., Gregory, W. and Kornfeld, S. (1989): Ligand interactions of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. The stoichiometry of mannose 6-phosphate binding. *J. Biol. chem.* **264**, 7962-7969.
- Traub, L. M., Ostrom, J. A. and Kornfeld, S. (1993): Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. *J. Cell Biol.* **123**, 561-573.
- Vara, J. A., Portela, A., Ortin, J., Jimenez, A. (1986): Expression in mammalian cells of a gene from *Streptomyces alboniger* conferring puromycin resistance. *Nucl. Acids. Res.* **14**, 4617-4624.
- von Figura, K. and Hasilik, A. (1986): Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 167-193.
- Waheed, A., Hasilik, A. and von Figura, K. (1982): UDP-N-acetyl-glucosamine: Lysosomal enzyme precursor N-actyl-glucosamine-1-phosphotransferase. *J. Biol. Chem.* **257**, 12322-12331.
- Waheed, A. and von Figura, K. (1990): Rapid equilibrium between monomeric, dimeric and tetrameric forms of the 46 kDa mannose 6-phosphate receptor at 37 °C. Possible relation to the function of the receptor. *Eur. J. Biochem.* **193**, 47-54.
- Waheed, A., Hille, A., Junghans, U., von Figura, K. (1990): Quarternary structure of the M_r 46,000 mannose 6-phosphate receptor: Effect of ligand, pH, and receptor concentration on the equilibrium between dimeric and tetrameric receptor forms. *Biochem.* **29**, 2449-2455.
- Watanabe, H., Grubb, J. H., Sly, W. (1990): The overexpressed human 46-kDa mannose 6-phosphate receptor mediates endocytosis and sorting of β-glucuronidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8036-8040.
- Wendland, M., Waheed, A., Schmidt, B., Hille, A., Nagel, G., von Figura, K. and Pohlmann, R. (1991a): Glycosylation of the M_r 46,000 Mannose 6-Phosphate Receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 4598-4604.
- Wendland, M., Waheed, A., von Figura, K., Pohlmann, R. (1991b): M_r 46,000 mannose 6-phosphate receptor: The role of histidine and arginine residues for binding of ligands. *J. Biol. Chem.* **266**, 2917-2923.
- Wenk, J. Hille, A., von Figura, K. (1991): Quantitation of M_r 46000 and M_r 300000 mannose 6-phosphate receptors in human cells and tissues. *Biochem. Int.* **23**, 723-732.
- Zhang, Y. and Dahms, N. M. (1993): Site-directed removal of N-glycosylation sites in the bovine cation-dependent mannose 6-phosphate receptor: effects on ligand binding, intracellular targeting and association with binding immunoglobulin protein. *Biochem. J.* **295**, 841-848.