



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

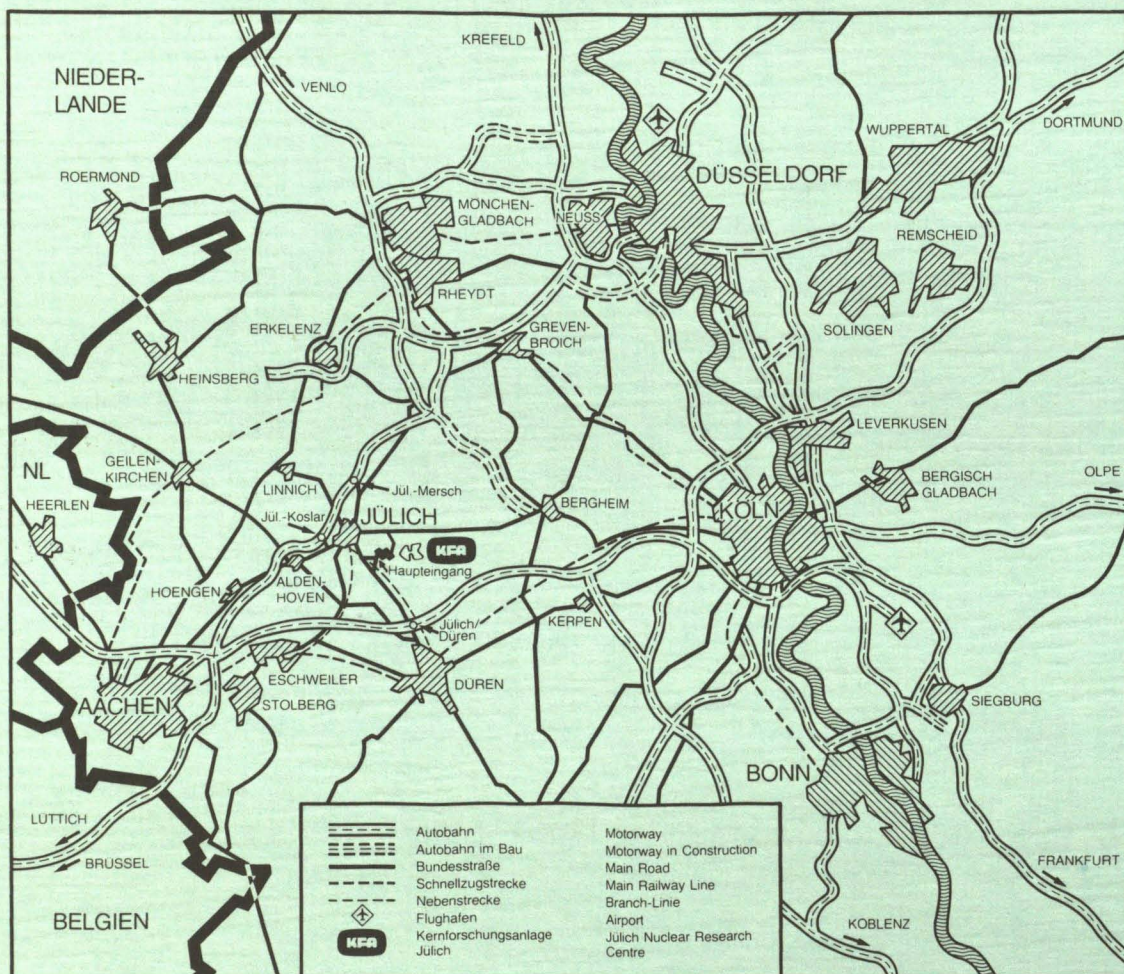
Institut für Neurobiologie

**Untersuchung der Funktion
von Proteinen im
Evertrebraten-Photorezeptor
mit Hilfe von Antikörpern**

von

K.M. Baer

Jül-1943
August 1984
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 1943
 Institut für Neurobiologie Jül-1943

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
 Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
 Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

**Untersuchung der Funktion
von Proteinen im
Evertibraten-Photorezeptor
mit Hilfe von Antikörpern**

von

K.M. Baer

D 82 (Diss. T.H. Aachen)

Rep 170 307

Inhaltsverzeichnis

I

	Summary	IV
	Abkürzungen und Definitionen	VIII
1.	Einleitung	
1.1	Der Transduktionsprozeß in der Evertibraten-Sehzelle	1
1.2	Polyklonale und monoklonale Antikörper	3
2.	Material und Methode	5
2.1	Versuchstiere	5
2.1.1	Krebse	5
2.1.2	Mäuse	5
2.1.3	Kaninchen	5
2.1.4	Tintenfische	5
2.2	Präparationen photosensorischer Membran	5
2.2.1	Photosensorische Membran des Flußkrebsses	5
2.2.1.1	Morphologie des Astacus-Auges	5
2.2.1.2	Präparationstechnik	6
2.2.2	Präparation der photosensorischen Membran des Tinten- fisches	7
2.2.3	Präparation von Rinder-Stäbchenaußensegmenten	7
2.3	Lichtbedingungen	7
2.3.1	Präparation bei schwachem Rotlicht	7
2.3.2	Belichtung von Suspensionen photosensorischer Membran	7
2.4	Ultraschallbehandlung von Membransuspensionen	8
2.5	Gelelektrophorese	8
2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	8
2.5.2	Anfärben der Proteinbanden nach Elektrophorese	9
2.6	Kaninchen-anti-Rhabdom-Antikörper	9
2.6.1	Immunisieren und Bluten von Kaninchen	9
2.6.2	Reinigen von Kaninchenantikörpern für die Elektro- physiologie	10
2.7	Monoklonale Antikörper	10
2.7.1	Gewinnung von "Feeder-Zellen"	12
2.7.2	Immunisieren von Mäusen	12
2.7.3	Die verwendete Tumorzelllinie	12
2.7.4	Kultur von Myelom- und Hybridomazellen	13
2.7.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen	13
2.7.6	Fusion von Myelom- und Milzzellen	14

2.7.7	Reklonieren von Zelllinien	15
2.8	Der Radio-Immunoassay (RIA)	16
2.8.1	Versuche zur Bestimmung der Empfindlichkeit des RIA	17
2.8.1.1	Nachweisgrenze für Antikörper	17
2.8.1.2	Nachweisgrenze für Antigen	18
2.8.2	Bindung an Detergenz-behandeltes Protein im RIA	18
2.9	Versuche zur Bestimmung der Immunoglobulinklasse der monoklonalen Antikörper	18
2.10	Markierung von Proteinen mit ^{125}Jod	19
2.10.1	Jodieren mit Chloramin T	19
2.10.2	Jodieren mit "Enzymobeads"	20
2.10.3	TCA-Fällung der jodierten Proteine	20
2.11	Identifizierung der Antigene mit der Immunoblotting- Methode	20
2.11.1	Anfärben der Nitrozellulosefilter	22
2.12	Kompetitionstests	22
2.12.1	Vergleich der Bindung von Antikörpern an belichtete und unbelichtete Präparationen photosensorischer Membran	23
2.13	Bestimmen von Proteinkonzentrationen	24
2.14	Anhang des methodischen Teils	25
3.	Ergebnisse	29
3.1	Ausbeute bei der Zellfusion	29
3.2	Markierung mit ^{125}Jod	30
3.3	Der Radio-Immunoassay	31
3.3.1	Empfindlichkeit des RIA für Antigen	33
3.3.2	Nachweisgrenze für Antikörper	34
3.3.3	Abschätzung der für ein Fusionsexperiment be- nötigten Menge an Astacus-Rhabdomproteinen	37
3.3.4	Abhängigkeit der RIA-Bindungskurven von der Menge an eingesetztem Antigen und Antikörper	38
3.4	Kreuzreaktivität	41
3.4.1	Untersuchung der Kreuzreaktivität im RIA	41
3.4.2	Untersuchung der Kreuzreaktivität im Kompetitions- assay	44
3.5	Einfluß von Detergenz auf die Antikörperbindung	44
3.6	Bestimmen der Antikörperklasse	50
3.7	Einfluß der Ultraschallbehandlung von Astacus photo- sensorischer Membran auf die Antikörperbindung	51

3.8	Einfluß von Belichtung der photosensorischen Membran auf die Antikörperbindung	57
3.9	Reinigung von Kaninchenantiserum für die elektrophysiologischen Versuche	64
3.10	Proteinzusammensetzung der Präparationen von Astacus photosensorischer Membran	67
3.11	Nachweis der Bindung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern an Astacus Rhabdomproteine mit der Immunoblotting-Methode	70
3.11.1	Proteintransfer vom Polyacrylamidgel auf ein Nitrozellulosefilter	70
3.11.2	Nachweis der Bindung von Antikörpern aus Kaninchen-anti-Rhabdom-Antiserum	71
3.11.2.1	Antikörper gegen membrangebundene Proteine des Rhabdoms	71
3.11.2.2	Antikörper gegen wasserlösliche Proteine des Rhabdoms	73
3.11.2.3	Nachweis der Bindung von monoklonalen Antikörpern an Astacus-Rhabdomproteine	75
4.	Diskussion	80
4.1	Antigene in der Rhabdompräparation von Flußkrebs	80
4.2	Unterschiedliche Bindung der Antikörper an Antigen aus belichteten und unbelichteten Rhabdompräparationen	84
4.3	Ergebnisse und Diskussion der elektrophysiologischen Experimente	88
	Literaturverzeichnis	95

Summary

Polyclonal and monoclonal antibodies against photosensory membrane preparations of the crayfish (*Astacus leptodactylus*) were obtained and are described. Their specific interaction can be used in functional studies of the *Astacus* and *Limulus* photoreceptor cell. Preparations of *Astacus* photosensory membrane yield about 5-8 μ g protein per retina. As characterized by SDS-gel electrophoresis, the predominant protein is the visual pigment (40 - 50 % of the total protein content). In addition, there are about 9 other major protein bands as demonstrated by Coomassie Brilliant Blue staining, as well as a number of minor protein bands which can be detected by silver stain.

A solid phase, indirect radio immuno assay employing polyvinylchloride microtiter plates was set up as a rapid and sensitive test for antibodies. Since no purified antigens were available, a sonicated preparation of whole illuminated rhabdoms, containing not only photosensory membrane but also cytoplasmic proteins of the rhabdom, was used for this test.

I Polyclonal antibodies

Astacus photosensory membrane preparation was injected into rabbits to obtain an antiserum. The antigens reacting with the serum antibodies were identified by an immunoblotting method. Although the investigated rabbit anti-rhabdom antiserum showed binding to almost all major proteins of the photosensory membrane and to some minor proteins of the preparation, most binding occurred to the *Astacus* visual pigment.

The antiserum was highly specific to *Astacus* photosensory membrane preparation and showed almost no crossreactivity to *Sepia* or bovine photosensory membrane preparations.

The effect of illumination on the binding of the antibodies to the rhabdom proteins was tested in a competition assay. The rabbit anti-rhabdom antiserum bound slightly better to proteins from illuminated than to those from non-illuminated preparations.

II Monoclonal antibodies

The antigen of five monoclonal antibodies was identified. Within the accuracy of the immunoblotting method, all five bound to the same polypeptide with an apparent molecular weight of about 165 000 g/mol (determined by SDS-polyacrylamid gel electrophoresis). Three of these monoclonal antibodies were analyzed in greater detail concerning the following topics:

- effect of illumination, sonication and detergent-treatment of *Astacus* photosensory membrane preparation on the binding of the antibodies,
- crossreactivity to bovine and *Sepia* photosensory membrane preparations,
- immunoglobulin class of the monoclonal antibodies.

Antibody 22 A crossreacted strongly to an as of yet unidentified antigen in bovine rod outer segments, while the other monoclonal antibodies did not crossreact significantly to either bovine or *Sepia* photosensory membrane preparations. Antibody of clone 22 A bound about 100 times better to illuminated than to non-illuminated (sonicated) photosensory membrane preparations of *Astacus*. Binding of this antibody to preparations of *Astacus* rhabdoms or bovine ROS was lowered to about 1/5 of the binding to native photosensory membrane preparations when detergents (SDS, Emulphogen) were added. Antibody 22 A presumably is of the IgM-class.

Another monoclonal antibody (16 c) bound slightly better to non-illuminated than to illuminated preparations, although illuminated rhabdoms were used for immunization. Sonication of *Astacus* photosensory membrane preparation seemed to be essential for the binding of this antibody in contrast to the other monoclonal antibodies. This could mean that the antigenic site was not accessible for this antibody unless the rhabdom structure was disrupted. Detergents (SDS, Triton X-100) did not diminish the binding of this antibody strongly. Antibody 16 c presumably is of the IgM-class.

Binding of the third monoclonal antibody (62 D) was not affected significantly by illumination or sonication, nor by SDS-treatment of preparations of photosensory membrane. This antibody presumably is of the IgG-class.

Discussion:

Surprisingly all monoclonal antibodies whose antigen I have identified so far, bind to the same polypeptide. To explain this, methodical reasons (selection by the RIA) and a high antigenicity of the polypeptide are discussed.

Illumination causes a strong effect on the binding of one of the monoclonal antibodies to the high molecular weight polypeptide. This might reflect light-induced modification of the polypeptide, which has been shown by several investigators for proteins of the invertebrate photoreceptor.

The high molecular weight polypeptide could be involved in a number of light-induced processes in the invertebrate photoreceptor, for example, visual transduction, adaptation, regulation of screening pigment granula movement and shedding and renewal of photosensory membrane.

The monoclonal antibodies may be used as a tool to show its function.

Electrophysiological experiments were performed in order to determine the effects of the antibodies on the function of the photoreceptor cell.

I. Extracellular application of antibodies:

Rabbit anti-Astacus rhabdom antiserum added to the bathing solution of the isolated Astacus retina showed no significant influence on the electrical light response (ERG) to test light flashes.

II. Intracellular application of antibodies:

Preliminary results show that, when pressure-injected into the Limulus ventral nerve photoreceptor cell, antibodies from anti-Astacus antiserum reduce the light response significantly. This effect was seen when the light response was not saturated.

Effects of monoclonal antibodies on the electrical light response of the Limulus photoreceptor cell were not yet examined.

Three main reasons are given as to why the antibodies showed no effect on the Astacus ERG when applied extracellularly:

1. The extracellular space is too narrow, so that the antibodies cannot diffuse between the microvilli and come in contact with the antigen.

2. Extracellular binding of antibodies cannot cause an effect, because all important protein reactions occur intracellularly.

3. The record of the ERG is not sensitive enough, because the light response of all retinula cells is summarized.

The mechanism of how the antibodies affect the light response of the Limulus ventral nerve photoreceptor cell, when intracellularly injected, has to be investigated in further experiments.

Abkürzungen und Definitionen

Antigen	Der Begriff Antigen wird gebraucht für solche Substanzen, die mit dem spezifischen Teil (Fab-Region) von Antikörpern reagieren
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
c	Konzentration
cpm	gemessene Zerfälle pro Minute (counts per minute)
Fab-Teil eines Ig	antigenbindender Teil eines Immunglobulinmoleküls
Fc-Teil	(fragment crystallizable) nicht-antigenbindender Teil des Immunglobulinmoleküls
Ig	Immunglobulin
μ, γ	schwere Ketten von Immunglobulinen
K, λ	leichte Ketten von Immunglobulinen
IgG, IgD	Immunglobulinklassen
IgM	
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösungen (phosphate buffered saline)
Protein A	Zellwandprotein von Staphylococcus aureus; bindet an den Fc-Teil von IgG vieler Tierarten
PVC	Polyvinylchlorid
ROS	Stäbchenaußensegmente (rod outer segments)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute - Zellkulturmedium
RIA	Radio-Immunoassay
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

1. Einleitung

1.1 Der Transduktionsprozeß in der Evertebraten-Sehzelle

Lichtsinnzellen nehmen Information aus ihrer Umgebung in Form von Lichtreizen auf und übersetzen sie in elektrische Impulse, die Sprache des Nervensystems.

Der Rezeptor - in der engeren Bedeutung des Wortes - für das Licht ist ein photosensibles Chromoprotein. In den weitaus meisten der bisher untersuchten Tiere ist der Chromophor dieses Proteins 11-cis Retinal, das durch Lichtabsorption isomerisiert wird zur all-trans-Konfiguration (Wald, 1968; Ausnahme: Vogt, 1983). Bei Evertebraten entsteht aus dem Rhodopsin innerhalb weniger Millisekunden ($\text{Limulus} \leq 5 \text{ ms}$, Fein, 1973) nach Photonenabsorption sein thermostabiles Photoprodukt Metarhodopsin (vgl. Goldsmith, 1972). Einige Zeit nach Beginn des Lichtreizes kann man mit den Methoden der Elektrophysiologie einen Einstrom von Ionen in die Photorezeptorzelle messen. Die elektrophysiologischen Experimente, die vor allem an den Photorezeptoren der Fliege und des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus*) durchgeführt wurden, zeigen, daß die Zeit zwischen Reizbeginn und Beginn des Ioneneinstroms, die Latenzzeit, relativ lang ist. Ihre Dauer hängt von der Stärke des Reizlichtes und von der Temperatur ab. Sie wird bei *Limulus* (dunkeladaptierte Zelle) nicht kürzer als etwa 25 ms (Stieve, 1983 a).

Aus weiteren elektrophysiologischen Experimenten folgt, daß das Rhodopsin nicht direkt die Leitfähigkeit kontrolliert, also nicht selbst ein Ionenkanal sein kann:

Damit ein Ionenstrom in der gemessenen Höhe zustande kommen kann, müssen sich bei schwacher Belichtung der Photorezeptorzelle viele (im dunkeladaptierten Zustand bis zu 10^4) Ionenkanäle öffnen. Der Verstärkungsgrad, d.h. die Anzahl der geöffneten Ionenkanäle pro belichtetes Rhodopsin, hängt vom Adaptationszustand der Zelle ab (Wong, 1978; Stieve, 1980). Beide beobachteten Phänomene, das der Latenzzeit und das der Verstärkung, lassen sich durch die Annahme erklären, daß ein angeregtes (belichtetes) Rhodopsinmolekül die Bindung oder Freisetzung eines Transmitters auslöst, der zu den Ionenkanälen diffundiert und bewirkt, daß sich diese vorübergehend öffnen.

Über die Natur des hypothetischen Transmitters und die biochemischen Abläufe bei Belichtung einer Evertibraten-Photorezeptorzelle ist wenig bekannt. Elektrophysiologische und biochemische Experimente an der Sehzelle von Wirbeltieren führten zu zwei verschiedenen Hypothesen über den Transduktionsmechanismus. Nach der einen Hypothese (Yoshikami, 1971; Hagins, 1972) sind Ca^{2+} -Ionen der Transmitter, nach der anderen zyklisches GMP (vgl. Kühn, 1980).

In der Evertibraten-Sehzelle sind Ca^{2+} -Ionen sehr wahrscheinlich nicht der ekzitatorische Transmitter (vgl. Stieve, 1981, 1983), Calcium spielt vielmehr eine Rolle bei der Adaptation der Lichtsinneszellen. Die Rolle zyklischer Nukleotide im Transduktionsprozeß der Evertibraten-Photorezeptorzelle ist noch unklar (Miller, 1971; Brown, 1981).

Um den Transduktionprozeß zu untersuchen, wäre es sehr hilfreich, spezifische Liganden oder Inhibitoren für die verschiedenen beteiligten Proteine zu besitzen.

Antikörper haben einige der dafür nötigen Eigenschaften:

Antikörper sind Proteinmoleküle (Immunoglobuline), die hochspezifische Bindungsstellen (K_D -Werte bis zu 10^{12} l/mol) für ganz bestimmte Regionen (Determinanten) eines anderen Moleküls (des Antigens) besitzen. Antikörper, die gegen eine geeignete Stelle des Antigens gerichtet sind, können durch ihre Bindung dessen Funktion stören. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wäre es möglich, für bestimmte Funktionen verantwortliche Proteine zu identifizieren. Antikörper ermöglichen außerdem die Lokalisierung von Proteinen durch immunohistochemische Methoden, sowie die Aufreinigung der Antigene durch Affinitätschromatographie. Das Ziel dieser Arbeit war es, Antikörper zu gewinnen, mit deren Hilfe der Transduktionsprozeß in der Photorezeptorzelle untersucht werden kann.

Um die Antikörper auch im elektrophysiologischen Experiment darauf testen zu können, ob sie die Funktion der Photorezeptorzelle verändern, wurde der Flußkrebis als Versuchstier gewählt. Die Sehzellen des Krebses sind elektrophysiologisch gut untersucht (Stieve, 1973, 1977). Vom Flußkrebsauge konnten wir außerdem leichter und kostengünstiger die für die Antikörpererzeugung und die biochemischen Experimente nötige Protein-

menge erhalten, als z.B. von Limulus, der ebenfalls für die elektrophysiologischen Experimente geeignet wäre.

1.2_____Polyklonale und monoklonale Antikörper

Antiseren gewinnt man, indem man ein Versuchstier (z.B. Maus oder Kaninchen) gegen ein (oder mehrere) Antigene immunisiert. Diejenigen Lymphozyten (aus der Gruppe der sog. B-Lymphozyten) des Versuchstieres, deren Antikörper das injizierte Antigen binden können, werden zur weiteren Vermehrung und Antikörperproduktion stimuliert. Jeder stimulierte Lymphozyt bildet einen Antikörper mit einer bestimmten Spezifität. Die Antikörper aus dem Serum eines immunisierten Tieres sind heterogen, weil sie von verschiedenen Lymphozyten gebildet werden, d.h. polyklonalen Ursprungs sind. Selbst wenn das Antigen aus nur einer Molekülsorte besteht, kann diese mehrere determinante Gruppen enthalten, so daß ein Antikörpermisch gebildet wird, das von Tier zu Tier auf nicht vorhersehbare Weise variiert. Polyklonale Antikörper besitzen folgende Vorteile:

- Man kann sie relativ leicht erhalten.
- Ein Antiserum enthält ein breites Spektrum von Antikörpern. Einige von ihnen besitzen eventuell die gewünschte Eigenschaft, die nötig ist, um einen bestimmten Effekt (z.B. Hemmung einer Enzymaktivität) zu erzielen.

Polyklonale Antikörper haben allerdings auch eine Reihe von Nachteilen:

- Wenn man Serumantikörper erhalten will, die nur an ein Protein binden, muß dieses Protein, bevor man es zum Immunisieren verwendet, aufgereinigt werden. Steht von diesem Protein nur sehr wenig zur Verfügung, ist die Aufreinigung aber oft praktisch nicht möglich.
- Ein Antiserum enthält wahrscheinlich verschiedene Antikörper, die an unterschiedlichen Orten des Antigens binden. Das kann die Interpretation von Ergebnissen erschweren und ist hinderlich, wenn man Vorgänge auf molekularer Ebene untersuchen will.
- Polyklonale Antikörper stehen nur in begrenzter Menge zur Verfügung, da die Antikörperzusammensetzung eines Serums nicht bekannt und nicht reproduzierbar ist.

Die Vorteile der polyklonalen Antikörper sollten genutzt werden, um einen Teil der Arbeitsmethoden sowie einen elektrophysiologischen Test zu etablieren. Zunächst sollten Antisera mit Antikörpern gegen möglichst viele Proteine der photosensorischen Membran zur Verfügung gestellt werden. Mit Hilfe dieser Antisera sollte untersucht werden, ob der vorhandene elektrophysiologische Test (Ableitung des Elektro-Retinogramms der Astacus-Retina) es ermöglicht, rasch zu testen, ob ein Antikörper die Funktion der Sehzelle beeinflusst oder nicht.

Da die Verwendung von polyklonalen Antikörpern nicht für alle geplanten Versuche günstig erschien, sollten außerdem noch Techniken ausgearbeitet werden, um monoklonale Antikörper gegen Proteine der Flußkrebs-Sehzelle zu gewinnen und zu charakterisieren. Hierbei wurde zunächst kein bestimmtes Protein als Antigen ins Auge gefaßt.

Als monoklonale Antikörper bezeichnet man solche Antikörper, die von den Tochterzellen eines Lymphozyten gebildet werden. Die Antikörper eines Lymphozytenklons haben die gleiche Aminosäuresequenz und damit die gleichen Bindungseigenschaften. Die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern ist möglich, seit es 1975 Köhler und Milstein gelang, antikörperproduzierende Lymphozyten durch Fusion mit tumorig entarteten Zellen des Lymphsystems (Myelomzellen) zur praktisch unbegrenzten Vermehrung in Zellkultur zu bringen. Jeder fusionierte Lymphozyt produziert weiterhin einen bestimmten Antikörper und gibt ihn an das umgebende Medium ab.

Die Herstellung und Isolierung antikörperproduzierender Klone erfordert viel Arbeit und Zeitaufwand, bietet aber außer dem Nutzen von genau definierten Antikörpern die Möglichkeit, Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren, die nicht aufgereinigt und unter Umständen zu Beginn der Versuche noch völlig unbekannt waren.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Krebse

Es wurden Krebse der Art *Astacus leptodactylus* verwendet. Die Tiere wurden über den Delikateßhandel bezogen und bei ca. 15° C in Aquarien gehalten.

2.1.2 Mäuse

Weibliche Mäuse vom Stamm Balb/c wurden im Alter von 6 - 8 Wochen bezogen vom Zentralinstitut für Versuchstiere (Hannover).

2.1.3 Kaninchen

Zwei weibliche Kaninchen unbekannter Rasse wurden bezogen von der Lipp'schen Versuchstierzucht (Extertäl).

2.1.4 Tintenfische

Die Kreuzreaktivität der Antikörper zu Tintenfisch-Photorezeptor-membran-Präparationen wurde untersucht. Die Tintenfische gehörten zur Art *Sepia officinalis*. Sepieneier stellte uns Herr Dr. Boletzky, Lab. Arago, Banyuls-sur-Mer (France) zur Verfügung. Die Sepien wurden in der Tierhaltung des INB von Herrn Overath aufgezogen.

2.2 Präparation der photosensorischen Membran

2.2.1 Photosensorische Membran des Flußkrebsses

2.2.1.1 Morphologie des *Astacus*-Auges

Der Aufbau des *Astacus*-Auges wurde von Bernhards (1916) genau untersucht. *Astacus* hat ein Komplexauge, das sich aus einzelnen Ommatidien zusammensetzt. Ein Ommatidium besteht aus dioptrischem Apparat (Cornea, Kristallkegel) und der Retinula. Eine Retinula ist aus 8 Zellen aufgebaut, wobei 7 mit fingerförmigen Membranausstülpungen (Mikrovilli) das Rhabdom bilden. Das Rhabdom ist spindelförmig und etwa 150 µm lang bei ca. 50 µm größter Dicke. Die Membran der Mikrovilli wird als photosensorische Membran bezeichnet.

2.2.1.2 Präparationstechnik

Die Präparationstechnik wurde von K. Hamacher erarbeitet und ist in seiner Doktorarbeit (Hamacher, 1981) beschrieben. Sie wurde von mir leicht abgeändert angewandt:

Um die Verunreinigung durch Schirmpigmentgranula gering zu halten, wurden nur dunkeladaptierte Augen präpariert, bei denen sich der größte Teil des Schirmpigments proximal der Rhabdome befindet. Da die Krebse einen diurnalen Rhythmus besitzen und nachmittags am besten dunkeladaptiert sind, wurden sie stets zu dieser Tageszeit nach 4-8 stündiger Dunkeladaptation präpariert. Die Augen von jeweils 4 Tieren wurden abgeschnitten, aus der Chitinhülle des Augenstiels herauspräpariert, und die Rhabdome jeder einzelnen Retina in 180 μ l Pufferlösung (70 mM Na-Phosphat pH 7,1 mM MgCl_2) vom Rest der Sehzelle abgetrennt. Die Rhabdomsuspension von je 8 Augen wurde durch Zentrifugation (1,5 h bei 98 000 x g, 4° C) über einen kontinuierlichen Dichtegradienten (Saccharoselösung in Na-Phosphatpuffer,

$\rho = 1,18 \text{ g/ml} \rightarrow \rho = 1 \text{ g/ml}$) gereinigt. Volumen des Gradienten war 9 ml. Die Rhabdombande wurde nach der Zentrifugation abgesaugt und tiefgefroren.

Im Verlauf mehrerer Tage wurden die Rhabdome von ca. 80 Augen präpariert. Die Präparationen wurden vereinigt, mit Na-Phosphatpufferlösung verdünnt und abzentrifugiert (50 000 x g, 30 min, 4° C). Das Pellet wurde nacheinander in je 1 ml 1 M NH_4Cl -Lösung, destilliertem Wasser und Na-Phosphatpufferlösung suspendiert und jeweils erneut abzentrifugiert.

Das letzte Pellet wurde in ca. 500 μ l Na-Phosphatpufferlösung mit Saccharose ($\rho = 1,14 \text{ g/ml}$) suspendiert, beschallt (s. 2.4) und in Portionen tiefgefroren.

Durch das Waschen der photosensorischen Membran mit Lösungen sehr hoher und niedriger Ionenstärke wird der größte Teil der löslichen Rhabdomproteine entfernt (s. Diplomarbeit). Die Präparation erfolgte bei Raumlicht mit Ausnahme der unter 2.12.1 beschriebenen Versuche.

2.2.2 Präparation der photosensorischen Membran des Tintenfisches

Dunkeladaptierte Tintenfische (*Sepia officinalis*) wurden bei Rotlicht dekapitiert, die Augen herauspräpariert, und nach Entfernen der Linse und kurzem Schwenken in Pufferlösung (0,4 M Tris . HCL, pH 7, 10 mM EGTA) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Um die Außensegmente der Sehzelle abzubereiten, wurden die in Tris/EGTA-Puffer aufgetauten Augen umgestülpt und mit einer Pinzette in 1 ml Pufferlösung geschwenkt. Die so erhaltene Suspension von Außensegmenten wurde durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und gewaschen, wie unter 2.2.1.2 für photosensorische Membran des *Astacus* beschrieben.

2.2.3 Präparation von Rinder-Stäbchenaußensegmenten

Präparationen von Stäbchenaußensegmenten wurden mir von Frau Dr. U. Wilden und Diskpräparationen von Frau E. Mavrommati zur Verfügung gestellt.

Die Präparation von ROS ist beschrieben bei McDowell and Kühn (1977) und die Präparation von Disks bei Smith et al. (1975) mit den Änderungen von Bauer and Mavrommati (1980).

2.3-----Lichtbedingungen

2.3.1 Präparation bei schwachem Rotlicht

Bei den unter 2.12.1 beschriebenen Versuchen wurde bei Rotlicht $\lambda > 690$ nm gearbeitet. Soweit möglich, wurde nur das Licht einer Taschenlampe (3 mW Leistung) mit dem Kantenfilter RG 715 benutzt, wenn dies nicht ausreichte, diente noch eine Tischlampe mit Rotlichtbirne (Phillips Pf 712 E) zur Beleuchtung.

2.3.2 Belichtung von Suspensionen photosensorischer Membran

Bei einem Teil der Versuche (s. 2.12.1) wurden *Astacus*-Rhabdome und Rinder-Stäbchenaußensegmente mit Orangelicht bestrahlt. Licht der Wellenlänge $\lambda > 500$ nm wird von Rhodopsin besser absorbiert als von seinen Photoprodukten. Rinder-Rhodopsin wird bei Orangelicht schnell quantitativ gebleicht. *Astacus*-Rhodopsin wird zu seinem thermostabilen Photoprodukt Metarhodopsin isomerisiert. Unter den gewählten Belichtungsbedingungen stellt

sich bei *Astacus* bereits nach wenigen Minuten ein photostationärer Zustand ein, in dem die Konzentration an Rhodopsin noch etwa 30 % beträgt (Hamacher, 1981).

In längere Zeit dunkeladaptierten *Astacus*-Augen liegt dagegen vermutlich alles Sehpigment als Rhodopsin vor.

Als Lampe diente eine Schott-Kaltlichtquelle mit Lichtleiter. Belichtet wurde durch das Kantenfilter OG 530 (Transmission $\lambda > 525$ nm).

Die Energiestromdichte in der Höhe der Rhabdomsuspension betrug etwa 100 mW/cm^2 (gemessen mit einem 550-1 Radiometer von EG & G mit Hilfe von Schott-Graufiltern).

Dauer der Belichtung war 15 min. Die Proben wurden während der Belichtung in einem Wasserbad von 15° C inkubiert.

2.4 ----- Ultraschallbehandlung von Membransuspensionen

Suspensionen von photosensorischer Membran (Proteinkonzentration 0,3 - 1 mg/ml) wurden in einem Polyethylengefäß der Firma Eppendorf (V = 1,5 ml) mit einem Ultraschall-Desintegrator (Branson Sonifier B 12) beschallt. Sowohl die Probe als auch der Metallstab des Sonifiers wurde im Eisbad vorgekühlt.

Während der Beschallung wurden die Probe und der Metallstab von einem Strom gekühlten N_2 -Gases umspült. Beschallt wurde 10 sec. bei ca. 20 kHz (output control 4).

In einem Teil der Proben wurde die Temperatur während der Beschallung gemessen. Sie stieg nicht über 6° C an.

2.5 ----- Gelelektrophorese

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde durchgeführt nach Laemmli (1970) entweder in Gelen mit einheitlicher Polyacrylamid-Konzentration (10 % Polyacrylamid) oder in Gelen mit einem Polyacrylamid-Gradienten (Anstieg von 5 auf 10 % Polyacrylamid bei ca. 13 cm Gellänge). Die Zusammensetzung der Lösungen für die Gelelektrophorese ist im Anhang des methodischen Teils angegeben. Es wurden Plattengele (180 x 130 x 1,4 mm) verwendet. Die Proben wurden durch Zugabe von Laemmli-Probenpuffer (s. Anhang) entweder 30 min. bei $30 - 40^\circ \text{ C}$ oder 1 min. im kochenden Wasserbad denaturiert (s. 3.10).

2.5.2 Anfärben der Proteinbanden nach Elektrophorese

Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden entweder mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue oder mit Silberanfärbung sichtbar gemacht. Die Zusammensetzung der Färbelösungen ist im Anhang des methodischen Teils aufgeführt.

2.6 Kaninchen-anti-Rhabdom-Antikörper

Zwei Kaninchen wurden gegen Astacus-Rhabdomproteine (s. 2.2.1.2) immunisiert, um (polyklonale) Antikörper aus dem Serum dieser Tiere zu erhalten.

2.6.1 Immunisieren und Bluten von Kaninchen

Den Tieren wurde dreimal im Abstand von 4 Wochen jeweils ca. 100 µg Rhabdomprotein unter die Nackenhaut injiziert. Dazu wurden die Rhabdomproteine kurz vor der Injektion in 0,6 ml physiologischer Kochsalzlösung (PBS) suspendiert.

Zur Rhabdomsuspension wurde das gleiche Volumen Freund's Adjuvant (Cappel Laboratories) gegeben. Die beiden Substanzen wurden gemischt, und die Mischung mehrmals hintereinander mit einer 1 ml Spritze aufgesaugt und durch die Kanüle (Durchmesser 0,9 mm) wieder herausgepreßt, bis eine stabile Emulsion entstand.

Das Adjuvant dient zur Verstärkung der Immunantwort. Bei der ersten Immunisierung wurde Complete Freund's Adjuvant, bei den nachfolgenden Incomplete Freund's Adjuvant (Sigma) verwendet. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion wurde den Tieren zwischen 5 und 30 ml Blut aus einer Ohrvene abgenommen. 3 Wochen nach der dritten Immunisierung wurde das Kaninchen mit dem besseren Titer getötet und durch Punktion des Herzens ca. 80 ml Blut gewonnen.

Das Blut wurde nach dem Gerinnen abzentrifugiert und das Serum tiefgefroren.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit dem Serum gemacht, das bei Kaninchen 1 beim Schlachten, bei Kaninchen 2 beim Bluten nach der dritten Immunisierung erhalten wurde.

2.6.2 Reinigen von Kaninchenantikörpern für die Elektro- physiologie

0,5 bis 1,5 ml Kaninchenserum wurden über eine Protein A Säule von ca. 3,5 ml Volumen (Protein A-Sepharose CL-4B, Pharmacia) gereinigt.

Die Chromatographie erfolgte nach Vorschrift der Firma.

Das gefriergetrocknete Gel wurde 15 min gequollen, auf einem gesinterten Glasfilter mit ca. 200 ml PBS pro Gramm gefriergetrockneten Materials gewaschen und in eine Säule gegossen.

Das Kaninchenserum wurde ohne vorherige Dialyse auf die Säule aufgetragen und mit mehreren Säulenvolumen PBS nachgewaschen.

Zur Elution der gebundenen Immunoglobuline wurde 0,1 M Glycin·HCL pH 3 benutzt. Die Lösung mit den eluierten Antikörpern wurde durch Zugabe von 1 M Tris · HCL pH 7,5 sofort neutralisiert.

Antikörper, die zur Injektion in die Limulus Ventralnerv Photorezeptorzelle bestimmt waren, wurden nach der Säulenchromatographie gegen die zum Füllen der Elektroden verwendete Pufferlösung (0,5 M KCl, 10 mM Tris · HCl oder 10 mM HEPES·KOH pH 7,5) dialysiert.

2.7-----Monoklonale Antikörper

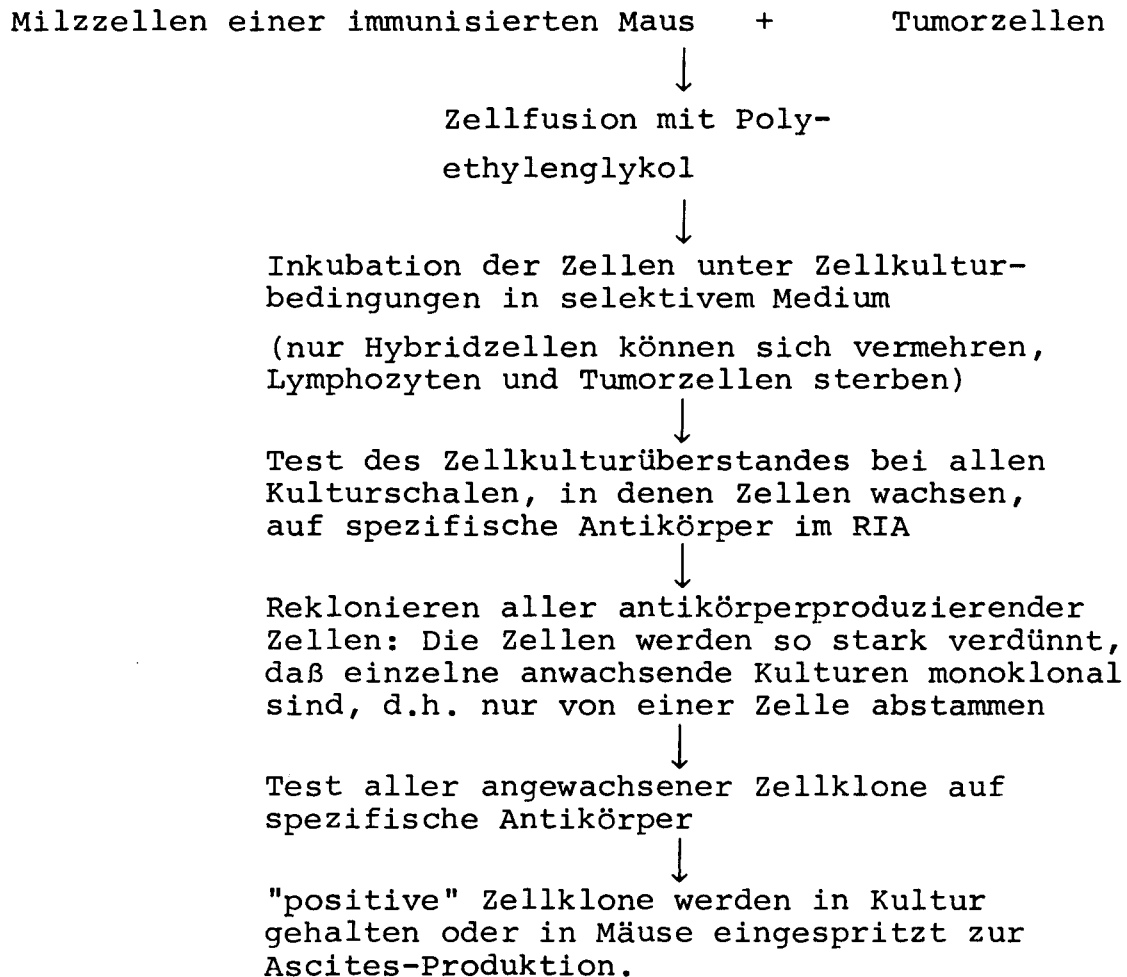
Antikörper aus dem Serum eines immunisierten Tieres stammen von verschiedenen Lymphozyten und haben unterschiedliche Eigenschaften (polyklonale Antikörper). Antikörper, die von genetisch gleichen (auf einen Lymphozyten zurückzuführenden) Zellen gebildet werden, bezeichnet man als monoklonal. Die Antikörper eines Zellklons haben den gleichen chemischen Aufbau.

Um monoklonale Antikörper zu gewinnen, macht man sich zunutze, daß jeder Lymphozyt nur einen bestimmten Antikörper produziert.

Um Lymphozyten in Zellkultur halten zu können, muß man sie mit Tumorzellen fusionieren. Die Hybride aus Tumorzellen und Lymphozyt produzieren weiterhin Antikörper und vermehren sich in Zellkultur.

Diese Klone von Hybridzellen werden auch als "Hybridome" bezeichnet.

Schematischer Arbeitsgang zur Gewinnung monoklonaler Antikörper



Der Zellkulturüberstand von Hybridom-Kulturen enthält in den meisten Fällen 5 - 100 µg Antikörper/ml. Spritzt man Hybridomzellen in den Bauchraum einer Maus ein, bilden sich Tumore und oft Asciten (Flüssigkeitsansammlungen in der Leibeshöhle). Asciten enthalten in typischen Fällen 3 - 15 mg Antikörper/ml. Ich habe alle beschriebenen Versuche mit Zellkulturüberständen durchgeführt.

2.7.1 Gewinnung von "Feeder"-Zellen

Bei der Fusion und beim Reklonieren wurden den Hybridomen "Feeder"-Zellen zugegeben. "Feeder"-Zellen sind Milzzellen oder Maus-Peritoneal-Makrophagen, durch deren Zugabe man eine günstige Zelldichte herstellt. Die Funktion von "Feeder"-Zellen wird darin gesehen, daß sie Wachstumsstoffe abgeben sowie abgestorbene Zellen phagozytieren (vgl. Fazekas, 1980).

Eine Milzzellsuspension wurde hergestellt wie in 2.7.6 beschrieben.

Um Peritonealzellen zu erhalten, wurde der Bauchraum einer getöteten Maus mehrere Male mit insgesamt 5 - 7 ml Saccharoselösung (0,34 M Saccharose in PBS, sterilfiltriert) gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde 10 min. bei ca. 400 x g zentrifugiert, das Pellet in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellen gezählt (s. 2.7.4).

Pro Maus erhält man etwa $3 \cdot 10^6$ Zellen.

Feederzellen wurden in Zellkulturmedium suspendiert und bis zu 8 Tage im Brutschrank aufbewahrt.

2.7.2 Immunisieren von Mäusen

Weibliche Mäuse vom Stamm Balb/c wurden insgesamt je viermal immunisiert.

Der Abstand zwischen zwei Injektionen betrug 14 Tage bis 4 Wochen. Die letzte Injektion erfolgte 3 Tage vor der Fusion. Pro Immunisierung wurden 80 - 150 µg Rhabdompräparation (s. 2.2.1.2) in ca. 150 µl PBS suspendiert, mit dem gleichen Volumen Freund's Adjuvant emulgiert und intraperitoneal gespritzt.

Für die erste Immunisierung eines Tieres wurde Complete Freund's Adjuvant benutzt, für die folgenden Incomplete Freund's Adjuvant.

2.7.3 Die verwendete Tumorzelllinie

Für die Fusion mit den Maus-Lymphozyten wurde die Tumorzelllinie X 63-AG 8. 653 verwendet. Sie wurde uns vom Institut für Genetik in Köln zur Verfügung gestellt.

Myelomzellen dieser Linie synthetisieren selbst keine Immunglobuline mehr.

Sie sterben in Medium ab, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (HAT-Medium, s. Anhang), da Aminopterin die DNA-Synthese blockiert, und sie im Gegensatz zu normalen Zellen das zugegebene Hypoxanthin nicht metabolisieren können.

2.7.4 Kultur von Myelom- und Hybridomazellen

Die Zellen wurden in einem Brutschrank (CO₂-Inkubator T 304 der Firma ASSAB, Hannover) bei 37° C, ca. 80 % Luftfeuchte und 10 % CO₂ inkubiert. Als Kulturgefäße dienten Costar 24-well Gewebekulturplatten (Costar, Cambridge, Mass.) mit ca. 2 ml Volumen pro Kultur, Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) für ca. 5 ml Medium, und bakteriologische Petrischalen (Greiner) mit Nocken für etwa 15 ml Medium.

Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Erythrozyten-Zählkammer ermittelt. Gutes Wachstum wurde bei einer Zelldichte zwischen 10⁴ und 5 · 10⁵ Zellen/ml erzielt.

Gut wachsende Hybridome und die Tumorzelllinie X 63 mußten etwa alle 3 - 4 Tage mit neuem Medium verdünnt werden.

Der Zustand der Zellen wurde regelmäßig unter einem Umkehrmikroskop bei 40 und 125facher Vergrößerung kontrolliert.

Neben normalen Zellkulturmedium (Zusammensetzung siehe Anhang des meth. Teils) wurde noch selektives Medium verwendet (HAT-Medium, siehe 2.7.3 und Anhang).

HAT-Medium wurde zur Zellfusion und für die Hybridome bis nach dem Reklonieren verwendet. Beim Wechseln von HAT zu normalem Medium wurden die Kulturen 2 - 3 mal mit Hypoxanthin, Thymidin-Medium (HT-Medium, gleiche Konzentrationen wie im HAT) gefüttert.

2.7.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Gesunde Kulturen von wenigstens 10⁵ Zellen wurden 5 min. bei ca. 200 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 - 500 µl eisgekühltem Einfriermedium (Zellkulturmedium mit 30 % fötalem Kälberserum und 10 % Dimethylsulfoxid) suspendiert, in ein Einfrierröhrchen (Nunc, Wiesbaden) pipettiert und sofort auf Eis gestellt. Die Röhrchen wurden in Styropor verpackt über Nacht in eine -70° C Tiefkühltruhe gestellt und danach in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Die Zellen wurden möglichst schnell durch Zugabe von warmem RPMI aufgetaut, mit RPMI auf ca. 15 ml verdünnt und abzentrifugiert (200 x g, ca. 5 min.).

Frisch aufgetaute Zellklone wurden mit $10^4 - 10^5$ "Feeder"-Zellen/ml in Kultur genommen (s. 2.7.1).

2.7.6 Fusion von Myelom- und Milzzellen

Pro Fusion wurden $6 - 8 \cdot 10^7$ Myelomzellen und $8 - 10 \cdot 10^7$ Milzzellen eingesetzt.

Eine immunisierte Maus wurde getötet, ihre Milz steril entnommen und in eine Petrischale mit ca. 20 ml RPMI gegeben. Mit Hilfe von zwei Pinzetten wurde das Gewebe zerrissen und möglichst viele Zellen in Suspension gebracht. Verbleibende Zellklumpen wurden durch mehrmaliges Aufsaugen mit einer Pipette verkleinert. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und ca. 5 min. stehen gelassen, damit sich größere Partikel absetzen.

Währenddessen wurden die Myelomzellen abzentrifugiert (5 min. bei 200 x g).

Das Myelomzellenpellet und die Milzzellensuspension wurden durch vorsichtiges Schwenken des Zentrifugenröhrchens vermischt und ca. 5 min. bei 200 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt, und das Pellet mit 1 ml warmer (37°C) Polyethylenglykol-Lösung (Zusammensetzung siehe Anhang) vermischt. Diese Lösung sollte insgesamt 1 min. Kontakt mit den Zellen haben, dann wurden 20 ml warmes RPMI im Verlauf von 15 min. zugetropft.

Die Zugabe von RPMI sollte besonders am Anfang sehr langsam erfolgen. Das Röhrchen mit der Zellsuspension wurde dabei ständig vorsichtig um seine Längsachse gedreht.

Danach wurde 5 min. mit 200 x g zentrifugiert und das Pellet sehr vorsichtig in 50 ml HAT-Medium suspendiert.

Milzzellen sind in Zellkultur nicht lange lebensfähig, und nicht fusionierte Myelomzellen sterben in dem selektiven HAT-Medium ab. Nur Fusionsprodukte aus Myelom- und Milzzelle, die Hybridomazellen, können sich vermehren.

Folgende Kulturbedingungen nach der Fusion erwiesen sich als günstig:

Die Zellsuspension (s. oben) wurde auf wenigstens 10 Costar 24-well Kulturplatten, das entspricht 240 Einzelkulturen, verteilt. Diese Platten wurden 3 Tage vor der Fusion mit ca. 1 ml HAT-Medium und etwa $4 \cdot 10^3$ Feederzellen pro Kultur vorbereitet. Nach etwa 14 Tagen im Inkubator waren die ersten Hybridklone mit bloßem Auge zu erkennen.

In Kulturen, die sichtbares Wachstum zeigten, wurde im Abstand von 3 - 4 Tagen 1/3 des Mediums entnommen und durch neues HAT-Medium ersetzt.

Überstände von Kulturen, die 2 - 3 mal auf diese Weise gefüttert worden waren, wurden im Radio-Immunoassay getestet. Positive Kulturen wurden sobald wie möglich rekloniert (s. 2.7.7) sowie parallel dazu Teile davon eingefroren.

2.7.7 Reklonieren von Zelllinien

Zum Reklonieren müssen die Hybridzellen so stark verdünnt auf viele Einzelkulturgefäße verteilt werden, daß anwachsende Kulturen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf nur eine Ausgangszelle zurückgeführt werden können. Dies ist der Fall bei Zellverdünnungen, bei denen in weniger als 30 % aller angelegten Kulturen Wachstum auftritt.

Rekloniert wurde zum ersten Mal sobald wie möglich nach der Fusion. Durch Mutation können immer wieder Zellen entstehen, die keine Antikörper produzieren. Um diese zu entfernen, müssen alle Zelllinien von Zeit zu Zeit erneut rekloniert werden.

Zum Reklonieren wurden Mikrotiterplatten aus Polystyrol der Firma Tecnomara verwendet. Diese Platten besitzen 96 Kulturgefäße mit jeweils etwa 300 µl Volumen.

Pro Hybridom wurden in der Regel 3 Mikrotiterplatten angesetzt. Die Zellen wurden in einer Erythrozytenzählkammer ausgezählt und so verdünnt, daß 1000, 100 und 10 Zellen pro 96 Kulturgefäße eingesetzt wurden. Die Kultivierung erfolgte in HAT-Medium mit 20 % fötalem Kälberserum und ca. $5 \cdot 10^4 - 10^5$ "Feeder"-Zellen/ml.

Nach etwa 14 Tagen wurden die Platten unter dem Mikroskop auf das Wachstum von Zellen untersucht. Die Kulturen aus Platten,

bei denen weniger als 30 % aller Kulturgefäße Wachstum zeigten, wurden im RIA getestet.

Positive Kulturen wurden in 2 ml fassende Kulturgefäße überimpft, sobald sie etwa den Boden ihres Kulturgefäßes überwachsen hatten. Beim Überimpfen in ein größeres Kulturgefäß erwies es sich als günstig, wieder 10^4 - 10^5 "Feeder"-Zellen/ml zuzugeben.

2.8-----Radio-Immunoassay

Für den Immunoassay wurden flexible Mikrotiterplatten aus PVC, U-Form, der Firma Dynatech (Denkendorf) verwendet. Diese Kunststoffplatten besitzen 96 Vertiefungen, die jeweils etwa 200 µl fassen, und die aufgrund ihrer Oberflächenbeschaffenheit in der Lage sind, Proteine sehr fest zu adsorbieren.

Ein Radio-Immunoassay war in folgende Arbeitsgänge gegliedert:

1. Beschichten der Platten mit Antigen

Pro Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 50 µl der antigenhaltigen Lösung bzw. Suspension pipettiert. Proteinkonzentration war in der Regel 10 µg/ml.

Gereinigte Proteine aus Rhabdomen standen nicht zur Verfügung. Deswegen wurden entweder beschallte Rhabdomsuspensionen (s. 2.2.1.2 und 2.4) oder in Detergenz gelöste Rhabdomproteine auf den Platten gebunden. Wenn Rhabdomvesikel verwendet wurden, wurden die mit der Suspension versehenen Platten mit Parafilm abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Sollten in Detergenz gelöste Proteine als Antigen benutzt werden, wurden die mit der Lösung gefüllten Mikrotiterplatten über Nacht offen bei 35 - 40° C im Trockenschrank inkubiert, bis alle Flüssigkeit verdampft war.

2. Waschen mit PBS oder Leitungswasser

Zum Waschen wurde eine 8-Kanal-Spritze benutzt, mit deren Hilfe die Vertiefungen Reihe für Reihe gleichmäßig mit PBS gefüllt wurden. Die Platte wurde anschließend mit einer ruckartigen Bewegung über dem Spülstein entleert und auf Küchentuch trockengeschlagen.

Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

3. Absättigen restlicher Bindungsstellen auf der Platte mit 0,1 % BSA in PBS für 1 - 2 h bei Raumtemperatur.

4. Waschen mit PBS oder Leitungswasser

5. Inkubation mit Antiserum bzw. Zellkulturüberstand, pro Vertiefung der Platte 50 µl.

Oft wurden Verdünnungsreihen von Seren oder Überständen getestet; zum Verdünnen wurde dann 1 % BSA in PBS oder frisches Zellkulturmedium benutzt.

Dauer der Inkubation: 4 - 6 h bei Raumtemperatur oder bei ca. 4° C über Nacht.

6. Waschen der Platten mit PBS

Bei diesem Schritt wird nicht gebundener Antikörper entfernt.

7. Nachweis gebundener Antikörper mit jodiertem Protein A oder radioaktiv markiertem zweiten Antikörper (Schaf-anti-Maus Ig, Kaninchen-anti-Maus-IgG, Ziege-anti-Maus-µ, s. 2.10).

Pro Vertiefung wurden 50 µl mit 40 000 - 80 000 cpm des radioaktiven zweiten Antikörpers bzw. Protein A eingesetzt.

8. Waschen der Platten mit PBS

Die radioaktive Lösung wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und in einer Waschflasche gesammelt. Ansonsten erfolgte das Waschen wie unter Punkt 2 beschrieben.

9. Die Platten wurden zerschnitten und jedes Reaktionsgefäß entweder direkt in einem γ-Zähler oder nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit (z.B. Instagel der Firma Packard) in einem Szintillationszähler gemessen.

2.8.1 Versuche zur Bestimmung der Empfindlichkeit des RIA

2.8.1.1 Nachweisgrenze für Antikörper

Mikrotiterplatten wurden mit Kaninchen-anti-Maus-Ig (10 µg/ml) beschichtet, mit 1 % BSA abgesättigt und mit verschiedenen Konzentrationen von Maus-Immunglobulin von 1 mg/ml bis 10⁻¹² mg/ml inkubiert (4 h bei Raumtemperatur).

Gebundenes Maus-Immunglobulin wurde mit jodiertem Schaf-anti-Maus-Ig (60 000 cpm/50 µl) nachgewiesen.

Kaninchen-anti-Maus-Ig und Maus-Ig wurden bezogen von der Firma Dynatech (Denkendorf).

2.8.1.2 Nachweisgrenze für Antigen

Maus-Ig (s. 2.8.1.1) wurde in Konzentrationen von 0,1 mg/ml bis 10^{-12} mg/ml in eine Mikrotiterplatte pipettiert und etwa 24 h bei 4° C inkubiert. Die Platte wurde abgesättigt mit 0,1 % BSA und anschließend gebundenes Maus-Ig mit ^{125}J Schaf-anti-Maus-Ig (63 000 cpm/50 µl) nachgewiesen (s. 2.8.1).

2.8.2 Bindung an Detergenz-behandeltes Protein im RIA

Die benötigte Menge Astacus photosensorische Membran oder Rinder ROS wurde in 1 % Detergenz (SDS, Triton X-100 oder Emulphogen) 30 min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde die Proteinlösung auf 10 µg/ml (etwa 1 : 100) verdünnt mit PBS und in Mikrotiterplatten pipettiert. Die Platten wurden über Nacht bei 30 - 40° C im Trockenschrank inkubiert, so daß die Lösung in den Vertiefungen eintrocknete, mehrmals mit Leitungswasser oder PBS gewaschen, und im RIA (s. 2.8.1) eingesetzt.

2.9-----Versuche zur Bestimmung der Immunglobulinklasse der monoklonalen Antikörper

Um eine Aussage darüber machen zu können, welcher Klasse die monoklonalen Antikörper angehören, wurde deren Bindung im RIA an verschiedene jodierte zweite Antikörper miteinander verglichen.

Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Kaninchen-anti-Maus-Ig (10 µg/ml) beschichtet und mit BSA abgesättigt.

Zellkulturüberstand in verschiedenen Verdünnungen wurde zugegeben und 3 - 6 h inkubiert.

Zum Nachweis gebundenen Antikörpers wurde radioaktives Schaf-anti-Maus-Ig, Ziege-anti-Maus-µ (beides vom Institut für Genetik in Köln) und bei einem Test auch Kaninchen-anti-Maus-IgG (New England Nuclear) benutzt.

Von den jodierten Antikörpern wurden zwischen 45 000 und 60 000 cpm/50 µl eingesetzt.

Als Standards für die Bindung von Antikörpern verschiedener Klassen dienten Zellkulturüberstände mit einem monoklonalen IgG-Antikörper ($\gamma_{2b}\text{K}$) und einem IgM-Antikörper (μK).

Diese Kontrollantikörper wurden vom Institut für Genetik in Köln zur Verfügung gestellt.

Das Schaf-anti-Maus-Ig sollte an alle Maus-Immunglobuline binden, es kann aber nicht erwartet werden, daß die Bindung an alle Antikörperklassen gleich gut ist.

Das Serum Ziege-anti- μ ist klassenspezifisch für alle Ig M-Antikörper, da nur diese die schwere μ -Kette besitzen.

Kaninchen-anti-Maus-Ig G sollte besonders gut an Ig G binden, aber auch an Antikörper anderer Klassen, da es nicht nur die schwere γ -Kette erkennt, sondern auch die leichten Ketten λ und κ , die auch in anderen Klassen vorkommen.

2.10 Markierung von Proteinen mit ^{125}Jod

Markiert wurden Protein A (Prot. A von Staphylococcus aureus, soluble, partially purified, Sigma) und anti-Maus-Ig-Antikörper (Schaf-anti-Maus-Ig, Ziege-anti- μ , Institut für Genetik, Köln). Radioaktives Jod wurde bezogen von den Firmen Amersham und New England Nuclear. Es lag als NaJ in verdünnter NaOH (pH 7 - 11) vor. Die Aktivität betrug 100 mCi (3,7 GBq) ^{125}J pro ml am Stichtag.

Die Jodierung mußte unter einem Abzug durchgeführt werden, da dabei freies Jod entsteht.

2.10.1 Jodieren mit Chloramin T

(nach: Hunter, Greenwood, Nature 1962)

Zu 50 μg Protein in 10 bis 50 μl PBS wurde 100 μl Na-Phosphatpuffer (0,5 M Na-Phosphat, pH 7,5) gegeben. Nach Zugabe von 50 μl Chloramin T - Lösung (2 mg/ml in H_2O) wurde die Lösung durchgemischt und in geschlossenem Gefäß 1 min. stehengelassen.

Nacheinander wurden 0,5 - 1 mC Na^{125}J (10 μl) und 100 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (2 mg/ml in Phosphatpuffer) zugegeben und vorsichtig durch Rühren mit der Pipettenspitze durchmischt.

Die Mischung wurde auf eine Dowex-Säule (s. unten) aufgetragen und mit 1 ml PBS nachgespült.

Zu dem Eluat wurde 1 ml PBS mit 0,02 % Azid und 3 % BSA gegeben. Die Lösung mit den markierten Proteinen wurde entweder portionsweise eingefroren, oder im Kühlschrank aufbewahrt.

Vorbereitung der Ionenaustauschersäule:

Dowex 1 x 8 (p.A, dry mesh 200 - 400, Chloride-Form) wurde in PBS gequollen. Zwischen 0,5 bis 1 ml wurden in eine 2 ml Einmal-Spritze gefüllt und erst mit 1 ml 0,1 % Rinderserumalbumin in PBS, dann mit ca. 10 ml PBS gewaschen.

Der Kolben der Spritze wurde dazu benutzt, nach Aufbringen der radioaktiven Probe und Nachwaschen mit PBS alle Lösung aus der Säule abzapfen.

2.10.2 Jodieren mit "Enzymobeads"

Alternativ zu Methode 2.10.1 wurde auch mit Enzymobeads der Firma BIO-RAD jodiert. Die Enzymobeads enthalten Glucoseoxidase und Lactoperoxidase gebunden an eine inerte Matrix.

In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden pipettiert:

50 µl Na-Phosphatpuffer (0,2 M Na-Phosphat, pH 7,2), ca. 50 µg Protein in 10 - 50 µl Puffer, sowie 50 µl Enzymobead-Reagenz. Dazu wurden 1 mCi ^{125}J (10 µl) und 25 µl Glucose-Lösung (1 % β -D-Glucose in H_2O) gegeben, gemischt und 25 min. stehengelassen. Danach wurde das Reaktionsgemisch 5 min. in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert, der Überstand auf eine Dowex-Säule gegeben und weiterbehandelt wie bei Methode 2.10.1 beschrieben.

2.10.3 TCA-Fällung der jodierten Proteine

Die Fällung dient zur Kontrolle, wieviel radioaktives Jod an Protein gebunden vorliegt.

Zu 5 µl Lösung des jodierten Proteins wurden 200 µl 0,5 % BSA in PBS gegeben, und die Proteine anschließend durch Zugabe von 50 µl 25 %iger Trichlor-Essigsäure-Lösung ausgefällt. Der Niederschlag wurde in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und die Radioaktivität in Pellet und Überstand gemessen.

2.11 Identifizierung der Antigene mit der Immuno-Blotting-Methode

(nach: H. Towbin et al. 1979)

Ca. 10 µg Rhabdomprotein wurden durch SDS-Gelelektrophorese (s. 2.5) aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine entweder durch Diffusion oder elektrophoretisch auf ein Nitro-

zellulosefilter (Ba 85, 0,45 µm Porengröße, Schleicher und Schüll) übertragen.

Für den Transfer durch Diffusion wurde das Gel direkt zwischen zwei angefeuchtete Nitrozellulosefilter gelegt und mit in PBS getränktem Filterpapier und Frischhaltefolie abgedeckt. Diese Anordnung wurde beschwert mit einer Metallplatte und Gewichten und bei Raumtemperatur belassen.

Für den elektrophoretischen Transfer wurde das Gel auf ein feuchtes Nitrozellulosefilter gelegt und diese Anordnung, umgeben von mehreren Lagen Filterpapier und zwei Kunststoffgittern, zwischen die beiden Elektrodenkammern einer speziell dafür gebauten Elektrophoreseapparatur gebracht. Beide Kammern wurden mit Pufferlösung gefüllt (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3) und der Transfer erfolgte für wenigstens 2 h bei 30 - 40 V, 225 mA. Das elektrische Feld war jetzt senkrecht zur Ebene von Gel und Filter, und das Nitrozellulosefilter wurde auf die der Anode zugewandte Seite des Gels gelegt. Nach dem Transfer wurden die Filter kurz in PBS gewaschen, und dann 1 h in 3 % BSA in PBS inkubiert zum Absättigen unspezifischer Bindungsplätze. Danach wurden sie nochmals in PBS gewaschen und mit Antikörperlösung inkubiert. Kaninchenantiserum wurde bis zu 1000fach mit 1 % Serumalbumin und 10 % Kälberserum verdünnt, für den Nachweis der Bindung von monoklonalen Antikörpern wurden in der Regel Zellkulturüberstände, in einem Fall auch 10 x konzentrierter Überstand 1 : 5 verdünnt mit Kälberserum eingesetzt.

Die Filter wurden 3 bis 8 Stunden in der Antikörperlösung gelassen, und danach unter häufigem Wechsel der Waschlösung 15 bis 30 min. mit PBS gewaschen.

Die Inkubation mit radioaktiv markiertem Protein A für Kaninchenantiserum bzw. zweitem, radioaktiven Antikörper für den Nachweis der monoklonalen Antikörper erfolgte über Nacht im Kühlschrank oder wenigstens 3 h bei Raumtemperatur.

Die jodierten Proteine wurden verdünnt mit 10 % Kälberserum im RPMI oder 1 % Rinderserumalbumin in PBS auf eine Aktivität von $0,4 - 1,2 \times 10^6$ cpm/ml.

Die Filter wurden unter häufigem Lösungswechsel 15 min. bis 1 h in PBS gewaschen, anschließend getrocknet und autoradiographiert.

Dauer der Autoradiographie war 4 - 8 Tage.

Folgende Blindwerte wurden gemacht:

Inkubation der Filter statt mit spezifischen Antikörpern

- mit Kaninchen- und Mausnormalserum
- mit frischem Zellkulturmedium
- mit Zellkulturüberständen von Hybridomen, die im RIA keine Bindung an Rhabdomproteine zeigten.

2.11.1 Anfärben der Nitrozellulosefilter

Durch Anfärben von Filterstreifen direkt nach der Elektrophorese wurde der Proteintransfer nachgewiesen.

Die Färbung erfolgte entweder mit Amidoschwarz (0,1 % Amidoschwarz, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure) oder mit Coomassie (0,05 % Coomassie R 250, 45 % Methanol, 2 % Essigsäure) für ca. 15 min.

Entfärbt wurde in 90 % Methanol, 2 % Essigsäure).

2.12 -----Kompetitionstests

Die Kompetitionstests wurden durchgeführt, um die Bindung eines Antikörpers bzw. Antiserums an verschieden behandelte Antigenpräparationen (z.B. belichtet und unbelichtet) oder verschiedene Antigene (Kreuzreaktivitätstests) zu vergleichen.

Diese Versuche wurden nach dem folgenden Schema durchgeführt:

Eine konstante Antikörpermenge wurde zusammen mit verschiedenen Konzentrationen an Antigen (= Kompetitor) inkubiert. Anschließend wurde im RIA in jeder Probe die Menge an freiem Antikörper bestimmt.

Für jede Antikörperlösung (Zellkulturüberstand oder Kaninchenantiserum) wurde zunächst eine Titrationskurve im RIA aufgenommen, um zu ermitteln, wie weit man die Antikörperlösung verdünnen muß, damit die Menge des Antikörpers im RIA limitierend wird. Diejenige Antikörperverdünnung, die 90 % des Maximalwertes in diesem Assay ergab, wurde für den Kompetitionstest verwendet.

Diese Antikörperlösung wurde mit dem gleichen Volumen des zu testenden Antigens (Kompetitor) das in Phosphatpuffer (70 mM Na-Phosphat, 1 mM $MgCl_2$, pH 7) oder PBS suspendiert war, gemischt.

Die Konzentration des Kompetitors wurde dabei über einen weiten Bereich (z.B. 1 - 100 µg/ml) variiert.

Nach 2 h Inkubation wurden die Proben auf einem Whirl-Mix durchmischt und in Aliquots daraus freier Antikörper durch die Bindung an immobilisiertes Antigen im RIA bestimmt. Bei einigen Experimenten wurden die Proben vorher 20 min mit 30 000 x g zentrifugiert und nur der Überstand im RIA getestet. Die Aussage der Versuche mit und ohne Zentrifugation war die gleiche. Der RIA wurde wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt.

Zur Versuchsauswertung wurden die aus dem RIA erhaltenen Werte gegen die Kompetitorkonzentration bei der Vorinkubation aufgetragen.

2.12.1 Vergleich der Bindung von Antikörpern an belichtete und unbelichtete Präparationen photosensorischer Membran

Die Augen von 2 - 4 Krebsen wurden bei schwachem Rotlicht präpariert (s. 2.2.1.2).

Die Rhabdombande aus dem Dichtegradienten wurde abgesaugt, mit Na-Phosphatpuffer (70 mM Na-Phosphat pH 7, 1 mM MgCl₂) verdünnt und zentrifugiert (30 min., 50 000 x g).

Das Pellet wurde suspendiert in 200 µl Na-Phosphatpuffer und beschallt wie unter 2.4 beschrieben.

Von der beschallten Suspension wurden 2 x 60 µl abgenommen.

Der Rest der Suspension diente zur Proteinbestimmung.

Eine dieser Proben wurde belichtet wie unter 2.3.2 beschrieben und bei Raumlicht weiter verarbeitet, die andere wurde weiterhin bei schwachem Rotlicht gehandhabt.

Von beiden Proben wurden Verdünnungsreihen pipettiert (1 : 2 → 1 : 2¹⁰ verdünnt mit Phosphatpuffer).

Jeweils 60 µl dieser Verdünnungen wurden mit 60 µl Antikörperlösung gemischt.

Die Proben mit belichteter photosensorischer Membran wurden bei Raumlicht, die Proben unbelichteter Membran wurden im Dunkeln inkubiert.

Nach 2 Stunden wurden die Proben auf einem Whirl-Mix gut durchmischt, jeweils 2 x 50 µl entnommen und in eine mit belichteten Rhabdomproteinen beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Es folgte ein RIA wie unter 2.8 beschrieben, der bis zur Zugabe des radioaktiven anti-Antikörpers im Dunkeln ausgeführt wurde.

2.13 Bestimmen von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen für Photorezeptormembran-Präparationen wurden nach Bradford bestimmt (s. Anhang des meth. Teils), da dieser Test sehr empfindlich ist. Als Standard für die Bestimmung diente Rinder-Serumalbumin.

Die mit dem Proteintest nach Bradford ermittelte Proteinkonzentration war etwa 1/3 kleiner als die nach Lowry bestimmten, oder bei Rinder-Stäbchenaußensegmenten spektroskopisch (bei 500 nm) bestimmten Werte.

Bei Antikörperlösungen wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen, und die Proteinkonzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Extinktion bei 280 nm} \times 0,7 &= \text{Antikörperkonzentration mg/ml} \\ (\text{molarer Extinktionskoeffizient für IgG } \epsilon &= 228\,800 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}) \end{aligned}$$

2.14 ----- Anhang des methodischen Teils

Ein Teil der verwendeten Methoden ist ähnlich auch in Schreier (1980) beschrieben.

Proteintest nach Bradford (1977)

Coomassie Färbelösung:

ca. 7 mg Serve-Blau G-250

5 ml 95 % Ethanol

10 ml 85 % Phosphorsäure

Probevolumen: 1 ml Färbelösung + 100 µl Proteinlösung

Die Proben wurden pipettiert und gut durchgeschüttelt.

Nach 2 min. konnte die Extinktion bei 595 nm gemessen werden.

Bei jeder Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit Rinder-serumalbumin im Bereich von 2 - 10 µg Protein aufgenommen.

Für die Auswertung wurde der E_{595} -Wert der Nullprobe von allen anderen Meßergebnissen abgezogen.

Phosphate-buffered saline (PBS)

pro Liter Lösung:

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

$\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,44 g

KH_2PO_4 0,2 g

pH: 7,4

Für die meisten Zwecke wurde PBS mit 0,02 % NaN_3 verwendet.

In den Lösungen, die zum Immunisieren von Tieren verwendet wurden oder in denen Enzymreaktionen ablaufen sollten, wie z.B. beim Jodieren, durfte kein Azid verwendet werden.

Zellkulturmedium

RPMI 1640 mit 2 g/l NaHCO_3 (Flow, Seromed)
10 % Serum von fötalen oder neugeborenen Kälbern (Seromed)
2 mM L-Glutamin (L-Glutamin-Lösung 200 mM, Serva)
50 000 IU/l Penicillin (Penicillin/Streptomycin-Lösung von
Serva oder Flow)
50 000 ug/l Streptomycin
 $5 \cdot 10^{-5}$ M β -Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol, reinst. Serva)

HAT-Medium (Littlefield, 1964)

Gleiche Zusammensetzung wie Zellkulturmedium mit fötalem Kälberserum, zusätzlich:

10^{-4} M Hypoxanthin (p.A., Serva)
 $1,6 \times 10^{-5}$ M Thymidin (Thymidin, Sigma)
 4×10^{-7} M Aminopterin (4-Aminopteroyl-Glutaminsäure, reinst,
Serva)

Von Hypoxanthin + Thymidin und Aminopterin wurden Stammlösungen mit dem 100fachen der oben angegebenen Konzentration hergestellt. Um das Lösen von Hypoxanthin zu erleichtern, wurde NaOH zugegeben.

Polyethylenglykol-Lösung

20 g Polyethylenglykol 4000 (Firma Roth, Karlsruhe) werden 20 min autoklaviert zur Sterilisation. Solange das PEG noch flüssig ist, gibt man unter Rühren 28 ml angewärmtes RPMI mit 15 % Dimethylsulfoxid (reinst, min. 99 %, Serva) dazu.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Trenngel-Puffer:

0,75 M Tris . HCl pH 8,8

Sammelgel-Puffer:

0,25 M Tris . HCl pH 6,8

Acrylamid/Bis/SDS-Lösung:

30 % Acrylamid

0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

0,1 % SDS

gelöst in H₂O

Ammonium-dioxypersulfat-Lösung:

0,8 % (NH₄)₂S₂O₈ in H₂O

Trenngel

20 ml Trenngelpuffer

13,4 ml Acryl/Bis/SDS-Lösung

2 ml (NH₄)₂S₂O₈-Lösung

auf 40 ml mit H₂O auffüllen,

+ 10 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

Sammelgel:

5 ml Sammelgel-Puffer

2 ml Acryl/Bis/SDS-Lösung

1 ml (NH₄)₂S₂O₈-Lösung

mit H₂O auf 20 ml auffüllen,

+ 10 µl TEMED

Probenpuffer:

220 mM Tris . HCl pH 6,8

2 % SDS

5 % β-Mercaptoethynol

15 % (V/V) Glycerin

Bromphenolblau

Elektrodenpuffer:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3

Stromstärke:

ca. 25 mA/Plattengel, max. 130 V

Anfärben der Gele mit Coomassie Brilliant Blue:

(nach Cleveland, 1977)

0,075 % Serva Blau R 250

50 % Methanol

10 % Essigsäure

Entfärben in 5 % Methanol, 10 % Essigsäure

Anfärben der Gele mit Silver-stain

(nach Oakley, 1980)

Das Gel wird nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

1) 10 % Glutaraldehyd, 30 min

2) > 2 h in destilliertem Wasser, Wasser oft wechseln

3) ammoniakalische Silberlösung: 15 min

0,7 ml Ammoniak-Lösung

10,5 ml 0,36 % NaOH

2 ml 19,4 % AgNO_3

auf 50 ml mit destilliertem Wasser auffüllen.

4) 2 min in destilliertem Wasser

5) 0,005 % Zitronensäure, 0,019 % Formaldehyd

6) > 1 h mit destilliertem Wasser waschen

Das Gel kann mit "Tetanol" (photographischer Fixier) entfärbt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Ausbeute bei der Zellfusion

Um Zellklone zu erhalten, die monoklonale Antikörper produzieren, wurden Lymphozyten aus der Milz einer immunisierten Maus mit Tumorzellen fusioniert (s. 2.7.6).

Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridome stammen aus zwei Fusionsexperimenten.

Bei der ersten Fusion wurden 144 Kulturen angelegt, von denen 71 (= 49 %) Klone hervorbrachten, u.a. die Klone 16 c und 46 a. Von den 71 Klonen produzierten 4 Wochen nach der Fusion noch 19 spezifische Antikörper, das entspricht 27 % aller gebildeter Klone. Bei der zweiten Fusion wurden 240 Kulturen angelegt; in 171 davon (= 71 %) wuchsen Zellen an.

4 Wochen nach der Fusion waren noch 13 Klone im RIA positiv, das entspricht 8 % aller gebildeter Klone.

Aus dieser Fusion stammen u.a. die Klone 56 B, 22 A und 62 D. Bei der zweiten Fusion wuchsen deswegen mehr Kulturen an, weil von Anfang an allen Kulturen Feederzellen zugegeben wurden (vgl. Fazekas, 1980).

Die meisten Versuche wurden mit den 3 Linien 16 c, 62 D und 22 A gemacht, ein Teil der Versuche mit 46 a und 56 B.

Von den positiven Klonen wurde ein Teil sofort rekloniert, der andere Teil zunächst eingefroren. Ein Teil der Klone ging verloren, weil die Zellen nicht unter Kulturbedingungen wuchsen, bei anderen war die Antikörperproduktion so instabil, daß keine produzierenden Subklone erhalten wurden. Bei zwei Klonen stellte sich heraus, daß sie im RIA immer "positive" Werte ergaben, egal welches Antigen getestet wurde. Diese Antikörper binden vermutlich entweder an BSA, oder ungewöhnlich stark an das PVC der Mikrotiterplatten.

Da von allen Klonen mehrmals Zellkulturen eingefroren worden sind, die noch nicht alle wieder aufgetaut wurden, kann nicht angegeben werden, wieviel stabile Zelllinien erhalten wurden. Nach Angaben in der Literatur (Edwards, 1981) produzieren etwa 10 % aller Hybridome, die bei einer Fusion entstehen, spezifische Antikörper. Die Anzahl der "positiven" Hybridome hängt vom Fusionsprotokoll und vom Antigen ab. Man geht davon aus, daß

50 - 70 % aller positiven Hybridome keine stabilen, in Zellkultur wachsenden Klone ergeben (Goding, 1980).

Die Anzahl der anfangs positiven Hybridome lag bei der ersten Fusion sehr hoch, während sie bei der zweiten mit den Anhaltswerten aus der Literatur (s. oben) übereinstimmt. Die endgültige Zahl der positiven, stabilen Hybridome aus beiden Fusionen steht zwar noch nicht fest, aber meiner Abschätzung nach wurde bei überdurchschnittlich vielen Hybridomen die Antikörperproduktion nicht stabil. Die Hauptursache dafür ist vermutlich meine mangelnde Erfahrung in den verwendeten Arbeitstechniken.

3.2 ----- Markierung mit ^{125}Jod

Die für den RIA und die Immunoblotting-Technik benötigten radioaktiv markierten anti-Maus-Ig-Antikörper und das Protein A wurden mit den unter 2.10.1 und 2.10.2 verwendeten Methoden jodiert.

Durch die Markierung mit ^{125}J (siehe 2.10) wurde eine spezifische Aktivität zwischen 3×10^6 cpm/ μg und 7×10^6 cpm/ μg erreicht. Nach dem Jodieren lagen die Proteine in der Konzentration von 20 .. 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vor. Die Radioaktivität dieser Lösung lag zwischen 8×10^5 und $1,6 \times 10^6$ cpm/10 μl .

Unabhängig davon, ob Enzymobeads (s. 2.10.2) oder Chloramin T (s. 2.10.1) zum Jodieren verwendet wurde, waren bei jodierten anti-Maus-Ig-Antikörpern stets wenigstens 90 % der Radioaktivität mit Trichloressigsäure fällbar, also an Protein gebunden. Bei Protein A lag dieser Wert teilweise nur bei 80 %. Die oben angegebene Abschätzung der spezifischen Aktivität geht von der Annahme aus, daß Proteinverluste auf der zur Reinigung des Präparats benutzten Ionenaustauschersäule vernachlässigt werden können.

Die jodierten Antikörper und jodiertes Protein A waren maximal 6 Wochen verwendbar. Bei Verwendung älterer Präparationen wurden die im RIA gemessenen spezifischen Werte niedriger, und der Background stieg an.

Die Enzymbeadmethode gilt als schonender als das Jodieren mit Hilfe von Chloramin T. Welche Methode bessere Ergebnisse brachte, wurde nicht systematisch untersucht.

3.3 Der Radio-Immunoassay (RIA)

An den RIA wurden folgende Anforderungen gestellt:

1. Er sollte möglichst wenig Arbeitsaufwand erfordern, da beim Herstellen monoklonaler Antikörper sehr viele Zellkulturüberstände getestet werden müssen, um die wenigen antikörperproduzierenden Klone zu finden.
2. Es sollten Präparationen photosensorischer Membran eingesetzt werden können, da gereinigte Antigene nicht zur Verfügung standen.
3. Er sollte so empfindlich sein, daß auch Antikörper gegen solche Proteine nachgewiesen werden konnten, die nur in geringer Menge im Rhabdom vertreten sind.
4. Der Verbrauch an photosensorischer Membran sollte möglichst gering sein, da diese wegen der geringen Größe und der arbeitsaufwendigen Präparation von Flußkrebsaugen stets limitierend war.

Die Antikörpermenge war dagegen nicht begrenzt. Hybridome produzieren im allgemeinen soviel Antikörper, daß deren Konzentration bei üblicher Zelldichte etwa 5 - 100 µg/ml im Zellkulturüberstand beträgt (Springer, 1980; Edwards, 1981).

Der RIA, der in der kurzen zur Verfügung stehenden Zeit etabliert wurde, folgt in wesentlichen Punkten dem Protokoll von Klinman (1976).

Der RIA basiert darauf, daß das Antigen durch unspezifische Adsorption an die Oberfläche von PVC-Mikrotiterplatten gebunden wird. Nach der Inkubation mit der Antikörperlösung können nicht gebundene Antikörper durch mehrmaliges Waschen der Platte abgespült werden. Gebundene monoklonale (Maus)-Antikörper wurden indirekt nachgewiesen durch radioaktiv markierte anti-Antikörper (z.B. ^{125}J -Schaf-anti-Maus-Ig), die an den unspezifischen (F_c -) Teil der Mausantikörper binden. Für den (ebenfalls indirekten) Nachweis von gebundenen Kaninchenantikörpern wurde jodiertes Protein A benutzt. Protein A (Review s. Langone

1982) bindet zwar gut an alle Kaninchen Ig G Antikörper, bei der Maus aber nur an einige Ig G-Subklassen und ist zum Nachweis der monoklonalen Antikörper deswegen nicht geeignet (Kornvall, 1970).

Das auf den Mikrotiterplatten immobilisierte Antigen lag nicht in gereinigter Form vor, sondern als ein Bestandteil einer beschallten Suspension photosensorischer Membran (zusammen mit anderen Proteinen und Membranlipiden).

Es wurde nicht untersucht, welcher Prozentsatz des zum Beschichten der Mikrotiterplatten eingesetzten Rhabdomproteins an der PVC-Oberfläche haften bleibt, und ob die Proteinzusammensetzung an der PVC-Oberfläche die gleiche ist wie in der ursprünglichen Rhabdompräparation.

Aus diesem Grund ist die tatsächliche Antigenkonzentration auf der Mikrotiterplatte nicht bekannt, sondern konnte nur aufgrund der gemessenen Antikörperbindung abgeschätzt werden (s. 3.3.1).

Routinemäßig wurde eine Proteinkonzentration von 10 µg/ml zum Beschichten der Platten eingesetzt. Die darin enthaltene Antigenmenge war bei den Kaninchenantisera und allen untersuchten monoklonalen Antikörpern limitierend, was man daran erkennen kann, daß bei höherem Antigeneinsatz auch die im RIA gemessene Bindung höher wurde.

Springer (1978) benutzte einen ähnlichen Radio-Immunoassay, um verschiedene monoklonale Antikörper gegen Zelloberflächenantigene zu charakterisieren, und zieht dabei aus dem RIA Rückschlüsse auf Antigen- bzw. Antikörpermengen.

Im Gegensatz dazu fand ich es problematisch, solche halbquantitativen Aussagen aus dem RIA abzuleiten:

Es war mir nicht möglich, zu unterscheiden, ob die Antikörpermenge oder die Avidität* der Antikörper für die im RIA gemessenen Bindungen ausschlaggebend war. Da es sich bei dem verwendeten RIA um einen Test mit indirektem Antikörpernachweis handelte, muß außerdem noch die Affinität des anti-Antikörpers zum ersten (monoklonalen) Antikörper berücksichtigt werden.

*Avidität: Maß für die Bindungsstärke, in das sowohl die Affinität des Antikörpers zum Antigen, als auch die Anzahl der Bindungsstellen eingeht. Diese hängt von der Ak-Klasse ab. IgM-Antikörper mit insgesamt max. 10 Bindungsstellen für Antigen binden fester als z.B. IgG-Ak. mit 2 Bindungsstellen.

Das ist vor allem dann bedeutend, wenn zwei monoklonale Antikörper miteinander verglichen werden sollen, die verschiedenen Klassen angehören.

Abgesehen von dieser Einschränkung wurde der RIA aber allen Anforderungen gerecht, die eingangs an ihn gestellt wurden.

3.3.1 Empfindlichkeit des RIA für Antigen

Um die Nachweisgrenze des Tests für Antigen abzuschätzen, wurde untersucht, ab welcher Konzentration an Mikrotiterplatten gebundenes Mausimmunoglobulin mit ^{125}J -Schaf-anti-Maus-Ig nachgewiesen werden konnte.

Bei diesem indirekten Nachweis von immobilisiertem Maus-Immunglobulin mit ^{125}J -Schaf-anti-Maus-Ig (s. 2.8.1.2) lag die untere Nachweisgrenze für Maus Ig bei ca. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (s. Abb. 1). Bei der Ermittlung dieses Wertes lagen nicht die gleichen Bedingungen vor wie bei dem sonst zum Antikörpernachweis ausgeführten RIA. Dort wurde die Bindung eines Antikörpers durch die Zugabe eines anti-Antikörpers nachgewiesen. Durch diesen zusätzlichen Schritt wird die Empfindlichkeit auch für die Antigenmenge wahrscheinlich noch erhöht.

Folgende Überlegung, die dem tatsächlichen Wert wahrscheinlich näher kommt, führt zu einer noch höheren Empfindlichkeit:

Im Bereich niedriger Antigenkonzentration ist die im RIA gemessene Bindung vor allem proportional zur Antigenmenge (vgl. Abb. 4). In diesem Bereich kann man eine 1 : 1 Interaktion von Antigen und monoklonalem Antikörper annehmen. Wenn der Antikörper der Klasse IgG angehört, kann man annehmen, daß er etwa einen radioaktiven anti-Antikörper bindet.

Der monoklonale Antikörper 62 D (ein IgG-Antikörper, s. 3.6) band etwa 1000 cpm, wenn die Mikrotiterplatten mit 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Rhabdomprotein beschichtet worden waren. Da die spezifische Aktivität des zum Nachweis verwendeten radioaktiven Kaninchen-anti-Maus IgG ca. 10^6 cpm/ μg betrug, wurde 1 ng Kaninchen-anti-Maus-IgG und damit ca. 1 ng monoklonaler Antikörper gebunden. Unter der obigen Annahme der 1 : 1 Interaktion von Antigen und Antikörper und etwa gleicher Molmasse der beiden (s. 3.11.3) setzt das 1 ng Antigen pro Vertiefung der Mikrotiterplatte bzw.

20 ng Antigen/ml Rhabdomsuspension voraus. Das Antigen würde nach dieser Abschätzung etwa 1/15 der Gesamtproteinmenge der Rhabdomsuspension ausmachen, was mit den Ergebnissen der gelelektrophoretischen Auftrennung der Rhabdomproteine in etwa übereinstimmt.

3.3.2 Nachweisgrenze für Antikörper

Um die Nachweisgrenze des RIA für Antikörper abzuschätzen, wurden Tests wie unter 2.8.1.1 beschrieben durchgeführt. Wenn man als untere Nachweisgrenze einen Wert annimmt, der etwa 5 mal höher als der im RIA ohne Antikörperzugabe gemessene Wert ist, konnten mit ^{125}J -Schaf-anti-Maus-Ig noch Immunglobulinkonzentrationen von 1 - 2 ng/ml nachgewiesen werden (s. Abb. 2). Da 50 μl Antikörperlösung pro Einzelbestimmung eingesetzt wurden, entspricht dieser Wert einer Antikörpermenge von 0,05 - 0,1 ng pro Test.

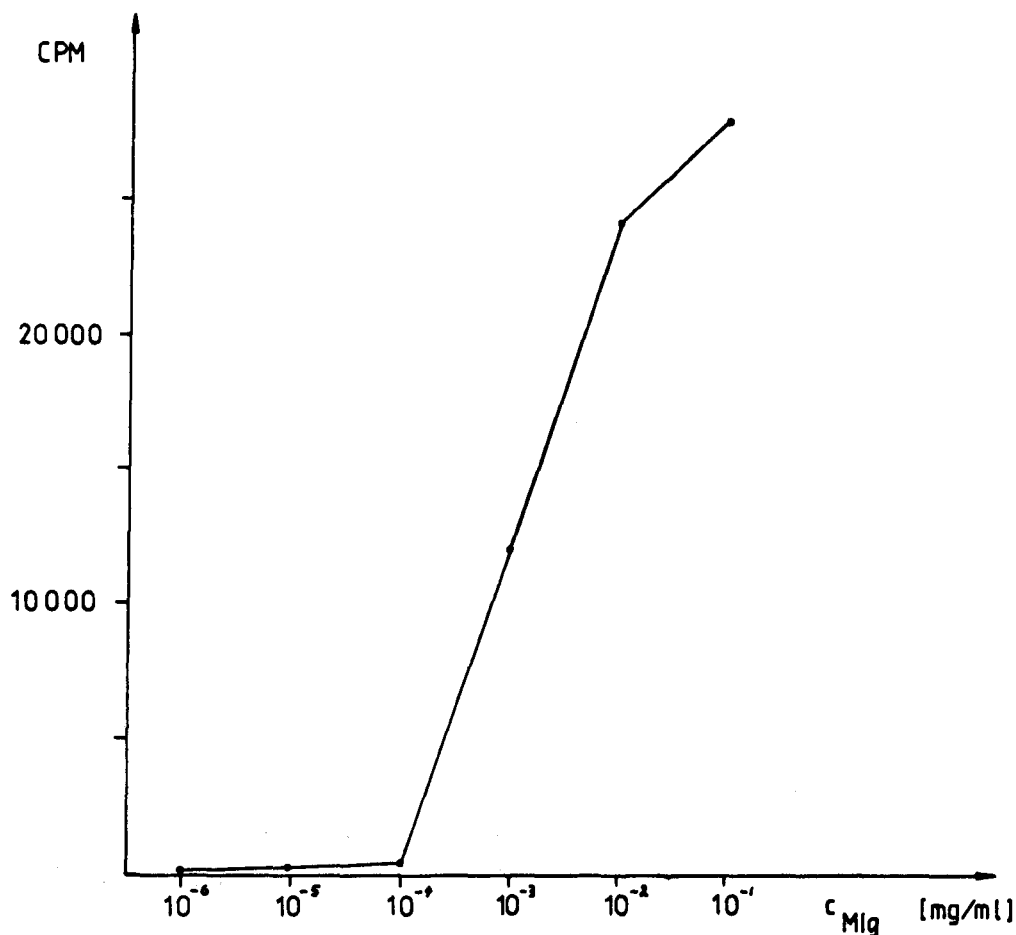


Fig. 1: Sensitivity of RIA to bound antigen
Purified mouse immunoglobulin at concentrations between 10^{-6} ... 10^{-1} mg/ml was coated to PVC-microtiter plates. Remaining binding sites were saturated with 0,1 % BSA. ^{125}J -labelled sheep anti-mouse Ig (63 000 cpm/50 μl) was used to detect the mouse Ig which was attached to the plates. Radioactivity bound (cpm) was plotted against the concentration of mouse Ig in the solution which was used to coat the microtiter plates.
5 times more radioactivity was bound when about 10^{-4} mg/ml mouse Ig was coated than at background.
Background (0,1 % BSA instead of mouse Ig) was 55 cpm.

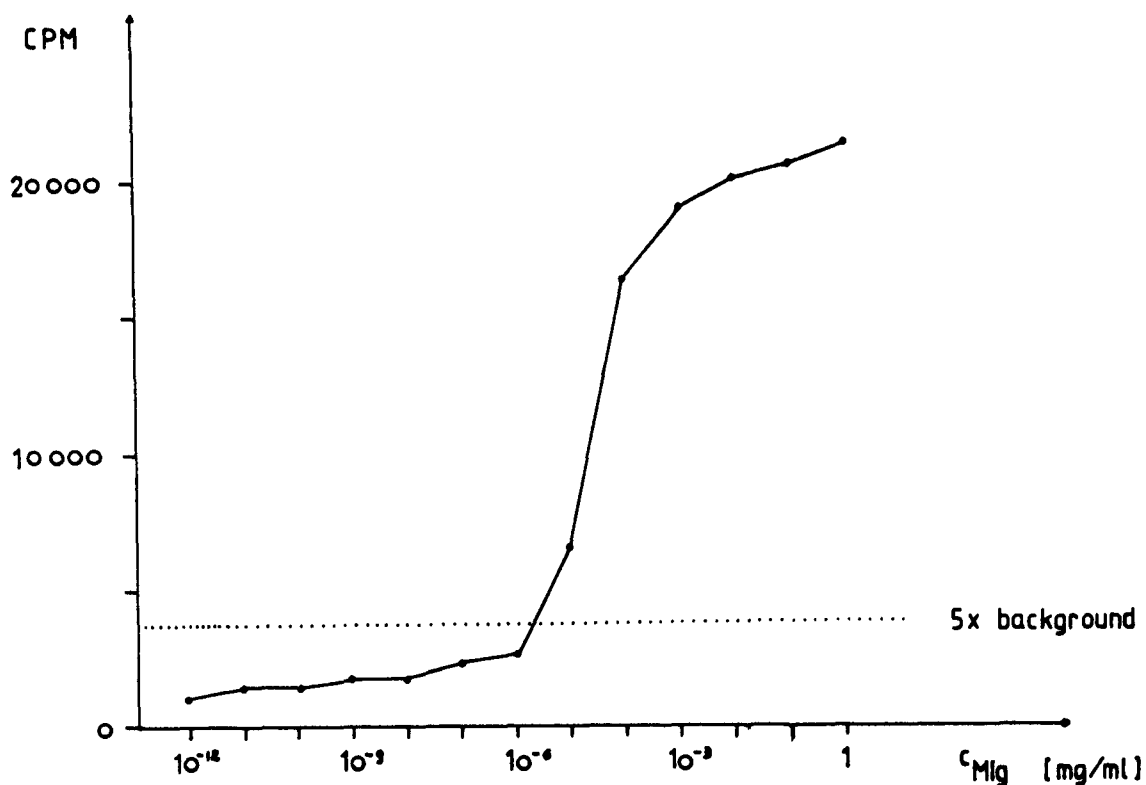


Fig. 2: Sensitivity of Radio-Immuno-Assay to bound antibodies
 Microtiter plates were coated with rabbit anti-mouse immunoglobulin and then incubated with various concentrations of mouse immunoglobulin (MIg). MIg bound was then detected with ¹²⁵J-labelled Sheep anti-MIg (60 000 cpm/50 µl).
 In the test shown above, 1.8 ng/ml mouse Ig could be clearly detected.
 The background (0,1 % BSA-solution instead of mouse Ig) was 750 cpm.

3.3.3 Abschätzung der für ein Fusionsexperiment benötigten Menge an Astacus-Rhabdomprotein

In zwei Experimenten wurden Milzzellen immunisierter Mäuse mit Tumorzellen fusioniert, um monoklonale Antikörper zu erhalten. Den Verbrauch an Rhabdomprotein bei dem zweiten Fusionsexperiment habe ich abzuschätzen versucht. Von dieser Fusion stammen 3 monoklonale Antikörper, mit denen weitere Versuche durchgeführt wurden, vermutlich sind aber noch 2-3 weitere, stabile Zelllinien entstanden, die spez. Antikörper produzieren, und die bisher noch nicht weiter untersucht wurden.

Von der Immunisierung der Maus für das Fusionsexperiment bis zur Isolierung von Zellklonen, die spezifische Antikörper produzieren, wurden etwa 2,2 mg Rhabdomprotein verbraucht (entspricht der Präparationsausbeute von 300 - 400 Augen). Diese Proteinmenge ergibt sich wie folgt:

1. Immunisierung der Maus: ca. 400 µg Rhabdomprotein

Die Maus, deren Milzzellen zur Produktion monoklonaler Antikörper verwendet wurde, wurde insgesamt viermal mit je ca. 100 µg Rhabdomprotein immunisiert.

2. Test der gebildeten Hybridome nach der Zellfusion: ca. 520 µg Rhabdomprotein

Nach der zweiten Fusion wuchsen in 171 Kulturen Zellen an. Um zu ermitteln, welche dieser Hybridome spezifische Antikörper produzieren, wurden die Überstände aller Hybridome dreimal im Abstand von jeweils etwa 4 Tagen im RIA getestet. Pro Test wurde ein Doppelwert für jeden Überstand gemessen, und 1 µg Rhabdomprotein pro Test und Hybridom verbraucht. (Zum Beschichten der Mikrotiterplatten im RIA wurden 10 µg/ml Rhabdomprotein eingesetzt, s. 2.8.)

3. Reklonieren der positiven Hybridome: ca. 1300 µg Rhabdomprotein

Die positiven Hybridome mußten nach der Fusion rekloniert werden (s. 2.7.7). Im günstigsten Fall waren dafür pro Klon 50 - 100 µg Rhabdomprotein nötig. Von den Hybridomen der zweiten Fusion wurden 13 rekloniert (vgl. 3.1), die aber nicht alle stabile Zelllinien ergaben.

3.3.4 Abhängigkeit der RIA-Bindungskurven von der Menge an eingesetztem Antigen und Antikörper

Zellkulturüberstände mit monoklonalen Antikörpern zeigten im RIA sehr unterschiedlich hohe Bindung und Titer (Titer = Verdünnung des Zellkulturüberstandes bei halbmaximaler Bindung, vgl. 3.4.1).

Am Beispiel zweier monoklonaler Antikörper (22 A und 62 D) wurde die Abhängigkeit der Form der RIA-Bindungskurven von der relativen Menge des eingesetzten Antigens und der relativen Antikörpermenge untersucht.

Bei einer vorgegebenen Antikörpermenge nahm die Bindung im RIA mit steigender Antigenmenge bis einem Maximalwert zu, und blieb danach konstant oder nahm wieder leicht ab. Diesen Abfall der Kurve kann man deuten als eine leichte Hemmung der Antigen-Antikörper-Bindung durch Antigenüberschuß. Die maximale Bindung wurde erreicht bei 12,5 µg/ml Gesamtprotein aus Rinder-ROS für Antikörper 22 A, und zwischen 15 und 30 µg/ml Astacus-Rhabdomprotein für Antikörper 62 D.

Beide Antikörper zeigten auch bei sehr geringer Antigenkonzentration noch eindeutig positive Bindungswerte im RIA:

Antikörper des Klons 62 D zeigten noch eine eindeutig positive Bindung (das Fünffache des "Backgrounds") wenn 0,3 µg/ml Astacus-Rhabdomprotein zum Beschichten der Mikrotiterplatten verwendet worden war. Bei Antikörpern des Klons 22 A lag der vergleichbare Wert für die Bindung an Rinder-ROS bei ca. 0,1 µg Gesamtprotein/ml.

Die Antigentitrationskurve (s. Abb. 3) verlief umso flacher, je niedriger die Antikörperkonzentration war.

Abb. 4 beinhaltet im Prinzip die gleiche Aussage wie Abb. 3, es wurde nur eine andere Auftrageweise gewählt. Sie soll die Bedeutung der Antigenkonzentration für die Form der Antikörper-titrationskurve verdeutlichen. Diese in Abb. 4 gewählte Darstellungsweise ist die gleiche, wie sie für die Charakterisierung von Zellkulturüberständen und die Tests auf Kreuzreaktivität (s. 3.4.1) gewählt wurde. Die Abb. 4 soll verdeutlichen, daß man einen großen Fehler begehen kann, wenn man die Bindung eines Antikörpers an verschiedene Präparationen vergleicht, wenn die Zusammensetzung dieser Präparationen, vor allem der Anteil des Antigens am Gesamtprotein und damit die eingesetzte Antigenmenge, nicht gleich ist.

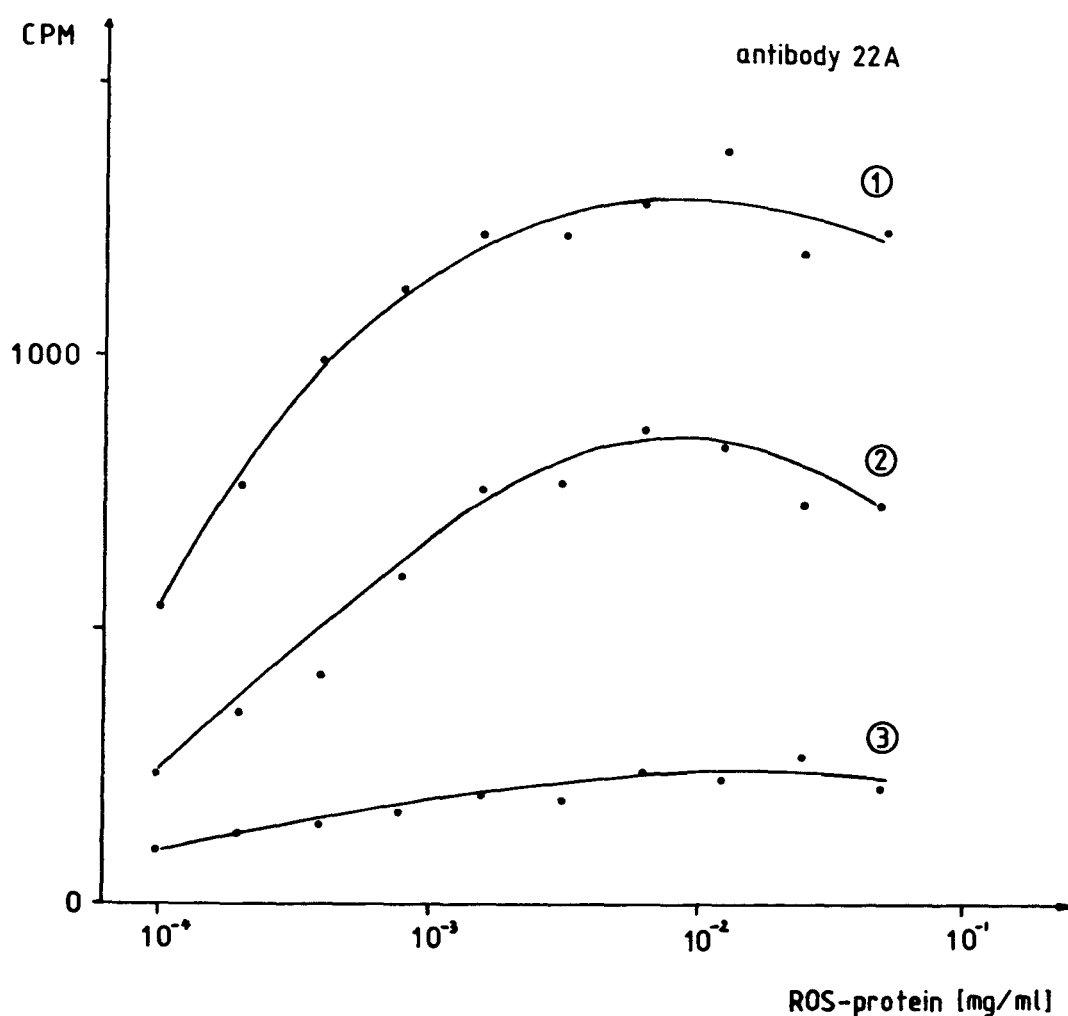


Fig. 3: Binding of antibody 22 A in RIA tested at different amounts of coated ROS protein
 A sonicated preparation of bovine rod outer segments was serially diluted and coated to PVC-microtiter plates at protein concentrations ranging from 0.1 → 50 μ g/ml.
 Binding of hybridoma culture supernatant of clone 22 A at various dilutions was tested in RIA (2.8)
 Second, radiolabelled antibody was rabbit anti-mouse Ig (50 000 cpm/50 μ l). Cpm bound in RIA were plotted against total ROS protein concentration coated.
 1: undiluted supernatant containing antibody 22 A
 2: 1 : 10 diluted supernatant
 3: 1 : 1000 diluted supernatant

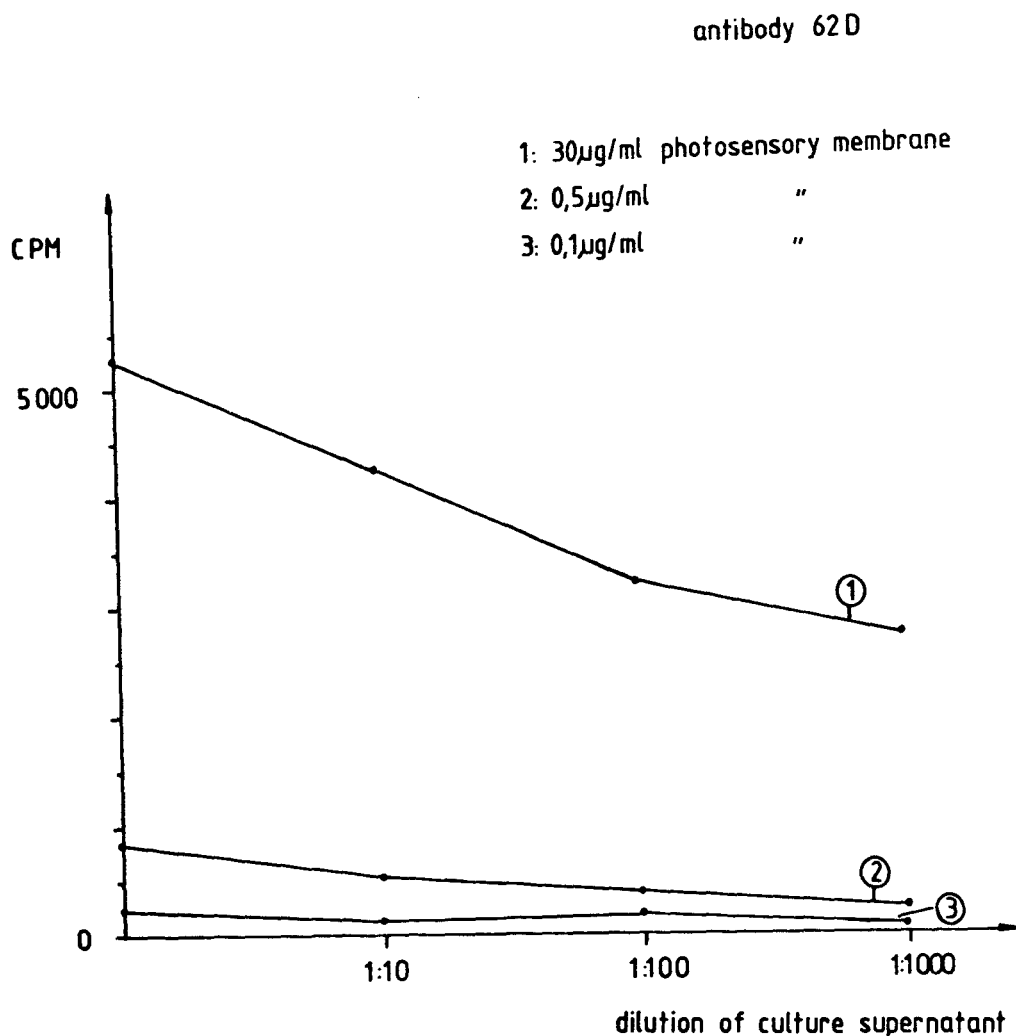


Fig. 4: Binding of monoclonal antibody 62 D in RIA using different amounts of coated antigen

In the figure above the radioactivity bound in RIA at different dilutions (1 : 10 $\rightarrow$ 1 : 1000) of culture supernatant containing antibody 62 D is shown for three different amounts of immobilized antigen (curve 1, 2 and 3). Sonicated photosensory membrane of *Astacus* with protein concentrations of 30 μ g/ml (curve 1), 0,5 μ g/ml (curve 2) and 0,1 μ g/ml (curve 3) was immobilized on PVC-micro-titer plates.

At each amount of coated rhabdom protein binding of antibody of clone 62 D was tested in RIA as described at 2.8, using undiluted, 1 : 10, 1 : 100 and 1 : 1000 diluted cell culture supernatant. Anti-antibody in the RIA was ^{125} J-rabbit anti-mouse IgG (50 000 cpm/50 μ l).

In curve 1 a 60 times higher antigen concentration was used as in curve 2, and the maximum binding of antibodies, which was detected in RIA, was about 6 times higher as in curve 2. 0,1 μ g/ml rhabdom protein (curve 3) contained too little antigen, to detect binding of antibodies.

Background (fresh culture medium instead of antibody) was ca. 100 cpm.

3.4 ----- Kreuzreaktivität

3.4.1 Untersuchung der Kreuzreaktivität im RIA

Die Bindung von 7 verschiedenen monoklonalen Antikörpern sowie von den Antiseren zweier Kaninchen an beschallte Präparationen photosensorischer Membran von Astacus, Sepia und Rind wurde im Radio-Immunoassay miteinander verglichen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Tests ist zu berücksichtigen, daß die Proteinzusammensetzung bei den Präparationen von Astacus, Sepia und Rind sicher nicht gleich ist, aber sowohl die Absolutwerte als auch die Steigung der Antikörpertitrationskurve von der Antigenmenge abhängt (s. 3.3.4). Nur in einem Fall wurde eine nennenswerte Bindung an andere als Flußkrebsproteine gefunden. Der Antikörper des Klons 22 A kreuzreagierte mit Rinder-Stäbchenaußensegmenten, aber nicht mit Sepia photosensorischer Membran.

Der Antikörper des Klons 22 A band ebenfalls gut an hypoton gewaschene Rinderdisks, die an Protein fast nur noch Rhodopsin (> 95 % des Gesamtproteins) enthalten, zeigten aber keine Bindung an gereinigtes G-Protein und Phosphodiesterase aus Rinder-Stäbchenaußensegmenten.

(G-Protein und Phosphodiesterase wurden von H. Kühn zur Verfügung gestellt; Präparation s. Kühn, 1983).

Fig. 5: Crossreactivity of rabbit-antirhabdom antisera and monoclonal antibodies to Sepia and bovine photoreceptor membrane preparations tested in solid phase RIA
Preparations of photosensory membrane were coated to PVC-microtiter plates. Rabbit antisera and hybridoma culture supernatants were serially diluted and their binding to preparations of photosensory membrane of Astacus, Sepia and cow were tested in the RIA. In the diagrams of Fig. 5 the radioactivity, which was bound to the preparations of photosensory membrane of the three different species was plotted versus the dilution of antibodies (hybridoma culture supernatant or rabbit antiserum). The protein concentrations which were used to coat the microtiter plates are shown as insets.- Generally, the binding to Sepia was weak, and to bovine ROS even weaker. Only antibody of one clone (22A) did crossreact significantly. It showed good binding to bovine ROS, but not to Sepia photoreceptor membrane preparation. - In figure 5 c, antibody 22 A shows better binding to bovine ROS than to Astacus photosensory membrane preparation. This does not mean, that antibody 22A prefers the antigen from bovine ROS, since the amount of coated bovine protein is much higher than the amount of coated Astacus protein. The concentration of the antigen is not known in either preparation.

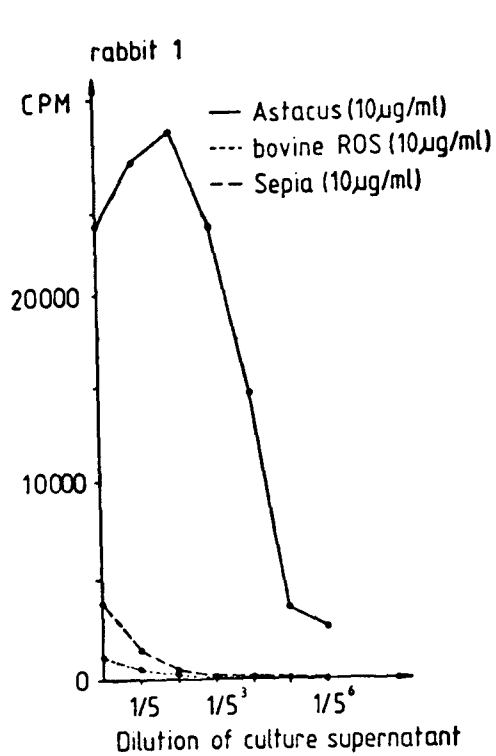


Fig. 5a

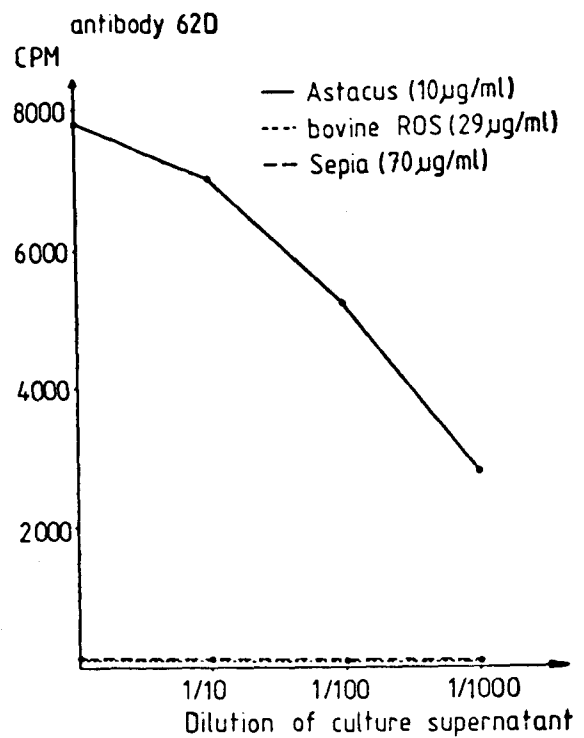


Fig. 5b

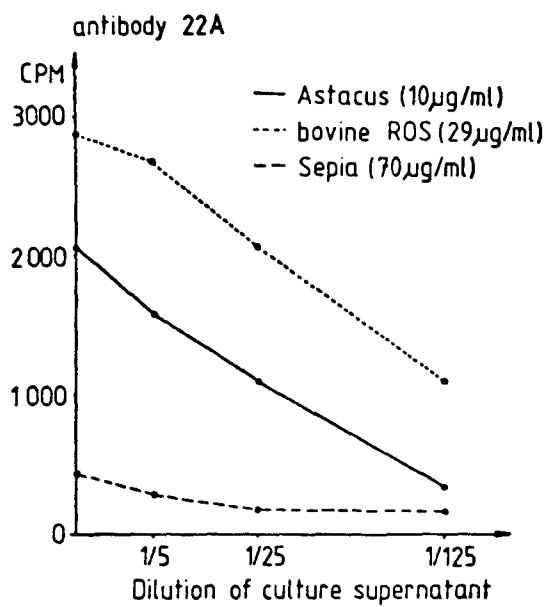


Fig. 5c

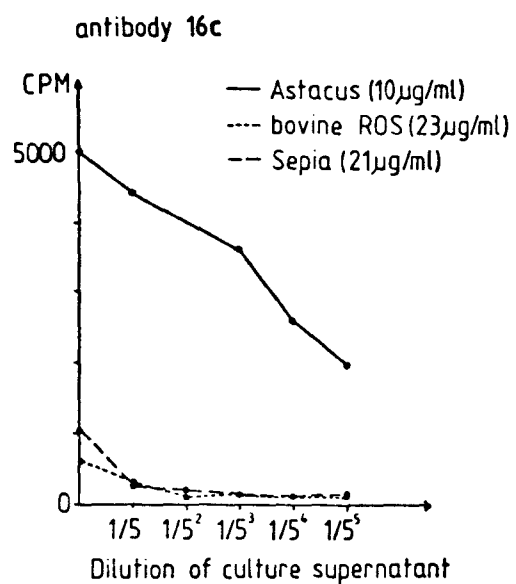


Fig. 5d

Tabelle 1

Kreuzreaktivität des Antikörpers 22 A mit einem Antigen in Rinder-Stäbchenaußensegmenten

getestete Präparation	µg Protein/ml	geb. Radioaktivität cpm	
		Überstand mit Antikörper 22 A	frisches Medium
Astacus photosensorische Membran	10	1290	80
Rinder-Stäbchenaußen-Segmente	12,5	1560	70
gewaschene Rinder-Disks	17,5	1830	100
G-Protein aus ROS	10	270	120
Phosphodiesterase aus ROS	10	310	130
BSA	10	100	60

Die getesteten Präparationen mit den in der Tabelle angegebenen Gesamtproteinkonzentrationen wurden in Mikrotiterplatten pipettiert und darin über Nacht inkubiert, um die Oberfläche der Platten mit Protein zu beschichten. Nicht adsorbiertes Protein wurde danach abgewaschen und die Platten mit Zellkulturüberstand von Klon 22 A bzw. frischem Zellkulturmedium inkubiert. Es wurde unverdünnter, 1 : 5 und 1 : 25 verdünnter Überstand getestet. Die maximale Bindung trat bei allen getesteten Präparationen bei der Inkubation mit unverdünntem Überstand auf.

Zum Nachweis gebundenen monoklonalen Antikörpers wurde ^{125}J Kaninchen-anti-Maus IgG (ca. 55 000 cpm/50 µl) verwendet. In der Tabelle sind die Mittelwerte von 2 Einzeltests eines Versuchs aufgeführt.

Weitere Versuche brachten das gleiche Ergebnis.

Wenn Präparationen von Rinder-Stäbchenaußensegmenten und von Astacus photosensorischer Membran mit der gleichen Gesamtproteinkonzentration im RIA getestet werden, war die Bindung von Antikörper 22 A an beide Präparationen etwa gleich hoch.

3.4.2 Untersuchung der Kreuzreaktivität im Kompetitionsassay
Eine zweite Möglichkeit, Kreuzreaktivität zu untersuchen, bietet der Kompetitionsassay (s. 2.12). Bei diesen Tests wurde zu einer konstanten Menge von polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern eine steigende Menge photosensorischer Membran von Sepia oder Rind (= Kompetitor) zugegeben, und anschließend die verbleibende Menge an freiem Antikörper im RIA durch die Bindung an immobilisierte Astacus photosensorische Membran bestimmt. Kaninchen-anti-Astacusrhabdom-Antiserum (Kaninchen 1) zeigte auch im Competitionstest keine Bindung an Präparationen photosensorischer Membran von Rind oder Tintenfisch (s. Abb. 6). Der Antikörper des Klons 22 A dagegen, der auch im RIA mit Rinder-Stäbchenaußensegmenten kreuzreagierte, band im Competitionstest sowohl an Rinder- als auch an Astacus photosensorische Membran (s. Abb. 7). Antikörper 22 A band nicht an alle Präparationen von Astacus photosensorischer Membran und von Rinder-ROS gleich gut. Bei manchen ROS-Präparationen konnte selbst bei Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml im Kompetitionsassay keine Bindung mehr nachgewiesen werden, ohne daß bis jetzt die Ursache dafür gefunden werden konnte.

3.5-----Einfluß von Detergenz auf die Antikörperbindung

Die Bindung der Antikörper an SDS-denaturierte Proteine (s. 2.8.2) wurde im RIA bestimmt. Die meisten Antikörper banden auch an SDS-denaturiertes Antigen noch gut (s. Tab. 2). Eine Ausnahme machte der Klon 22 A, dessen Antikörper zwischen Astacus und Rinder photosensorischer Membran kreuzreagiert. Der Antikörper des Klons 22 A band nicht mehr an Astacus Rhabdome und ROS, wenn diese zuvor mit SDS denaturiert wurden. Auch das Detergenz Emulphogen beeinträchtigte in 2 von 3 Versuchen die Bindung des Antikörpers 22 A an ROS-Präparationen (s. Abb. 7) ebenso stark wie SDS. Aus diesem Grunde ist der Befund, daß dieser Antikörper nicht an gereinigtes, in Emulphogen gelöstes Rinder-Rhodopsin bindet, kein Beweis dafür, daß Antikörper 22 A nicht mit nativem Rhodopsin reagiert. Für Antiserum von Kaninchen 1 und Antikörper des Klons 16 c wurde die Bindung an Triton-Rhabdomextrakte im Kompetitionsassay (s. 2.12) untersucht. Sowohl Antikörper aus Kaninchen-antiserum als auch die monoklonalen Antikörper (Klon 16 c) banden an in Triton gelöste Rhabdomproteine (s. Abb. 8) etwa ebenso gut wie an Rhabdomproteine in beschallten Suspensionen. (Es wurde nur ein Experiment dazu durchgeführt).

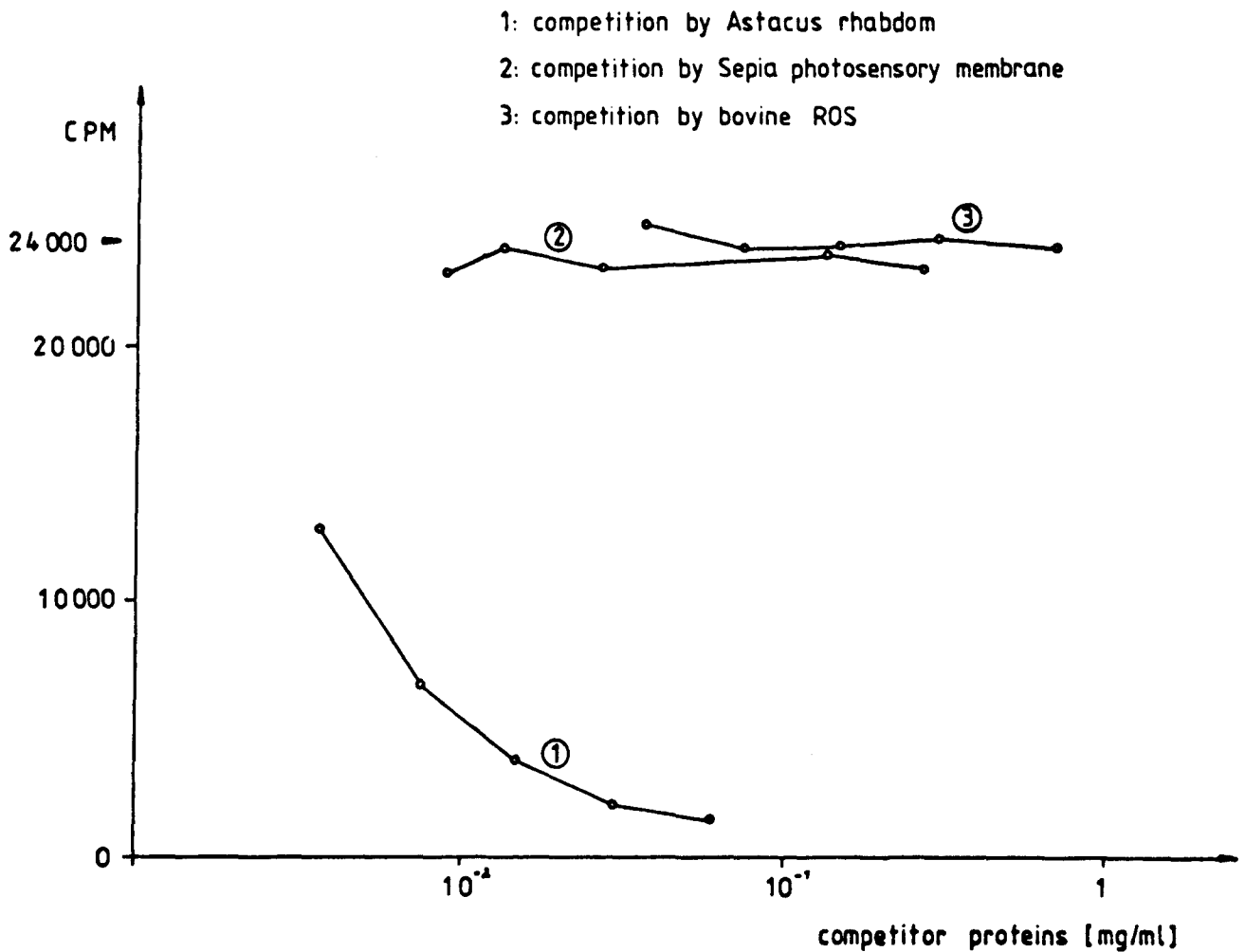


Fig. 6: Crossreactivity of rabbit anti-rhabdom antiserum to *Sepia* and bovine photosensory membrane examined in competition assay

Rabbit antiserum was diluted 1 : 100 and incubated with serial dilutions of sonicated photoreceptor membrane preparations of *Astacus* (1), *Sepia* (2) and Cow (3) as competitor. After 2 hrs of incubation aliquots were tested in RIA (2.8) for remaining antibody binding to *Astacus* photosensory membrane preparations. CPM bound to *Astacus* photosensory membrane in the RIA were plotted against the concentration of photoreceptor membrane proteins of the three species used as competitor. When buffer was added instead of photosensory membrane (no competitor), the binding of antiserum was 24 000 cpm.

- 1 Competition to binding to *Astacus* rhabdom proteins by *Astacus* rhabdomproteins
- 2 Competition to binding to *Astacus* rhabdom proteins by *Sepia* rhabdomproteins
- 3 Competition to binding to *Astacus* rhabdom proteins by proteins from bovine ROS

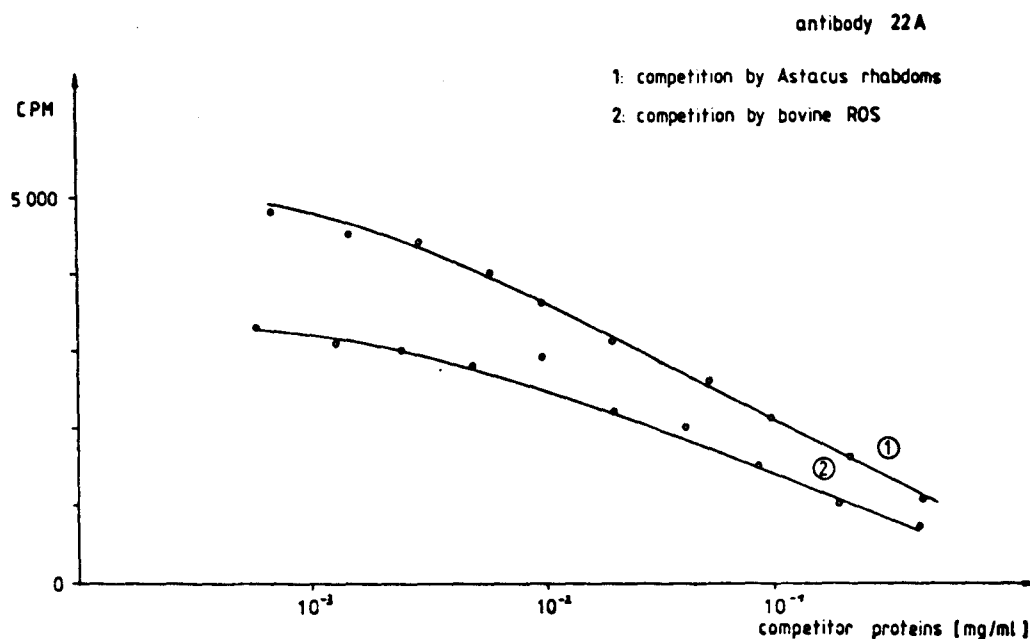


Fig. 7: Binding of antibodies of clone 22 A to *Astacus* rhabdoms and bovine ROS measured in competition assay
Supernatant of clone 22 A (1 : 100 diluted) was incubated with serially diluted suspensions of sonicated photoreceptor membrane proteins from *Astacus* (1) or cow (2) as competitor. After 2 hrs of incubation aliquots of the samples were tested for their binding to sonicated, bleached ROS in RIA (1.8). In the graph shown above, cpm bound to the sonicated, bleached ROS in this RIA were plotted against the concentration of *Astacus* or bovine photoreceptor membrane proteins (= competitor) which had been present during the incubation. In the experiment shown above, bovine ROS were more effective as competitor than *Astacus* rhabdoms. This result depends very much on the preparation, which was tested. Other preparations of ROS bound less antibody.

Tabelle 2

Einfluß des denaturierenden Detergenzes SDS auf die Antikörperbindung

Antikörper	Bindung an SDS-behandelte Rhabdompräparationen in % der max. Bindung ohne SDS (± Standardabweichung)	
Kaninchenantiserum (Kaninchen 1)	105 ± 7	(n = 2)
Kaninchenantiserum (Kaninchen 2)	90	(n = 1)
Klon 16 c	78 ± 6	(n = 2)
Klon 45 D	80	(n = 1)
Klon 56 B	64 ± 6	(n = 2)
Klon 62 D	105 ± 7	(n = 2)
Klon 22 A	18 ± 3,5	(n = 2)

Die Bindung von Antikörpern an SDS-denaturierte Rhabdome wurde im RIA (s. 2.8) getestet und verglichen mit der Bindung an nicht-denaturierte Rhabdome. Die maximale Bindung an denaturierte Rhabdome wurde als Prozentsatz der maximalen Bindung an native Rhabdome der gleichen Präparationen und im gleichen Test ausgedrückt.

Die unspezifische Bindung (statt Antikörperlösung frisches Zellkulturmedium) war bei nativen und SDS-denaturierten Rhabdomen gleich hoch.

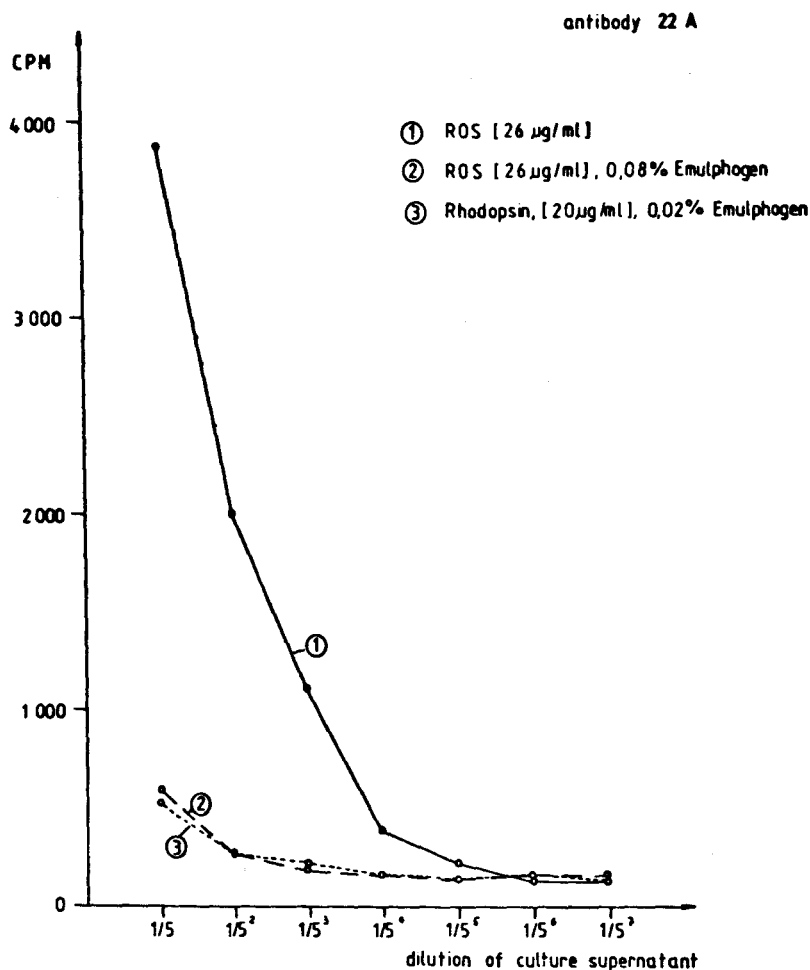


Fig. 7a: Effect of detergent on the binding of monoclonal anti-body 22 A
 Sonicated, bleached ROS with (2) and without (1) Emulphogen and purified rhodopsin in Emulphogen (3) were coated to microtiter plates by drying the solutions down in the wells overnight at ca. 35° C.
 Binding of antibodies in serially diluted hybridoma culture supernatant was then tested in RIA (s. 2.8.2). Radioactivity bound in the RIA was plotted against the dilution of cell culture supernatant containing anti-body 22 A.

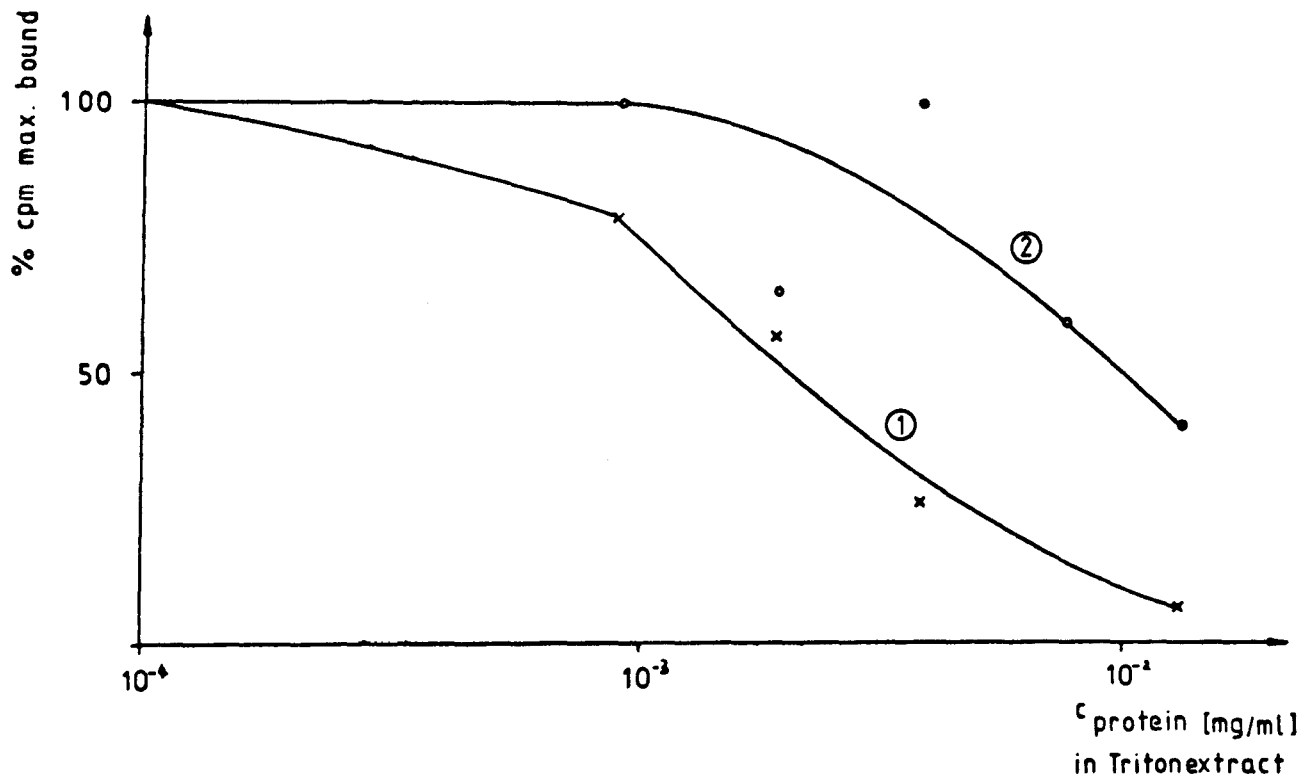


Fig. 8: Inhibition of antibody binding to sonicated *Astacus* rhabdoms by Triton-solubilized rhabdoms
 Rabbit anti-rhabdom antiserum (curve 1) and culture supernatant of clone 16 c (curve 2) were preincubated with serially diluted Triton X-100 extract (see text) of *Astacus* rhabdoms as a competitor, and subsequently tested for their capacity to bind to sonicated *Astacus* rhabdoms in RIA.
 Maximum binding (called 100 %) occurred, when no Triton-extract of *Astacus* rhabdoms was present during pre-incubation.
 Binding in the other samples, where antibody had been preadsorbed with increasing amounts of rhabdom protein, as shown in the abscissa, was expressed as percentage of the maximum binding and plotted in the ordinate.

3.6 Bestimmen der Antikörperklasse

Insgesamt wurden die Antikörper von 5 Hybridomen getestet (s. 2.9). Die Antikörper von 2 Hybridomen (56 B, 62 D) banden besser an Schaf-anti-Maus-Ig als an Ziege-anti- μ , und sind deswegen vermutlich keine IgM-Antikörper (vgl. 2.9).

Die Antikörper eines dieser Hybridome (62 D) reagierten außerdem sehr gut mit Kaninchen-anti-Maus-IgG, woraus man schließen kann, daß es sich um IgG-Antikörper handelt. Antikörper des Klons 56 B wurden nicht mit anti-IgG getestet.

Die Antikörper der restlichen Hybridome banden sowohl an Schaf-anti-Maus-Ig als auch an anti-Maus- μ wie auch der IgM Kontrollantikörper, was darauf hindeutet, daß die Antikörper der restlichen Klone der Klasse IgM angehören (s. Abb. 9).

Keiner der monoklonalen Antikörper band an Protein A, auch nicht der IgG-Kontrollantikörper. Dies steht im Widerspruch zur Literatur (Kronvall, 1970), wonach Maus-IgG-Antikörper mit einer γ_3 , γ_{2a} oder γ_{2b} Kette an Protein A binden sollen. Die Antikörperklassen wurden vor allem deshalb bestimmt, um die experimentelle Arbeit zu erleichtern. Antikörper verschiedener Klassen werden nach verschiedenen Methoden aufgereinigt oder aus Lösungen gefällt.

Die Konzentration der einzelnen Antikörperklassen im Mäuserum ist wie folgt:

Klasse	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)
IgG 1	6 500
IgG 2a	4 200
IgG 2b	1 200
IgA	260
IgM	1 000

(Balb/c-Maus, 15 Wochen alt; Tabelle aus: Hudson, 1976).

Von den untersuchten monoklonalen Antikörpern waren vermutlich 3 (22 A, 16 c, 46 a) von der Klasse IgM, und 2 (56 B, 62 D) von der Klasse IgG. Die Klasse IgA kann für Antikörper 56 B nicht ausgeschlossen werden, ist aber unwahrscheinlich, da IgA-Antikörper sehr selten sind (s.o.). Verglichen mit der Ver-

teilung der Antikörperklassen im Serum waren unerwartet viele monoklonale Antikörper der Klasse IgM.

Ich halte es für unwahrscheinlich, daß das Immunisierungsschema der Grund dafür ist, da die Mäuse mehrmals immunisiert wurden.

(Beim ersten Kontakt mit einem Antigen werden bevorzugt IgM-Antikörper gebildet.)

Der hohe Anteil an IgM könnte mit dem Antigen zusammenhängen. Eine weitere mögliche Erklärung ist, daß IgM-Antikörper, da sie mehr (theoretisch 10) Bindungsstellen für das Antigen haben als IgG-Antikörper (2 Bindungsstellen), fester binden, und deshalb im RIA leichter entdeckt wurden.

3.7-----Einfluß der Ultraschallbehandlung von Astacus photo- sensorischer Membran auf die Antikörperbindung

Im Kompetitionstest (s. 2.12) wurde die Bindung der Antikörper von 3 Klonen an beschallte (s. 2.4) und unbeschallte Rhabdompräparationen verglichen. Der Antikörper des Klons 16 c bindet wesentlich schlechter an unbeschallte Präparationen als an beschallte. Bei beschallten Präparationen mußte weniger als 10 µg/ml Gesamtprotein zugegeben werden, um die Antikörperbindung im Kompetitionssassay auf 50 % der Maximalbindung zu verringern, bei unbeschallten Präparationen war dagegen auch bei Zugabe von 70 µg/ml Gesamtprotein noch kaum Hemmung erkennbar (s. Abb. 10). Dieses Ergebnis kann man damit erklären, daß die Bindungsstelle für den Antikörper 16 c bei unbeschallten Rhabdompräparationen nicht für den Antikörper zugänglich ist. Möglicherweise liegt sie auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Rhabdommembran, und kann erst dann von dem Antikörper erreicht werden, wenn sich beim Beschallen "inside-out"-Vesikel bilden.

Für den Antikörper des Klons 62 D ergab sich nur ein geringer Unterschied in der Bindung an beschallte und unbeschallte Präparationen. Es wurde nicht untersucht, ob dieser Unterschied signifikant ist (s. Abb. 12). Die Bindung des Antikörpers von Klon 22 A an unbeschallte Astacus Photorezeptormembranen war etwas besser als an beschallte, wenn die Präparation unbelichtet war. Bei belichteten Rhabdomen war die Bindung an beschallte Präparationen besser (s. Abb. 11).

Fig. 9: Determination of the antibody class of the monoclonal antibodies

Different dilutions of tissue culture supernatants containing monoclonal antibodies were incubated in microtiter plates which had been coated with rabbit anti-mouse Ig. The binding of radiolabelled sheep-anti-mouse Ig, goat anti- μ and rabbit anti-mouse IgG was determined in RIA (s. 2.9).

The binding of sheep anti-mouse Ig and goat anti- μ was determined in one assay, binding of rabbit anti-IgG was measured in the same way, but in another assay, using another batch of culture supernatant.

IgG and IgM-control are tissue culture supernatants with monoclonal antibodies of known classes.

Radioactivity bound by the monoclonal antibodies in RIA is plotted in the ordinate, dilution of culture supernatant containing the monoclonal antibodies in the abscissa.

R - aMIgG: rabbit anti-mouse Immunoglobulin G

S - aMIg : sheep anti-mouse Immunoglobulin (IgG + IgM)

G - a μ : goat anti-mouse μ (IgM heavy chain).

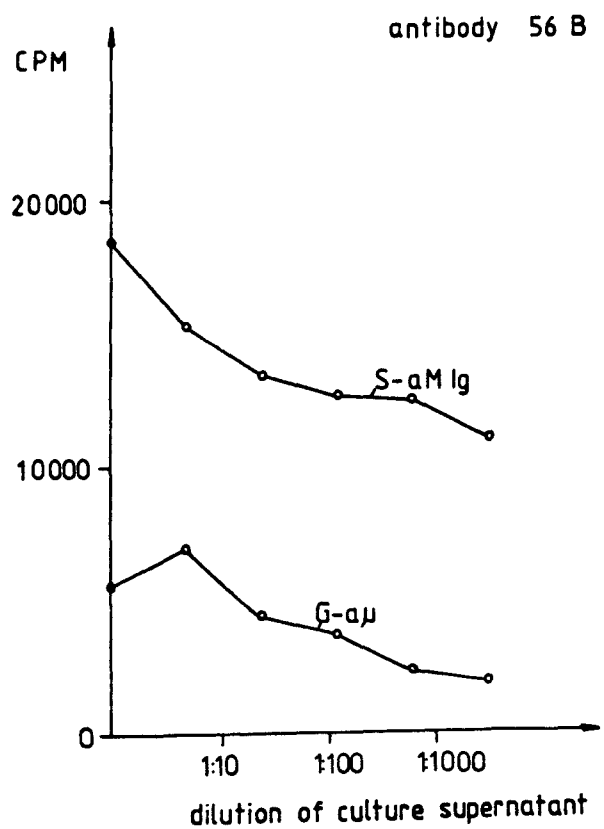
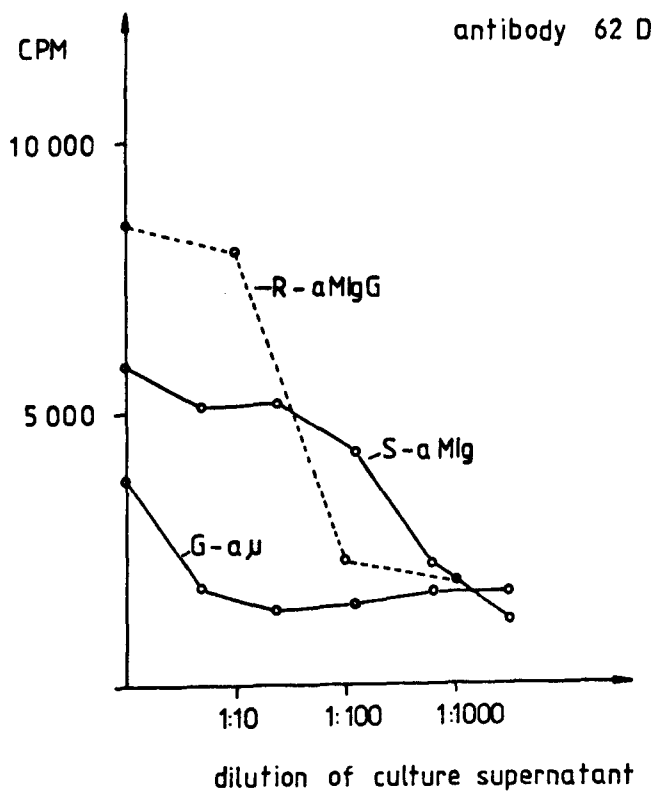
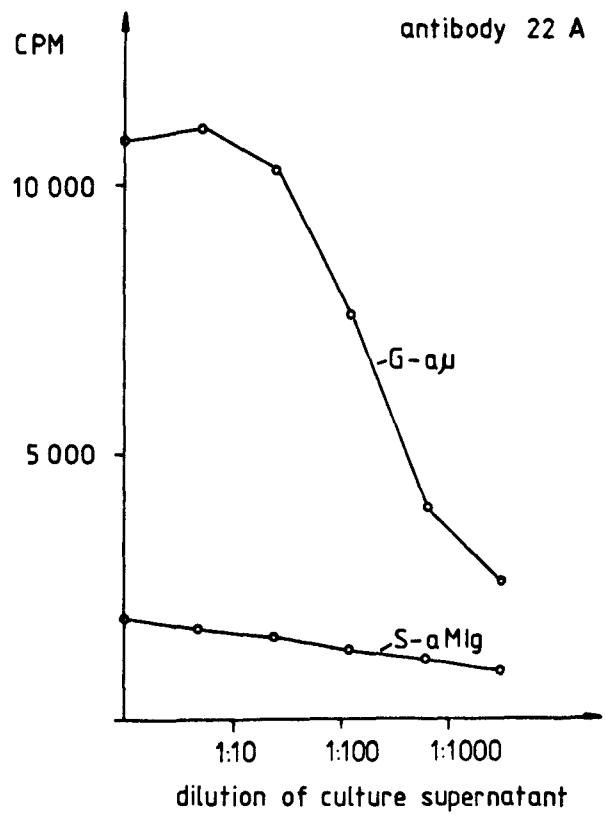
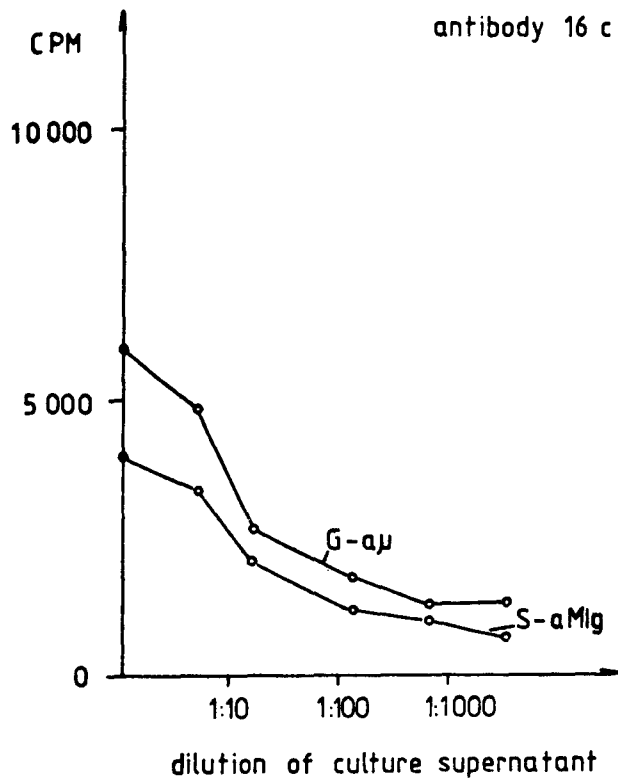


Fig. 9

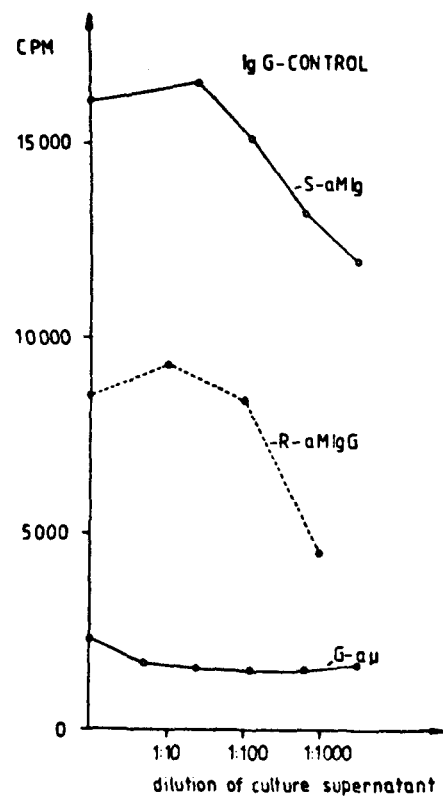
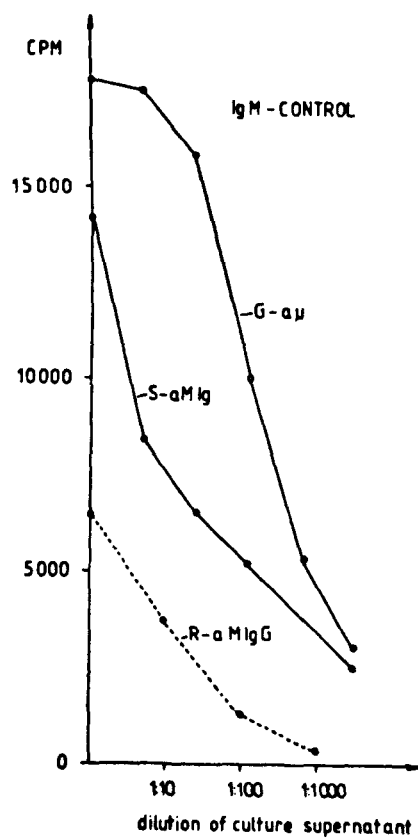
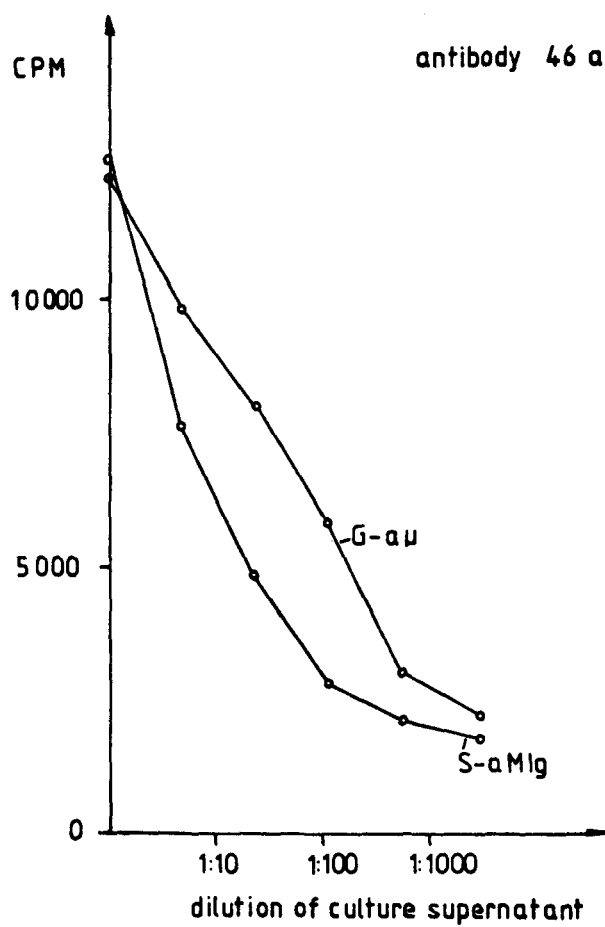


Fig. 9

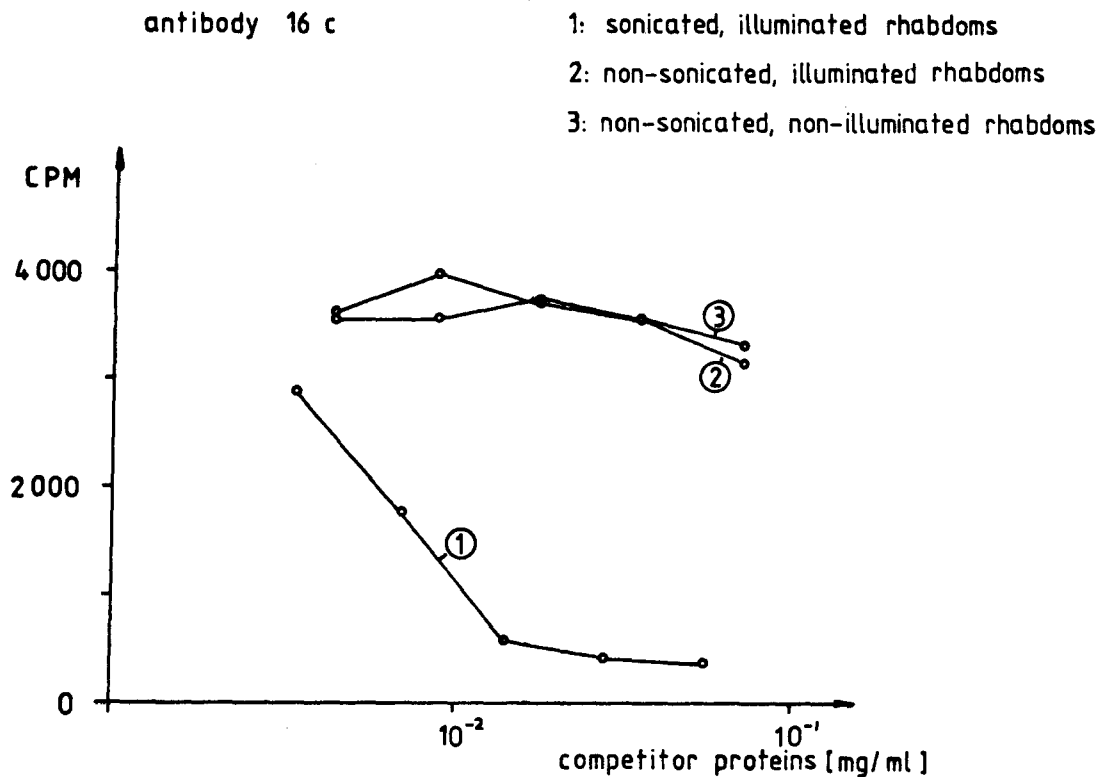


Fig. 10: Effect of sonication of *Astacus* photosensory membrane on the binding to monoclonal antibody 16 c measured by competition assay

Supernatant of clone 16 c was incubated with serially diluted nonsonicated rhabdoms (illuminated (2) and nonilluminated (3)), and sonicated, illuminated rhabdoms (1).

After 2 hrs of incubation all samples were centrifuged (30 min, 30 000 x g), and the amount of free antibody in the supernatant was measured in a RIA with sonicated, illuminated rhabdoms as antigen.

When no rhabdom protein was present during the incubation, 4200 cpm were bound in the RIA.

When increasing amounts of sonicated, illuminated rhabdoms were added (concentration shown in the abscissa) the amount of free antibody decreased, as measured in the RIA.

Non-sonicated rhabdoms (curve 2 and 3), however, bound almost no antibody.

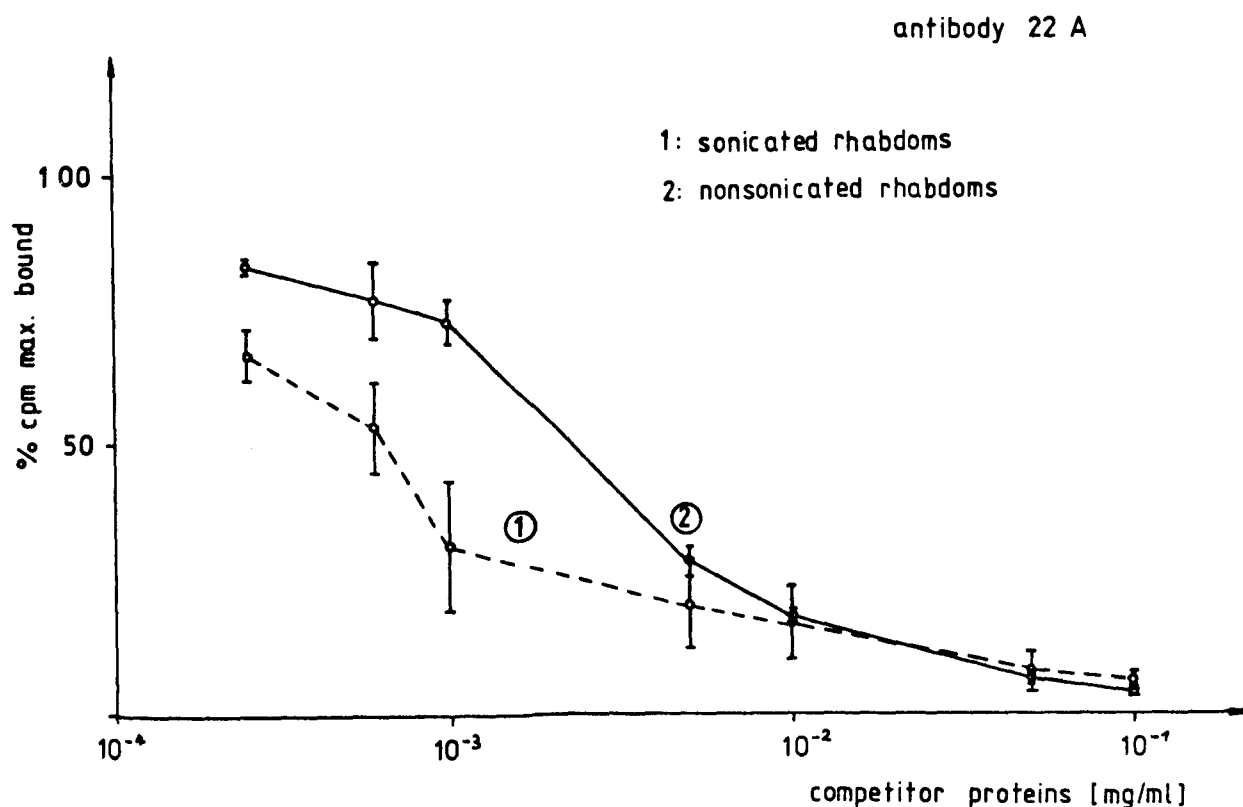


Fig. 11: Binding of monoclonal antibody 22 A to illuminated sonicated or nonsonicated *Astacus* photosensory membrane measured by competition assay

Astacus rhabdoms were prepared in dim red light. The preparation was divided and one part was sonicated using a Branson sonifier (2.4). Both parts of the preparation were illuminated with orange light (2.3.2) and then kept in roomlight. Supernatant of clone 22 A was incubated with serial dilutions of sonicated and non-sonicated rhabdoms. After 2 hrs of incubation aliquots of each sample were tested for binding to illuminated, sonicated rhabdoms in RIA.

The maximum amount of antibody was measured in a sample, where buffer had been added instead of rhabdom preparation (6200 resp. 5050 cpm). This value was called 100 %. Binding in other samples, where antibody had been preadsorbed with increasing amounts of rhabdom protein (as shown in the abscissa), was expressed as percentage of the max. binding and plotted in the ordinate. The values shown in the graph above are the means $\pm$ standard deviation from two experiments. Sonicated (illuminated) rhabdoms (1) bound better to antibody 22 A than non-sonicated rhabdoms (2).

3.8 -----Einfluß von Belichtung der photosensorischen Membran auf die Antikörperbindung

Um zu untersuchen, ob sich die Bindung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern an ein Antigen in der Photorezeptormembran bei Belichtung ändert, wurden Kompetitionstests (s. 2.12) durchgeführt. Die unbelichtete, nur schwachem Rotlicht ausgesetzte, und die belichtete Hälfte einer Präparation wurden dabei miteinander verglichen bezüglich ihrer Wirksamkeit darin, mit belichteten, an Mikrotiterplatten adsorbierten Rhabdomvesikeln um Antikörper zu kompetieren.

Diejenige Konzentration an Photorezeptormembran, die nötig war, um soviel Antikörper zu binden, daß der Ausgangswert im Kompetitionstest auf die Hälfte absank, wurde als Maß für die Bindung der Antikörper an ein Antigen genommen.

Dieser Wert konnte für den gleichen Antikörper von Versuch zu Versuch sehr verschieden sein (s. Tabelle 3). Wenn Unterschiede in der Bindung an belichtete und unbelichtete Rhabdome auftraten, waren diese aber in jedem Einzelexperiment zu beobachten.

Kaninchen-anti-Rhabdom-Antiserum (Kaninchen 1) und der Antikörper des Klons 16 c zeigten kleine, aber reproduzierbare Unterschiede in ihrer Bindung an belichtete und unbelichtete Membran. Das Kaninchenantiserum 1 band im Mittel ($n = 3$) etwa 1,8 mal besser an belichtete als an unbelichtete Rhabdome, Antikörper des Klons 16 c ca. 1,5 mal besser an unbelichtete Rhabdome ($n = 3$) (s. Abb. 14 und 15).

Die Bindung des Antikörpers von Klon 62 D wurde durch Belichtung des Antigens nicht signifikant geändert (s. Abb. 12). Großen Einfluß hatte die Belichtung der Rhabdom-Präparationen auf die Bindung des monoklonalen Antikörpers 22 A. Bei unbelichteten *Astacus* Rhabdompräparationen war eine im Mittel ($n = 2$) etwa 100 mal größere Proteinkonzentration erforderlich, um 50 % Hemmung zu erreichen, als bei belichteten, d.h. die Antikörper banden an belichtete Rhabdome wesentlich besser (s. Abb. 13).

Antikörper dieses Klons kreuzreagierten stark mit Rinder-Stäbchenaußensegmenten. Die für 50 % Hemmung im Kompetitions-test nötige Proteinmenge war bei verschiedenen Stäbchenaußen-segment-Präparationen extrem unterschiedlich (von 16 µg/ml bis > 190 µg/ml), ohne daß die Ursache dafür bisher herausge-funden werden konnte.

Versuche, mit denen ermittelt werden sollte, ob Unterschiede in der Bindung dieses Antikörpers an unbelichtete und ge-bleichte ROS bestehen, brachten widersprüchliche Aussagen, so daß diese Frage bisher nicht geklärt werden konnte.

Tabelle 3

Änderung der Antikörperbindung an Präparationen photosensorischer Membran durch Belichtung und Behandlung der Präparationen mit Ultraschall, gemessen im Kompetitionstest.

<u>Antikörper</u>	Konzentration der getesteten Rhabdompräparation (Kompetitor) (Gesamtprotein µg/ml) bei 50 % Hemmung			
	belichtet		unbelichtet	
	beschallt	unbeschallt	beschallt	unbeschallt
Kaninchen-anti-rhabdom Antiserum (Kaninchen 1) (1 : 200 verdünnt)	-	$4,3 \pm 1,5$ n = 3	-	$7,6 \pm 2,9$ n = 3
Klon 16 c (1 : 10 verdünnt)	$5,3 \pm 0,2$ n = 2 (30,2)*	> 50 n = 2	$3,0 \pm 0,2$ n = 2 (23,4)*	> 50 n = 2
Klon 62 D (1 : 600 verdünnt)	$10,5 \pm 5$ n = 2	21 n = 1	13 ± 10 n = 2	26 n = 1
Klon 22 A (1 : 200 verdünnt)	$0,65 \pm 0,2$ n = 2	$2,5 \pm 0,4$	$63 \pm 3,5$ n = 2	$31,5 \pm 15$

*Diese Werte stammen von einem Einzelexperiment mit einer anderen Rhabdompräparation und einer anderen Charge von Zellkulturüberstand (vgl. 3.8).

Erklärung der Tabelle im Text

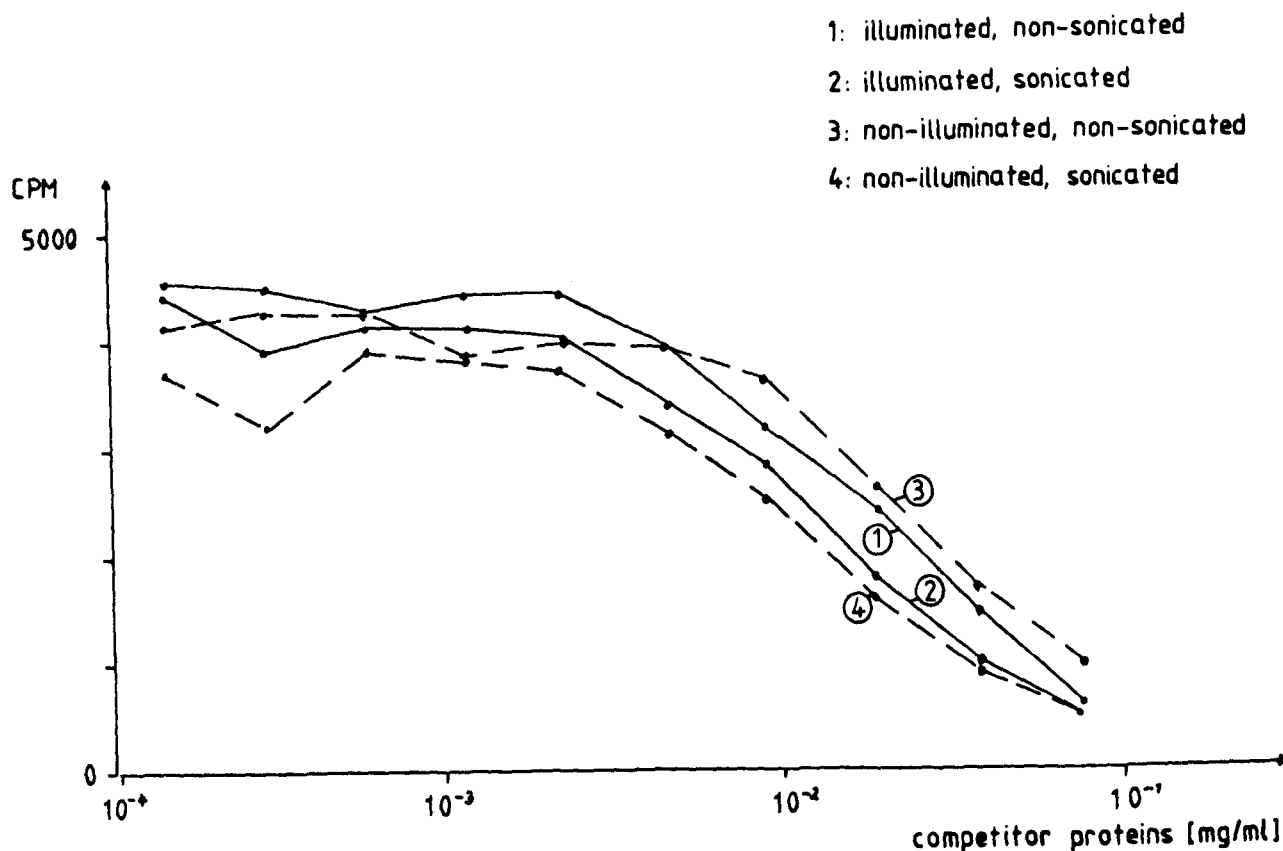


Fig. 12: Effect of illumination and sonication of rhabdom preparation on the binding of monoclonal antibody 62 D examined by solid phase competition assay

Astacus rhabdoms were prepared in the dark. The preparation was divided and one half was sonicated. From both, the sonicated and the non-sonicated part one half was illuminated. Thus, 4 series of samples (concentration of rhabdom proteins shown in the abscissa) were obtained and incubated with supernatant of clone 62 D (final dilution of supernatant: 1 : 600).

After the incubation, binding of all samples to illuminated, sonicated rhabdoms was measured in the RIA. The radioactivity bound in this RIA is plotted in the ordinate.

Neither sonication nor illumination altered the binding capacity of the preparations to antibody 62 D significantly.

antibody 22 A

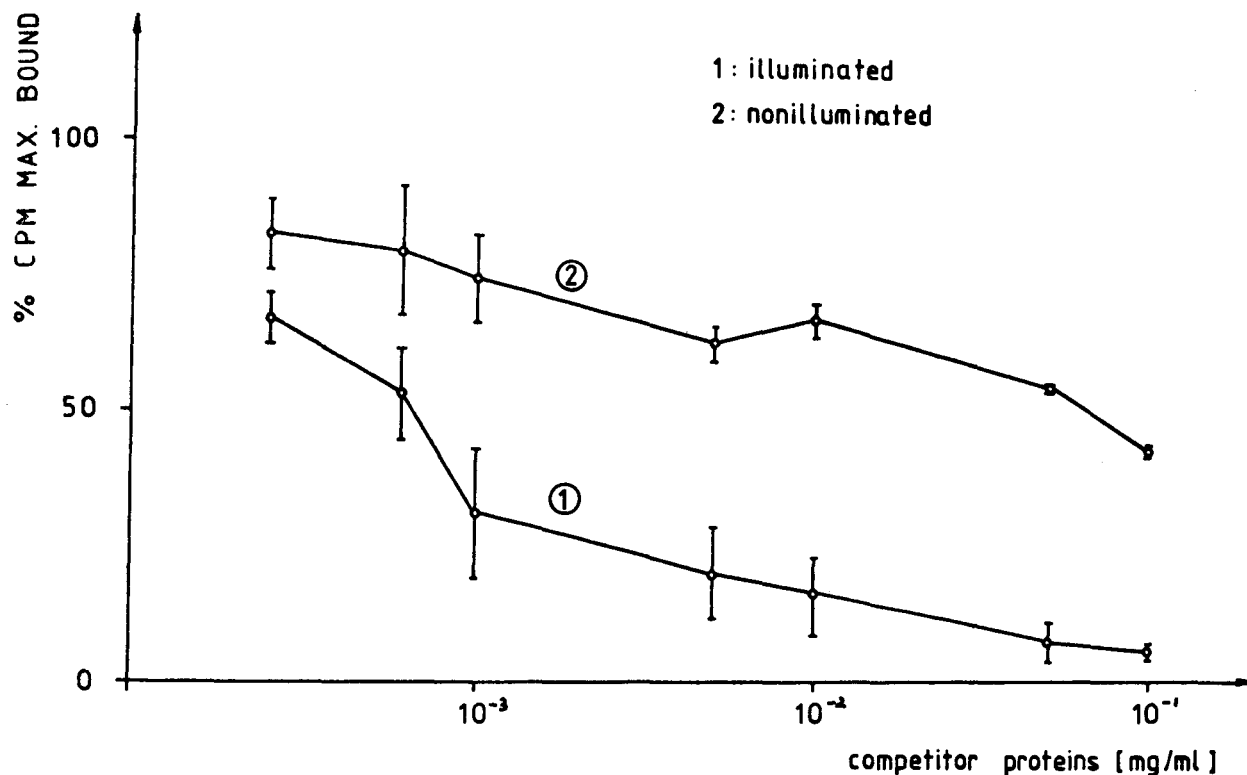


Fig. 13: Binding of monoclonal antibody 22 A to illuminated and non-illuminated rhabdom preparations measured in solid phase competition assay

Astacus rhabdoms were prepared and sonicated in dim red light. The preparation was divided and one half was kept in the dark (curve 2), the other one was illuminated for 15 min with orange light and then kept in roomlight (curve 1).

Both parts of the preparation were serially diluted and incubated with culture supernatant of clone 22A containing specific antibody. Final dilution of culture supernatant was 1/200. The concentration of rhabdom protein in the samples is plotted on the abscissa.

After 2 hrs of incubation in the dark (curve 2) resp. at roomlight (curve 1) aliquots of each sample were tested for free antibody by measuring the remaining binding capacity to illuminated, sonicated rhabdom preparations in the radio immuno assay. The maximum amount of antibody was bound in a sample, where buffer had been added instead of rhabdom preparation (6200 reps. 5050 cpm). This value was called 100 %. Binding in other samples, where antibody had been preadsorbed with increasing amount of rhabdom protein, was expressed as percentage of the max. binding and plotted in the ordinate. The values shown in the graph above are the means $\pm$ standard deviation from two experiments.

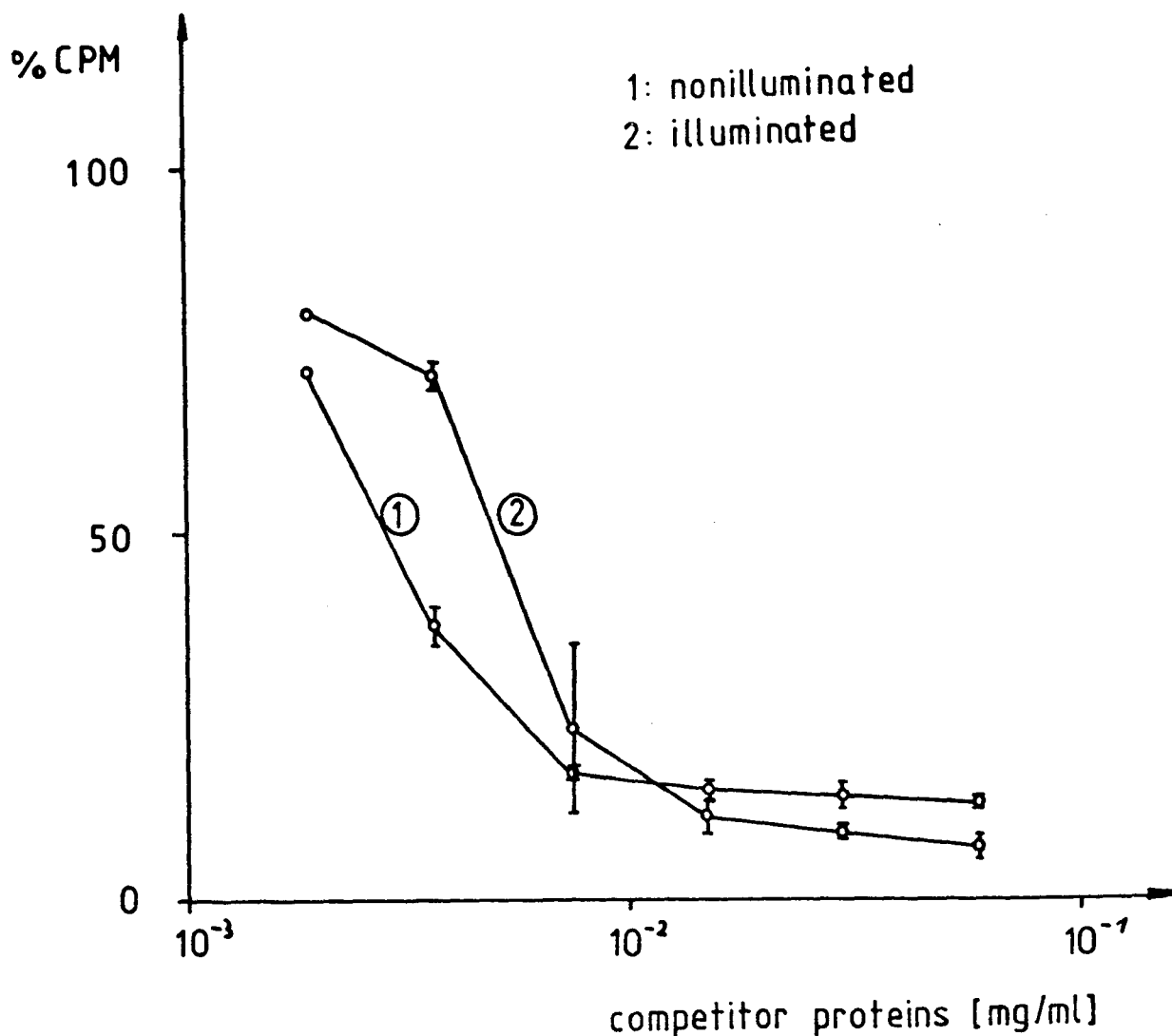


Fig. 14: Effect of illumination of rhabdom preparations on the binding of monoclonal antibody 16 c measured in competition assay
Method as described at fig. 13.
Final dilution of culture supernatant containing antibody 16 c was 1 : 10. The values shown are the means $\pm$ standard deviation from 2 experiments. 100 % cpm bound was 1700 resp. 2500 cpm. Non-illuminated rhabdoms showed a higher binding capacity for antibody 16 c than illuminated rhabdoms.

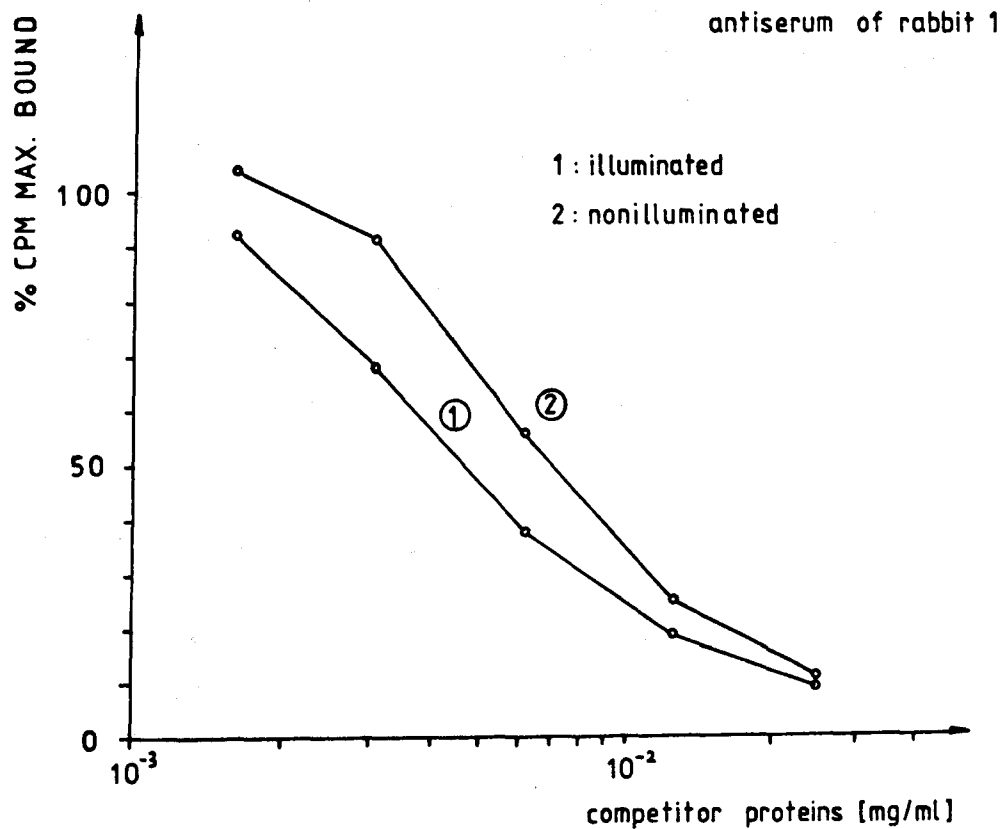


Fig. 15: Binding of rabbit antiserum to illuminated and non-illuminated rhabdom preparations measured in solid phase competition assay
 Method as described at fig. 13.
 Final dilution of rabbit antiserum (rabbit 1) was 1 : 200. The figure shows the data from one experiment.
 100 % cpm bound was 56000 cpm.
 Illuminated rhabdoms showed a higher binding capacity for rabbit antiserum than non-illuminated rhabdoms.

3.9 Reinigung von Kaninchenantiserum für die elektrophysiologischen Versuche

Für die Injektion in die Limulus Ventral Nerv Photorezeptorzelle wurde die Immunglobulinfraction aus Kaninchen-anti-Astacusrhabdom Antiserum affinitätschromatographisch über Protein-A-Sepharose (s. 2.6.2) aufgereinigt.

Laut Literatur (Langone, 1982) bindet Protein A im wesentlichen alle Kaninchenantikörper der Immunglobulin G-Klasse, die den überwiegenden Teil (ca. 90 %) der Serumantikörper ausmachen. Über Protein A affinitätschromatographisch gereinigtes IgG ist danach frei von anderen Proteinen. Die anderen Serumproteine laufen ohne Verzögerung durch die Säule (s. Abb. 16). Die Ausbeute an Ig nach der Affinitätschromatographie lag bei ca. 6 mg/ml Serum.

Von dieser Gesamtausbeute konnten nur die Fraktionen mit hoher Proteinkonzentration (möglichst mehr als 5 mg/ml) für die elektrophysiologischen Versuche verwendet werden. Da außerdem noch Proteinverluste bei der Dialyse auftraten, betrug die schließlich noch verwertbare Antikörpermenge noch 3 - 4 mg pro ml Kaninchenantiserum.

Die Bindung des gereinigten Kaninchen IgG an Astacus photosensorische Membran wurde im RIA mit der Bindung des unreinigten Serums verglichen (s. Abb. 17).

Beim Vergleich der Bindungskurven von ungereinigtem Serum und IgG-Fraktion muß man berücksichtigen, daß die IgG-Konzentration im Serum (8 - 16 mg IgG/ml) um den Faktor 7 - 12 größer ist als in der hier getesteten IgG-Fraktion (1,3 mg IgG/ml).

Unter Berücksichtigung dieser Annahme findet man keinen wesentlichen Aktivitätsverlust durch die Reinigung.

Antikörper in Puffer mit 0,5 M KCl (s. 2.6.2, Puffer, wie er zur Injektion in Limulus verwendet wurde) zeigten eine etwas geringere Bindung als Antikörper der gleichen Präparation in PBS (s. Abb. 17).

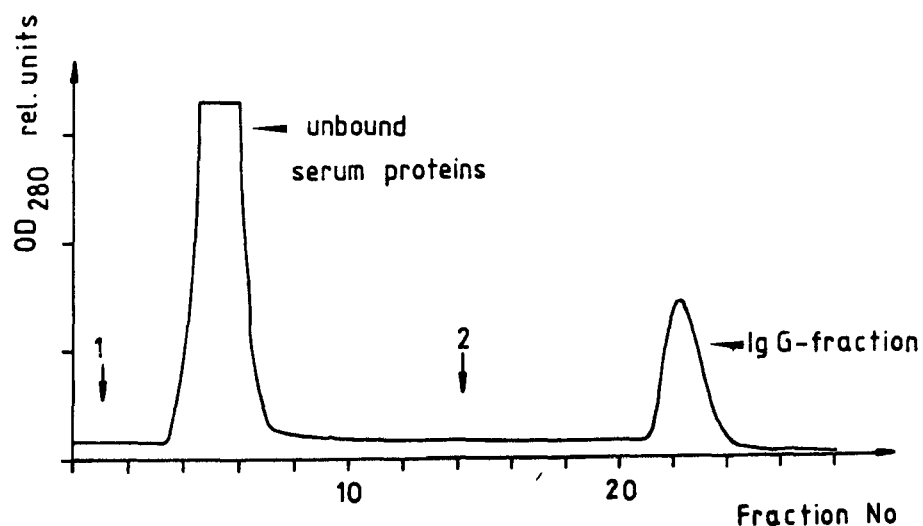


Fig. 16: Affinity chromatography of rabbit anti-rhabdom anti-serum on Protein A Sepharose CL-4B
 Serum was applied to the column (1↓) and unbound proteins were eluted with phosphate-buffered saline (pH 7,3). Fractions containing rabbit IgG were eluted with 0,1 M glycine · HCl at pH 3, as indicated by the arrow (2↓).

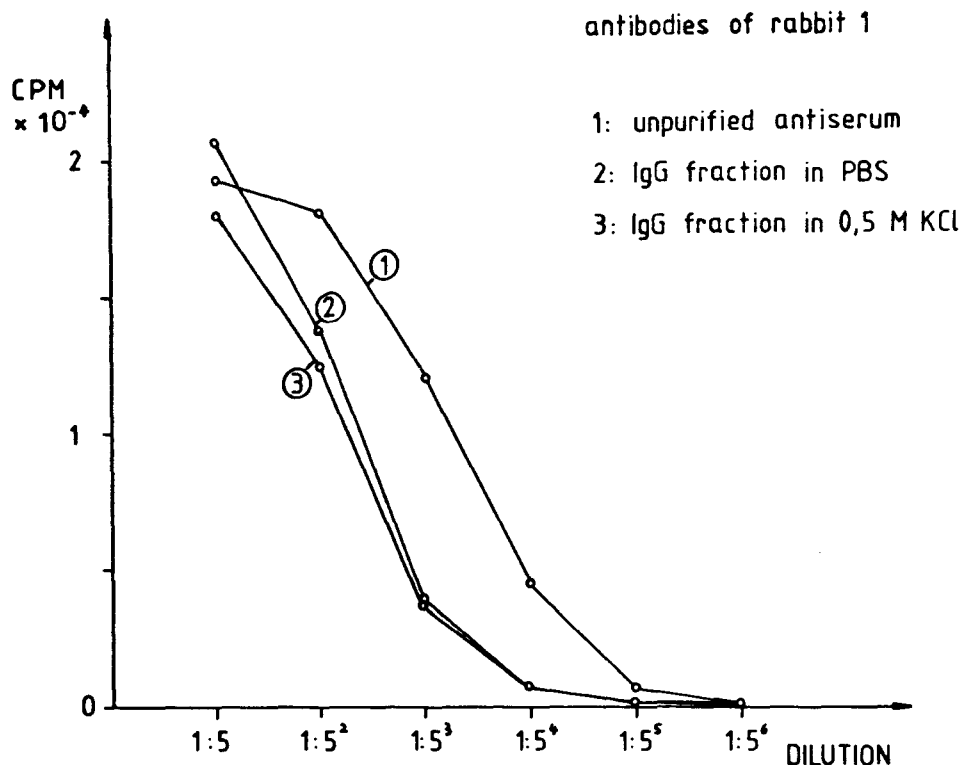


Fig. 17: Binding of rabbit anti-rhabdom antibodies to *Astacus* photosensory membrane in RIA
 Curve 1: unpurified antiserum (8 - 16 mg IgG/ml)
 Curve 2: IgG fraction (1,3 mg/ml IgG) from this anti-serum, purified by affinity chromatography with a Protein A column.
 The fraction eluted from the column at low pH was dialyzed against PBS, and all dilutions were made in PBS.
 Curve 3: Same IgG-fraction as in curve 2, but dialyzed against Limulus buffer (0,5 M KCl, 10 mM Tris HCl, pH 7,5), and diluted with this buffer.
 RIA was performed as described at 2.8.
 Abscissa: dilution of antibody solution
 Ordinate: radioactivity bound in the RIA

3.10 Proteinzusammensetzung der Präparationen von Astacus photosensorischer Membran

Abb. 18 zeigt auf einem Gel die Proteinzusammensetzung einer Präparation der photosensorischen Membran von Astacus, die gewonnen wurde wie unter 2.2.12 beschrieben. Die Membranproteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Proteinmenge entspricht etwa der eines Flußkrebssauges.

Wenn man die Gele nach der Elektrophorese statt mit Coomassie Brilliant Blue mit der empfindlicheren Silberfärbemethode anfärbte, waren wesentlich mehr Proteinbanden zu sehen (s. Abb. 18). Die Silberfärbemethode ist ca. 100 mal empfindlicher als die Anfärbung mit Coomassie, es können damit Proteinbanden mit nur 0,5 ng Protein nachgewiesen werden (Oakley, 1980). Die Stärke der Anfärbung erlaubt keine Aussage über die Proteinmenge, da der Anfärbefaktor noch mehr als bei Coomassie von den Eigenschaften des einzelnen Proteins abhängt.

Präparationen mit der Proteinzusammensetzung der Abb. 18 wurden sowohl zum Immunisieren der Mäuse und Kaninchen als auch für die Antikörpertests benutzt. Sie enthielten im wesentlichen die Membran der Mikrovilli, die als photosensorische Membran bezeichnet wird, mit ihren integralen und den fester gebundenen peripheren Membranproteinen. Das Astacus-Chromoprotein (rel. Molmasse ca. 35 000 g/mol, s. Hamacher, 1977) machte 50 - 60 % der Proteinmenge aus.

Außer der Bande des Sehpigments gehörten noch zwei der stärker angefärbten Gelbanden zu integralen Membranproteinen (s. Diplomarbeit, 1980). Die schwächer gebundenen peripheren Membranproteine sowie die löslichen Proteine aus dem Zytoplasma wurden durch das Waschen der Membran bei hoher und niedriger Ionenstärke größtenteils entfernt (s. 2.2.1.2).

Die Präparation enthielt eventuell als Verunreinigung die nicht wasserlöslichen Proteine des Zytoskeletts der Mikrovilli (nachgewiesen bei Cephalopoden: Saibil, 1982, Dipteren: Blest, 1982) und Reste von Schirmpigmentgranula (s. Diplomarbeit, 1980).

Die Proteinzusammensetzung der Rhabdompräparation ist in meiner Diplomarbeit (RWTH Aachen, 1980) näher beschrieben.

Beim Immunoblotting (s. 2.11) banden Antikörper manchmal stark an den Beginn des Trenngels. Dies könnte damit zusammenhängen, daß nicht alle Proteine vor der Elektrophorese genügend in SDS gelöst worden waren. Deshalb wurden bei einem Teil der Immunoblots die Proben mit photosensorischer Membran vor der Elektrophorese in SDS- und Merkaptoethanol-haltiger Lösung gekocht, statt wie üblich bei 40⁰ C inkubiert.

Nach Erhitzen der Proben in SDS-haltiger Lösung traten nach der Elektrophorese mehr Proteinbanden im oberen Bereich des Gels auf, und das erhaltene Proteinmuster war schlecht reproduzierbar. Das lag vermutlich daran, daß viele Proteine bei höherer Temperatur Aggregate bilden (Fairbanks, 1971). Die entstandenen Oligomere wanderten bei der Elektrophorese nicht gemäß ihrer Molmasse und waren deswegen schwerer identifizierbar.

Der Einfluß der Denaturierungsbedingungen auf das Ergebnis des Immunoblots, der möglicherweise mit einer Veränderung des Proteinmusters zusammenhängt, wurde noch nicht näher untersucht.

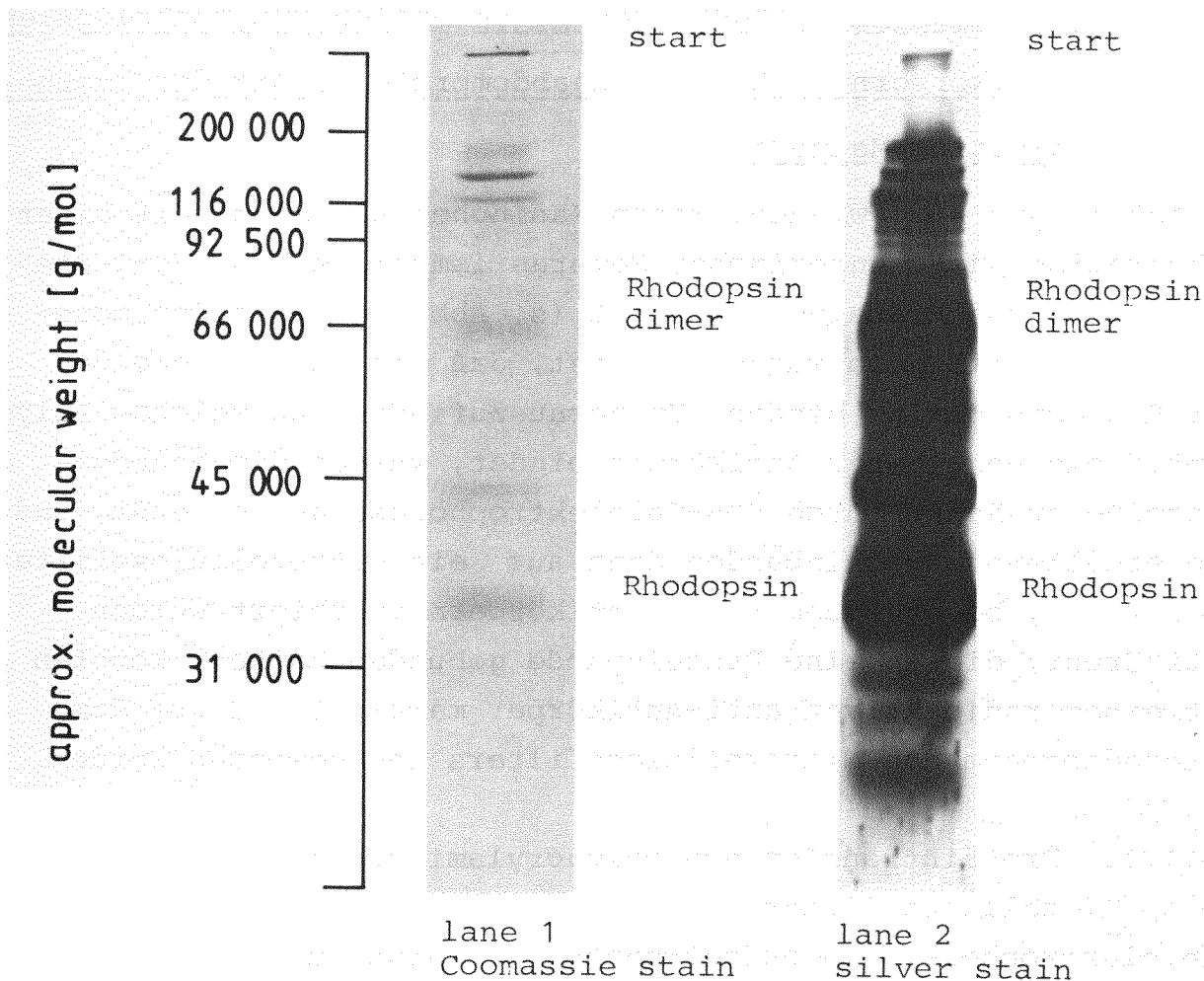


Fig. 18: Protein composition of the *Astacus* photosensory membrane preparation
Astacus photosensory membrane preparation (protein content from one eye, ca. 5 μ g) was subjected to SDS gel electrophoresis according to Laemmli (1970) on a 10 % Polyacrylamid gel slab. The gel was first stained with Coomassie Brilliant Blue (according to Cleveland, 1976, lane 1) and then with the silver stain (Oakley, 1980, lane 2). Upon staining with Coomassie Brilliant Blue about 10 major protein bands are to be seen. More bands appeared when using the about 100 times more sensitive silver stain. *Astacus* visual pigment is marked by a "R". The polypeptide at 42 000 g/mol presumably is actin (compare 4.2).

3.11 Nachweis der Bindung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern an Astacus Rhabdomproteine mit der Immunoblotting-Methode

Um Antikörper zu gewinnen, waren Kaninchen und Mäuse mit einer Präparation photosensorischer Membran immunisiert worden, die eine Reihe von Proteinen enthielt (s. Abb. 18). Von den monoklonalen Antikörpern wurde erwartet, daß sie nur an je eines der Rhabdomproteine binden. Um herauszufinden, an welches Polypeptid ein bestimmter Antikörper bindet, wurden die Rhabdomproteine zunächst durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, und die erhaltenen Proteinbanden dann auf ein Nitrozellulosefilter übertragen, bevor sie mit den Antikörpern inkubiert wurden. Antikörper, die an eine Proteinbande gebunden hatten, konnten mit einem radioaktiven anti-Antikörper markiert und auf dem Autoradiogramm des Nitrozellulosefilters nachgewiesen werden.

3.11.1. Proteintransfer vom Polyacrylamidgel auf ein Nitrozellulosefilter

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden vor der Inkubation mit den Antikörpern auf ein Nitrozellulosefilter übertragen.

Abb. 19 zeigt ein Nitrozellulosefilter, auf dem die Proteinbanden mit Amidoschwarz angefärbt wurden.

Die Opsinbande erschien auf dem Nitrozellulosefilter etwas diffus, und war oft in geringerer Stärke vorhanden als erwartet, besonders wenn der Transfer im elektrischen Feld erfolgte (s. 2.11). Offenbar wurde das Opsin schlechter von dem Filter festgehalten als andere Proteine. Erfolgte der Transfer vom Gel auf eine doppelte Lage von Nitrozellulosefiltern, dann konnte auch auf dem zweiten Filter hinter dem Gel noch Opsin nachgewiesen werden, d.h. ein Teil wurde durch das erste Filter nicht gebunden. Die Übertragung von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf ein Nitrozellulosefilter war sowohl im elektrischen Feld als auch durch einfache Diffusion möglich (s. 2.11).

Mit der Diffusionsmethode ließ sich insgesamt weniger Protein übertragen, die Opsinbande war aber im Verhältnis zu anderen Proteinen in größerer Menge vertreten.

Bei der Untersuchung der meisten Antikörper wurden beide Methoden angewandt.

Die meisten Proteine ließen sich nicht quantitativ vom Gel auf das Filter übertragen. Bei hochmolekularen Proteinen war die Übertragung weniger effektiv als bei den kleineren Proteinen.

Es blieb im allgemeinen noch genügend Protein auf dem Gel zurück, damit dieses mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt und das Proteinmuster mit dem Autoradiogramm des Nitrozellulosefilters verglichen werden konnte.

3.11.2 Nachweis der Bindung von Antikörpern aus Kaninchen-anti-Rhabdom-Antiserum an Astacus Rhabdomproteine mit der Immunoblotting-Methode

3.11.2.1 Antikörper gegen die membrangebundenen Proteine des Rhabdoms

Antikörper aus dem Kaninchenantiserum 1 markierten in den Immunoblots vor allem 3 Gelbanden, denen Polypeptide mit Molmasse von ca. 35 000, 68 000 und 120 000 g/mol entsprachen (s. Abb. 20-3).

Die Gelbande mit dem Protein der Molmasse 35 000 g/mol konnte dem Sehpigment des Krebses zugeordnet werden (Hamacher, 1977), und die Bande bei 68 000 g/mol ruht vermutlich vom Dimer dieses Proteins her. Stark markiert durch Antikörper aus dem Kaninchenantiserum wurde auch ein Polypeptid mit der Molmasse von etwa 120 000 g/mol. Das mit Coomassie angefärbte Gel zeigte in diesem Bereich keine besonders starke Bande. Möglicherweise liegt auch dieser Bande ein Oligomer des Sehfarbstoffs zugrunde.

Weiterhin enthielt das Kaninchenantiserum Antikörper gegen ein Polypeptid mit einer Molmasse von mehr als 200 000 g/mol, gegen eine Reihe von Polypeptiden mit Molmassen zwischen 66 000 und 40 000 g/mol, sowie gegen zwei Polypeptide mit kleinerer Molmasse als der des Astacus-Chromoproteins (35 000 g/mol).

Diese beiden niedermolekularen Polypeptide wurden zwar von den Antikörpern markiert, man sah sie aber gewöhnlich nicht auf Gelen, die mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt worden waren, sondern nur bei Silberfärbung (s. Abb. 18).

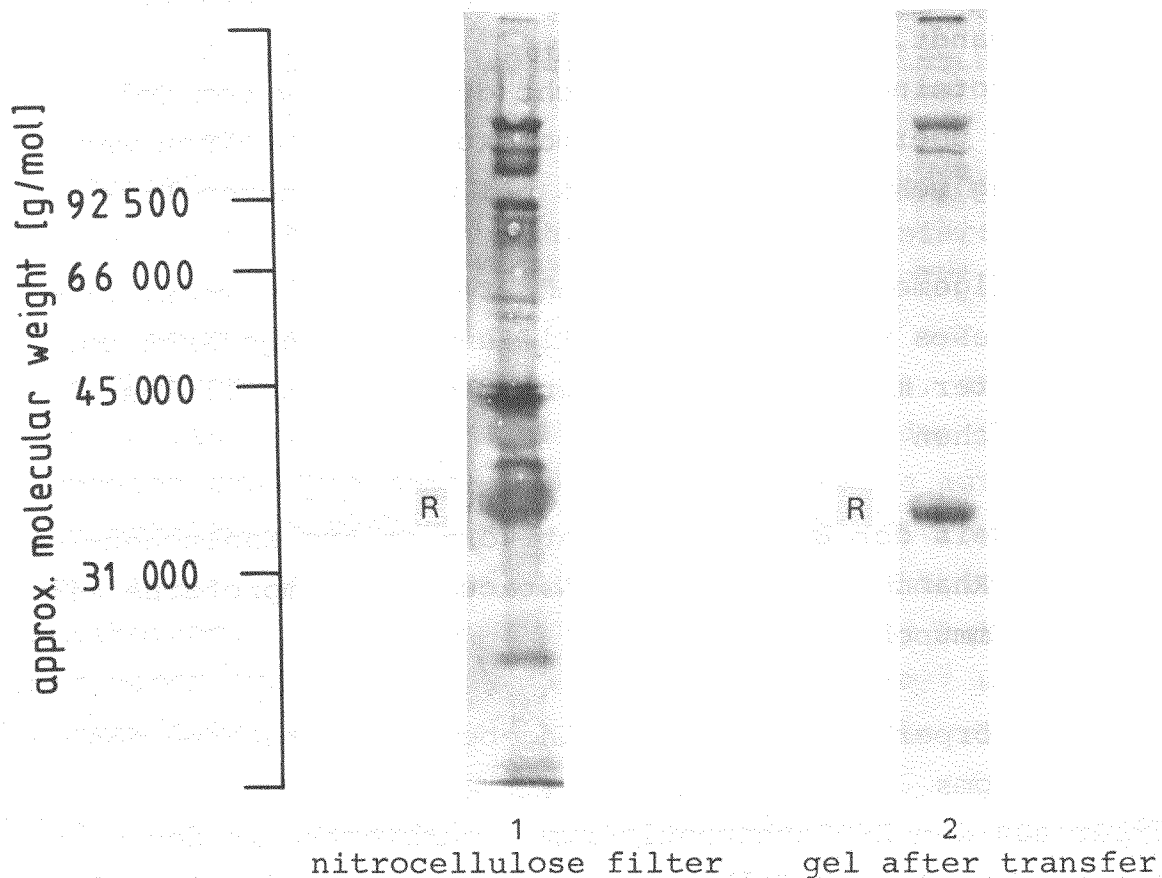


Fig. 19: Transfer of proteins from a Polyacrylamid gel slab to a Nitrocellulose filter

Crayfish rhabdom proteins (water soluble + membrane bound proteins) were subjected to electrophoresis on a 10 % Polyacrylamid gel in the presence of SDS. After electrophoresis the separated proteins were transferred electrophoretically onto a Nitrocellulose filter as described at 2.11.

The Nitrocellulose filter stripe was stained with Amido-black (1). The Polyacrylamid gel was stained with Coomassie Brilliant Blue after the transfer of proteins to the filter (2).

The *Astacus* visual pigment is marked by "R".

A comparison of Polyacrylamid gel and filter shows that all protein bands which had been present on the gel were at least partially adsorbed to the filter. Normally enough material remained on the gel from proteins with high molecular weight that bands could be seen clearly after staining with Coomassie Brilliant Blue. Some smaller proteins were removed quantitatively (e.g. polypeptides smaller than rhodopsin). It is not typical, however, that the proteins with about 45 000 g/mol disappeared almost totally from the gel, as to be seen in the picture above.

Die starke Markierung von Gelstart und Lauffront wies darauf hin, daß in dem verwendeten Gelsystem nicht alle Antigene aufgetrennt werden konnten.

3.11.2.2 Antikörper gegen die wasserlöslichen Proteine des Rhabdoms

Wenn man Astacus-Rhabdome in 1 M NH_4Cl -Lösung suspendiert und dann zentrifugiert, enthält der Überstand eine Reihe von wasserlöslichen Proteinen. Diese Proteine stammen wahrscheinlich zum Teil aus dem Zytoplasma innerhalb der Mikrovilli, ein anderer Teil könnte unter physiologischen Bedingungen an die Membran der Mikrovilli gebunden sein. Diese Proteine lassen sich nicht vollständig von den integralen Membranproteinen der photosensorischen Membran abtrennen (s. Diplomarbeit, 1980) und waren deswegen auch in den Präparationen enthalten, mit denen das Kaninchen immunisiert wurde.

Auch gegen diese wasserlöslichen Proteine ließen sich in dem Kaninchenantiserum Antikörper nachweisen (Abb. 20-5). Sie banden vor allem an zwei Proteine mit Molmassen von 35 000 - 40 000 g/mol. Manchmal konnte man auch auf mit Coomassie Brilliant Blue angefärbten Gelen in diesem Bereich unscharfe Banden erkennen. Möglicherweise handelte es sich bei einer dieser Banden um Rhodopsin, das durch die Zentrifugation nicht vollständig abgetrennt worden war.

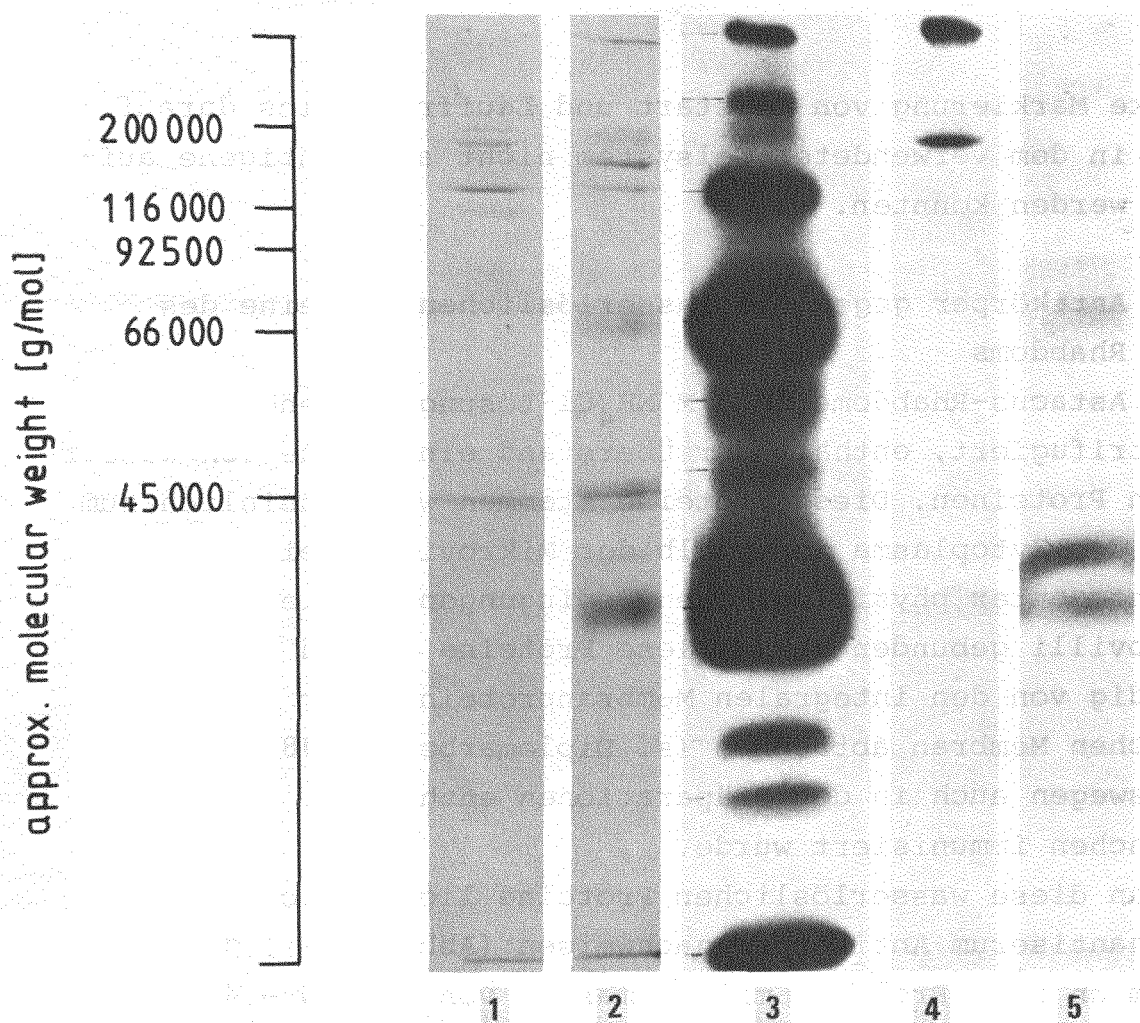


Fig. 20: Identification of antigens reactive with rabbit anti-rhabdom antiserum and monoclonal antibody 16 c

Astacus rhabdom proteins were separated by SDS-gel electrophoresis on a 10 % Polyacrylamid slab gel and transferred to a Nitrocellulose filter as described at 2.11. The Nitrocellulose filter stripes were incubated with antibody solution, and antibody which had bound to a protein band on the filter was detected with ^{125}J -labelled anti-mouse Ig antibody (lane 4) or labelled Protein A (lanes 3, 5) and subsequent autoradiography.

1. Supernatant with water soluble and peripherally membrane bound proteins of the Astacus rhabdoms was separated by SDS-gel electrophoresis and stained with Coomassie Brilliant Blue.
2. Membrane bound Astacus rhabdom proteins separated by SDS gel electrophoresis and stained with Coomassie Brilliant Blue.
3. Autoradiography of a Nitrocellulose filter blot from Astacus rhabdom membrane proteins (as shown in lane 2). The filter was incubated in rabbit anti-rhabdom antiserum (diluted 1 : 100) and subsequently in ^{125}J -Protein A.
4. Autoradiography of a Nitrocellulose filter blot as in lane 3, but incubated in cell culture supernatant of hypridoma 16 c and subsequently with ^{125}J -labelled goat anti-mouse μ antibodies.
5. Autoradiography of a Nitrocellulose filter blot from water soluble proteins (supernatant) of the Astacus rhabdom (as shown in lane 1). The filter was incubated with the same rabbit anti-rhabdom antiserum as in 3.

3.11.3 Nachweis der Bindung von monoklonalen Antikörpern an Astacus Rhabdomproteine

Mit der Immunoblotting-Methode (s. 2.11) konnte die Bindung der Antikörper von 5 verschiedenen Klonen an ein Rhabdomprotein nachgewiesen werden. Diese monoklonalen Antikörper stammen aus zwei verschiedenen Fusionsexperimenten. Die Antigene für die Antikörper von 6 weiteren Klonen konnten mit dieser Methode bisher nicht gefunden werden.

Um auszuschließen, daß die beobachtete Markierung einer Proteinbande auf unspezifischer Bindung beruht, wurden verschiedene Blindwerte bestimmt (s. 2.11). Bei keinem dieser Blindwerte traten markierte Banden auf.

Im Rahmen der Genauigkeit der verwendeten Methode banden die 5 verschiedenen monoklonalen Antikörper an die gleiche Proteinbande (Abb. 21). Das verwendete Gelsystem eignete sich für die Bestimmung der Molmasse von Proteinen in dem fraglichen Bereich kaum, deswegen konnte nur eine grobe Abschätzung für die Masse des Proteins gegeben werden, an das die monoklonalen Antikörper banden. Sie lag bei etwa 165 000 ($\pm$ 15 000) g/mol. Manchmal waren außer dieser Bande noch ein bis zwei weitere Banden, allerdings viel schwächer, markiert. Dabei könnte es sich um ähnlich gebaute Proteine oder um Aggregate bzw. Bruchstücke des Antigens handeln. Da diese Banden nur sehr schwach markiert waren, sind sie in den Fotografien der Abbildungen nicht zu erkennen.

Das Polypeptid, an das die monoklonalen Antikörper banden, war auf den Immunoblots mit Kaninchenantiserum nicht stark markiert. Das Kaninchen war mit Astacus Rhabdompräparationen der gleichen Proteinzusammensetzung immunisiert worden wie die Mäuse, von deren Lymphozyten die monoklonalen Antikörper produziert wurden (s. Abb. 20).

Das Antigen der monoklonalen Antikörper sedimentierte bei der Zentrifugation unabhängig von der Ionenstärke stets mit der Photorezeptormembran, was darauf hinweist, daß es ein integrales Membranprotein ist (s. Abb. 22).

Auf Gelen, die mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt worden waren, bildete dieses Protein keine der Hauptbanden. Möglicherweise hängt die Stärke dieser Bande von den Bedingungen beim

Denaturieren der Proteinproben vor der Elektrophorese ab (s. 3.10). Unter den gewöhnlich benutzten milden Denaturierungsbedingungen machte die mit Coomassie anfärbbare Menge dieses Proteins auf SDS-Gelen maximal $\frac{1}{10}$ der Rhodopsinmenge aus, also max. 0,5 µg/Auge.

Bei manchen Immunoblots war überhaupt nur der Gelstart, bei anderen zusätzlich zu der Proteinbande noch der Gelstart markiert.

Der monoklonale Antikörper 22 A, der an das hier beschriebene hochmolekulare Polypeptid band, kreuzreagierte stark mit Rinder-Stäbchenaußensegmenten (s. 3.4). Es ist nicht gelungen, im Immunoblot die Bindung des Antikörpers dieses Klons an ein Protein im Rinder-Stäbchenaußensegment nachzuweisen; bei den Autoradiographien dieser Immunoblots war oft lediglich der Gelstart markiert. Die Ursache könnte darin liegen, daß Detergenz die Bindung dieses Antikörpers störte (s. 3.5).

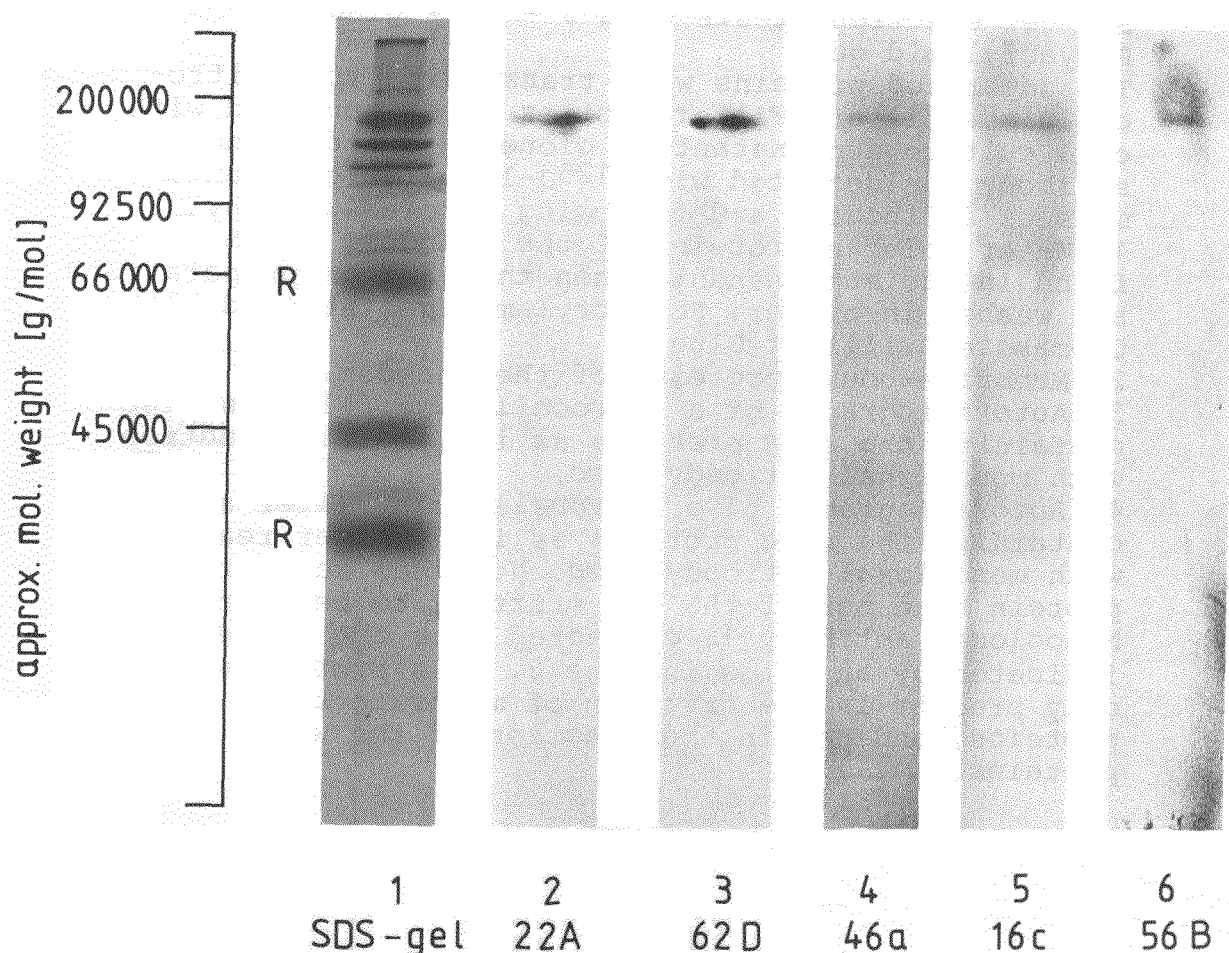


Fig. 21: Identification of antigen reactive with different monoclonal antibodies using the immunoblotting method Method as described in fig. 20. The figure shows the results from 3 different experiments. 1. SDS gel with separated *Astacus* rhabdom proteins, stained with Coomassie Brilliant Blue. The *Astacus* visual pigment and its dimer are marked by "R". 2 - 6. Autoradiographies of Nitrocellulose filter stripes containing the same proteins as in 1, after incubation with different monoclonal antibodies as indicated. Within the precision of the used method all monoclonal antibodies bound to the same protein (or to very similar migrating proteins) with an apparent molecular weight of approximately 165 000 g/mol.

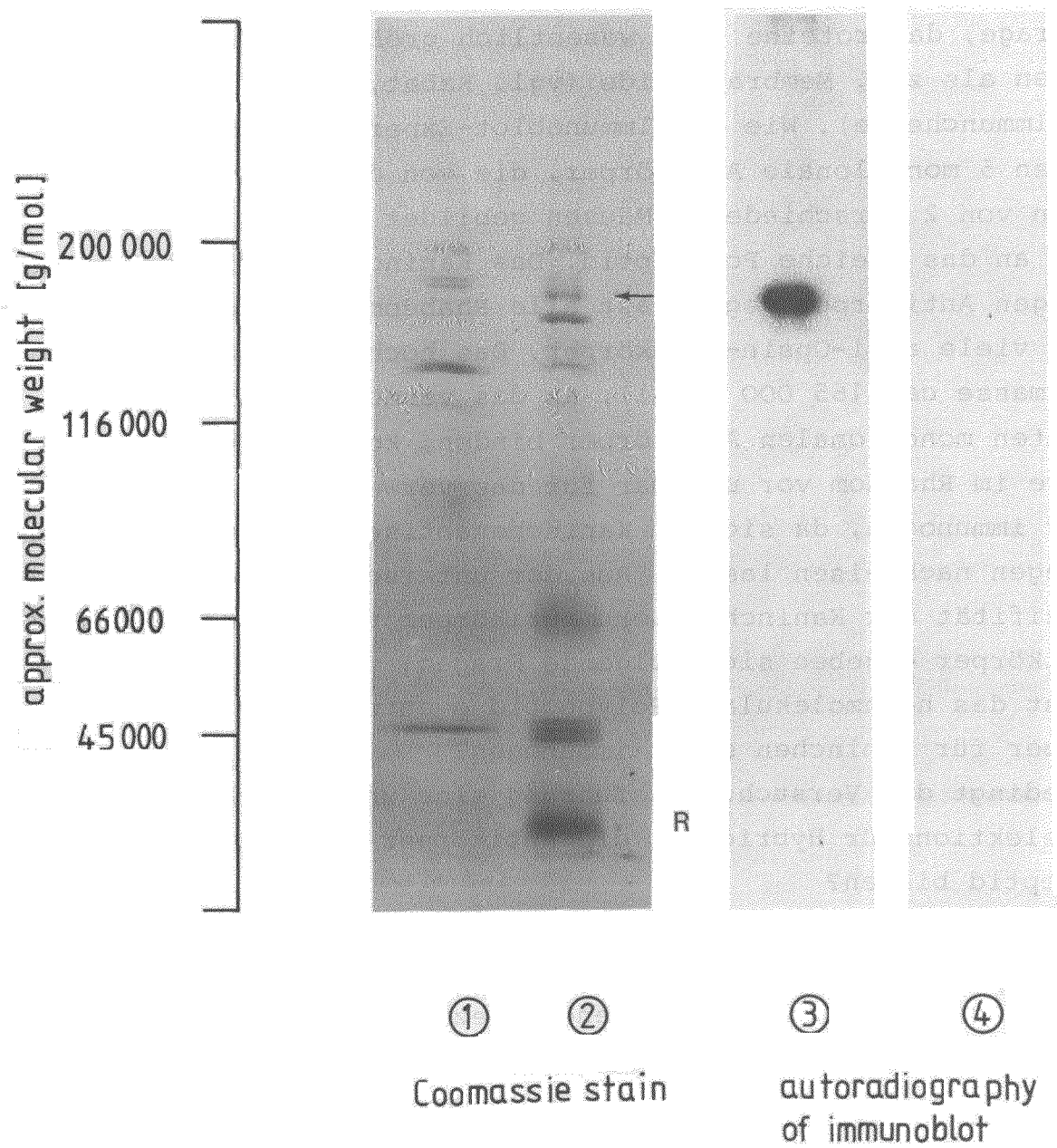
Fig. 22: Identification of antigen reactive with monoclonal antibody 16 c

Astacus rhabdom proteins (2.2.1.2) were separated by SDS gel electrophoresis on a 5 - 10 % gradient Polyacrylamid gel.

The separated proteins were transferred to a Nitro-cellulose filter. Filter stripes were incubated with cell culture supernatant of clone 16 c and bound antibody was detected with ^{125}J -labelled goat anti-mouse μ antibodies and following autoradiography.

1. Water soluble proteins of the rhabdom, which are found in the supernatant when the rhabdom preparations are washed in buffer. Polyacrylamid gel stained with Coomassie Brilliant Blue.
2. Membrane-bound proteins of the rhabdom.
3. Autoradiography of a Nitrocellulose filter stripe containing the same proteins as in 2, after reaction with monoclonal antibody 16 c.
4. Autoradiography of a Nitrocellulose filter stripe containing the same proteins as in 1, after reaction with monoclonal antibody 16 c. No label neither of a protein band nor of the gel start is to be seen.

Monoclonal antibody 16 c reacted with the protein indicated by an arrow in lane 2. This protein was only present in the fraction of membrane bound rhabdom proteins, and not in the fraction of the water soluble proteins.



4. Diskussion

4.1 Antigene in der Rhabdompräparation vom Flußkrebs

Kaninchen und Mäuse wurden mit Flußkrebs-Rhabdompräparationen immunisiert. Diese Präparationen zeigen, wenn ihre Proteine mit SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt werden, etwa 10 Hauptbanden. Nach diesen Gelen beurteilt, ist etwa die Hälfte des Gesamtproteins das Astacus-Sehpigment (vermutlich ein Rhodopsin). Als Antigene kommen vor allem die Proteine dieser Präparationen in Frage, da Proteine eine wesentlich größere Antigenität besitzen als z.B. Membranlipide (vgl. Kabat, 1968 u.a. Lehrbücher der Immunchemie). Wie die Immunoblot-Experimente zeigen (3.11.3), binden 5 monoklonale Antikörper, die von den fusionierten Lymphozyten von 2 verschiedenen Mäusen gebildet werden, wahrscheinlich an das gleiche Polypeptid. Das Kaninchen-Antiserum enthält dagegen Antikörper gegen fast alle Rhabdomproteine, vor allem aber viele anti-Opsin-Antikörper. Das hochmolekulare Polypeptid (Molmasse ca. 165 000 g/mol), an das vermutlich alle untersuchten monoklonalen Antikörper binden, kommt nicht in großer Menge im Rhabdom vor und war für das verwendete Kaninchen nicht sehr immunogen, da sich im Kaninchenantiserum kaum Antikörper dagegen nachweisen lassen. Aus der unterschiedlichen Antigen-spezifität der Kaninchen-Serumantikörper und der monoklonalen Antikörper ergeben sich folgende Fragen:

- Ist das hochmolekulare Polypeptid eventuell für Mäuse, nicht aber für Kaninchen stark immunogen?
- Bedingt die Versuchsdurchführung eine unbeabsichtigte Selektion für Hybridome, die Antikörper gegen dieses Polypeptid bilden?

Es gibt in der Literatur Beispiele dafür, daß verschiedene Versuchstierarten, die mit dem gleichen Antigen immunisiert werden, Antiseren mit verschiedener Spezifität bilden (z.B. van der Giessen, 1974). Ob ein solcher Fall auch hier vorliegt, kann relativ leicht untersucht werden, indem man Immunoblots mit dem Serum immunisierter Mäuse vergleicht mit den Immunoblots von Kaninchen-anti-Rhabdom Antiserum. Dieses Experiment soll in Kürze gemacht werden.

Eine Selektion durch die Versuchsdurchführung könnte folgendermaßen zustande kommen:

Wenn man monoklonale Antikörper erhalten will, muß man nach der Fusion von Lymphozyten und Myelomzellen diejenigen Hybridome herausfinden, die spezifische Antikörper produzieren. Dazu diene hier der RIA.

Daß alle von mir bisher erfolgreich getesteten Hybridklone Antikörper gegen das gleiche Antigen bilden, könnte daran liegen, daß monoklonale Antikörper gegen andere Antigene durch den RIA nicht nachgewiesen werden konnten, und die betroffenen Hybridome deshalb nicht aufgezogen wurden. Es ist z.B. denkbar, daß dieses eine Protein besonders gut an die PVC-Oberfläche der Mikrotiterplatten bindet. Dagegen spricht, daß das Kaninchen-antiserum, welches nur sehr wenig Antikörper gegen das Antigen der monoklonalen Antikörper enthält, einen relativ guten Titer (vgl. 3.4.1) im RIA aufwies. Außerdem bildete - mit dem RIA gemessen - ein relativ hoher Prozentsatz der Hybridome nach der Fusion spezifische Antikörper (27 bzw 8 %). Das spricht dafür, daß die meisten produzierenden Klone auch erkannt wurden. Nach der Literatur (Yelton, 1981; Edwards, 1981; u.a. Reviews) bilden etwa 10 % der Hybridome einer Fusion spezifische Antikörper. Dieser Prozentsatz hängt allerdings stark von dem untersuchten Antigen ab.

Obwohl die Antikörper von 5 Klonen vermutlich an das gleiche Antigen binden, handelt es sich doch eindeutig um verschiedene Antikörper. Die Antikörper der einzelnen Hybridome unterscheiden sich in ihrer Bindung in den RIA-Titrationskurven (vgl. 3.4.1), und sie gehören nicht alle der gleichen Antikörperklasse an (vgl. 3.6). Die unter 3.8 beschriebenen Versuche zeigen, daß Belichtung der Rhabdompräparation die Bindung der drei näher untersuchten monoklonalen Antikörper (16 c, 22 A, 62 D) in unterschiedlicher Weise verändert. Das läßt sich damit erklären, daß die Antikörper an verschiedenen Orten des Antigens binden. Eine andere Interpretation dieser Versuche ist, daß die Antikörper zwar an den gleichen Bindungsort, dort aber unterschiedlich fest binden. Die Antikörper mit niedriger Affinität binden nicht mehr, wenn sich der Bindungsort ändert,

während die Antikörper hoher Affinität trotzdem binden.

Der Bindungsort des Antikörpers 16 c liegt an einer Stelle des Antigens, die bei beschallten Präparationen für den Antikörper viel besser zugänglich ist. Es ist möglich, daß dieser Ort innerhalb der Mikrovilli liegt, und erst zugänglich wird, wenn sich beim Beschallen sog. "inside-out"-Vesikel bilden.

Einer der monoklonalen Antikörper unterscheidet sich weiterhin deutlich von den anderen dadurch, daß er mit einem noch nicht charakterisierten Antigen aus Rinder-Stäbchenaußensegmenten kreuzreagiert (3.4).

Die Bindung dieses Antikörpers an Präparationen photosensorischer Membran wird außerdem nach Behandlung der Präparation mit Detergenz viel geringer, während die Bindung der anderen monoklonalen Antikörper durch Detergenz nur wenig beeinflusst wird (s. 3.5).

Mit der Immunoblotting-Methode konnte nur das Antigen von 5 der insgesamt 11 getesteten monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden.

Mögliche Ursachen, warum sich die Methode bei 6 monoklonalen Antikörpern nicht anwenden ließ, sind:

- zu geringe Affinität zwischen Antikörper und SDS-denaturiertem Antigen
- zu geringe Antigenmenge auf dem Nitrozellulosefilter.

Der erstgenannte Grund - zu geringe Affinität - ist für die meisten monoklonalen Antikörper der wahrscheinlichere. Bei 4 der monoklonalen Antikörper war die Bindung auch an nicht-denaturierte Rhabdompräparationen im RIA relativ niedrig. Diese Antikörper banden wie die meisten anderen getesteten monoklonalen Antikörper an SDS-denaturiertes Antigen noch schlechter als an natives.

Antikörper erkennen nur einen kleinen, etwa 6 - 7 Aminosäuren langen Bereich ihres Antigens (Tzartos, 1981). Die an der Antikörperbindung beteiligten Aminosäuren müssen in der Primärstruktur der Polypeptidkette nicht aufeinanderfolgen, sie können auch durch die räumliche Anordnung der Polypeptidkette benachbart sein.

Manche Antikörper binden deshalb nicht mehr, wenn sich die Konformation des Antigens geändert hat (vgl. Margry, 1982).

Bei der Immunoblotting-Methode müssen die Antigene vor der Elektrophorese mit SDS denaturiert werden. Obwohl das SDS vor der Inkubation mit den Antikörpern wieder entfernt wird, so daß eventuell eine teilweise Renaturierung des Antigens erfolgen kann, wird ein Teil der Bindungsstellen für Antikörper (Epitope) vermutlich irreversibel zerstört (vgl. Waehnelt, 1975). Wenn man herkömmliche Antiseren benutzt, findet man fast immer auch eine Bindung an SDS-denaturiertes Antigen, da die Seren viele verschiedene Antikörper enthalten, und nicht alle Epitope durch Denaturieren verloren gehen (vgl. Burridge, 1978). Bei monoklonalen Antikörpern ist das anders, da sie gegen einen einzigen Bindungsort am Antigenmolekül gerichtet sind. Wenn bei vielen Antigenmolekülen dieser Ort verändert ist, kann mit der verwendeten Methode keine Antikörperbindung mehr nachgewiesen werden.

Eine weitere Erklärung, warum manche Antikörper keine Polypeptidbande im Immunoblot markierten, könnte eine zu geringe Antigenmenge auf dem Nitrozellulosefilter sein.

Die Immunoblotting-Methode gilt allerdings als sehr empfindlich. Die Proteinmenge pro Bande auf dem Filter, die gerade noch durch Antikörper nachgewiesen werden kann, wird mit 1 - 2 ng (Burnette, 1981) bzw. 0,1 ng (Towbin, 1979) angegeben.

Die auf die Nitrozellulose übertragene Proteinmenge wurde von mir nicht bestimmt. Unter den beschriebenen Bedingungen war die Übertragung von Polypeptiden aus dem Acrylamidgel auf das Nitrozellulosefilter nicht sehr effektiv (vgl. 3.11.1):

Bei Polypeptiden großer Molmassen blieb der größte Teil einer jeden Polypeptidbande auf dem Gel zurück. Die Immunoblot-Methode kann sicher noch optimiert werden:

Die quantitative Übertragung von Polypeptidbanden, wie sie in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben wird (Bittner, 1980; Burnette, 1981), hätte vor allem den Vorteil, daß dadurch die pro Elektrophorese nötige Proteinmenge stark reduziert werden könnte. Um eine quantitative Übertragung zu erreichen, muß der Transfer bei wesentlich höheren Stromstärken (2 A) und viel länger (bis zu 22 h) durchgeführt werden.

Dabei besteht allerdings die Gefahr, daß Polypeptidbanden kleinerer Molmassen in den Elektrodenpuffer eluiert werden.

4.2 Unterschiedliche Bindung der Antikörper an Antigen aus belichteten und unbelichteten Rhabdompräparationen

Die Bindung eines Antikörpers ändert sich, wenn sein Bindungsort am Antigen durch eine chemische Reaktion modifiziert bzw. durch eine Konformationsänderung verdeckt oder verändert wird.

Deshalb können z.B. sowohl Antikörper aus Kaninchen-antiserum (Schalken, 1983), als auch monoklonale Antikörper (Molday, 1983) zwischen Rinder-Rhodopsin und dem bei Belichtung daraus entstehenden Opsin unterscheiden.

Mit einer indirekten Methode, dem Kompetitionstest (s. 3.8) habe ich untersucht, ob monoklonale und Serumantikörper an Präparationen belichteter und unbelichteter Flußkrebsrhabdome verschieden gut binden.

Wenn das Rhabdom belichtet wird, werden vermutlich viele Prozesse in Gang gesetzt, wodurch sich mehrere experimentelle Größen ändern.

Gemäß der Hypothese von Hamdorf und Razmjoo (1979) gibt es im Evertibraten sowohl vom Rhodopsin als auch von dem bei Belichtung daraus entstehenden Metarhodopsin wenigstens 2 Zustände, die sich nicht in ihren Absorptionsspektren unterscheiden. Nur wenn Rhodopsin in einem "energiereichen" Zustand Photonen absorbiert, entsteht daraus ein solches Metarhodopsin, das (falls es nicht sofort wieder zu Rhodopsin reisoomerisiert wird) für eine kurze Zeit in der Lage ist, diejenigen Prozesse auszulösen, über die die Membranleitfähigkeit erhöht wird. Welche Reaktionen dabei im einzelnen ablaufen, ist noch unbekannt (s. Einleitung). Ich habe bei meinen Versuchen vorausgesetzt, daß bei gleichen Belichtungsbedingungen bestimmte Veränderungen, z.B. an den Rhabdomproteinen, reproduzierbar ablaufen.

Kaninchen-anti-Rhabdom-Antiserum zeigte eine etwas bessere Bindung an belichtete als an unbelichtete Rhabdompräparationen. Die drei getesteten monoklonalen Antikörper, deren Antigen vermutlich das gleiche hochmolekulare Polypeptid ist, verhielten sich unterschiedlich:

Antikörper 16 c zeigte eine geringfügig bessere Bindung an das Antigen in unbelichteten Rhabdompräparationen, Antikörper 62 D zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Bindung, und

Antikörper 22 A band wesentlich besser an das Antigen aus belichteten Rhabdompräparationen. Das Kaninchen bzw. die Mäuse, von denen die Antikörper stammen, wurden mit belichteter photosensorischer Membran immunisiert. Es ist deshalb verständlich, daß das Kaninchenantiserum besser an die Proteine aus belichteten Rhabdomen bindet. Der beobachtete Effekt ist beim Kaninchenantiserum nicht sehr groß, da das Serum nicht monospezifisch ist, sondern Antikörper gegen verschiedene Proteine enthält.

Auch bei einem monoklonalen Antikörper ist es wahrscheinlicher, daß er, falls er Lichtunterschiede erkennt, besser an belichtetes Antigen bindet, da mit belichteten Rhabdomen immunisiert wurde.

Außerdem wurden solche Antikörper, die ausschließlich an unbelichtete, nicht aber an belichtete Rhabdome binden, nicht erkannt, weil beim RIA stets nur die Bindung an belichtete Präparationen untersucht wurde. Bei dem einen monoklonalen Antikörper (16 c), der besser an unbelichtete als an belichtete Rhabdompräparationen bindet, ist dieser Unterschied in der Bindung nicht sehr groß.

Die untersuchten monoklonalen Antikörper binden vermutlich alle an das gleiche Antigen, ein hochmolekulares Polypeptid. Die Funktion dieses Polypeptides ist zur Zeit noch unbekannt. Es könnte außer am Transduktionsprozeß der Sehzelle, der im Millisekunden-Bereich abläuft, noch an anderen, langsameren lichtabhängigen Prozessen beteiligt sein:

- Die Empfindlichkeit der Sehzelle wird verstellt durch Vorgänge, die man unter dem Begriff der Adaptation zusammenfaßt (vgl. Stieve, 1977a).
- Im Evertibratenaugen wandern weiterhin Schirmpigmentgranula zum distalen Bereich der Retina, um das Rhabdom vor zu starkem Lichteinfall zu schützen (Bernhards, 1916; Krebs, 1972). An der Wanderung von Schirmpigmentgranula ist ein System von Mikrotubuli beteiligt (Frixione, 1979; Antony, 1984). Diese liegen außerhalb des Rhabdoms und sind keine Verunreinigung der Rhabdompräparationen (Diplomarbeit, 1980), wogegen Schirmpigmentgranula selbst die Hauptverunreinigung darstellen.

Das Schirmpigment (sog. Ommochrome, Butenandt, 1960) wird zwar durch das Waschen in hypotoner Lösung entfernt, die Membran der Granula aber sedimentiert vermutlich mit der Photorezeptor-membran, und Proteine aus diesen Membranen können deswegen in den Präparationen enthalten sein.

- Bei vielen Evertebraten (*Limulus*, *Leptograpsus*, *Procambarus*) wurde ein Abbau von photosensorischer Membran bei Helladaptation beobachtet (s. z.B. Behrens, 1974; Stowe, 1981; Eguchi, 1976), der teilweise auch vom diurnalen Rhythmus dieser Tiere beeinflusst wird. Weiterhin beobachtete E. Winterhager, die die Rhabdome des Flußkrebsses mit der Gefrierbruch-Methode untersuchte, eine lichtinduzierte Umorientierung von Partikeln in der Mikrovillusmembran (Winterhager, 1979). Es wird angenommen, (Blest, 1982), daß am Auf- und Abbau der photosensorischen Membran ein Zytoskelett beteiligt ist, das außerdem die hochgeordnete Struktur der Mikrovilli stabilisiert (Winterhager, 1982). Ein Zytoskelett innerhalb des Rhabdoms wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen in den Mikrovilli von Cephalopoden (Saibil, 1982), Dipteren (Blest, 1982) und Crustaceen (Blest, pers. Mitteilung) nachgewiesen. Diese Proteine des Zytoskeletts (u.a. Aktin, Saibil, 1982) sind höchstwahrscheinlich in der untersuchten Präparation von *Astacus* photosensorischer Membran enthalten.

Die unterschiedlich gute Bindung von zwei monoklonalen Antikörpern an belichtete und unbelichtete Präparationen photosensorischer Membran läßt sich am besten dadurch erklären, daß das Polypeptid, an das die Antikörper binden, bei Belichtung modifiziert wird.

Es sind verschiedene lichtinduzierte Modifizierungen von Proteinen in der Photorezeptorzelle bekannt.

Lange bekannt ist die Konformationsänderung des Rhodopsinmoleküls bei Vertebraten (Wald, 1968). Sie wird ausgelöst durch die Absorption von Licht, und hat eine Änderung der spektralen Eigenschaften des Moleküls zur Folge. Biochemische Untersuchungen am Vertebraten-Photorezeptor haben gezeigt, daß durch diese Konformationsänderung direkte, lichtinduzierte Interaktionen zwischen dem Rhodopsin und Enzymen, wie z.B. der Rhodopsinkinase und

einem GTP-bindenden Protein (Kühn, 1980) möglich werden. Weiterhin sind Konformationsänderungen von anderen Proteinen der Photorezeptorzelle (Phosphodiesterase, Ionenkanal etc.) als Folge der direkten oder indirekten Aktivierung oder Inaktivierung durch das angeregte Rhodopsin wahrscheinlich. Die biochemischen Vorgänge im Evertibraten-Photorezeptor sind viel weniger gut untersucht, aber eine lichtregulierte GTPase-Aktivität wurde auch dort gefunden (Vandenberg, 1982; Fein, 1981; Calhoon, 1980; Saibil, 1983).

Es konnten außerdem eine Reihe von lichtinduzierten posttranslationalen Modifizierungen an Proteinen in Photorezeptorzellen nachgewiesen werden, bei denen kovalente Bindungen geknüpft werden. Dazu gehören die Phosphorylierung von Rhodopsin (Kühn, 1972; Paulsen, 1978; Paulsen, 1983; Vandenberg, 1982) bei Vertebraten und Evertibraten (Tintenfisch, Fliege), sowie von anderen Proteinen bei Vertebraten (Lolley, 1977; Polans, 1979), die Methylierung von Proteinen im Vertebraten-Stäbchenaußensegment (Swanson, 1983) und die chemisch noch nicht näher charakterisierte Modifizierung von Proteinen bei *Drosophila* (Matsumoto, 1982).

In meiner Diplomarbeit habe ich nachgewiesen, daß auch im *Astacus*-Photorezeptor das Rhodopsin lichtabhängig phosphoryliert wird.

Weitere Polypeptide des *Astacus*-Rhabdoms werden ebenfalls phosphoryliert, ein Einfluß der Belichtung auf die Phosphorylierung dieser Polypeptide konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Diplomarbeit, 1980).

Über die Bedeutung der meisten Modifikationen für den Sehprozeß ist nicht viel bekannt.

Im Wirbeltier-Photorezeptor bewirkt die Phosphorylierung des Rhodopsins möglicherweise, daß durch Belichtung in Gang gesetzte Enzymreaktionen wieder abgeschaltet werden (Hypothese von Liebman, Sitaramayya, 1983).

Im Photorezeptor der Fliege konnte nachgewiesen werden, daß die Photoregeneration von Metarhodopsin zu Rhodopsin eine schnelle Dephosphorylierung des Opsins auslöst (Paulsen, 1983). Paulsen interpretiert diesen Befund gemäß einer Hypothese über den Seh-

vorgang im Evertebraten von Hamdorf (1979) so, daß nur das nichtphosphorylierte Metarhodopsin die Erregung der Photorezeptorzelle auslöst.

Aufgrund der bisher durchgeführten Experimente kann weder über die Art der Modifizierung, noch über die Funktion des von den monoklonalen Antikörpern markierten Polypeptids etwas gesagt werden. Die charakterisierten monoklonalen Antikörper bieten die Möglichkeit, die Funktion dieses Polypeptides zu untersuchen, und seine Lage im Rhabdom herauszufinden. Es kann dabei von Nutzen sein, daß einer der Antikörper mit einem Protein aus Rinderdisks kreuzreagiert (s. 3.4). Wenn es gelingt, ein homologes Protein in Rinderdisks zu identifizieren, läßt sich damit unter Umständen auch die Bedeutung des Astacus-Proteins klären, da viele Proteine im Vertebraten-Photorezeptor schon gut untersucht sind.

Kreuzreaktivität von Antigenen wird allgemein als ein Zeichen für homologe Struktur und ähnliche Funktion gewertet. Kreuzreaktivität hat bei monoklonalen Antikörpern allerdings nicht unbedingt die gleiche Aussagekraft wie bei polyklonalen Antisera (vgl. Lane, 1982), da ein monoklonaler Antikörper nur einen sehr kleinen Bereich auf dem Antigenmolekül erkennt (Tzartos, 1981).

Der Kreuzreaktivität kann deshalb auch nur eine zufällige Ähnlichkeit (ein kleines Stück gleiche Aminosäuresequenz), und keine Verwandtschaft zugrunde liegen.

4.3 ----- Ergebnisse und Diskussion der elektrophysiologischen Experimente

Die elektrophysiologischen Experimente wurden von Frau H. Bräuer und Herrn U. Müller (extrazelluläre Ableitung) sowie von Frau M. Bruns (intrazelluläre Ableitung) durchgeführt.

Antikörper sind große Moleküle (Molmasse je nach Klasse 160 000 - 900 000 g/mol), die mit hoher Affinität an ihr Antigen binden (K_D -Werte bis zu 10^{12} l/mol). Deshalb können Antikörper, die an eine geeignete Stelle des Antigens binden, dadurch dessen Funktion vollständig oder teilweise blockieren.

Um Antikörper zu finden, die bei der Reaktion eines Proteins stören, benötigt man einen Bioassay als möglichst einfachen Test für den Ablauf des untersuchten Vorgangs.

Beispiele aus anderen Bereichen sind Antikörper, die die Funktion einer Ionenpumpe (der Na-K-ATPase) hemmen (Review: Lauf, 1978) oder monoklonale Antikörper, die spezifische Interaktionen zwischen Zellen stören (z.B. Aggregation von Dictyostelium-Zellen: Müller, 1978; Gerisch, 1980; Interaktion zwischen Lymphozyten: Webb, 1979).

Wir versuchten, als Bioassay die Änderung der Leitfähigkeit der Photorezeptorzelle bei Belichtung zu verwenden.

Zunächst wurde Kaninchen-anti-Rhabdom-Antiserum (ca. 1 : 15 bis 1 : 50 verdünnt) der Badlösung einer isolierten Astacus-Retina zugegeben. Diese Retina wurde in regelmäßigen Abständen mit Lichtblitzen gereizt, und die elektrische Lichtantwort (ERG) der Retinulazellen extrazellulär abgeleitet. (Zur Beschreibung der elektrophysiologischen Ableitung siehe Stieve, 1980).

Die Antiseren von zwei Kaninchen wurden auf diese Weise getestet, und beide hatten keinen signifikanten Einfluß auf die Größe oder Form der abgeleiteten Potentialänderung (s. Abb. 23).

Von beiden Antiseren war aus dem Radio-Immunoassay bekannt, daß sie Antikörper gegen Astacus-Rhabdomproteine enthalten.

Es kann verschiedene Ursachen haben, daß diese Antikörper keinen Effekt auf die extrazellulär abgeleitete Lichtantwort zeigen:

1. Keiner der Antikörper hindert eines der Rhabdomproteine an seiner Funktion.
2. Die Antikörper als relativ große Proteinmoleküle können nicht in den Rhabdombereich eindringen, weil der Extrazellularraum zwischen den Mikrovilli zu eng ist.
3. Die Antikörper bewirken nur eine geringe Veränderung, und das auch nur bei wenigen Retinulazellen. Da aber das Potential von vielen Zellen gemittelt wird, ist die Methode zu unempfindlich, um die Änderung zu erfassen.
4. An der Seite der Mikrovilli, die zum Extrazellularraum weist, befinden sich keine Bindungsstellen für die getesteten Antikörper, über die sich die Funktion von wichtigen Proteinen beeinflussen lassen. Die für den Sehvorgang wichtigen Proteine kommen nur in

der Zelle vor, und deshalb können die Antikörper auch nur wirken, wenn sie intrazellulär eingesetzt werden.

Zu 2: Der Extrazellularraum zwischen den Mikrovilli ist sehr eng, aber, wie Schröder u.a. (1979) gezeigt haben, für das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) noch zugänglich. Die HRP hat eine Molmasse von ca. 40 000 g/mol und ist damit kleiner als die Immunoglobulinmoleküle (Molmasse IgG: ca. 160 000 g/mol), so daß die Frage der Zugänglichkeit noch ungeklärt ist. Die hier aufgeführten Punkte beinhalten sicher nicht alle Gründe dafür, warum die extrazellulären Versuche erfolglos waren. Es gibt z.B. monoklonale Antikörper gegen den Acetylcholinrezeptor im elektrischen Organ von Fischen, die die Funktion dieses Rezeptors nur in rekonstituierten Membranen, und nicht in nativen Membranen hemmen (A. Maelicke, persönliche Mitteilung).

Um einen Teil der möglichen Gründe, warum bei den extrazellulären Versuchen keine Wirkung der Antikörper gesehen wurde, auszuschließen, wurden die Kaninchenserumantikörper in Photorezeptorzellen injiziert, und die Lichtantwort einer einzelnen Zelle mit einer intrazellulären Ableitelektrode gemessen.

Diese Experimente waren an der Sehzelle des Flußkrebsses nicht möglich, da diese sehr klein ist und stabile intrazelluläre Ableitungen sehr selten sind. Deshalb wurden diese Versuche an Limulus Ventralnerv Photorezeptor ausgeführt.

Die Methode der intrazellulären Ableitung ist beschrieben bei Stieve (1978).

Gereinigte Antikörper (3.9) wurden durch die Ableitelektrode (Glasmikroelektrode, Spitzendurchmesser $< 1 \mu\text{m}$) mit einem kurzen Druckpuls in die Zelle injiziert. Die Zelle wurde vor und nach der Druckinjektion in regelmäßigen Abständen mit einem Reizprogramm mit 3 aufeinanderfolgenden Lichtreizen be-
lichtet. Der erste Lichtreiz (Dauer: 2 s) dient der Helladaptation der Zelle und ruft eine gesättigte Lichtantwort hervor. Der zweite und dritte Lichtreiz ist jeweils ein kurzer Blitz, wobei die Zelle beim ersten Blitz (α) noch helladaptiert ist, und beim zweiten Blitz (β) fast dunkeladaptiert (Reizprogramm s. Stieve, 1983a).

Dieses Reizprogramm hat den Vorteil, daß die Reaktion der Zelle unter verschiedenen Adaptationsbedingungen getestet werden kann. Wenn die Intensität der Lichtblitze so gewählt wird, daß die hervorgerufene Lichtantwort der Zelle nicht ihre maximale Höhe hat (gesättigt ist), können auch sehr kleine Änderungen in der Empfindlichkeit der Zelle erkannt werden. Zusammen mit den Antikörpern wurde das Enzym Meerrettichperoxidase in die Zellen injiziert. Nach Ablauf des Versuchs wurde durch die Peroxidase-Färbereaktion (s. Saunders, 1964) nachgewiesen, ob die Proteine tatsächlich in die Zelle gelangt waren. Die Ergebnisse dieser Versuche sind nicht einheitlich. Die meisten Experimente zeigten jedoch folgendes:

Nach Injektion der Antikörper wird die Lichtantwort auf den ersten (α) Blitz drastisch kleiner. Erhöht man jedoch die Reizlichtintensität, nimmt die Amplitude der Antwort wieder zu. Die Lichtantwort auf die helladaptierende Belichtung und auf den zweiten Lichtblitz (β) ist nicht oder nur kaum betroffen. Das Ergebnis läßt sich so deuten, daß die Empfindlichkeit der helladaptierten Photorezeptorzelle nach Injektion des Antikörpers herabgesetzt wird.

Antikörper aus dem Serum eines nicht-immunisierten Kaninchens zeigten in der Mehrzahl der Experimente diesen Effekt auf die Lichtantwort nicht.

Das Ergebnis dieser elektrophysiologischen Versuche läßt sich zur Zeit noch nicht sicher erklären.

Eine mögliche Interpretation ergibt sich daraus, daß die meisten Antikörper in dem getesteten anti-Rhabdom-Antiserum wahrscheinlich gegen das Astacus-Rhodopsin gerichtet sind (s. 3.11.2.1). Vorausgesetzt, daß ein Teil dieser Antikörper mit dem Rhodopsin des Limulus kreuzreagiert, könnte man den nach der Injektion beobachteten Effekt z.B. als Empfindlichkeitsabnahme der Rezeptorzelle durch die Blockierung von Rhodopsinmolekülen deuten. Nachdem die polyklonalen Antikörper bei den Injektionsversuchen einen Effekt auf die Lichtantwort gezeigt haben, sollen demnächst monoklonale Antikörper getestet werden. Da diese monospezifisch sind, d.h. nur an ein bestimmtes Protein binden, bieten sie bessere Voraussetzungen dafür, die Abläufe in einer

Sehzelle bei Belichtung zu untersuchen, als die mit vielen Proteinen reagierenden Antikörper eines Antiserums.

Die elektrophysiologischen Experimente - Injektion von Antikörpern in die Limulus Ventralnerv Photorezeptorzelle und intrazelluläre Ableitung der Lichtantwort der Zelle - erfüllen jedoch nicht die Anforderungen, die an den eingangs erwähnten Bioassay gestellt werden. Diese Tests erfordern zuviel Zeit und Arbeit, um damit eine größere Zahl an monoklonalen Antikörpern testen zu können. Sie haben außerdem den Nachteil, daß die Wirkung der Antikörper bei einer anderen Tierart getestet wird, als der, gegen deren Proteine sie erzeugt wurden.

Um die hier beschriebene Arbeit fortzuführen, ist deshalb geplant:

1. Einen geeigneteren Bioassay zu entwickeln.
2. An Präparationen von photosensorischer Membran aus dem Limulus-Ventrallauge zu untersuchen, ob die polyklonalen und monoklonalen Antikörper kreuzreagieren. Eine Präparationsmethode für Limulus-Lateraläugen wird zur Zeit von E. André an diesem Institut erarbeitet.

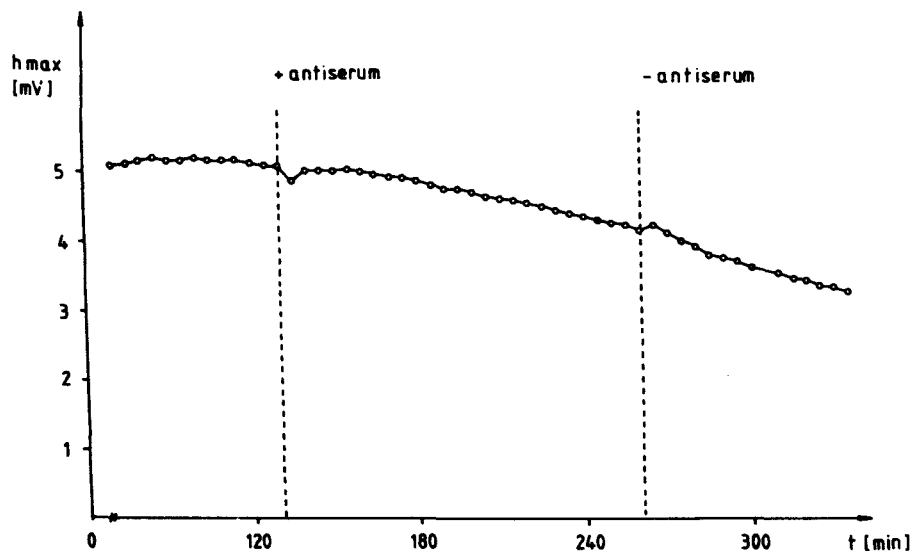


Fig. 23a:
Schematic drawing of the ERG (electroretinogram) and the parameters which were measured: h_{max} , t_{max} , t_2

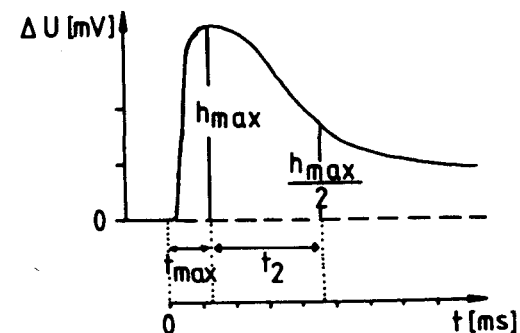


Fig. 23:
Effect of rabbit anti-rhabdom antiserum on the ERG of the isolated *Astacus* retina. Rabbit anti-*Astacus* rhabdom antiserum (final dilution 1/15) was added to the superfusate of an isolated *Astacus* retina. The retina was irradiated with saturating light flashes (1 flash/5 min) and the ERG was recorded.
 $t = 130$ min: antiserum in physiological saline was added
 $t = 260$ min: antiserum solution was replaced by fresh physiological saline (mod. van Harreveld solution).
The antibodies had no significant effect neither on the amplitude nor on the time parameters of the ERG.

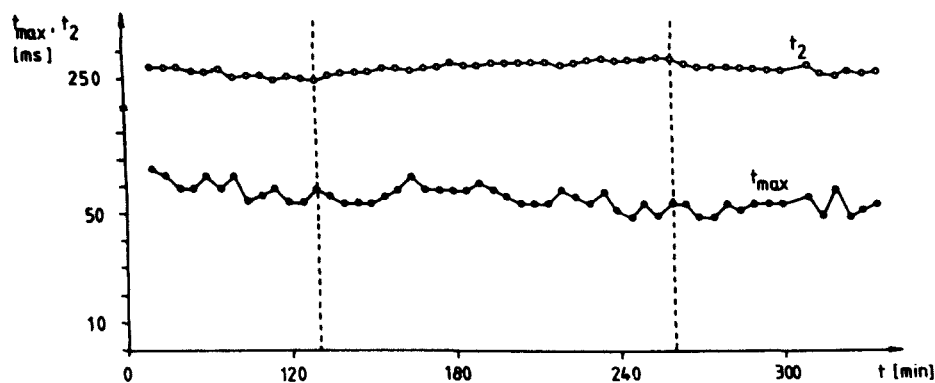


Fig.
24 a

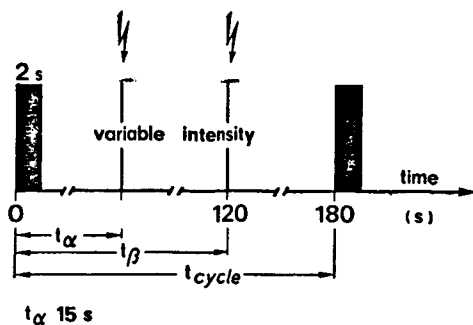


Fig.
24 b

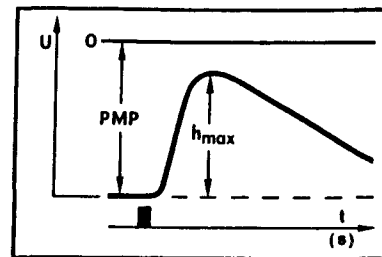


Fig.
24 c

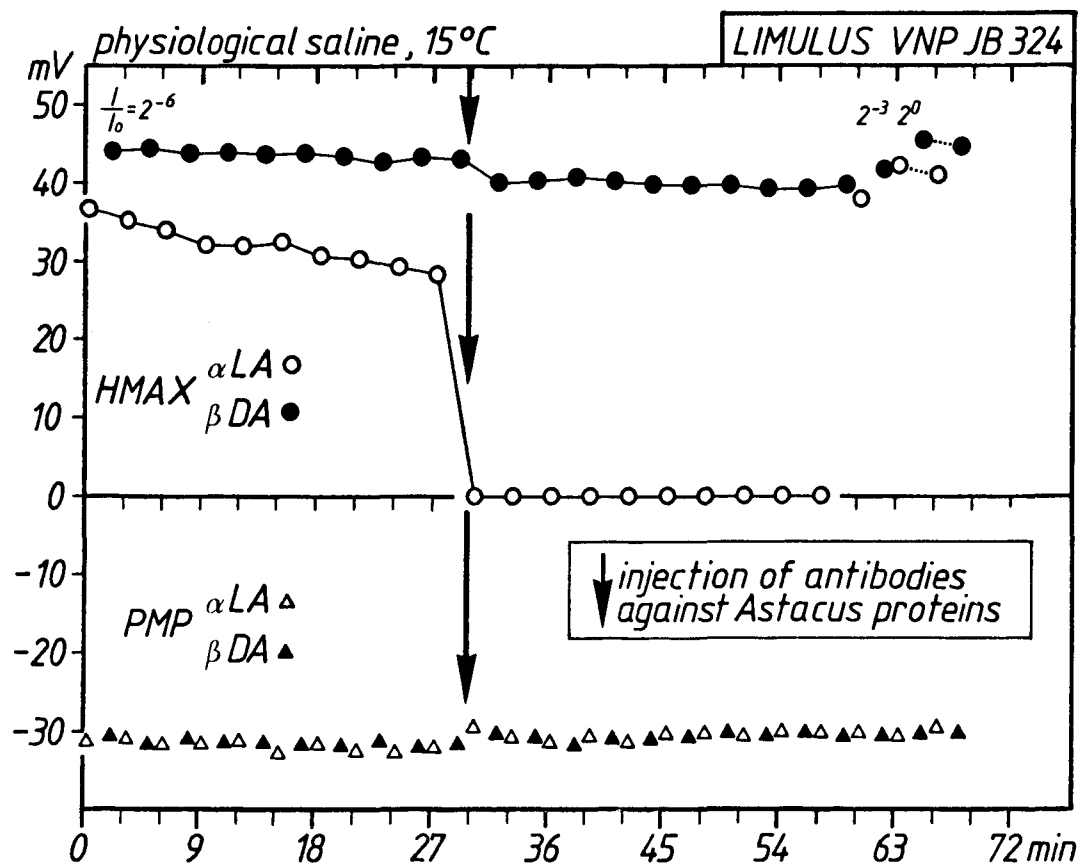


Fig. 24: Effect of rabbit anti-rhabdom antibodies on the light response of the Limulus ventral nerve photoreceptor cell. Rabbit antibodies against *Astacus* photosensory membrane proteins were pressure injected into the Limulus ventral nerve photoreceptor cell. The cell was stimulated with white light as shown in 24a, and the membrane potential was measured by intracellular recording. Upon illumination a receptor potential (depolarization of the cell) is recorded as shown in 24b.

- Fig. 24c: o: maximum amplitude of the light response (h_{max} as indicated in 24b) to the first test flash (α); the cell is light-adapted, the amplitude of the response is not saturated.
- : maximum amplitude of the response to the second (β) test flash; the cell is nearly dark-adapted, the amplitude of the response is almost in saturation.
- When antiserum was injected, the light response of the light-adapted cell (α) diminished. When the intensity of the test light flash was raised (from $I/I_0 = 2^{-6} \rightarrow I/I_0 = 2^0$), the response could be recorded again. The response of the dark-adapted cell (β) was not affected, presumably because the light flash was almost saturating.
- $\Delta\Delta$: The PMP (prae stimulus potential, resting potential of the cell) was constant during the experiment.

Literaturverzeichnis

Antony, S. (1984)

Wechselwirkung zwischen Calcium-Haushalt und Schirmpigmentwanderung untersucht an der Photorezeptorzelle des *Astacus leptodactylus*.

Dissertation, RWTH Aachen, Institut für Neurobiologie der KFA-Jülich

Baer, K. (1980)

Lichtbedingte Veränderungen der Proteine des *Astacus*-Rhabdoms. Diplomarbeit, RWTH Aachen, Institut für Neurobiologie der KFA-Jülich

Bauer, P.-J.; Mavrommati, E. (1980)

Interaction of Ficoll with bovine disc membranes.

Biophys. Struct. Mech. 6 (Suppl.), 116

Behrens, M. (1974)

Photomechanical changes in the ommatidia of the *Limulus* lateral eye during light and dark adaptation.

J. Comp. Physiol. 89, 45 - 57

Bernhards, H. (1916)

Der Bau des Komplexauges von *Astacus fluviatilis*.

Z. wiss. Zool. 116, 649-707

Bittner, M.; Kupferer, P.; Morris, Ch.F. (1980)

Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets.

Anal. Biochem. 102, 459-471

Blest, A.D.; Stowe, S.; Eddey, W.; Williams, D.S. (1982)

The local deletion of a microvillar cytoskeleton from photoreceptors of tipulid flies during membrane turnover (plates 1-6).

Proc. Roy. Soc. Lond. 215, (1201), 469-479

Blest, A.D.; Stowe, S.; Eddey, W. (1982a)

A labile, Ca^{2+} -dependent cytoskeleton in rhabdomeral microvilli of blowflies.

Cell Tiss. Res. 223, 553-573

Bradford, M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 72, 248-254

Brown, J.E.; Kaupp, U.B.; Malbon, C.C. (1981)

cAMP and adenylate cyclase probably do not mediate excitation in Limulus ventral photoreceptors.

Biol. Bull. 161, 340

Burnette, W.N. (1981)

"Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A.

Anal Biochem. 112, 195-203

Burridge, K. (1978)

Direct identification of specific glycoproteins and antigens in sodium dodecyl sulfate gels.

Meth. Enzymol., New York, 50, 54-64

Butenandt, A.; Biekert, E.; Kübler, H.; Linzen, B. (1960)

Über Ommochrome, XX: Zur Verbreiterung der Ommatine im Tierreich. Neue Methoden zu ihrer Identifizierung und quantitativen Bestimmung.

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 319, 238-256

Calhoon, R.; Tsuda, M.; Ebrey, T.G. (1980)

A light-activated GTPase from Octopus photoreceptors.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 94 (4), 1452-1457

Cleveland, D.W.; Fischer, S.G.; Kirschner, M.W.; Laemmli, U.K. (1977)

Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis.

Jour. Biol. Chem. 252 (3), 1102-1106

Edwards, P.A.W. (1981)

Some properties and applications of monoclonal antibodies.

Biochem. Jour. 200, 1-10

- Eguchi, E.; Waterman, T.H. (1976)
Freeze-etch and histochemical evidence for cycling in crayfish photoreceptor membranes.
Cell Tiss. Res. 169, 419-434
- Fairbanks, G.; Steck, T.L.; Wallach, D.F.H. (1971)
Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane.
Biochem. 10 (13), 2606-2617
- Fazehas de St. Groth, S.; Scheidegger, D. (1980)
Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics
Jour. Immunol. Meth. 35, 1-21
- Fein, A.; Cone, R.A. (1973)
Limulus rhodopsin: rapid return of transient intermediates to the thermally stable state.
Science 182, 495-497
- Fein, A.; Corson, D.W. (1981)
Excitation of Limulus photoreceptors by vanadate and by a hydrolysis-resistant analog of guanosine triphosphate.
Science 212, 555-557
- Frixione, E.; Aréchiga, H. (1979)
Photomechanical migrations of pigment granules along the retinula cells of the crayfish.
Jour. Neurobiol. 10 (6), 573-590
- Gerisch, G.; Krelle, H.; Boozaro, S.; Eitle, E.; Guggenheim, R. (1980)
Analysis of cell adhesion in Dictyostelium and Polysphandylum by the use of Fab
in: Cell adhesion and motility
ed. A.S.G. Curtis, J.D. Pitts, Cambridge University Press
- Giessen, M. van der, de Lange, B.; van der Lee, B. (1974)
The production of precipitating antiglobulin reagents specific for the subclasses of human IgG.
Immunology 27, 655-663
- Goding, J.W. (1980)
Antibody production by hybridomas.
Jour. Immunol. Meth. 39, 285-308
- Goldsmith, T.H. (1972)
The natural history of invertebrate visual pigments.
in: Handbook of Sensory Physiology VII/1
Photochemistry of Vision, ed. by H.J.A. Dartnall,
Springer-Verlag

Hagins, W.A. (1972)

The visual process: excitatory mechanism in the primary receptor cells.

Ann. Rev. Biophys. Bioenerg. 1, 131-158

Hamacher, K. (1977)

Isolierung und Charakterisierung eines photosensitiven Chemoproteins (Astacus Rhodopsin).

Diplom-Arbeit, RWTH Aachen, Institut für Neurobiologie der KFA Jülich

Hamacher, K. (1981)

Absorptionsspektroskopische Analyse des Astacus Rhodopsin-systems und Nachweis einer metabolischen Regeneration des Rhodopsins nach Helladaptation.

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich GmbH, Institut für Neurobiologie, Jül-1718

Hamdorf, K.; Razmjoo, S. (1979)

Photoconvertible pigment states and excitation in Calliphora; the induction and properties of the prolonged depolarizing afterpotential.

Biophys. Struct. Mech. 5, 137-161

Hudson, L.; Hay, F.C. (1976)

Practical Immunology.

Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne

Hunter, W.M.; Greenwood, F.C. (1962)

Preparation of Iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.

Nature 194 (4827), 495-496

Kabat, E.A. (1968)

Structural concepts in immunology and immunochemistry

Holt, Rinehart and Winston, Inc.

New York, Chicago, San Francisco, Atlanta, Dallas, Montreal, Toronto, London

Kearny, J.F.; Radbruch, A.; Liesegang, B.; Rajewsky, K. (1979)

A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting hybrid cell lines.

Jour. Immunol. 123 (4), 1548-1550

- Klinman, N.R.; Pickard, A.R.; Sigal, N.H.; Gearhardt, P.J.
Metcalf, E.S.; Pierce, S.K. (1976)
Assessing B-cell diversification by antigen receptor and precursor cell analysis.
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 127c, 489-502
- Köhler, G.; Milstein, C. (1975)
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature 256, 495-497
- Krebs, W. (1972)
The fine structure of the retinula of the compound eye of *Astacus fluviatilis*.
Z. Zellforsch. 133, 399-414
- Kronvall, G.; Grey, H.M.; Williams, R.C. (1970)
Protein A reactivity with mouse immunoglobulins.
Jour. Immunol. 105 (5), 1116-1123
- Kühn, H. (1980)
Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes.
Nature 283, 587-589
- Kühn, H.; Dreyer, W.J. (1972)
Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by ATP.
FEBS-Letters 20 (1)
- Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4.
Nature (London) 227, 680-685
- Lane, D.; Koprowski, H. (1982)
Molecular recognition and the future of monoclonal antibodies.
Nature 296, 200-202
- Langone, J.J. (1982)
Applications of immobilized Protein A in immunochemical techniques.
Jour. Immunol. Meth. 55, 277-296
- Lauf, P.K. (1978)
Membrane immunological reactions and transport.
in: Membrane transport in biology I, concepts and models,
ed. D.C. Tosteson, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

- Littlefield, J.W. (1964)
Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro
and their presumed recombinants.
Science 145, 709-710
- Lolley, R.N.; Brown, B.M.; Farber, D.B. (1977)
Protein phosphorylation in Rod outer segments from bovine
retina: cyclic nucleotide activated protein kinase and its
endogeneous substrate.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 572-578
- Margry, R.J.C.F.; Jacobs, C.M.W.; deGrip, W.J.; Daemen, F.J.M.
(1982)
Interference of detergents in immunoassays of Rhodopsin.
Vis. Res. 22, 1447-1449
- Matsumoto, H.; O'Tousa, J.E.; Pak, W.L. (1982)
Light-induced modification of Drosophila retinal polypeptides
in vivo.
Science 217, 839-841
- McDowell, H.; Kühn, H. (1977)
Light-induced phosphorylation of rhodopsin in cattle photo-
receptor membranes: substrate activation and inactivation.
Biochem. 16, 4054-4060
- Miller, W.H.; Gorman, R.E.; Bitensky, M.W. (1971)
Cyclic adenosine monophosphate: function in photoreceptors.
Science 174, 295-297
- Molday, R.S.; MacKenzie, D. (1983)
Monoclonal antibodies to rhodopsin: characterization, cross-
reactivity, and application as structural probes.
Biochem. USA 22 (3), 653-659
- Müller, K.; Gerisch, G. (1978)
A specific glycoprotein as the target site of adhesion
blocking Fab in aggregating Dictyostelium cells.
Nature 274 (5670), 445-449
- Oakley, B.R.; Kirsch, D.R.; Morris, N.R. (1980)
A simplified ultrasensitive silver stain for detecting
proteins in polyacrylamid gels.
Anal. Biochem. 105, 361-363

- Paulsen, R.; Hoppe, I. (1978)
 Light-activated phosphorylation of cephalopod rhodopsin.
 FEBS-Letters 96, 55-58
- Paulsen, R.; Bontrop, J.; Peters, K. (1983)
 Photochemistry and biochemistry of blowfly photoreceptor
 membranes.
 Abstract, BPS-ARVO, p.24
- Polaus, A.S.; Hermolin, J.; Bownds, M.D. (1979)
 Light-induced dephosphorylation of two proteins in frog rod
 outer segments.
 J. Gen. Physiol. 74, 595-613
- Saibil, H. (1978)
 Actin in squid retinal photoreceptors.
 J. Physiol. 281 (17) p. 18
- Saibil, H. (1982)
 An ordered membrane-cytoskeleton network in squid photoreceptor
 microvilli.
 J. Mol. Biol. 158, 435-456
- Saibil, H. (1983)
 Photoexcited rhodopsin and GTP-binding protein crossreact
 in squid and bovine photoreceptors.
 Abstract, BPS-ARVO, p.45
- Schalken, J.J.; Margry, R.J.C.F.; deGrip, W.J.; Daemen, F.J.M.
 (1983)
 A radioimmunoassay specific for opsin.
 Biochim. Biophys. Acta 742, 471-476
- Schreier, M.; Köhler, G.; Hengartner, H.; Berek, C.; Truco, M.;
 Forni, L.; Staehelin, T.; Stocker, J.; Takacs, B. (1980)
 Hybridoma Techniques.
 EMBO, SKMB course 1980, Basel
- Schröder, W.; Stieve, H.; Claßen-Linke, I. (1979)
 Accessibility of extracellular space in the rhabdome of the
 living isolated retina of the crayfish.
 Z. Naturforsch. 34c, 136-142
- Saunders, Holmes-Siedle and Stark (1964)
 Peroxidase.
 Butterworths, London

- Sitaramayya, A.; Liebman, P.A. (1983)
 Phosphorylation of rhodopsin and quenching of cyclic GMP phosphodiesterase activation by ATP at weak bleaches.
 J. Biol. Chem. 258 (20), 12106-12109
- Smith, H.G.; Stubbs, D.; Lithman, P. (1975)
 The isolation and purification of osmotically intact discs from retinal rod outer segments.
 Exp. Eye Res. 20, 211-217
- Springer, T.; Galfré, G.; Secher, D.S.; Milstein, C. (1978)
 Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens.
 Eur. J. Immunol. 8, 539-551
- Springer, T.A. (1980)
 Cell-surface differentiation in the mouse.
 in: Monoclonal antibodies.
 ed. Kennet, R.H.; McKean, T.J.; Bechtol, K.B.
 Plenum Press, New York and London
- Stieve, H. (1973)
 Experiments on the ionic mechanism of the receptor potential of Limulus and crayfish photoreceptor.
 In: Biochemistry and physiology of visual pigments,
 Hrsg. H. Langer, Springer-Verlag Berlin
- Stieve, H. (1977)
 On the mechanism of conductance control of the arthropod visual cell membrane.
 Biophys. Struct. Mech. 3, 145-151
- Stieve, H. (1977a)
 Photorezeption und ihre molekularen Grundlagen.
 in: Biophysik - Ein Lehrbuch. Hrsg. W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Stieve, H.; Bruns, M. (1978)
 Extracellular calcium, magnesium and sodium ion competition in the conductance control of the photosensory membrane of Limulus ventral nerv photoreceptor.
 Z. Naturforsch. 33c, 574-597

Stieve, H.; Bruns, M. (1980)

Dependence of bump rate and bump size in *Limulus* ventral nerve photoreceptor on light adaptation and calcium concentration.

Biophys. Struct. Mech. 6, 271-285

Stieve, H.; Claßen-Linke, I. (1980a)

The effect of changed extracellular calcium and sodium concentration on the electroretinogram of the crayfish retina.

Z. Naturforsch. 35c, 308-318

Stieve, H. (1981)

Roles of calcium in visual transduction in invertebrates.

in: Sense Organs (ed. M.S. Laverack, D.J. Cosens),

Blackie and Son Ltd., Glasgow and London, p. 163-185

Stieve, H. (1983)

Transduction of light energy to electrical signals in photoreceptor cells.

Society for Experimental Biology Symposium XXXVI, The Biology of Photoreception, ed. D.J. Cosens and D. Vince-Price

Stieve, H.; Bruns, M.; Gaube, H. (1983a)

The intensity dependence of the receptor potential of the *Limulus* ventral nerve photoreceptor in two defined states of light- and dark adaptation.

Z. Naturforsch. 38c, 1043-1054

Stowe, S. (1981)

Effects of illumination changes of rhabdom synthesis in a crab.

J. Comp. Physiol. 142, 19-25

Swanson, R.J.; Applebury, M.L. (1983)

Methylation of proteins in photoreceptor rod outer segments

J. Biol. Chem. 258 (17), 10599-10605

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (9), 4350-4354

- Tzartos, S.J.; Rand, D.E.; Einarson, B.L.; Lindstrom, J.M.
(1981)
Mapping of surface structures of electrophorus acetylcholine
receptor using monoclonal antibodies.
J. Biol. Chem. 256 (16), 8635-8645
- Vandenberg, C.A.; Montal, M. (1982)
Light regulates GTPase and kinase activities in squid
photoreceptors.
Biophys. J. 37, 195a
- Vogt, K. (1983)
Is the fly visual pigment a rhodopsin?
Z. Naturforsch. 38c, 329-333
- Waehneltd, T.V. (1975)
Sodium dodecyl sulfate in protein chemistry.
Bio Systems 6, 176-187
- Wald, G. (1968)
Molecular basis of visual excitation.
Science 162, 230-239
- Webb, M.; Mason, D.W.; Williams, A.F. (1979)
Inhibition of mixed lymphocyte response by monoclonal anti-
body specific for a rat T lymphocyte subset.
Nature 282, 841-843
- Winterhager, E. (1979)
Ultrastrukturuntersuchungen an der Retina des Flußkrebsses
Astacus leptodactylus mit Hilfe der Gefrierbruch- und Ultra-
dünnschnitt-Methode.
Dissertation, RWTH Aachen, Institut für Neurobiologie der
KFA Jülich
- Winterhager, E.; Stieve, H. (1982)
Effect of hyper- and hypoosmotic solutions on the structure
of the Astacus retina.
Cell Tiss. Res. 223, 267-280
- Wong, F. (1978)
Nature of light-induced conductance changes in ventral
photoreceptors of Limulus.
Nature 276, 76-79

Yelton, D.E.; Scharff, M.D. (1981)

Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine.

Ann. Rev. Biochem. 50, 657-680

Yoshikami, S.; Hagins, W.A. (1971)

Light, calcium and the photocurrent of rods and cones.

Biophys. Soc. Abstr. 11, 47a

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Neurobiologie der Kernforschungsanlage Jülich angefertigt.

Die zum Herstellen von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern nötigen Arbeitstechniken konnte ich am Institut für Genetik der Universität Köln erlernen. Ein Teil des von mir verwendeten Materials (anti-Immunoglobulin-Antikörper, Tumorzelllinie X63 Ag 8.653) wurde mir von diesem Institut zur Verfügung gestellt. Dafür möchte ich Herrn Prof. K. Rajewsky danken, sowie den Mitgliedern seines Instituts, vor allem Frau G. von Hesberg und Herrn Dr. M. Cramer für ihre Hilfsbereitschaft, und Herrn Dr. A. Radbruch für das Überlassen von klassenspezifischen anti- μ -Antikörpern.

Ich möchte Herrn Prof. H. Stieve danken für die Themenstellung und großzügige Förderung meiner Arbeit, sowie ihm, Frau M. Bruns, Herrn J. Klomfaß, Herrn U. Müller und Frau H. Bräuer für die Leitung bzw. Durchführung der elektrophysiologischen Experimente. Mein Dank gilt allen Mitgliedern des Instituts, vor allem Herrn Dr. W. Schröder, für ihre Unterstützung.

