



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

Institut für Neurobiologie

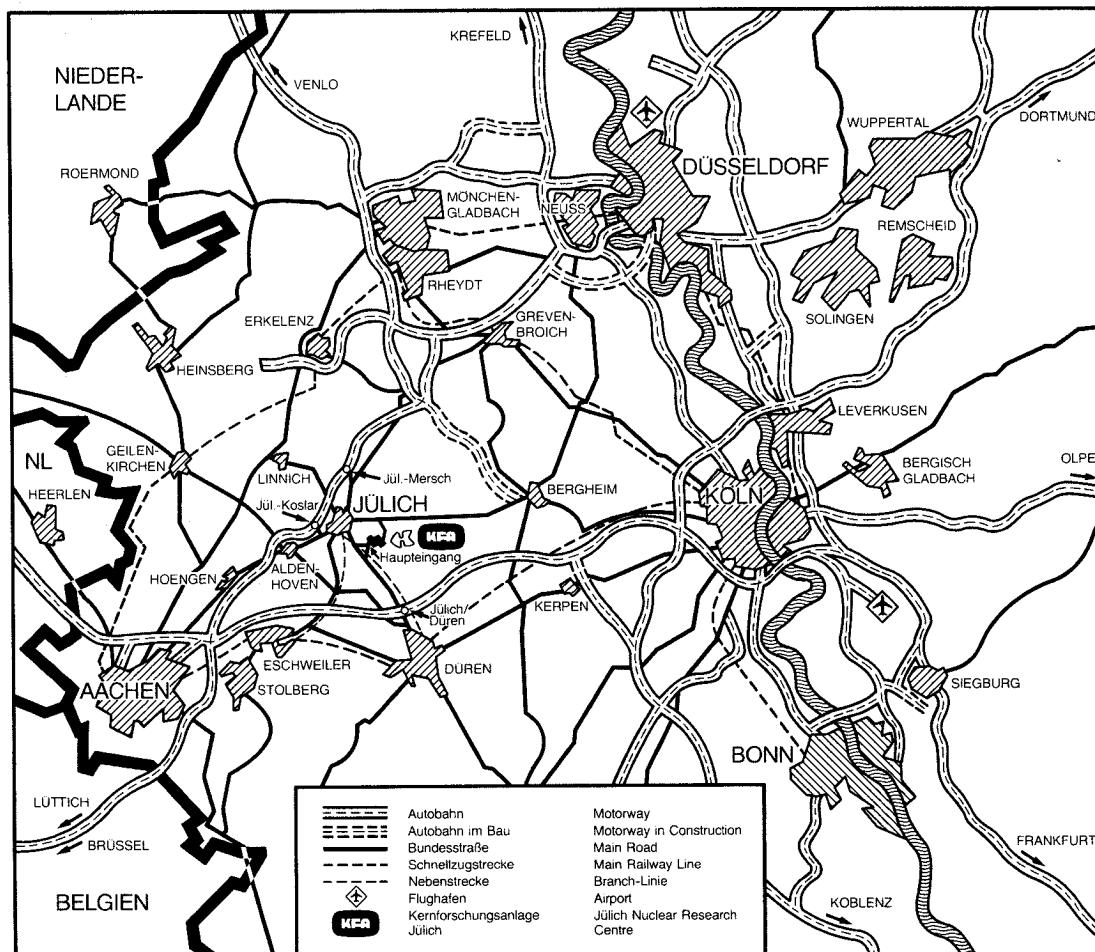
**Charakterisierung von Proteinen des
Vertebraten-Photorezeptors mit Hilfe
von monoklonalen Antikörpern**

von

R. Stierner

**Jül - 2034
Dezember 1985
ISSN 0366-0885**





Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2034

Institut für Neurobiologie Jül-2034

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

Charakterisierung von Proteinen des Vertebraten-Photorezeptors mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern

von

R. Stiemer

D 82 (Diss. T. H. Aachen)

Summary

Peripheral and soluble proteins of bovine rod outer segments were used as antigens for the production of hybridomas. Using radioimmunoassay light hybrid clones were selected with purified transducin (GBP) or protein preparations of cGMP dependent phosphodiesterase (PDE). The specificity of these hybrid clones was determined by radioimmunoassay and western-blotting technique. For these experiments culture supernatants, ascites or isolated in mAb's were used.

Three mAb's (γ_1 -class) showed specific reactions with PDE from bovine rod outer segments. One of these antibodies inhibited the enzyme activity of PDE (hydrolysis of cGMP) between 40 % and 50 %. Protein preparations of invertebrate photoreceptor cells (*Sepia officinalis*) did not react with these three PDE-specific mAb's.

Five mAb's (μ -class) crossreacted with several different peripheral and soluble proteins from bovine rod outer segments. These crossreactions were confirmed by several criterias.

- 1) Using enriched and purified protein preparations in the radioimmunoassay.

- 2) Using extracts of peripheral and soluble proteins in the "Western-Blotting-technique".

All proteins recognized by these mAb's interact with the photosensory membranes of bovine rod outer segments.

Seven mAb's were studied for their binding to native and SDS-denatured preparations of transducin (GBP)- and PDE-preparations using radioimmunoassay. Three different types of reactions were detected, and described.

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen und Definitionen	IV
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	7
2.1 Versuchstiere und Versuchsmaterial	7
2.1.1 Mäuse	7
2.1.2 Kaninchen	7
2.1.3 Tintenfische	7
2.1.4 Stäbchenaußensegmente von Rinderaugen	7
2.1.4.1 Extraktion der löslichen und peripheren Proteine	7
2.1.4.2 Gereinigte oder angereicherte Proteine	8
2.1.4.3 Denaturierung gereinigter oder angereicherter Proteine für Radioimmunoassays	8
2.2 Immunisierung	9
2.2.1 Mäuse	9
2.2.2 Kaninchen	9
2.3 Zellfusion	10
2.3.1 Myelomzelllinie	12
2.3.2 Fusion	12
2.3.3 Halten und Sichern von Hybridzellen	13
2.3.4 Klonierung von Hybridzelllinien	14
2.3.5 Einfrieren und Auftauen von Hybridzellen	16
2.3.6 Ascites-Produktion	16
2.4 Charakterisierung und Markierung von Nachweisreagenzien	17
2.4.1 Jodieren mit Chlormin T	21
2.4.2 Jodieren mit Enzymobeads	21
2.5 Radio-Immunoassay (RIA)	22
2.5.1 Direkter Radioimmunoassay	23
2.5.2 Indirekter Radioimmunoassay	25
2.5.3 Direkte und indirekte Radioimmunoassays mit Terasaki- Platten	26

-II-

2.6	Borsäurefällung und Gelfiltration für monoklonale IgM Antikörper	32
2.7	Ammonsulfatfällung und Ionenaustauscher-Chromatographie für monoklonale IgG Antikörper	33
2.8	Elektrophorese	34
2.8.1	Mikrozonenelektrophorese	34
2.8.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.9	Western-Blotting	39
2.9.1	Elektro-Transfer	39
2.9.2	Saugtransfer	40
2.9.3	Weiterverarbeitung der Westernblotts zur Identifizierung der Antikörperspezifität	40
2.10	Bestimmung der Proteinkonzentration	42
2.10.1	Photometrisch	42
2.10.2	Bradford-Assay	42
2.11	Monoklonale Kontrollantikörper	42
2.12	Chemikalien, Puffer und Lösungen	43
3.	Ergebnisse	44
3.1	Fusion I	45
3.1.1	Charakterisierung des Antigens	45
3.1.2	Immunisierung und Charakterisierung der Immunantwort	47
3.1.3	Ausbeute der Fusion I	49
3.1.4	Feinspezifität des mAK D-2-24-3 auf verschiedenen nativen und denaturierten Antigenen	53
3.1.5	Nachweis der Antikörperspezifität mit der "Western-Blotting-Technik"	57
3.2	Fusion II	57
3.2.1	Charakterisierung des Antigens	58
3.2.2	Immunisierung und Charakterisierung der Immunantwort	59
3.2.3	Ausbeute der Fusion II	60

3.2.4	Feinspezifität von mAK auf verschiedenen nativen und denaturierten Antigenen	62
3.2.5	Feinspezifität der isolierten mAK IgM-Antikörper auf verschiedenen isolierten nativen Proteinen	68
3.2.6	Charakterisierung der Antikörperspezifität mit der "Western-Blotting-Technik"	69
3.2.7	Ascites-Produktion, Reinigung und Charakterisierung der mAK im Radioimmunoassay	77
3.2.8	Inhibition der cGMP abhängigen Phosphodiesterase des Stäbchenaußensegment von Rinderaugen	81
4.	Diskussion	84
4.1	Kreuzreaktive monoklonale Antikörper	85
4.2	Feinspezifität der charakterisierten mAK auf nativen und SDS denaturierten Antigenen	88
4.3	Monospezifische monoklonale Antikörper	90
5.	Zusammenfassung	95
6.	Literatur	97

Abkürzungen und Definitionen

A	Aminopterin
Antigen	Der Begriff Antigen wird für solche Substanzen gebraucht, die mit dem spezifischen Teil (Fab-Region von Antikörpern reagieren.)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
c	Konzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cpm	gemessene Zerfälle pro Minute (counts per minute)
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fab-Teil eines Ig	Antigen bindender Teil eines Immunglobulinmoleküls
Fc-Teil eines Ig	nicht-antigen-bindender Teil des Immunglobulinmoleküls (crystallizable fragment)
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
GBP	GTP bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
H	Hypoxanthin
Ig	Immunglobulin
μ , γ	schwere Ketten von Immunglobulinen
IgG, IgM	Immunglobulinklassen
KD	Kilodalton
MIg	Maus Immunglobulin

mAK	monoklonaler Antikörper
MZE	Mikrozonenelektrophorese
NKS	Normales Kaninchen Serum
NMIg	Normales Maus Immunglobulin
NMS	Normales Maus Serum
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösungen (phosphate buffered saline)
PEG	Polyethylenglycol
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	Radioimmunoassay
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
T	Thymidin
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

1. Einleitung

Lebewesen verarbeiten extrazelluläre Reize, die chemischer oder physikalischer Natur sein können durch Zelloberflächenrezeptoren - "first messenger". Mindestens zwei verschiedene generelle Mechanismen liegen der Transduktion extrazellulärer Reize in intrazelluläre Prozesse zugrunde.

Beim einen Mechanismus führt die Verarbeitung des Reizes durch den Rezeptor zur Aktivierung einer Proteinkinase, die zur Weiterleitung des Reizes zelluläre Proteine an Serin, Threonin oder Tyrosinresten phosphorylieren kann, einschließlich - soweit bisher bekannt - des Rezeptors selbst. Ein gutes Beispiel hierfür ist der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktor (Carpenter and Cohen, 1979; Carpenter, 1984; Hunter, 1984).

Beim anderen Mechanismus erfährt der Rezeptor eine Konformationsänderung, die ein intrazelluläres peripher an die Plasmamembran gebundenes Enzym aktiviert oder inaktiviert. Dieses Protein reguliert ein weiteres Enzym, das seinerseits einen löslichen intrazellulären "second messenger" produziert oder hydrolysiert. Enzyme dieser Art sind beispielsweise die Adenylatzyklase, die ATP in cAMP umwandelt und die Phosphodiesterase, die cGMP hydrolysiert.

Dieser zweite Transduktionsmechanismus erfolgt bei einer Reihe von Hormonen und bei der Reizverarbeitung des visuellen Systems. Das Rezeptor-Protein des visuellen Systems ist Rhodopsin, das durch Photonen eine Konformationsänderung erfährt.

Diese Konformationsänderung wird über eine Reihe biochemischer Schritte in elektrische Impulse, die Sprache des Nervensystems, übersetzt. Bei den photosensorischen Zellen der Evertebraten

kommt es dabei zur Depolarisierung und bei den Vertebraten zur Hyperpolarisierung der Membran. Diese Aspekte sind von H. Stieve (1982) zusammenfassend dargestellt. Über die Natur des Transmitters, der bei Vertebraten zur Hyperpolarisierung des ganzen Rezeptors führt, gibt es widersprüchliche Meinungen. Elektrophysiologische und biochemische Experimente an Photorezeptoren von Vertebraten führten zu zwei verschiedenen Hypothesen über den Transduktionsmechanismus. Nach der einen Hypothese (Hagins, 1972; Yoshikami and Hagins, 1971) sind Ca^{2+} -Ionen der Transmitter, nach der anderen cGMP (Woodruff and Bownds, 1979).

Erst in jüngster Zeit ist durch patch-clamp Versuche nachgewiesen worden, daß wahrscheinlich cGMP der entscheidende Transmitter ist (Fesenko et al., 1985).

Als Einführung in die Morphologie des visuellen Systems der Vertebraten sei hier auf folgende Übersichtsartikel hingewiesen: Daemen (1973); Dratz and Hargrave (1983); Krebs and Kühn (1977); Litman et al., (1982); Mullen and Akhtar (1981); Papermaster and Dreyer (1974).

Einige der biochemischen Reaktionen, die durch einen Reiz in der photosensorischen Zelle ausgelöst werden, konnten identifiziert und weitgehend charakterisiert werden. Eine vollständige Charakterisierung aller beteiligten Komponenten, d.h. ihre Interaktionen und ihre Lokalisation in der photosensorischen Zelle, ist bisher noch nicht gelungen.

Komponenten, die an den Initialschritten beteiligt sind und als Enzymkaskade ineinander greifen, sind folgende:

- (1) Rhodopsin, ein integrales, glykosyliertes Membran-Protein (MG 41 KD) dient als Rezeptor-Protein des Reizes und erfährt durch Absorption eines Photons eine Konformationsänderung.
- (2) Diese Konformationsänderung ermöglicht die Bindung eines GDP/GTP austauschenden Proteins (Kühn, 1980), das gleichzeitig GTPase Aktivität besitzt und den Reiz verstärkt (Fung and Stryer, 1980). Dieses Protein wird Transducin oder GBP (GTP-bindendes Protein) genannt und besteht aus den drei Polypeptiden G_{α} (MG 37-40 KD), G_{β} (MG 35-37 KD) und G_{γ} (MG 6-10 KD) (Fung, Hurley and Stryer, 1981; Kühn, 1980).
- (3) Nach erfolgtem Nukleotid-Austausch bindet die α -Untereinheit in der GTP-Form den Inhibitor (γ -Untereinheit) der cGMP abhängige Phosphodiesterase (PDE), die Enzymaktivität der PDE (Hydrolyse von cGMP) verstärkt den Reiz nochmals. Die PDE besteht ebenfalls aus drei Polypeptiden. PDE α und β als Dublette (MG 88 KD und MG 84 KD) und γ (MG 14 KD). Diese Molekulargewichtsangaben können je nach Autor etwas differieren) Stein et al., 1983). Als Einführung bezüglich dieses Enzyms sei auf folgende Referenzen verwiesen: Knowles (1984); Kohnken et al. (1984); Liebman and Pugh (1979); Sitaramayya et al. (1977); Yamazaki et al. (1983); Yee and Liebman (1978).

In diese beschriebenen Initialschritte der Enzymkaskade (s. Abb. 1) greifen andere Proteine regulativ ein. So beispielsweise eine Kinase, die für eine lichtabhängige Phosphorylierung des Rhodopsins an insgesamt neun Serin- und Threoninresten verantwortlich ist (Kühn, 1978; Lee et al., 1981; Shichi and Somers, 1978; Wilden, 1981; Wilden and Kühn, 1982). Ein weiteres Protein ist das 48 KD, das an phosphoryliertes Rhodopsin bindet (Kühn et al., 1984).

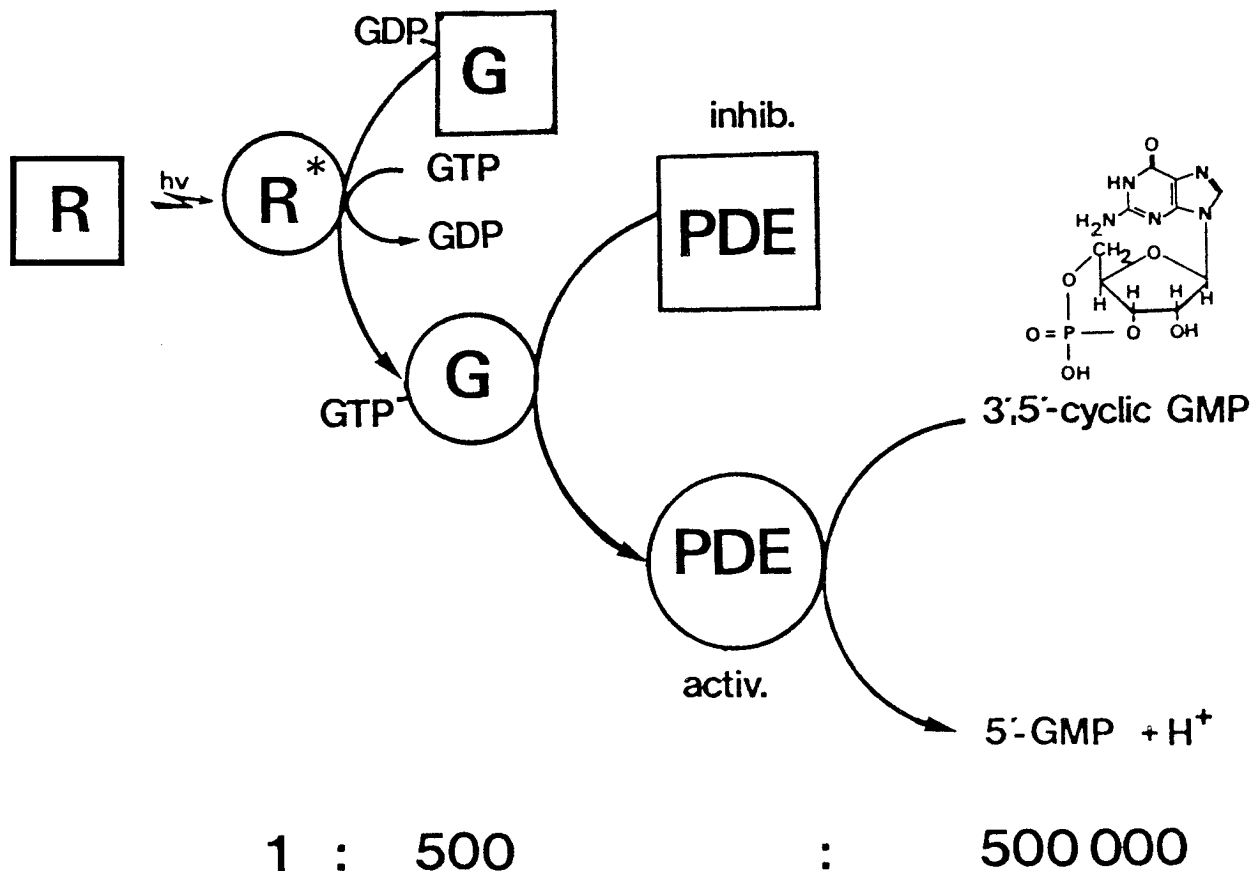


Abb. 1: Schema einiger der Reaktionen, die nach Anregung des Rhodopsins ($R \rightarrow R^*$) zur Hydrolyse des cGMP führen. G, GTP bindendes Protein, das aus den Untereinheiten G_α , G_β und G_γ besteht. PDE, Phosphodiesterase, die ebenfalls aus drei Untereinheiten PDE_α , PDE_β und PDE_γ besteht. (Mit freundlicher Genehmigung von H. Kühn).

Zur Charakterisierung der verschiedenen, obengenannten Komponenten, ihrer Struktur, Funktion und Lokalisation, sind Substanzen geeignet, die spezifisch an die untersuchten Proteine binden. Diese Eigenschaften besitzen Antikörper: Es handelt sich dabei um Proteine mit mindestens zwei Bindungsstellen, die hochspezifische Interaktionen mit anderen, auch als antigene Determinanten oder Epitope bezeichnete Strukturen eingehen können.

Zur Produktion von solchen Antikörpern können zwei verschiedene Strategien eingeschlagen werden. Bei der einen Strategie immunisiert man Versuchstiere, z.B. Kaninchen oder Mäuse mit einem möglichst reinen Antigen, im Idealfall einer einzelnen immunogenen Determinante. Trotz dieser hochspezifischen Immunisierung wird die Immunantwort des Tieres immer noch eine Vielzahl von verschiedenen Antikörpern beinhalten, da immer mehrere verschiedene Antikörperproduzierende B-Lymphozyten stimuliert werden. Es handelt sich hierbei um ein sogenanntes polyklonales Antiserum. Dieses polyklonale Antiserum wird immer mengenmäßig begrenzt sein und von Blutung zu Blutung verschiedene Qualität besitzen.

Die andere Strategie entwickelte sich folgerichtig aus der Ersten. Die polyklonale Immunantwort des Versuchstieres wird außerhalb des Tieres, im vorliegenden Fall der Maus, in vitro in ihre Komponenten zerlegt. Dazu wird aus der Milz einer immunisierten Maus eine Suspension hergestellt, und die einzelnen Milzzellen werden mit Tumorzellen fusioniert (Köhler and Milstein, 1975; Köhler et al., 1976; Köhler and Milstein, 1976). Die nach dieser Methode erhaltenen Zellen werden

Hybrdom- oder Hybridzellen genannt und können im Gegensatz zur einzelnen Milzzelle in vitro überleben. Die Hybridzellen können jeweils einen einzigen Antikörper produzieren, der spezifisch für eine antigene Determinante ist.

Nach Klonierung dieser Zellen werden die produzierten Antikörper als monoklonale Antikörper (mAK) bezeichnet. Die unbegrenzte Verfügbarkeit solcher mAK ist von ungeheurem Vorteil, jedoch ist die Produktion solcher mAK sehr arbeitsintensiv und zeitaufwendig. Zur Strategie und Anwendung solcher Produktionen sei auf folgende einführende Übersichtsartikel hingewiesen: Colombatti (1982); Edwards (1981); Eisenbarth (1981); Fazekas De St. Groth und Scheidegger (1980); Goding (1980); Milstein (1981); Yelton und Scharff (1981).

Ziel dieser Arbeit war es, monoklonale Antikörper spezifisch für die durch Licht aktivierbare cGMP abhängige Phosphodiesterase zu produzieren, die an den oben beschriebenen Initialschritten der Enzymkaskade beteiligt ist. Im Idealfall sollten Determinanten des Enzyms von diesen mAK erkannt werden, die eine funktionelle Bedeutung haben und nach neuesten Erkenntnissen wahrscheinlich an der Regulation des lichtabhängigen Natriumkanals beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Versuchsmaterial

2.1.1 Mäuse

Weibliche Mäuse des Inzuchtstammes BALB/c wurden von der zentralen Versuchstieranstalt Hannover gekauft und waren bei Versuchsbeginn mindestens sechs bis acht Wochen alt.

2.1.2 Kaninchen

Kaninchen der Rassen "Weißer Neuseeländer" und "Großer Riese" stammten aus der Lippischen Versuchstierzucht Hagemann, Extertal.

2.1.3 Tintenfische

Die Tintenfische gehörten zur Art *Sepia officinalis*. Präparationen peripherer und löslicher Proteine wurden mir freundlicherweise von E. André zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Stäbchenaußensegmente des Rindes (ROS = Rod outer Segment)

Die Verarbeitung der Rinderaugen und Präparation der Stäbchenaußensegmente erfolgte wie von U. Wilden ausführlich beschrieben (Wilden, 1981).

2.1.4.1 Extraktion der löslichen und peripheren Proteine

Zur Extraktion der löslichen und peripheren Proteine wurden sedimentierte ROS in möglichst wenig Puffer (5 mM Hepes, pH 7,2) resuspendiert und mit einem Teflonstempel in einem Homogenisator zerkleinert. Nach Inkubation der resuspendierten ROS

für 30 Minuten auf Eis wurde die Suspension zentrifugiert (5000 x g Ja 21 Rotor der Firma Beckman). Nach einer zweiten Zentrifugation des Überstandes wurde im Überstand die Proteinkonzentration bestimmt, bevor die Proteinlösung bei -70°C gelagert oder für weitere Experimente eingesetzt wurde.

2.1.4.2 Gereinigte oder angereicherte Proteine

Alle gereinigten oder angereicherten Proteine wurden freundlicherweise von H. Kühn und U. Wilden (INB) zur Verfügung gestellt. Bei den jeweils eingesetzten Mengen handelt es sich um Konzentrations-Abschätzungen.

2.1.4.3 Denaturierung gereinigter oder angereicherter Proteine für Radioimmunoassays

Die gereinigten oder angereicherten Proteine wurden in PBS-Natriumazid verdünnt. Diese Lösung enthielt zusätzlich 0,1 % SDS und wurde für die Denaturierung mindestens 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die denaturierten Proteine wie die nativen Proteine im Radioimmunoassay weiter verarbeitet.

2.2 Immunisierung

2.2.1 Mäuse

Die verwendeten Antigene wurden vor der Immunisierung mit "Complete Freund's Adjuvant" (Cappel Laboratories) im Volumenverhältnis 1 : 1 gründlich gemischt und den Mäusen intraperitoneal injiziert. Bei den weiteren Immunisierungen wurde das Antigen mit "Freund's incomplete Adjuvant" (Sigma, Heidelberg) ebenfalls im Volumenverhältnis 1 : 1 gründlich gemischt und im Abstand von jeweils 14 Tagen ebenfalls intraperitoneal injiziert.

Einen Tag vor einer Fusion wurden die Mäuse mit Äther narkotisiert und Blut aus dem Flexus retroorbitales entnommen. Dies kann wiederholt geschehen, ohne das Auge zu schädigen. Dabei kann bis zu 1 ml Blut (einmalig) gewonnen werden, das nach Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge bei 8000 x g ca. 300 µl Serum ergibt. Präimmunserum (NMS) wurde auf die gleiche Weise gewonnen. Die verschiedenen Seren wurden dann bis zu weiteren Untersuchungen bei -70° C eingelagert.

2.2.2 Kaninchen

Das bei Mäusen durchgeführte zeitliche Immunisierungsschema wurde ebenfalls bei Kaninchen angewendet. Die Antigen-Präparationen wurden wie bei den Mäusen mit "Freund's Adjuvant" vorbereitet, dann jedoch intramuskulär in die beiden Hinterläufe injiziert. Blut wurde den Kaninchen jeweils am 7., 11. und 14. Tag nach der letzten Immunisierung aus der Ohrvene entnommen. Serum und zelluläre Bestandteile wurden ebenfalls durch Zentrifugation bei 8000 x g voneinander getrennt.

Präimmunserum (NMS) wurde auf die gleiche Weise gewonnen. Die Seren wurden dann ebenfalls bis zu weiteren Untersuchungen bei -70°C gelagert.

2.3 Zellfusion

Hybridzellen, deren sekretierte Antikörper in dieser Arbeit näher charakterisiert wurden, sind durch die Polyäthylenglykoll-Fusionstechnik produziert worden (Galfre et al., 1977; Hämmerling, 1977). Die Zusammensetzung der benötigten Medien und Reagienzien sind im Folgenden aufgeführt.

Grundmedium

RPMI 1640 (Moore et al., 1967) wurde entweder von Seromed oder von Flow Laboratories in flüssiger Form bezogen und entsprechend den folgenden Rezepten modifiziert.

Kulturmedium

1000 Ml RPMI 1640

+ 10 % Fötales Kälberserum (FCS) (Boehringer Mannheim)

+ Glutamin, 2×10^{-3} M (Seromed, München)

+ Penicillin 100 I.U./ml (Seromed, München)

+ Steptomycin 100 mg/ml (Seromed, München)

+ β -2-Mercaptoethanol 2×10^{-5} M (Serva, Heidelberg)

Im Klonierungsmedium war die doppelte Menge FCS enthalten.

Stammlösungen

Die Stammlösungen für das Selektionsmedium waren 100 x konzentriert (Littlefield, 1964).

A: Aminopterin (Sigma, Heidelberg) 3,83 mg/200 ml H₂O bidest

HT: Hypoxanthin (Sigma, Heidelberg) 272,2 mg und Thymidin (Sigma, Heidelberg) 77,65 mg zusammen pro 200 ml H₂O bidest.

Um Hypoxanthin zu lösen sollte der pH mit NaOH auf 8,1 bis 8,5 eingestellt werden. Die genannten Stammlösungen können inzwischen als Konzentrat käuflich erworben werden (Boehringer, Mannheim).

Selektionsmedium, vollständig (HAT)

1000 ml Kulturmedium
+ 10 ml A
+ 10 ml HT

Selektionsmedium, unvollständig (HT)

1000 ml Kulturmedium
+ 10 ml HT

Fusionsmedium

20 g PEG 4000 (Roth, Karlsruhe) in 100 ml Flasche für 20 min. autoklavieren. Das PEG muß flüssig werden. 28 ml steriles Grundmedium, das 15 % DMSO enthält hinzufügen und anschließend bei -20° C bis zum Gebrauch aufbewahren.

Einfriermedium

RPMI 1640 Medium
+ 40 % FCS
+ 10 % DMSO

2.3.1 Myelomzelllinie

Als Fusionspartner der Mausmilzzellen wurde die 5-Azaguanin-resistente Myelomzelllinie P3 X63 Ag 8-653 verwendet.

Diese Myelomzelllinie wurde ursprünglich von C. Milstein (Cambridge, UK) etabliert und später die oben genannte Variante im Labor von K. Rajewsky mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierers isoliert (Kearney et al. 1979). P3 X63 Ag 8-653 Zellen produzieren weder schwere noch leichte Ketten des MOPC 21 Proteins. Hybride dieser Myelomlinie mit Mauslymphozyten bilden und sekretieren daher den monoklonalen Lymphozyten-Antikörper frei von jeder Kontamination mit MOPC 21 Ketten. Gehalten wurden die Myelomzellen im oben beschriebenen Kulturmedium. Die konstanten Inkubatorbedingungen waren 37⁰ C und 10 % CO₂ - 95 % Luftfeuchtigkeit. (CO₂-Inkubator T304 der Firma ASSAB, Hannover).

2.3.2 Fusion

Die Fusion gliederte sich in folgende Arbeitsschritte, die alle unter sterilen Bedingungen ausgeführt wurden.

1) Einen Tag vor der Fusion wurden einer nicht immunisierten Maus Peritonealmakrophagen durch Spülung des Peritoneums mit komplettem Selektions-Medium entnommen. Anschließend wurde dieser Maus ebenfalls die Milz entnommen, die zu einer Einzelzellsuspension homogenisiert wurde.

Peritonealmakrophagen und Milzzellen wurden vermischt und 2 x mit komplettem Selektions-Medium gewaschen. 1 x 10⁵ Zellen dieser Zellsuspension wurden zusammen mit 1,5 ml komplettem Selektions-Medium pro Loch einer 24 Loch Costarplatte verteilt.

Auf diese Weise wurden 480 Kulturgefäße vorbereitet und bis zum nächsten Tag vorinkubiert. Diese sogenannten Feederzellen sind nicht PEG geschädigt und haben einen wachstumsfördernden Einfluß auf die neu gebildeten Hybridzellen.

2) Der auf Immunantwort vorgetesteten Maus wurde die Milz entnommen und zu einer Einzelzellsuspension homogenisiert. Diese Zellsuspension wurde in einem konischen 50 ml Röhrchen auf Eis gelagert und die Zellzahl im Hämacytometer unter dem Mikroskop bestimmt. Die dabei festgestellte Zellzahl wurde zusammen mit der gleichen Anzahl Myelomzellen abzentrifugiert, der Niederschlag durch Schütteln gelockert und mit 1 ml des auf 37° C vorgewärmten Fusionsmediums vermischt. Nach einer Minute wurde das PEG im Fusionsmedium langsam durch tropfenweise Zugabe des Kulturmediums verdünnt (nach Möglichkeit 10 ml in 10 Minuten, weitere 20 ml wiederum in 10 Minuten). Diese Zellsuspension wurde daraufhin erneut abzentrifugiert und vorsichtig mit komplettem Selektionsmedium auf eine Endkonzentration von 2×10^6 Zellen pro ml verdünnt. 200 µl dieser Zellsuspension wurden dann pro vorbereitetes Kulturgefäß verteilt und für 10 Tage bei 37° C in einer mit Feuchtigkeit gesättigten 10 %igen CO₂ Atmosphäre gehalten.

2.3.3 Halten und Sichern von Hybridzellen

Nach 10 Tagen Verbleib im Brutschrank konnten bei erfolgreichen Fusionen, die ersten wachsenden Zellkolonien beobachtet werden. Die Kulturen wurden daraufhin zum erstenmal gefüttert, indem ein Teil des alten Mediums durch frisches komplettes Selektionsmedium ausgetauscht wurde. Wachsende Hybridzellen sollten vor einem Test ihrer Kulturüberstände

mindestens zweimal im Abstand von vier Tagen gefüttert werden. Dies ist notwendig, da auch nicht fusionierte Lymphozyten für ein bis zwei Wochen in den Kulturen überleben und Antikörper sekretieren können. Diese sekretierten Antikörper können den Nachweistest für die Hybridzellantikörper stören, wenn sie nicht mit dem alten Medium entfernt werden. Kulturen, deren Überstände antigen-spezifische Antikörper enthielten, wurden solange kultiviert, bis ein dichter Zellrasen entstanden war und Zellen eingefroren werden konnten. Während dieser Kultivierung wurde das komplette Selektionsmedium nach und nach durch das inkomplette Selektionsmedium ausgetauscht und später ganz durch Kulturmedium ersetzt.

2.3.4 Klonierung von Hybridzelllinien

Im Radio-Immunoassay als positiv identifizierte, d.h. antigen-spezifische Antikörper produzierende Hybridomkulturen, die aus einem dichten Zellrasen bestanden, wurden sofort kloniert. Hierzu wurden Zellen der Kultur entnommen und zunächst auf ihre Lebensfähigkeit überprüft. Die einfachste Möglichkeit war das Begutachten der Kulturen unter dem Mikroskop. Lebende Lymphozyten erschienen dabei transparent und die Plasmamembran zeigte keine Ausfransungen, woran sich degenerierte Lymphozyten erkennen lassen. Rein morphologische Veränderungen zeigten, wenn auch subjektiv häufiger, Zelltod an, als eine Färbung mit Trypanblau. Sie beruht auf der Durchlässigkeit von toten Zellen für den Farbstoff Trypanblau. Dabei wird von einer 2 %igen Stammlösung ein Teil Färbelösung mit vier Teilen Zellsuspension gemischt. Schon nach ein bis zwei Minuten ist eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich.

Weitere Methoden, die auch eine größere Genauigkeit bieten, sind im "Handbook of Experimental Immunology" (D.M. Weir) beschrieben.

Trypanblau-Stammlösung (Rezept für 100 ml)

K_2HPO_4 0,06 g

Trypanblau 0,40 g

NaCl 0,81 g

+ ca. 1 ml 1 n NaOH

in 95 ml H_2O kochen und filtrieren.

Stammlösung ist bei Zimmertemperatur haltbar.

Die zur Klonierung verwendete Zellkultur wurde soweit verdünnt, daß 20 ml Klonierungsmedium schließlich 100, 500 oder 1000 Zellen enthielten, da die Klonierungseffizienz des Hybridoms nicht bekannt war. Der jeweiligen Zellverdünnung wurden 10^6 Milzzellen oder 10^4 bis 10^5 peritoneale Makrophagen einer nicht immunisierten Maus zur Wachstumsförderung hinzugegeben und die Zellsuspension gleichmäßig auf 96 Kulturgefäße einer Costar-Mikrotiterplatte aus Polysterol verteilt. Zellkolonien konnten nach zwei bis drei Wochen mikroskopisch beobachtet werden. Wenn in nicht mehr als 37 % der Kulturgefäße Zellwachstum des entsprechenden Hybridoms beobachtet wurde, konnten diese Hybridome mit hoher Wahrscheinlichkeit als Klone betrachtet werden. Andernfalls muß die Klonierung wiederholt werden. In jedem Fall sollte eine Klonierung eines Hybridoms durch "limiting dilution" in Mikrotiterplatten durchgeführt werden. In der Regel wurden Klone weiterkultiviert, die aus einer mit 100 Hybridomzellen beschickten Costar-Mikrotiterplatte stammten.

2.3.5 Einfrieren und Auftauen von Hybridzellen

Zellen werden am besten in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfrieren:

Zellsuspensionen wurden in sterilen konischen 10 ml Röhrchen bei 200 x g zentrifugiert und der Niederschlag mit wenigen ml eiskalten Einfriermediums resuspendiert. Diese Suspension wurde in Aliquots von einem ml abgefüllt und zum langsamen Einfrieren in einer Kühltruhe bei -70°C mindestens einen Tag aufbewahrt und dann zur endgültigen Lagerung in Flüssigstickstoff überführt.

Auftauen:

Der Vorgang des Auftauens sollte möglichst rasch vonstatten gehen, damit eine Schädigung der Zellen durch extensive Umkristallisationen im Temperaturbereich von -20°C bis 0°C vermieden wird. Die gewünschte Ampulle wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nach dem Flüssigwerden des Ampulleninhaltes wird dieser sofort in Kulturmedium aufgenommen und die Zellsuspension bei 200 x g für 5 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wird in Kulturmedium resuspendiert und entsprechend der Zellzahl mit einigen Feederzellen in Kultur genommen.

2.3.6 Ascites-Produktion

Sobald von einem klonierten Hybridom genügend Zellen vorhanden und durch Einfrieren ebenfalls gesichert waren, wurden diese Hybridomzellen BALB/c Mäusen intraperitoneal (i.p.) injiziert, ca. 10^6 Zellen pro Maus. Den Mäusen war jedoch 3 bis 50 Tage vorher 0,5 ml Pristan (Roth, Karlsruhe) intraperitoneal injiziert worden, um das Wachstum eines soliden Tumors zu verhindern. Die Hybridzellen wuchsen dann für 14 bis 28 Tage als

Ascitestumor in der Maus, deren Peritoneum stark anschwell. Die Ascitesflüssigkeit wurde der Maus mehrfach im Abstand von zwei bis drei Tagen durch Punktion mit einer sterilen ein mm-Nadel entnommen, die Tumorzellen bei 200 x g abzentrifugiert und wie oben beschrieben eingefroren. Die Ascitesflüssigkeit wurde bei -20° C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

2.4 Charakterisierung und Markierung von Nachweisreagenzien

Die antigen-spezifische Bindung von Antikörpern wurde mit gereinigten anti-Maus-Ig-Antikörpern (Abt. Immunbiologie, Prof. K. Rajewsky) bzw. Protein A (Sigma, Heidelberg) nachgewiesen.

Schaf-anti-MIg ist ein konventionelles Antiserum, das - soweit getestet - alle Antikörperklassen der Maus erkennt und nach Immunisierung mit gereinigtem Maus-Immunglobulin gewonnen wurde.

Ziege-anti- μ dagegen ist ein absolut monospezifisches konventionelles Antiserum, das nur die schwere Kette der μ -Antikörper erkennt. In beiden Fällen lagen affinitätschromatographisch gereinigte Immunglobulinfraktionen vor.

Protein A stammt vom Bakterium Staphylococcus aureus. Es bindet besonders gut an Kaninchen-Immunglobuline und an die Maus-Antikörperklassen γ_3 , γ_{2a} und γ_{2b} .

Diese Nachweisreagenzien wurden mit radioaktivem ^{125}Jod der Firmen Amersham Buchler, Braunschweig oder NEN, Frankfurt gekoppelt. Das ^{125}Jod lag als Na^{125}J in verdünnter NaOH (pH 7 - 11) vor. Die Jodierung mußte unter einem Abzug durch-

geführt werden, da bei der Reaktion freies Jod entsteht. Die Jodierung wurde mit den unter 2.4.1 und 2.4.2 beschriebenen Methoden durchgeführt. Die Abtrennung des nicht gekoppelten Na^{125}J erfolgte bei beiden Methoden mit dem Ionenaustauscher Dowex 1 x 8 (p.A., dry mesh 200 bis 400, Chlorid-Form; Serva, Heidelberg).

Dazu wurde der Ionenaustauscher in einer 3 %igen Rinderserumalbuminlösung oder einer 1 %igen Gelatinelösung in PBS-Natriumazid aufgenommen und entgast. Von dieser Suspension wurde eine zwei ml Säule in einer Spritze gegossen und mit dem 10fachen Säulenvolumen PBS-Natriumazid gewaschen.

Im Laufe der Arbeit wurde bekannt, daß die durch Licht aktivierbare cGMP abhängige Phosphodiesterase, GBP und Guanylat Zykase Interaktionen mit BSA eingehen (Buzdygon and Liebman, 1981a, b; White and Karr, 1980).

Diese Arbeiten führten zu einem Austausch des zur Absättigung üblicherweise verwendeten Reagenz BSA gegen 1 %ige Gelatine-Lösung.

Der Stempel der Spritze wurde benutzt, um nach Auftragen der radioaktiven Probe und nach dem Spülen der Säule mit PBS-Natriumazid die gesamte Flüssigkeit unter leichtem Druck aus der Säule zu pressen. Nach diesem Trennungsschritt wurde eine 100 %ige Rückgewinnung des Proteins vorausgesetzt und keine erneute Proteinbestimmung durchgeführt. Um das Verhältnis an proteingebundenem und an freiem ^{125}J des Reaktionsgemisches zu bestimmen, wurde das Protein mit Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt (Boime et al., 1971). Einer 10 μl Probe des Re-

aktionsgemisches wurden 200 µl einer 3 %igen PBS-Natriumazid BSA-Lösung hinzugegeben, und die Proteine durch 50 µl einer 25 %igen TCA-Lösung ausgefällt. Das Präzipitat wurde fünf Minuten mit der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und die Radioaktivität im Sediment und im Überstand in einem γ -Zähler bestimmt. Während bei den beiden Antiseren Schaf-anti-MIg und Ziege-anti- μ nach der Ionenaustauschersäule in der Regel etwa 95 % der eingesetzten cpm TCA fällbar waren, ist dies für Protein A nur selten der Fall gewesen.

In Tabelle 1 sind die für die Anwendung wichtigen bestimmbar Parameter exemplarisch aufgelistet. Die markierten Nachweisreagenzien wurden entweder bei 4° C im Kühlschrank oder portionsweise bei -20° C eingefroren aufbewahrt und nach Möglichkeit nicht länger als 8 Wochen nach der Jodierung verwendet.

Tabelle 1: Für die Anwendung von ^{125}J -markierten Nachweisreagenzien wichtige Parameter

	Schaf-anti-MIg	Ziege-anti- μ	Protein A
1) Volumen nach Ionenaustauschersäule	3000 μl	2800 μl	3000 μl
2) Total cpm/ μl	306600	228300	349600
3) TCA cpm/ μl	304600	222530	340650
4) TCA cpm/ μl pro total cpm/ μl	99 %	97 %	98 %
5) eingesetzte Proteinmenge	50 μg	50 μg	50 μg
6) spezifische Aktivität cpm/ μl Protein	$1,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$

2.4.1 Jodieren mit Chloramin T

(Hunter and Greenwood, 1962)

Zu 50 μ l (1 mg/ml) einer Proteinlösung ohne Natriumazid wurde 100 μ l Phosphat-Puffer (0,5 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,2) und 1 mCi (in 10 μ l) Na^{125}J gegeben und die Jodierungsreaktion durch Zugabe von 20 μ l Chloramin-T-Lösung (10 mg/ml in 0,5 Na-Phosphatpuffer, pH 7,2) gestartet. Nach zwei Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μ l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (30 mg/ml in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,2) gestoppt und die Lösung auf die vorbereitete Ionenaustauschersäule (Dowex 1 x 8) gegeben.

Unter leichtem Druck wurde diese Lösung durch die Ionenaustauschersäule gepreßt und dieser Vorgang 2 x mit je 1 ml PBS wiederholt. Zu dem Eluat wurde 1 ml 3 %ige BSA oder 1 %ige Gelatine-Lösung gegeben.

2.4.2 Jodieren mit Enzymobeads

(Bio-Rad Produktinformation, 1978)

Zu 50 μ l (1 mg/ml) Proteinlösung ohne Natriumazid wurde 50 μ l Phosphatpuffer (0,2 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,5), 25 μ l = 0,5 μ g Enzymobeads-Reagenz, 1 mCi Na^{125}J (in 10 μ l) und 25 μ l Glukose-Lösung (1 % β -D-Glukose in H_2O) gegeben, gemischt und nach 30 bis 45 Minuten die Reaktion durch Auftragen des Reaktionsgemisches auf eine vorbereitete Ionenaustauschersäule (Dowex 1 x 8) beendet. Die Weiterbehandlung erfolgte wie unter 2.4.1 beschrieben.

2.5 Radio-Immunoassay (RIA)

Der Nachweis antigen-spezifischer Antikörper im Serum von Kaninchen und Mäusen bzw. im Kulturüberstand von wachsenden Hybridzellen erfolgte mit dem Radioimmunoassay. Dafür wurden die unter 2.5.1 und 2.5.2 näher beschriebenen RIA Methoden verwendet. Als einführende Übersichtsartikel sei auf folgende Referenzen verwiesen (Hunter, 1982; Shelly et al., 1973).

In Radioimmunoassay können Antikörper bis zu einer Konzentration von 10 bis 100 ng/ml nachgewiesen werden. Diese große Empfindlichkeit zusammen mit seiner Leichtigkeit und Schnelligkeit machen den RIA (oder ähnliche Systeme) zur idealen Testmethode für die Erkennung gewünschter Antikörper in einer großen Anzahl von Kulturüberständen. Ein gewisses Problem stellt nur die Spezifität des Testes dar, die von folgenden Faktoren abhängig ist.

1) Bei jeder Fusion gibt es Überstände, die sog. "klebrige" Antikörper enthalten. Diese Antikörper sind meistens IgM-Antikörper und binden an die Antigen beschichtete und abgesättigte Plastikoberfläche auf unbekannte und unspezifische Weise. Unspezifische Antikörper können jedoch meistens von den spezifischen Antikörpern unterschieden werden, da sie ebenfalls mit einer BSA- oder Gelatine-beschichteten Kontrollplatte, die parallel zur Antigen beschichteten Platte angelegt wird, reagieren.

2) Eine wesentliche Rolle spielt die Reinheit des Antigens, da bereits geringste "Verunreinigungen" des verwendeten Antigens zu einer spezifischen Reaktion führen können. Wenn man diese "Verunreinigungen" durch geeignete Methoden reinigt oder zumindest anreichert, können Reaktionen, die zuvor nur zwei bis dreimal über dem "background" lagen, unter Umständen später zu starken Nachweisreaktionen führen. Unter "background" versteht man die unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien an Antigenbeschichtete Platten bzw. die Bindung von Antikörper und Nachweisreagenz an antigenfreie jedoch abgesättigte Platten.

2.5.1 Direkter Radioimmunoassay

Flexible Polyvinylchlorid-Plastikplatten (PVC) (Dynatech, Denkendorf) wurden mit jeweils 50 µl Antigenlösung oder nur Verdünnungs-Mittel pro Loch entweder bei 37° C für 1 Stunde oder bei 4° C über Nacht in einer feuchten Kammer oder mit Parafilm abgedeckt, inkubiert.

Hierbei heften sich die Proteine durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen an das Plastikmaterial. Nach Verwerfen der Lösung und einmaligem Waschen erfolgte eine Absättigung überzähliger Plastikhaftstellen durch Inkubation mit 1 %iger BSA-Lösung oder 1 %iger Gelatine-Lösung (250 µl pro Loch) für mindestens 1 Stunde bei 37° C. Erneutes Waschen vervollständigte die Bereitstellung von Antigen beschichteten Polyvinylplatten für den Nachweis von antikörperhaltigen Lösungen. Diese Platten konnten so zumindest für einige Tage bei 4° C in einer feuchten Kammer aufbewahrt werden.

Eine Verbesserung des Radioimmunoassay konnte durch die Verwendung von Polystyrolplatten erreicht werden, die auch unter der Bezeichnung Terasaki-Platten bekannt sind. Vorteile dieser Platten gegenüber den PVC-Platten waren geringere Mengen benötigten Antigens, gesteigerte Sensitivität durch Verwendung einer indirekten Nachweismethode (s. 2.5.2) und ein niedriger "background". Nachteile zeigten diese Platten nur bei Ascites-Titrationsen, da auf Grund der hohen Antikörperkonzentration Kontaminationen benachbarter Löcher bei den Waschgängen auftreten können.

Die Herstellung antigenbeschichteter Terasaki-Platten erfolgte anders als bei PVC-Platten. Jeweils 20 µl Antigen-Lösung oder nur Verdünnungsmittel zu Kontrollzwecken wurden pro Loch pipettiert und über Nacht bei 37° C eintrocknen lassen. Danach erfolgte eine Inkubation der Platte mit 15 ml einer 1 %igen Gelatine-Lösung bei 37° C für drei Stunden. Nach gründlichem Abschlagen konnte die Platte direkt für RIA's eingesetzt oder bei -70° C unbegrenzt gelagert werden.

Als Waschflüssigkeit, Antigenverdünnungsmittel und Lösungsmittel der zur Absättigung verwendeten 1 %igen Rinderserumalbumin- bzw. 1 %igen Gelatine-Lösung diente PBS (pH 7,2), die 0,02 % Natriumazid enthielt.

Bei direkter Verwendung der PVC- bzw. Terasaki-Platten wurden die Platten wie folgt weiterbehandelt:

- Die Platten wurden in Doppelwerten mit 50 µl bzw. 20 µl pro Loch eines entsprechenden Zellkulturüberstandes oder Antikörperverdünnung beschichtet und für mindestens eine Stunde bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen.

- Der Nachweis antigen-spezifischer Bindung wurde dann mit den ^{125}Jod -markierten Nachweisreagenzien Ziege-anti- μ , Schaf-anti-MIg bzw. Protein A durchgeführt, deren Konzentrationen in einem Modellsystem gerade noch sättigende Signale ergaben. Das konzentrierte radioaktiv markierte Nachweisreagenz wurde in 1 %iger Rinderserumalbumin-Lösung oder 1 %iger Gelatine-Lösung verdünnt und die Platten mit 50 μl bzw. 20 μl pro Loch beschichtet. Nach erneuter Inkubation für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur folgte ein viermaliges Waschen, dann das Trocknen und Zerschneiden der Platten. Das Zerschneiden der Polystyrolplatten wurde mit Hilfe einer heißen Säge durchgeführt. Die gebundene Aktivität pro Loch wurde entweder direkt in einem γ -Zähler bestimmt oder durch Zugabe von Szintillationsflüssigkeit (z.B. Instagel der Firma Packard) in einem Szintillationszähler gemessen.

2.5.2 Indirekter Radioimmunoassay

Im Gegensatz zum direkten Radioimmunoassay wurden beim indirekten RIA die Platten mit einem Kaninchen-anti-Maus Ig Antiserum ebenfalls für eine Stunde zusätzlich inkubiert. Dieser Zwischenschritt führte zu einer Sensitivitätssteigerung des Testes.

Die verwendete Antiserumverdünnung war vorher für ein optimales Verhältnis von unspezifischer zu spezifischer Bindung bestimmt worden (s. 2.5.3). Der Nachweis einer antigen-spezifischen Bindung eines produzierten Antikörpers wurde im indirekten RIA mit ^{125}Jod -markiertem Protein A durchgeführt.

Das verwendete konventionelle Kaninchen-anti-Maus Ig Antiserum ist ebenfalls wie Schaf-anti-Maus Ig Antiserum spezifisch für alle Maus Antikörperklassen. Die Bindung an Maus Ig kann mit ^{125}J -markiertem Protein A nachgewiesen werden. Ausgangsmaterial für die Immunisierung eines Kaninchens war gekauftes, affinitätschromatographisch gereinigtes normales Maus Ig (NMIg; Cappel, USA), das aus allen Maus-Antikörperklassen bestand. Die Immunisierungen und Blutungen des Kaninchens wurden nach der unter 2.2.2 beschriebenen Methode vorgenommen. Eine der produzierten Serumchargen wurde in allen indirekten Radioimmunoassays verwendet.

2.5.3 Direkte und indirekte Radioimmunoassays mit Terasaki-Platten

Beim Einsatz von PVC-Platten mit den verwendeten Antigenen traten häufig hohe, unspezifische Bindungsreaktionen auf. Es wurde daher nach Testsystemen gesucht, mit denen dieses Problem beseitigt werden konnte. Gleichzeitig sollten die begrenzten und einzusetzenden Antigenmengen gesenkt werden. Ein modifizierter Radioimmunoassay auf Terasaki-Platten aus Polystyrol beseitigte beide Probleme. Für diesen RIA mußten Parameter ermittelt werden, die einen optimalen Einsatz der Nachweisreagenzien und des Antigens gewährleisteten.

1) Die eingesetzte Menge an markiertem Nachweisreagenz sollte im Sättigungsbereich liegen. Getestet wurde dies unter Verwendung eines Modellsystems, in dem als Antigen NMIg verwendet wurde. Die Sättigung des Modellsystems ist von der Güte der jeweiligen Markierung der Nachweisreagenzien mit ^{125}J abhängig und kann exemplarisch für markiertes Schaf-anti-MIg und Ziegen-anti-MIg in Abb. 2 abgelesen werden.

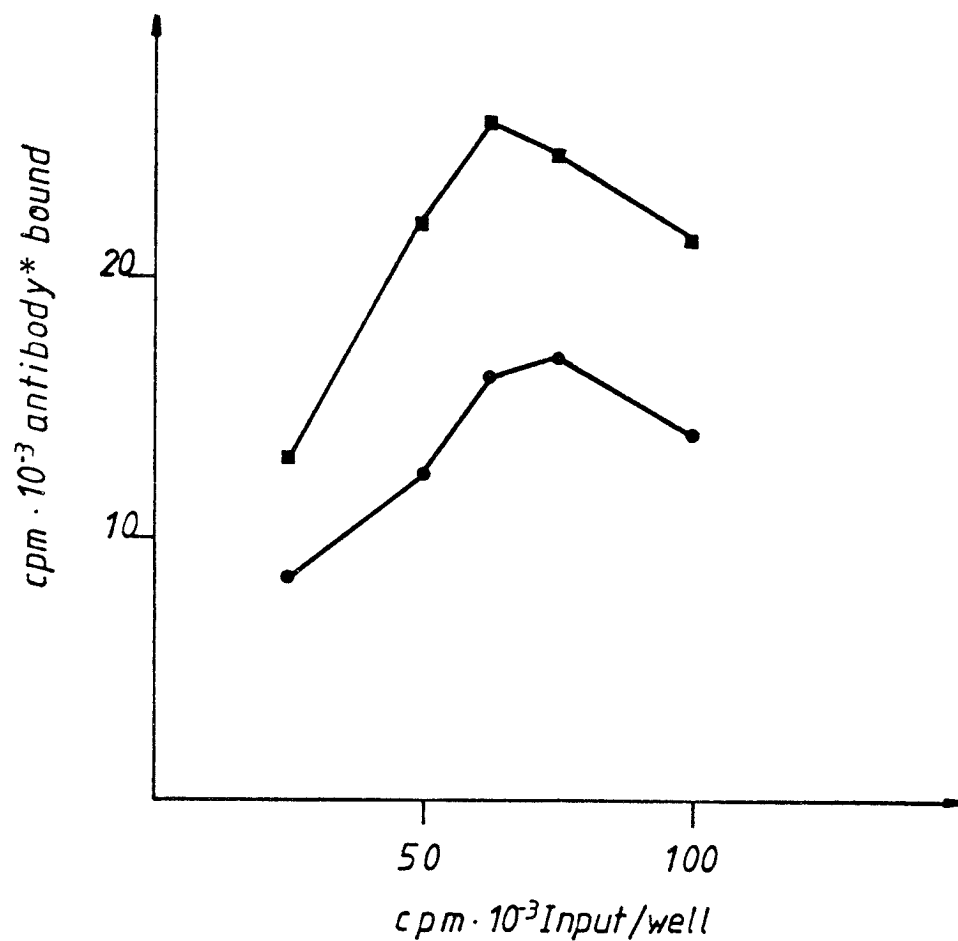


Abb. 2: Direkter Radioimmunoassay auf Terasaki-Platten zur Ermittlung des Sättigungsbereiches der verwendeten Nachweisreagenzien (■) Schaf-anti-MIg und (●) Ziege-anti-μ. Antigen war NMiG (10 μg/ml) in PBS-Natriumazid und PBS-Natriumazid alleine. Die Mittelwerte der unspezifischen Bindungsreaktionen wurden von den Mittelwerten der spezifischen Bindungsreaktionen abgezogen.

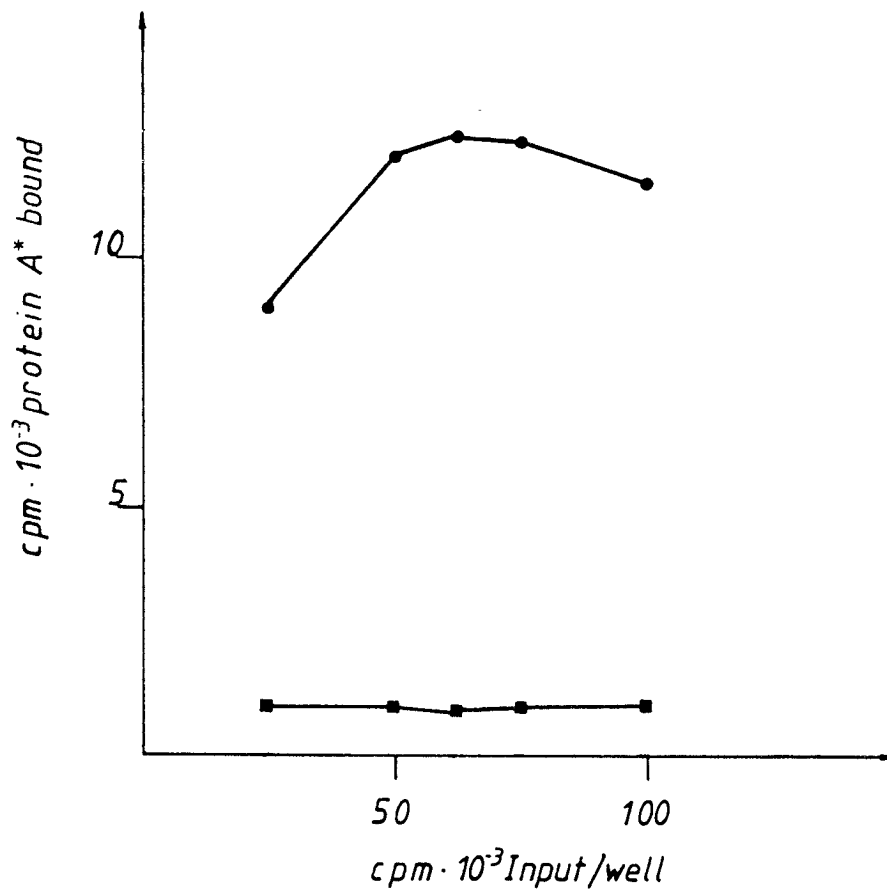


Abb. 3: Radioimmunoassay auf Terasaki-Platten zur Ermittlung des Sättigungsbereiches von markiertem Protein A mit (●) und ohne (■) Kaninchen-anti-Maus Ig (8×10^{-2} verdünnt) als Zwischenschritt. Als Antigen diente NMIg ($10 \mu\text{g/ml}$) in PBS-Natriumazid und PBS-Natriumazid alleine. Die Mittelwerte der unspezifischen Bindungsreaktionen wurden von den Mittelwerten der spezifischen Bindungsreaktionen abgezogen.

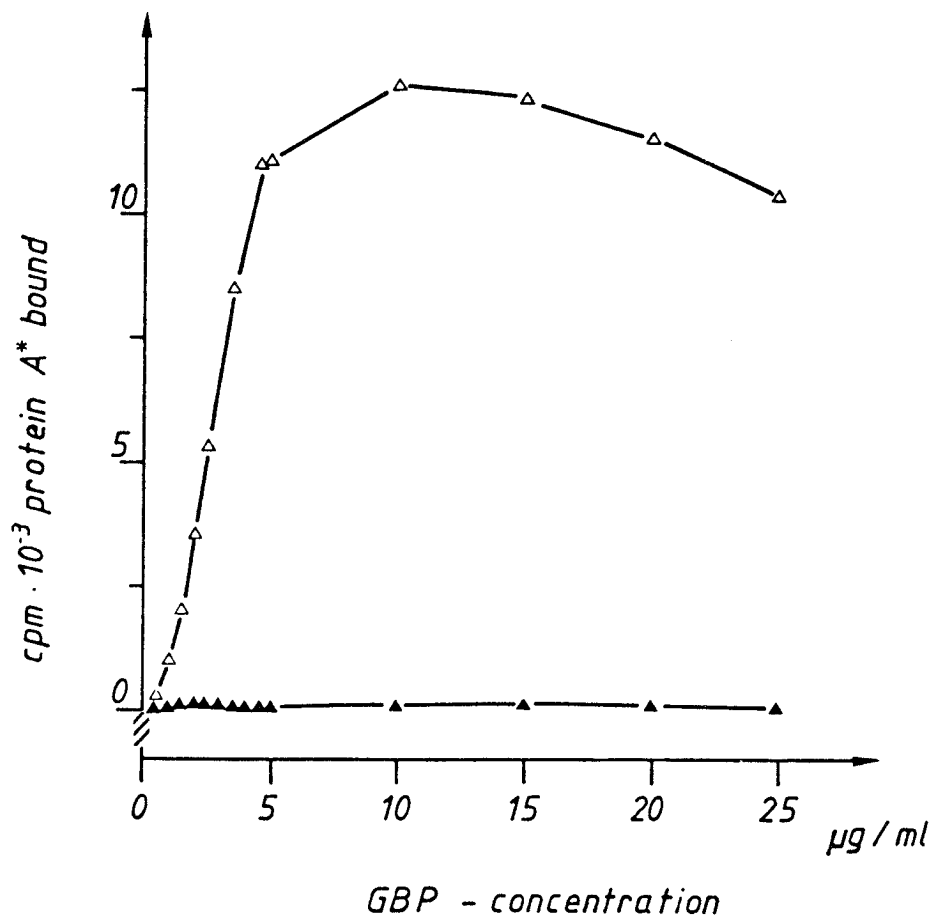


Abb. 4: Indirekter Radioimmunoassay auf Terasaki-Platten. Pro Loch wurde 20 μl der angegebenen Proteinkonzentration pro ml aufgetragen. Das Kaninchen-anti-MIg Antiserum lag 8×10^{-2} verdünnt vor. ^{125}J -markiertes Protein A wurde im Sättigungsbereich verwendet ($\blacktriangle$) X63 Kulturüberstand, ($\triangle$) D-2-24-3 Kulturüberstand.

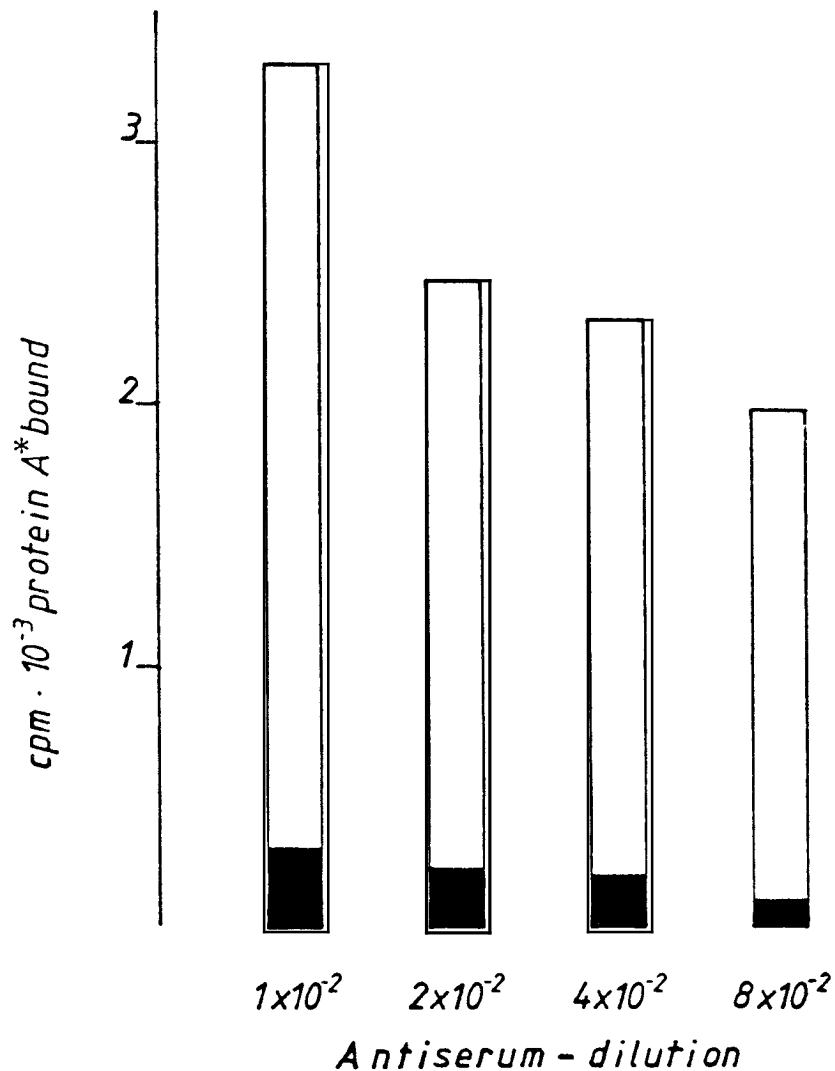


Abb. 5: Indirekter Radioimmunoassay auf Terasaki-Platten zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses von unspezifischer zu spezifischer Bindung. Die Antigenkonzentration betrug 2 µg/ml GBP in PBS Natriumazid bzw. nur PBS-Natriumazid. Die einzelnen Verdünnungen des Kaninchen-anti-Maus Ig Antiserums wurden mit PBS-Natriumazid hergestellt, die 1 % Gelatine enthielt. Schwarz eingezeichnet ist die unspezifische Bindung an Terasaki-Platten.

Für markiertes Protein A ist dieser Sättigungsbereich so nicht direkt feststellbar gewesen (s. Abb. 3), da die Fraktion an Protein A bindenden Immunglobulinen in NMiG wahrscheinlich zu gering war. Die Empfindlichkeit des Modellsystems wurde hier durch die Anwendung des indirekten Radioimmunoassays entscheidend verbessert. Hierzu wurde ein zusätzlicher Inkubationsschritt mit verdünntem Kaninchen-anti-Maus Ig (s. Abb. 3) durchgeführt, dessen Bindung dann mit ^{125}J -markiertem Protein A* nachgewiesen wurde (indirekter Radioimmunoassay, s. 2.5.2).

2) Für die Anwendung des Radioimmunoassays auf Terasaki-Platten wurde das Antigen NMiG des Modellsystems schließlich durch das Antigen GBP ersetzt. Der Einfluß der Antigenkonzentration wurde mit Kulturüberständen des Hybridklons D-2-24-3 bestimmt. Dies ist ein Hybridom, das in der "Fusion I" produziert wurde und dort näher charakterisiert wird.

Es wurde eine steigende Konzentration an GBP bei gleichbleibender Menge an Kulturüberstand getestet. Dieser Test führte bei etwa 9 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ GBP in PBS-Natriumazid zur Sättigung (s. Abb. 4). Dieser Test ist allerdings abhängig von der Qualität des Kulturüberstandes, der darin enthaltenen Menge Antikörper und dessen Affinität zum Antigen.

3) Ein weiterer Parameter ist die optimale Verdünnung des Kaninchen-anti-MiG Antiserums, das als Zwischenschritt im indirekten Radioimmunoassay verwendet werden sollte. Die optimale Verdünnung wurde bei geringerer GBP Konzentration bestimmt. Als antigen-spezifischer Antikörper wurde wieder Kulturüberstand des Hybridoms D-2-24-3 verwendet.

Eine 8×10^{-2} Verdünnung des Antiserums in 1 %iger Gelatine-PBS-Natriumazid-Lösung ergab das beste Verhältnis von unspezifischer zu spezifischer Bindung (s. Abb. 5). Diese Verdünnung wurde bei allen weiteren indirekten Radioimmunoassays verwendet.

2.6 Borsäurefällung und Gelfiltration für monoklonale IgM Antikörper

Serum und Ascites wurde zunächst durch Zentrifugation ($7500 \times g$ JA 20 Rotor, der Firma Beckman) von unlöslichen Bestandteilen getrennt. Ein Volumenanteil (etwa 20 bis 25 ml Serum und Ascites) wurde dann mit 20 Teilen vorgekühlter 0,5 %iger Borsäure versetzt und eine Stunde bei $4^{\circ} C$ gerührt. Das Präzipitat wurde bei oben bereits angegebener Beschleunigung abzentrifugiert und im Ausgangsvolumen physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und das Präzipitat nach dem 3. Mal in einem möglichst geringen Volumen physiologischer Kochsalzlösung gelöst (ungefähr 5 bis 10 ml). Es folgte eine Dialyse gegen Gelfiltrationspuffer über Nacht (0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl und 0,02 % Natriumazid, pH 7,2). Diese nochmals zentrifugierte Lösung hauptsächlich monoklonaler IgM Antikörper wurde einer Gelfiltration unterworfen (Sephacryl-S-300, Pharmacia Schweden). Die Länge der Säule betrug 85 cm und hatte einen Durchmesser von 1,6 cm. Die in Gegenwart von Gelfiltrationspuffer gepackte Säule wurde nach jedem Lauf mit dem zweifachen Säulenvolumen einer 0,2 M NaOH Lösung in Gegenwart von ebenfalls 0,02 % Natriumazid und 0,5 M NaCl gereinigt und anschließend wieder mit dem zweifachen Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer äquilibriert.

Das Auftragen der Proteinlösung auf die Säule erfolgte unter Packdurchfluß-Geschwindigkeit (36 Tropfen pro min.). Die Proteinlösung wurde anschließend langsam mit dem Gel-filtrationspuffer eluiert. Dazu wurde eine Peristaltikpumpe (Desaga) zwischengeschaltet und auf etwa fünf Tropfen pro Minute eingestellt, die Fraktionen bestanden aus je 50 Tropfen.

2.7 Ammoniumsulfatfällung und Ionenaustauscher-Chromatographie für monoklonale IgG Antikörper

Serum und Ascites wurde zunächst durch Zentrifugation ($7500 \times g$, Ja 20 Rotor der Firma Beckman) von unlöslichen Bestandteilen getrennt. Zu einem Volumenanteil (etwa 20 bis 25 ml Serum oder Ascites) wurde dann langsam das 1,5fache Volumen einer $3 \text{ M}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Lösung bei R.T. unter ständigem Rühren zugetropft, um höhere örtliche Konzentrationen als 45 % zu vermeiden. Nach zwei Stunden wurde das Präzipitat durch Zentrifugation bei $15\,000 \times g$ (Ja 20 Rotor) für 15 Minuten sedimentiert, im Ausgangsvolumen physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und dieser Vorgang wiederholt.

Dieses zweite Präzipitat wurde ebenfalls im Ausgangsvolumen physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und über Nacht gegen $0,01 \text{ M}$ Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) dialysiert und anschließend nochmals bei $7500 \times g$ (Ja 20 Rotor) zentrifugiert. Der Ionenaustauscher DE-52 Zellulose (Whatman, Maidstone, UK) wurde im Batch-Verfahren mit dem 10fachen Volumen $0,01 \text{ M}$ Natriumphosphatpuffer äquilibriert und gewaschen, der pH von 7,2 schließlich mit H_3PO_4 eingestellt. Von diesem Material wurde eine Säule mit dem Volumen des eingesetzten Ascites oder

Serums gegossen, dann die Proteinlösung aufgetragen und überschüssiges Protein durch Waschen mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer entfernt (mindestens zwei Säulenvolumina). Die Elution erfolgte mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,01 M bis 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde photometrisch bei 280 nm verfolgt, entsprechende Fraktionen vereinigt und der mAK fraktioniert bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.8 Elektrophorese

2.8.1 Mikrozonenelektrophorese

Für den Nachweis von Myelombanden in Asciten wurde die Mikrozonenelektrophorese (MZE) angewendet, die auf zwei verschiedenen Trägermaterialien durchgeführt wurde.

1) Fertige Agaroseplatten (Corning, USA) wurden an den vorhandenen Auftragsstellen mit je 1 μl Ascites versehen und für 40 Minuten die Proteinlösung in einer Corning-Elektrophoresekammer in Gegenwart von Barbitalpuffer elektrophoretisch getrennt. Fixieren, an- und entfärben der Agaroseplatten erfolgte in folgenden Lösungen:

- Fixier- und Färbelösung, 15 Minuten

50 % Äthanol

7 % Eisessig

0,2 % Coomassie Brilliant Blue

43 % H_2O

- Entfärbelösung

30 % Äthanol

7 % Eisessig

64 % H_2O

2) In Barbitalpuffer getränkte Zelluloseacetatfolien (Sartorius Membranfilter, Göttingen) wurden in einer MZE-Kammer (Sartorius) eingespannt. Mit einem dazugehörenden Stempel wurden 0,25 µl Protein auf den Startpunkt aufgetragen, der eine optimale Trennschärfe der Banden ergab. Die Proben wurden 40 Minuten bei 200 V in Gegenwart von Barbitalpuffer getrennt. Fixieren, an- und entfärben der Zelluloseacetatfolien wurde wie bei den Nitrozellulosefiltern durchgeführt (Towbin et al., 1979).

Barbitalpuffer, pH 8,6 (Rezept für 1 l)

5,5 Diethylbarbitursäure Natriumsalz 10,30 g

5,5 Diethylbarbitursäure 1,84 g

2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) war Basis für qualitative Analysen der peripheren und löslichen Proteine des Stäbchenaußensegmentes. Mit Hilfe dieser Technik konnten zum einen Aussagen über die Reinheit der betreffenden Proteine gewonnen werden und zum zweiten waren entsprechend vorbereitete Gele Ausgangsmaterial für die "Western-Blotting-Technik" (s. 2.10). Die benutzten Lösungen sind unten aufgeführt.

Die zu analysierenden Proben (3 Vol.) wurden mit Probenpuffer (1 Vol.) gemischt und für drei Minuten gekocht oder bei 56° C für 10 Minuten inkubiert, in der Eppendorf-Zentrifuge kurz zentrifugiert und anschließend direkt auf das Gel gegeben.

Als Molekulargewichtsstandards wurde die Testproteinmischung der Firma Bio-Rad benutzt und genauso wie die zu analysierenden Proben behandelt.

Die verwendeten Gele wurden nach den in Tabelle 2 angegebenen Rezepten hergestellt. Dies sind entsprechend den Geldimensionen abgeänderte Standardrezepte. Bei Gradientengelen wurden dabei je 1 Volumenanteil der entsprechenden Mischung mit dem Gradientenmischer in vorbereitete Gelplatten gegeben. Bei kontinuierlichen Gelen dagegen wurden jeweils 2 Volumenanteile der gleichen Mischung verwendet.

1) Acrylamid-Lösung (Rezept für 100 ml)

Acrylamid	30,0 %
N-Methyl-bisacrylamid	0,8 %

2) Unterer Tris-Puffer (Rezept für 100 ml), pH 8,8

Tris (hydroxymethyl) aminomethan	18,17 g
20 %ige SDS-Lösung	2 ml

Endkonzentration: 1,5 M Tris-HCl

0,4 % SDS

3) Oberer Tris-Puffer (Rezept für 100 ml), pH 6,8

Tris (hydroxymethyl) aminomethan	6,6 g
20 %ige SDS-Lösung	2 ml

Endkonzentration: 0,5 M Tris-HCl

0,4 % SDS

4) Elektroden-Puffer (Rezept für 1 l), pH 8,3

Tris (hydroxymethyl) aminomethan	3 g	25 mM
Glycerin	14,4 g	192 mM
20 %ige SDS-Lösung	5 ml	0,1 %

5) Probenpuffer

220 mM Tris HCl pH 6,8

2 % SDS

5 % β -Mercaptoethanol

15 % (V/V) Glycerin

6) Färben und Entfärben der Gele

- ungefähr 12 Stunden in Lösung A inkubieren

0,05 % Coomassie Brilliant Blue R 250

25 % Isopropanol

10 % Eisessig

- weitere 6 Stunden in Lösung B inkubieren

0,005 % Coomassie Brilliant Blue R 250

10 % Isopropanol

10 % Eisessig

- und entfärben bis der Hintergrund farblos ist in
Lösung C.

10 % Eisessig

Tabelle 2

Trenngele

	7,5 % ¹	10 %	11,5 %	15 %	20 %	Sammelgel
1) Unterer Tris-Puffer	5 ²	5	5	5	5	-
2) Oberer Tris-Puffer	-	-	-	-	-	2,5
3) Acrylamid-Lösung	5	6,6	7,95	10	13,32	1
4) Aqua bidest	9,86	8,2	7,05	2,94	-	6,455
5) Glycerol	-	-	-	2,0	1,8	-
6) 10 % (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,05
7) Temed	0,0066	0,0066	0,0066	0,0066	0,0066	0,005

- 38 -

(für eigene Gradientengele abgeänderte Rezepte)

1 Endkonzentration des Polyacrylamids

2 alle Angaben sind in ml dimensioniert.

2.9 Western Blotting

Für den Spezifitätsnachweis von Antikörpern wurde die Western-Blotting-Technik angewendet (Towbin et al., 1979). Grundlegendes Prinzip dieser Technik ist die elektrophoretische Auftrennung der immunologisch zu charakterisierenden Antigene entweder unter denaturierenden oder nativen Bedingungen in der Elektrofokussierung. Danach erfolgt ein elektrophoretischer Transfer auf Nitrozellulose-Folien, auf dem das Immunogen immobilisiert wird. Dieser, wie auch weitere Schritte der Western-Blotting-Technik haben in den letzten Jahren vielfältige Variationen erfahren, die im "Laboratory Manual - LKB 2005-Transphor-Electroblotting Unit" mit den entsprechenden Literaturangaben zusammengestellt sind.

2.9.1 Elektro-Transfer

Nach Auftrennung der entsprechenden Extrakte aus Stäbchenaußensegmenten unter denaturierenden Bedingungen im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Gele mit folgenden zusätzlichen Folien zwischen zwei Plastikgitter geklemmt.

- 1) Scotch-Grid
- 2) mindestens 1 Lage Whatman Papier
- 3) Gel
- 4) Nitrozellulose-Filter
- 5) mindestens 1 Lage Whatman Papier
- 6) Scotch-Grid

Beim Einfügen dieser Anordnung in die Blottingkammer muß die Nitrozellulose-Folie auf der Anodenseite liegen. Der Elektrottransfer dauerte 2 Stunden und fand in Gegenwart von 192 mM Glycin , 25 mM Tris-HCl und 20 % Methanol statt. Dieser Transferpuffer ist mit Methanol versetzt, um ein Quellen der Gele zu verhindern, und während des Transfers auf 4° C gekühlt. Nach einem Transfer wurde ein Kontrollstreifen mit Amidoschwarz 10B angefärbt (Towbin et al., 1979). Die übrige Nitrozellulose-Folie wurde direkt weiterbehandelt.

2.9.2 Saugtransfer

Diese Technik wurde nach elektrophoretischen Trennungen unter nativen Bedingungen angewendet. Die Elektrophorese wurde in Agarosefilmen in Gegenwart von Barbitalpuffer durchgeführt. Im Gegensatz zum Elektrottransfer wurde beim Saugtransfer die trockene Nitrozellulose-Folie für etwa 5 bis 10 Minuten auf den Agarosefilm gelegt. Auf Grund der dünnen Schicht und der Struktur eignet sich Agarose besonders gut für einen solchen Saugtransfer. Nitrozellulose-Folien aus diesen Experimenten wurden dann wie beim Elektrottransfer weiterbehandelt.

2.9.3 Weiterverarbeitung der Westernblotts zur Identifizierung der Antikörperspezifität

Nach erfolgreichem Elektro- bzw. Saugtransfer auf Nitrozellulose wurden die entsprechenden Streifen wie folgt weiterbehandelt;

- 1) Inkubation für 1 Stunde bei 37° C bzw. über Nacht bei 4° C in einer 3 %igen BSA-Lösung oder 1 %igen Gelatine-Lösung.
- 2) Kurzes Waschen in PBS-Natriumazid
- 3) Inkubation der Streifen in den entsprechenden Kulturüberständen oder Ascites Verdünnungen für 90 Minuten bei 37° C oder über Nacht bei 4° C.
- 4) Waschen der Streifen in PBS-Natriumazid, mehrmaliger Wechsel der Flüssigkeit etwa alle 10 Minuten.
- 5) Inkubation der Streifen mit radioaktiv markierten Nachweisreagenzien, ungefähr 5×10^6 TCA fällbare cpm in 5 ml 3 %iger Rinderserumalbumin-Lösung oder 1 %iger Gelatine-Lösung
- 6) Waschen der Streifen in PBS-Natriumazid, mehrmaliger Wechsel der Flüssigkeit etwa alle 10 Minuten
- 7) Die Schritte 4 bis 6 wurden beim Raumtemperatur durchgeführt.
- 8) Nach dem letzten Waschgang wurden die markierten Nitrozellulosestreifen getrocknet und einem Agfa-Röntgenfilm X-Omat exponiert.

2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.10.1 Photometrisch:

Proteinkonzentrationen oberhalb von 0,1 mg/ml wurden photometrisch durch Messung der Absorption bei 280 nm und 260 nm nach folgender Formel bestimmt

$$c = \text{Cmg/ml} = 1,54 \times \text{OD}_{280} - 0,76 \times \text{OD}_{260}$$

2.10.2 Bradford-Assay (Bradford, 1976)

Proteinkonzentrationen unterhalb von 0,1 mg/ml wurden ebenfalls photometrisch bestimmt, jedoch wird hier die Änderung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue R-250 von 465 nach 595 nm bei Bindung an das Protein vorausgesetzt. Der Anstieg der Absorption bei 595 nm wird schließlich gemessen. Für die Durchführung des Testes sollten Plastik-Einmalküvetten verwendet werden, da bei Glasküvetten Farbreste die Reproduzierbarkeit des Testes stören. Als Standard wurde BSA verwendet.

2.11 Monoklonale Kontrollantikörper

Zur Spezifitätskontrolle von neu produzierten mAK sollten nach Möglichkeit bereits etablierte und weitgehend charakterisierte mAK eingesetzt werden, die sich nur im variablen Teil des mAK's unterscheiden. Da ich in der Vergangenheit mit mAK spezifisch für verschiedene Antigene des Haupt-histokompatibilitätskomplexes (MHC) der Maus gearbeitet habe, wurden einige dieser mAK hier als Spezifitätskontrolle eingesetzt. Die verwendeten mAK wurden von H. Lemke produziert (Lemke et al., 1979). Die mAK sind spezifisch für Klasse I und Klasse II Antigene und erkennen alle verschiedene Antigene Determinanten auf den entsprechenden Proteinen. Für die

Kontrollexperimente auf den Antigenen Rhodopsin, GBP und PDE wurden Asciten oder Zellkulturüberstände selbst hergestellt. Dabei zeigten die mAK H-141-29, H-141-30, H-141-51, H-116-32 und B-17-123 keinerlei Reaktionen mit angegebenen Antigenen im Radioimmunoassay. Anders verhielten sich die mAK B-17-263, B-15-124 und H-118-49, die ähnliche Kreuzreaktionen wie die in dieser Arbeit näher charakterisierten mAK D-2-24-3, D-2-177-4, PDE-1-4-15, PDE-1-89-12 und PDE 1-266-8 aufwiesen. Auf die beobachteten Kreuzreaktionen mit den Kontrollantikörpern wird im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

2.12 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalien, deren Herkunft in den einzelnen Abschnitten nicht bereits erwähnt wurden, stammten alle von der Firma E. Merck, Darmstadt.

PBS wurde in verschiedenen Abschnitten ohne Angabe der Zusammensetzung erwähnt. Dies soll hier nachgeholt werden.

Phosphat Buffered Saline (PBS) pH 7,2 (Rezept für 1 l)

NaCl 8,0 g

KCl 0,25 g

Na₂HPO₄ 1,44 g

KH₂PO₄ 0,25 g

Als antibakteriell wirkende Substanz enthielt PBS 0,02 % Natriumazid.

Physiologische Kochsalzlösung (Saline) :

Dabei handelt es sich um eine 0,9 %ige NaCl-Lösung in H₂O bidest.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, mAK zu produzieren, die funktionell in den Transduktionsmechanismus der Photorezeptoren von Vertebraten eingreifen, d.h. einen der Initialschritte der Enzymkaskade inhibieren (s. Abb. 1). Im Idealfall sollte ein mAK produziert werden, der spezifisch für die durch Licht aktivierbare cGMP abhängige Phosphodiesterase ist und die Funktion inhibitorisch beeinflusst. Um dieses Ziel zu erreichen, können zwei verschiedene Strategien angewendet werden, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

Strategie 1:

Bei der "Strategie 1" verwendet man wenig Mühe auf die Reinheit des Antigens und verlagert das Bemühen um Spezifität der mAK auf die Zeit nach der Produktion der Antikörper, nämlich auf die Selektion der Hybridome. Der größte Teil der Hybridome wird eliminiert, nachdem ein spezifischer Test gezeigt hat, welche Hybridome eine interessante bzw. gewünschte Spezifität zeigen. Dieser Weg wurde bei der "Fusion I" beschritten.

Strategie 2:

Bei der "Strategie 2" wird zur Immunisierung ein relativ homogenes Antigen verwendet, das im Extremfall aus einem einzigen Immunogen besteht. Diese Strategie wurde bei der "Fusion II" angewendet. Um mögliche Kreuzreaktionen der selektionierten mAK auszuschließen, sollte z.B. in der "Western-Blotting-Technik" das Gesamtspektrum aller Proteine des untersuchten Systems als Basis für die genaue Spezifitätsbestimmung verwendet werden.

Um alle antigen-spezifischen Hybridomkulturen zu identifizieren unabhängig der von ihnen produzierten Antikörperklasse - wurde die Selektionen für Antikörper-produzierende Zellen bei beiden Fusionen mit ^{125}J -markiertem Schaf-anti-MIg und PVC-Platten durchgeführt.

3.1 Fusion I

Folgende Aspekte waren Ziel der "Fusion I":

1. Mit einem in großen Mengen zur Verfügung stehenden Antigen sollte die Fusionstechnologie erprobt werden.
2. Es sollten, wenn möglich, mAK spezifisch für Rhodopsin produziert werden.

3.1.1 Charakterisierung des Antigens

Eine überdurchschnittlich große Menge Antigen (50 µg) wurde dazu in einem SDS-Polyacrylamid-Gradienten (10 % bis 20 %) aufgetrennt (s. Abb. 6). Diese zur Immunisierung und späteren Selektion der Hybridome verwendete Antigenpräparation bestand aus gewaschenen und gebleichten Disks, die jedoch immer noch kleine Fraktionen peripherer, löslicher und höher molekularer Proteine des Rinderaußensegmentes enthielt. Zum Zeitpunkt der Fusion war dies nicht bekannt.

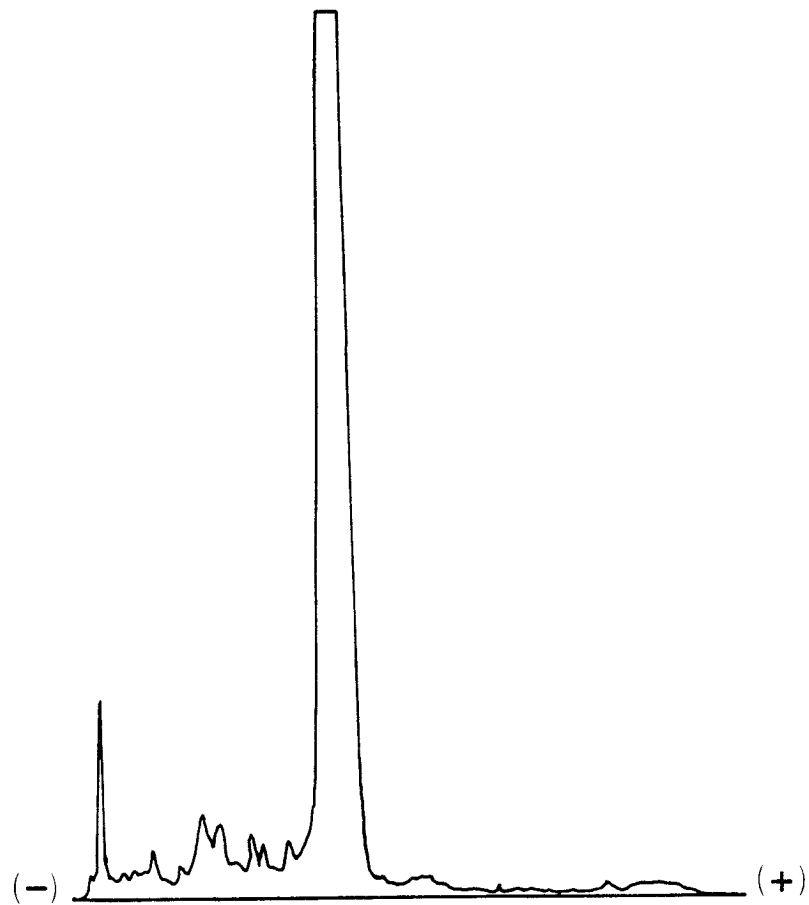


Abb. 6: 50 µg gewaschene und gebleichte Rinder-ROS wurden in einem 10 % bis 20 %igen SDS-Polyacrylamid-Gradienten aufgetrennt.

3.1.2 Immunisierung und Charakterisierung der Immunantwort

Mit dem Antigen wurde eine Maus sechsmal intraperitoneal immunisiert (ungefähr je 100 µg). Dabei war das Antigen der ersten Immunisierung mit "Freund's complete Adjuvant" gemischt. Die folgenden Immunisierungen wurden in Gegenwart von "Freund's incomplete Adjuvant" durchgeführt. Einen Tag vor der Fusion wurden Serumverdünnungen, 10^{-1} und 10^{-2} , der immunisierten Maus im direkten Radioimmunoassay auf ihre Immunantwort untersucht. Beide Serumverdünnungen zeigten im Gegensatz zum Präimmunserum eine deutliche Immunantwort und das Vorhandensein von Protein A bindenden Antikörpern (s. Abb. 3). Dieses Antiserum diente später als positive Kontrolle während der Selektion antigen-spezifischer Hybridomkulturen mit dem Radioimmunoassay.

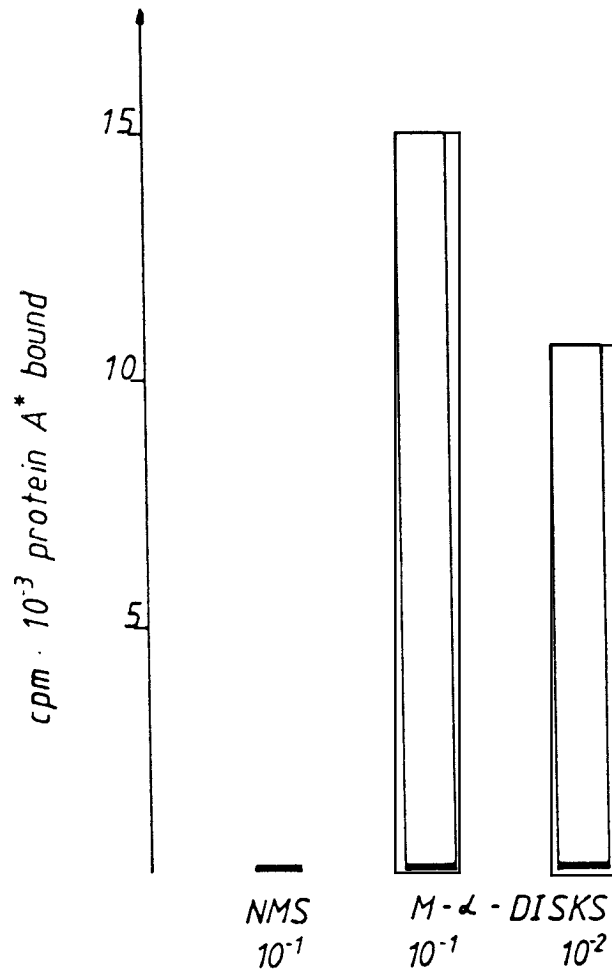


Abb. 7: Direkter Radioimmunoassay auf PVC-Platten mit Präimmuns-
serum (NMS) und Maus-anti-Disks Antiserum auf gewaschen
und gebleichten Disks in PBS-Natriumazid (4 µg/ml).
Schwarz eingezeichnet ist die unspezifische Bindung.

3.1.3 Ausbeute der "Fusion I"

Die "Fusion I" wurde mit den Lymphozyten einer Milz durchgeführt, wobei das Verhältnis von Lymphozyten zu Myelomzellen bei der Fusion ungefähr 1 : 1 betrug.

456 vorbereitete Kulturgefäße wurden anschließend mit ungefähr je $0,33 \times 10^6$ Zellen beschickt. Diese Zellen beinhalten 2/5 Myelomzellen, 2/5 Milzzellen der immunisierten Maus und etwa 1/5 Milzzellen einer nicht immunisierten Maus als "Feederzellen". Die Ausbeute der "Fusion I" kann aus folgendem Flußdiagramm abgelesen werden.

456 Kulturgefäße werden
nach der Fusion beschickt



230 Kulturgefäße zeigen
Hybridwachstum



70 Kulturgefäße enthalten
durch RIA selektionierte
antigen-spezifische Hybridkulturen



29 Hybridome sind nach weiterer
Kultivierung in Stickstoff lagerbar

Zwei dieser Hybride, D-2-24-3 und D-2-177-4 (s. Tab. 3) werden in dieser Arbeit charakterisiert.

Auch nach Klonierung der beiden Hybridzellen zeigten Kulturüberstände mit dem Immunogen im Radioimmunoassay keine stärkeren Bindungsreaktionen. Es bestanden daher folgende Möglichkeiten.

Tabelle 3:

Selektionierte und klonierte Hybridlinien

Hybrid	Antikörperklasse
D-2-24-3	μ
D-2-177-4	μ

- 1) Es handelt sich um mAK mit einer sehr schwachen Affinität.
- 2) Es handelt sich um mAK mit Spezifität für Komponenten des Immunogens.

Die zweite Möglichkeit konnte zumindest teilweise durch die folgenden Experimente bestätigt werden:

1) Ein zu diesem Zeitpunkt verfügbares, gereinigtes peripheres Protein des Rinderaußensegmentes war GBP. Ein Gel der GBP-Präparation ist in Abb. 8 dargestellt. Deutlich sichtbar im Densitogramm sind die drei Untereinheiten, α , β , γ . Bei Verwendung dieses Antigens wurden mit Kulturüberständen der Hybridome D-2-24-3 und D-2-177-4 im Radioimmunoassay so starke Reaktionen beobachtet (Abb. 9), daß es interessant erschien, diese mAK näher zu charakterisieren. Als Negativkontrolle wurde Kulturüberstand von X63 Myelomzellen benutzt.

2) Die Antikörper wurden durch verschiedene Klassenspezifische Nachweisreagenzien mit dem Antigen GBP auf ihre Antikörperklassenzugehörigkeit untersucht. Bindungsreaktionen an GBP konnten mit dem monospezifischen ^{125}J -markierten Ziege-anti- μ -Antiserum nachgewiesen werden. Es handelt sich daher mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit um IgM-Antikörper. Dies wird durch die Art der Isolierung aus Asciten unterstützt.

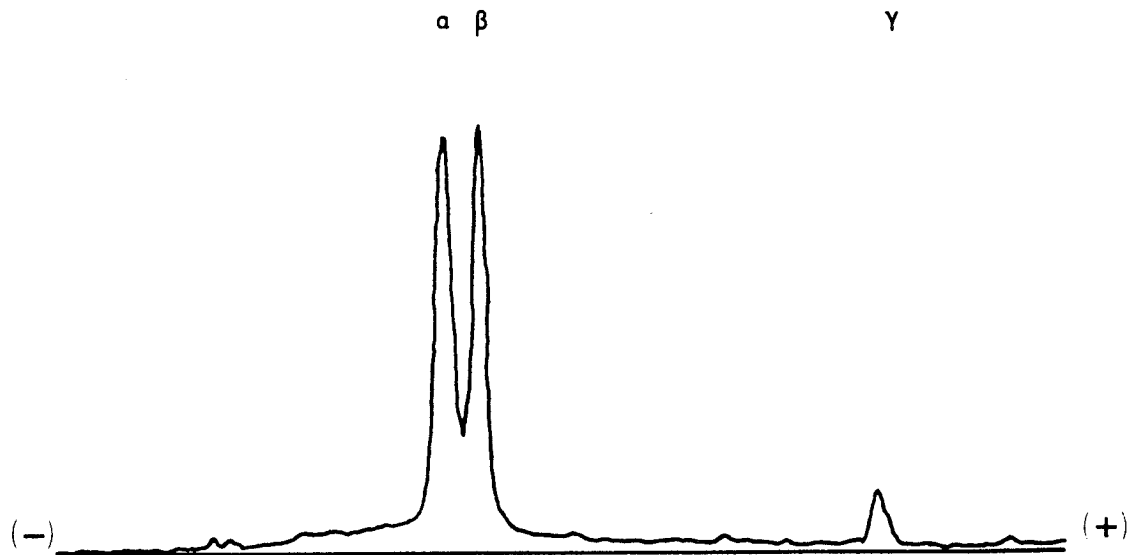


Abb. 8: 5 μ g GBP aus Stäbchenaußensegmenten wurden in einem 10 % bis 20 %igen SDS-Polyacrylamid-Gradienten aufgetrennt.

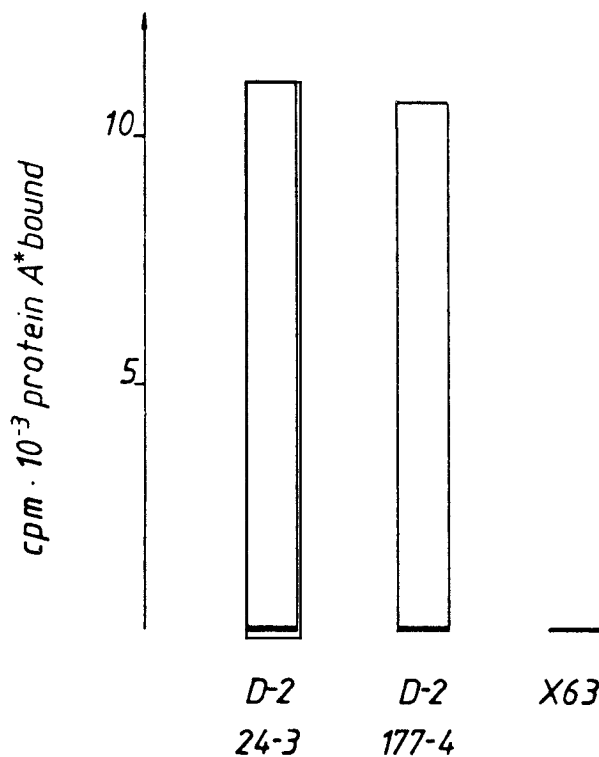


Abb. 9: Indirekter Radioimmunoassay auf Terasaki-Platten mit GBP (9 μ g/ml) in PBS-Natriumazid als Antigen. Es wurden Kulturüberstände der Hybridomlinien D-2-24-3, D-2-177-4 und von X63 Myelomzellen getestet. Schwarz eingezeichnet ist die unspezifische Bindung.

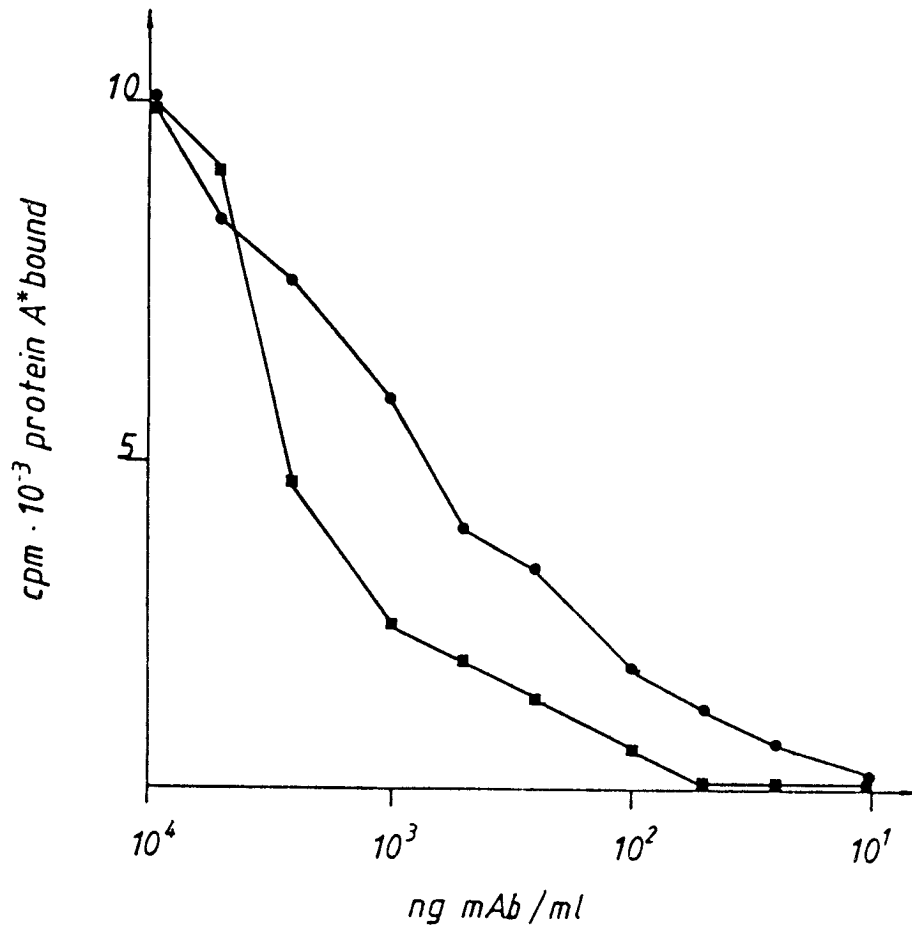


Abb. 10: Indirekter PVC-RIA mit GBP (9 µg/ml) in PBS-Natriumazid als Antigen. Die Mittelwerte der Bindungsreaktionen auf PBS-Natriumazid wurden von den Mittelwerten der antigenspezifischen Bindungsreaktionen subtrahiert. D-2-24-3 (●) und D-2-177-4 (■) lagen in isolierter Form als Ausgangsmaterial vor und wurden in PBS-Natriumazid verdünnt, die 1 % Gelatine enthielt.

3) Beide aus Asciten gereinigten mAK waren Basis für Titrationskurven auf den Antigenen GBP und Rhodopsin in Emulvogen (Helenius und Simmens, 1979). PDE wurde nicht getestet, da die Präparationen immer mit GBP verunreinigt sind. Mit Rhodopsin zeigten beide isolierten mAK im RIA keine Reaktionen. In Abb. 10 sind die Titrationskurven beider mAK auf GBP dargestellt.

3.1.4 Feinspezifität des mAK D-2-24-3 auf verschiedenen nativen und denaturierten Antigenen

Die "Feinspezifität" der charakterisierten mAK auf verschiedenen nativen und denaturierten Antigenen wird allgemein und ausführlich noch in Abschnitt 3.2.4 und 3.2.5 behandelt. Hier soll nur auf den Einfluß bei der Anwendung der "Western-Blotting-Technik" hingewiesen werden.

Der mAK D-2-24-3 wurde im indirekten Radioimmunoassay auf denaturierten GBP und PDE Präparationen getestet. Dieser Versuchsansatz war notwendig, um eine erfolgreiche Durchführung der "Western-Blotting-Technik" unter denaturierenden Bedingungen zu gewährleisten.

Die Bindung des mAK D-2-24-3 an GBP wurde durch die Denaturierung des Antigens mit SDS nicht beeinträchtigt, sondern eher noch verbessert (Abb. 11). Bei Verwendung einer PDE-Präparation als Antigen ließen sich im nativen Zustand nur schwache Reaktionen feststellen, die auf die Kontamination der Präparationen mit der GBP _{β} Untereinheit zurückgeführt werden könnten. Die starke Zunahme dieser Bindungsreaktionen nach Behandlung der PDE-Präparation mit SDS läßt sich jedoch nicht alleine damit erklären, daß antigene Strukturen in der GBP _{β} Untereinheit durch die Behandlung mit SDS besser zugänglich für den mAK wurden. Es müssen antigene Strukturen innerhalb der beiden schweren Untereinheiten α und/oder β der PDE für den mAK zugänglich geworden sein (Abb. 12). Dies läßt sich durch die Blottingdaten bestätigen (s. 3.1.5, Abb. 13).

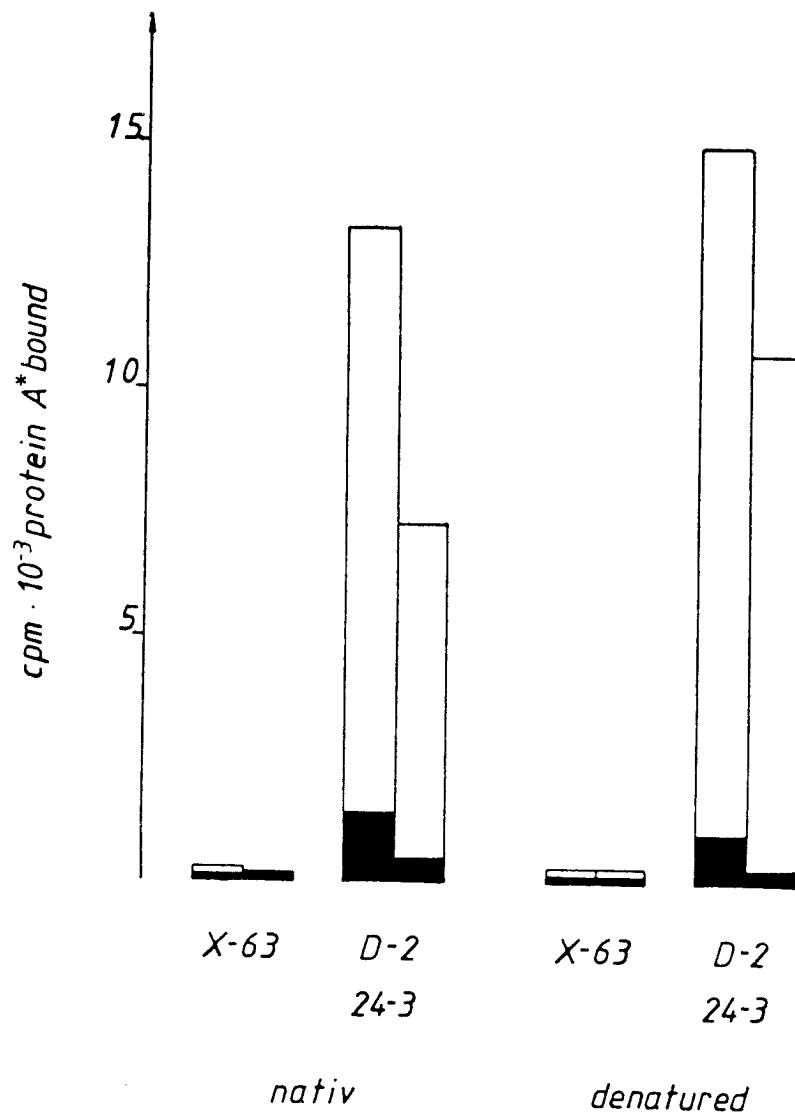


Abb. 11: Indirekter PVC-RIA mit den Ascitesverdünnungen 10^{-3} und 10^{-4} des mAK D-2-24-3. Als Antigen wurde eine GBP-Präparation (s. Abb. 8) verwendet. Diese Präparation wurde entweder nativ oder mit SDS denaturiert (0,1 % SDS Endkonzentration) verwendet. Die Konzentration des Antigens betrug 1,9 µg/ml. Die Ascites-Verdünnungen wurden mit PBS-Natriumazid hergestellt, die 1 % Gelatine enthielt. Schwarz eingezeichnet ist die unspezifische Bindung.

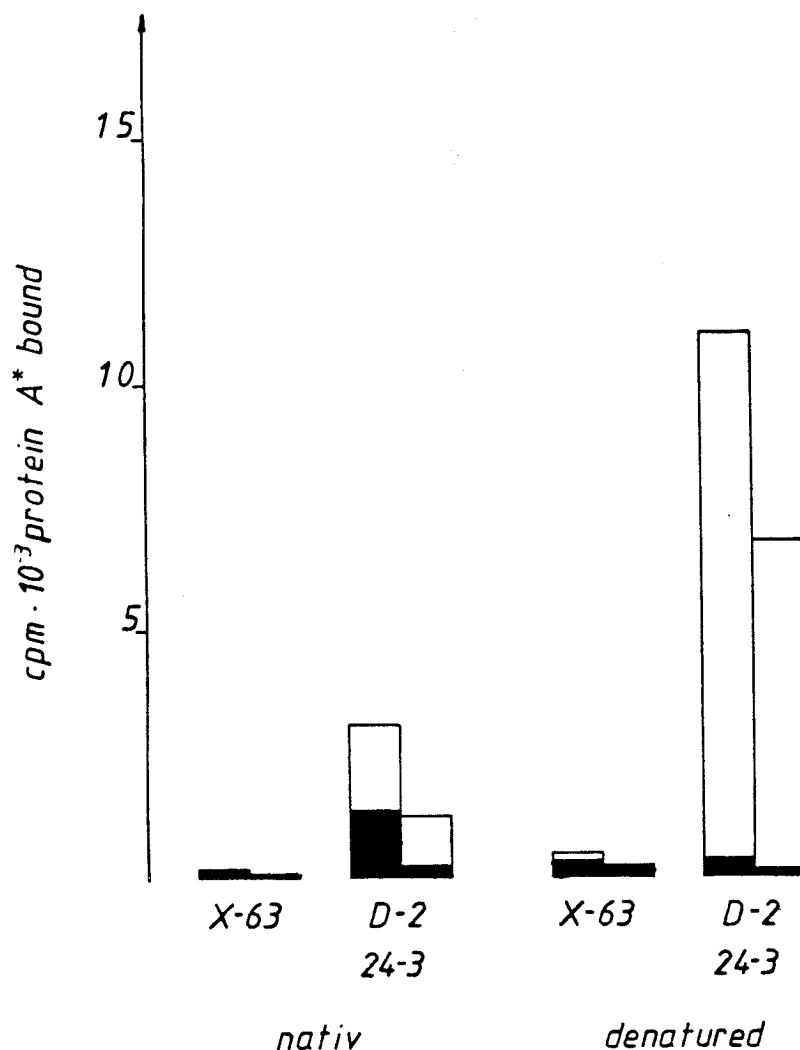


Abb. 12: Indirekter PVC-RIA mit den Ascitesverdünnungen 10^{-3} und 10^{-4} des mAK D-2-24-3. Als Antigen wurde eine PDE-Präparation (s. Abb. 14) verwendet. Diese Präparation wurde entweder nativ oder mit SDS denaturiert (0,1 % SDS-Endkonzentration) verwendet. Die Konzentration des Antigens betrug 3,8 $\mu\text{g/ml}$. Die Ascites-Verdünnungen wurden mit PBS-Natriumazid hergestellt, die 1 % Gelatine enthielt. Schwarz eingezeichnet ist die unspezifische Bindung.

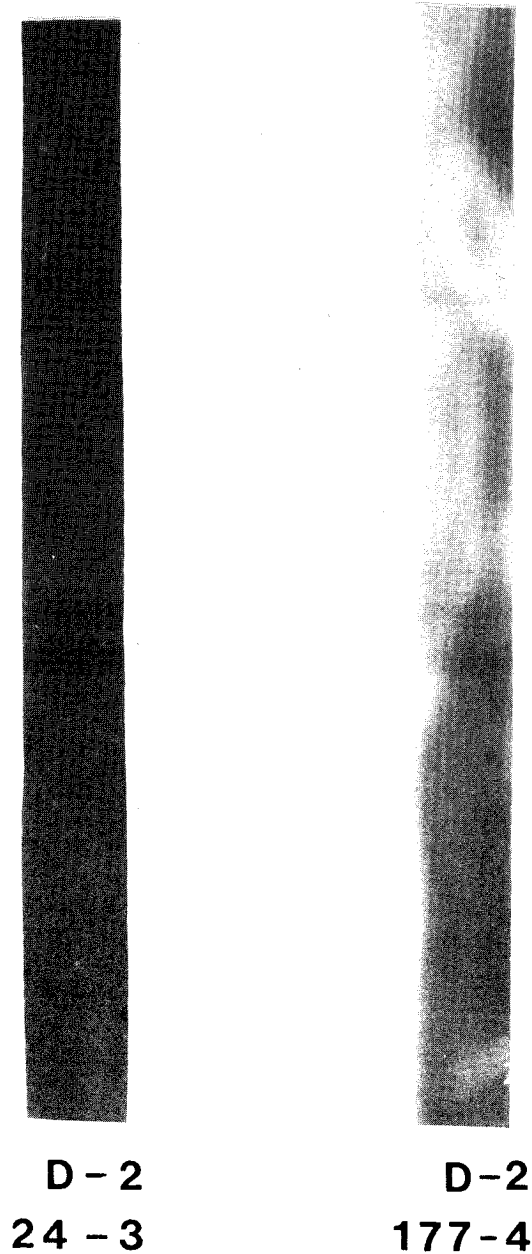


Abb. 13: Periphere Proteine des Rinderaußensegmentes wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (10 % bis 15 %) aufgetrennt und durch Elektrotransfer auf Nitrozellulose immobilisiert. Die weiteren Schritte zur Identifizierung der für die mAK spezifischen Antigene wurden entsprechend 2.9.3 durchgeführt. Es wurden mAK enthaltende Hybridomkulturüberstände als Antikörperquelle verwendet.

3.1.5 Nachweis der Antikörperspezifität mit der "Western-Blotting-Technik"

Die weitere Charakterisierung der mAK D-2-24-3 und D-2-177-4 erfolgte mit der "Western-Blotting-Technik". Dazu wurden die peripheren Proteine des Stäbchenaußensegmentes in einem 10 %igen bis 15 %igen SDS-Polyacrylamidgradienten aufgetrennt. Die beiden Untereinheiten α und β der PDE wurden im Gegensatz zu den Untereinheiten α und β des GBP nicht aufgetrennt. Nach einem Elektrottransfer auf Nitrozellulose wurden die Blotts entsprechend 2.9.3 weiterbehandelt. Als mAK Quelle wurden Hybridomkultur-überstände verwendet. Der Nachweis der antikörperspezifischen Bindung wurde mit ^{125}J markiertem Ziege-anti- μ Antiserum durchgeführt. Die beiden mAK D-2-24-3 und D-2-177-4 zeigten Bindungsreaktionen mit den nicht aufgetrennten Untereinheiten α und/oder β der PDE und mit der α und β Untereinheit von GBP (s. Abb. 13). Diese Bindungsreaktionen wurden mit denaturiertem Protein gefunden und spiegeln zumindest für D-2-24-3 die Daten wieder, die mit dem indirekten Radioimmunoassay auf PDE und GBP Präparationen unter denaturierenden Bedingungen gefunden wurden (s. 3.1.4).

3.2 "Fusion II"

Nach Etablierung der notwendigen Technologien wurde mit der "Fusion II" die direkte Strategie (s. 3.1) angewendet, um das Ziel eines für die cGMP abhängige Phosphodiesterase inhibitorisch wirkenden mAK zu produzieren.

3.2.1 Charakterisierung des Antigens

3 μg des Antigens wurde in einem SDS-Polyacrylamid Gradientengel (10 % bis 20 %) aufgetrennt (s. Abb. 14). Diese zur Immunisierung und späteren Selektion der Hybridome verwendete Antigenpräparation bestand im wesentlichen aus den drei Untereinheiten der cGMP-abhängigen Phosphodiesterase, α , β und γ . Die Präparation war zusätzlich mit der β -Kette des GBP's verunreinigt, wie ebenfalls aus Abb. 14 ersichtlich ist.

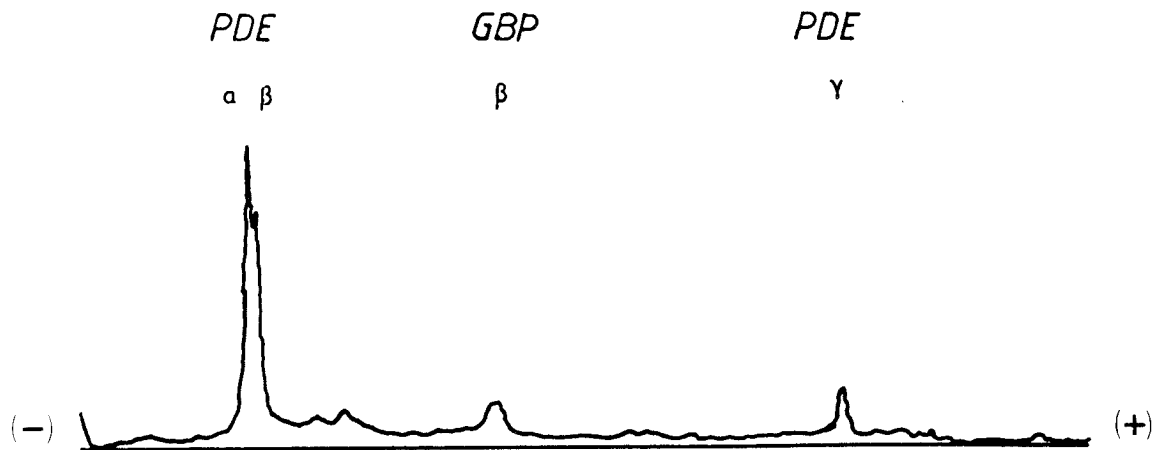


Abb. 14: 3 μg der PDE-Präparation wurden in einem 10 % bis 20 %igen SDS-Gradientengel getrennt.

3.2.2 Immunisierung und Charakterisierung der Immunantwort
Mit dem Antigen wurde eine Maus dreimal intraperitoneal immunisiert (ungefähr je 100 µg). Dabei war das Antigen der ersten Immunisierung mit "Freund's complete Adjuvant" gemischt. Die zweite und dritte Immunisierung erfolgte in Gegenwart von "Freund's incomplete Adjuvant". Einen Tag vor der Fusion wurden Serumverdünnungen 10^{-1} und 5^{-2} bis 5^{-6} der immunisierten Maus im direkten Radioimmunoassay auf ihre Immunantwort untersucht. Diese Serumverdünnungen zeigten im Gegensatz zum Prä-immunserum eine deutliche Immunantwort und das Vorhandensein Protein A bindender Antikörper (s. Abb. 15). Dieses Antiserum diente später als positive Kontrolle während der Selektion antigen-spezifischer Hybridomkulturen mit dem Radioimmunoassay.

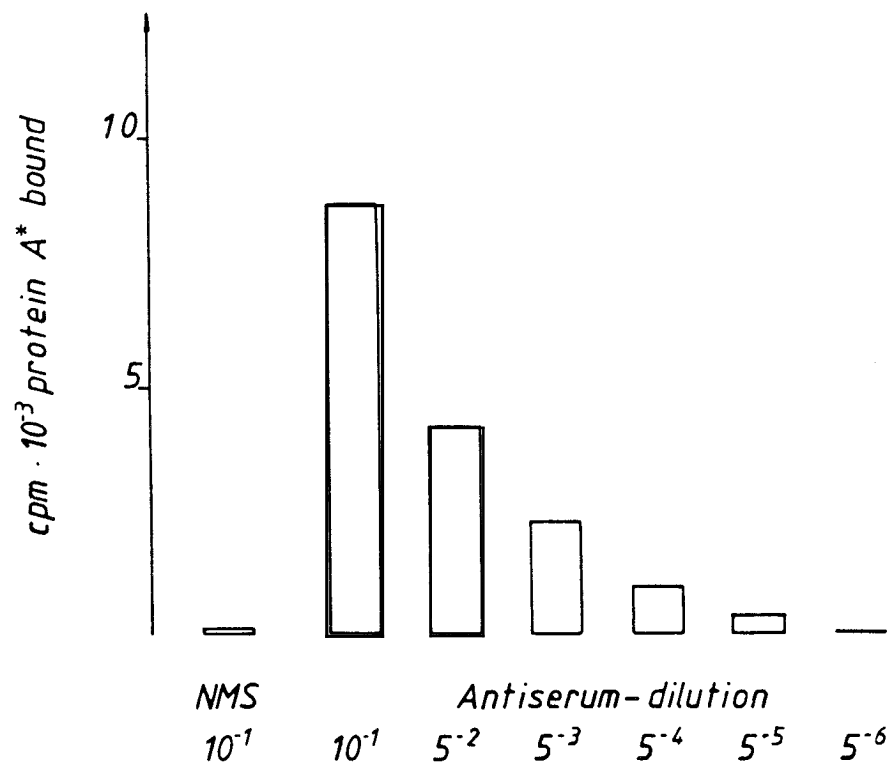


Abb. 15: Direkter Radioimmunoassay auf PVC-Platten mit Prä-immunserum (NMS) und Maus-anti-PDE-Antiserum auf der durch Licht aktivierbaren cGMP abhängigen PDE in PBS-Natriumazid (4 µg/ml).

3.2.3 Ausbeute der "Fusion II"

Die "Fusion II" wurde mit den Lymphozyten einer Milz durchgeführt, wobei das Verhältnis von Lymphozyten zu Myelomzellen bei der Fusion ungefähr 1 : 1 betrug. In 433 mit Feederzellen bereits beschickten Kulturgefäßen wurden je $0,75 \times 10^6$ Zellen gegeben. Die Ausbeute der "Fusion II" kann aus dem folgenden Flußdiagramm abgelesen werden.

433 Kulturgefäße werden
nach der Fusion beschickt



279 Kulturgefäße zeigen
Hybridwachstum



5 Kulturgefäße enthalten
durch RIA selektionierte
antigen-spezifische Hybridkulturen



4 dieser 5 Hybride sind nach weiterer
Kultivierung in Stickstoff lagerbar
und ergeben nach Klonierung 6 ver-
schiedene monoklonale Antikörper

Tabelle 4:

Selektionierte und klonierte Hybridlinien

Hybrid	Antikörperklasse
PDE-1-4-15	μ
PDE-1-39-11	γ_1
PDE-1-89-6	γ_1
PDE-1-89-12	μ
PDE-1-89-20	γ_1
PDE-1-266-8	μ

Bis zu 39 Tage nach der Fusion wurden die angelegten Kulturgefäße beobachtet und wenn nötig mit neuem Selektionsmedium versorgt. Da während dieser Zeit in 279 der 433 Kulturgefäßen (> 37 %) Hybridzellen beobachtet wurden, war Wachstum von mehr als einem antigen-spezifischen Hybrid in einem Kulturgefäß möglich. Ein Kulturgefäß PDE-1-89 wies genau diese Eigenschaft auf. Durch 12 nacheinander durchgeführte Klonierungen des Originalhybrids wurden drei antigen-spezifisch verschiedene monoklonale Antikörper selektioniert. Es handelt sich dabei um die mAK PDE-1-89-6, PDE-1-89-12 und PDE-1-89-20. In Tabelle 4 sind die insgesamt sechs verschiedenen mAK der "Fusion II" mit ihrem Code und der Antikörperklasse aufgeführt. Die Bestimmung der Antikörperklasse wurde wie bei den mAK der "Fusion I" nach dem Ausschlußprinzip durchgeführt.

3.2.4 Feinspezifität von mAK auf verschiedenen nativen und denaturierten Antigenen

1) Alle bisher erstellten RIA-Daten über Bindungsreaktionen der sechs mAK aus "Fusion II" beruhten auf der Verwendung einer im nativen Zustand belassenen PDE-Präparation, die aus mehr als einem Polypeptid bestand (s. Abb. 14). Diese Bindungsreaktionen sind nochmals für zwei verschiedene Ascitesverdünnungen der sechs mAK in Abb. 16 auf der nativen PDE-Präparation zusammengefaßt. Als Kontrolle wurde "X63 Ascites" verwendet. Die Asciten der mAK PDE-1-4-15, PDE-1-89-6, PDE-1-89-12 und PDE-1-266-8 sowie der Kontrollascites X63 lagen in den Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-4} vor. Die Asciten der mAK PDE-1-39-11 und PDE-1-89-20 dagegen wurden in den Verdünnungen 10^{-2} und 10^{-3} getestet. Die Verwendung der angegebenen Verdünnungsstufen wurde durch Vortests nahegelegt.

2) Da G_{β} Bestandteil der PDE-Präparation war, wurden die Ascitesverdünnungen als weitere Spezifitätskontrolle auch auf der im nativen Zustand belassenen GBP-Präparation (s. Abb. 8) im indirekten Radioimmunoassay getestet (s. Abb. 17). In diesem Test zeigten die mAK PDE-1-39-11, PDE-1-89-6 und PDE-1-89-20 nur sehr geringe oder gar keine Bindungsreaktionen, während die mAK PDE-1-4-15, PDE-1-89-12 und PDE-1-266-8 deutliche Bindungsreaktionen mit GBP aufwiesen.

3) Für eine weitere Charakterisierung der Feinspezifität der mAK wurden die beiden Antigenpräparationen PDE und GBP mit SDS denaturiert (s. 2.1.4.3) und anschließend mit den Ascitesverdünnungen nochmals im indirekten Radioimmunoassay getestet.

Die denaturierte PDE-Präparation als Antigen zeigte stärkere Bindungsreaktionen für die mAK PDE-1-39-11, PDE-1-89-6 und PDE-1-89-20 und gleich gute Bindungsreaktionen der mAK PDE-1-4-15, PDE-1-89-12 und PDE-1-266-8 in Relation zur nativen PDE-Präparation (s. Abb. 18). Genau anders verhielten sich die Bindungsreaktionen der mAK bei Verwendung der denaturierten GBP-Präparation als Antigen. Die guten Bindungsreaktionen der mAK PDE-1-4-15, PDE-1-89-12 und PDE-1-266-8 mit nativem GBP wurden durch die Denaturierung des Proteins reduziert. Keinerlei Einfluß hatte die Denaturierung auf das Reaktionsverhalten der übrigen drei mAK PDE-1-39-11, PDE-1-89-6 und PDE-1-89-20 (s. Abb. 19).

4) Welchen Einfluß die Spaltung von möglichen S-S Brücken innerhalb eines Polypeptides durch die reduzierende Substanz Mercaptoethanol auf die Antigenität hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter betrachtet. Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte weiterhin sichergestellt werden, daß eine Charakterisierung der Antikörperspezifität mit der "Western-Blotting-Technik" möglich sein würde.

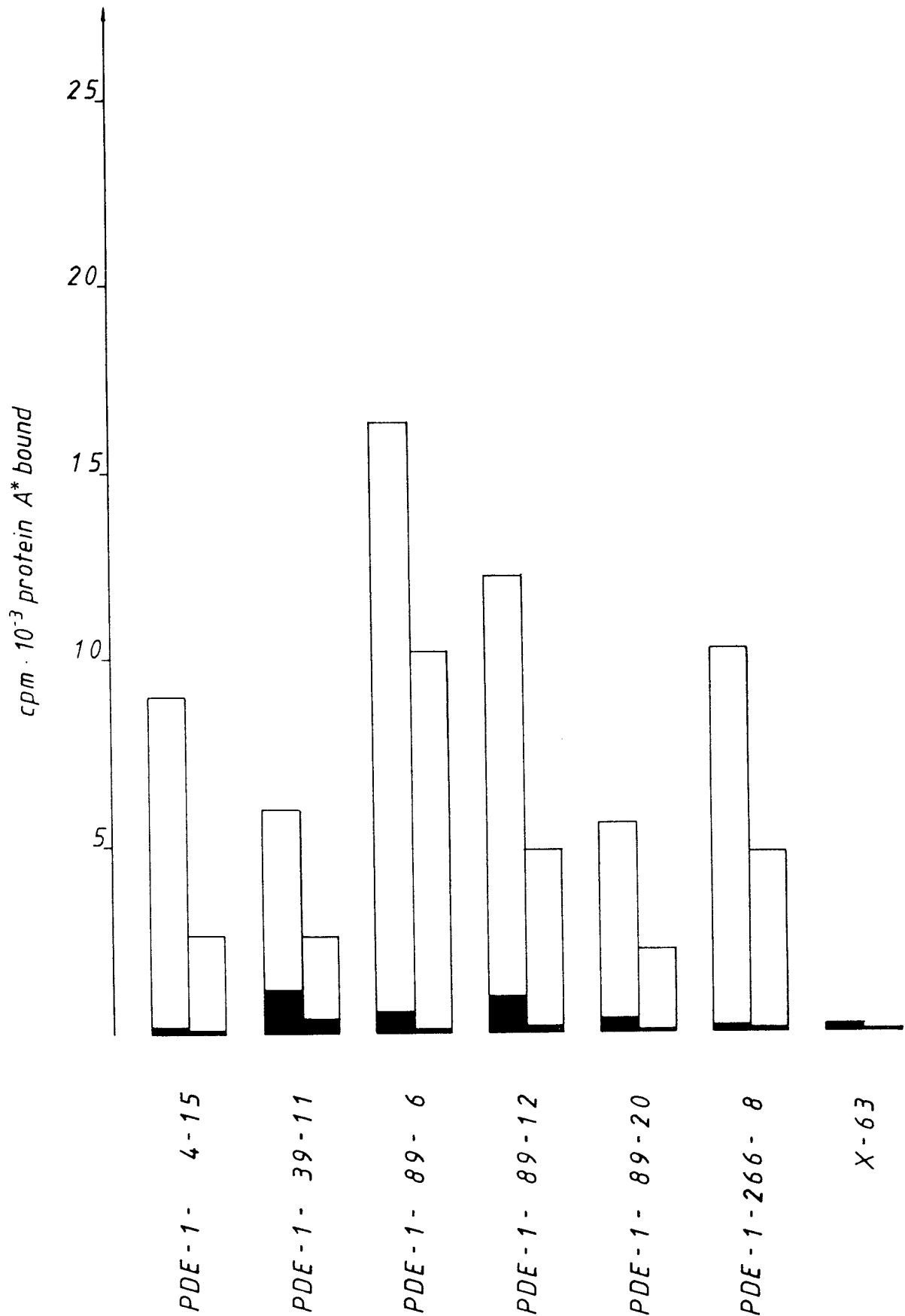


Abb. 16: Indirekter PVC-RIA mit einer nativen PDE-Präparation (s. Abb. 14). Die Konzentration des Antigens betrug 3,8 µg/ml in PBS-Natriumazid. Die Antikörperverdünnungen wurden mit PBS-Natriumazid hergestellt, die 1 % Gelatine enthielt. Schwarz eingezeichnet ist die unspezifische Bindung.

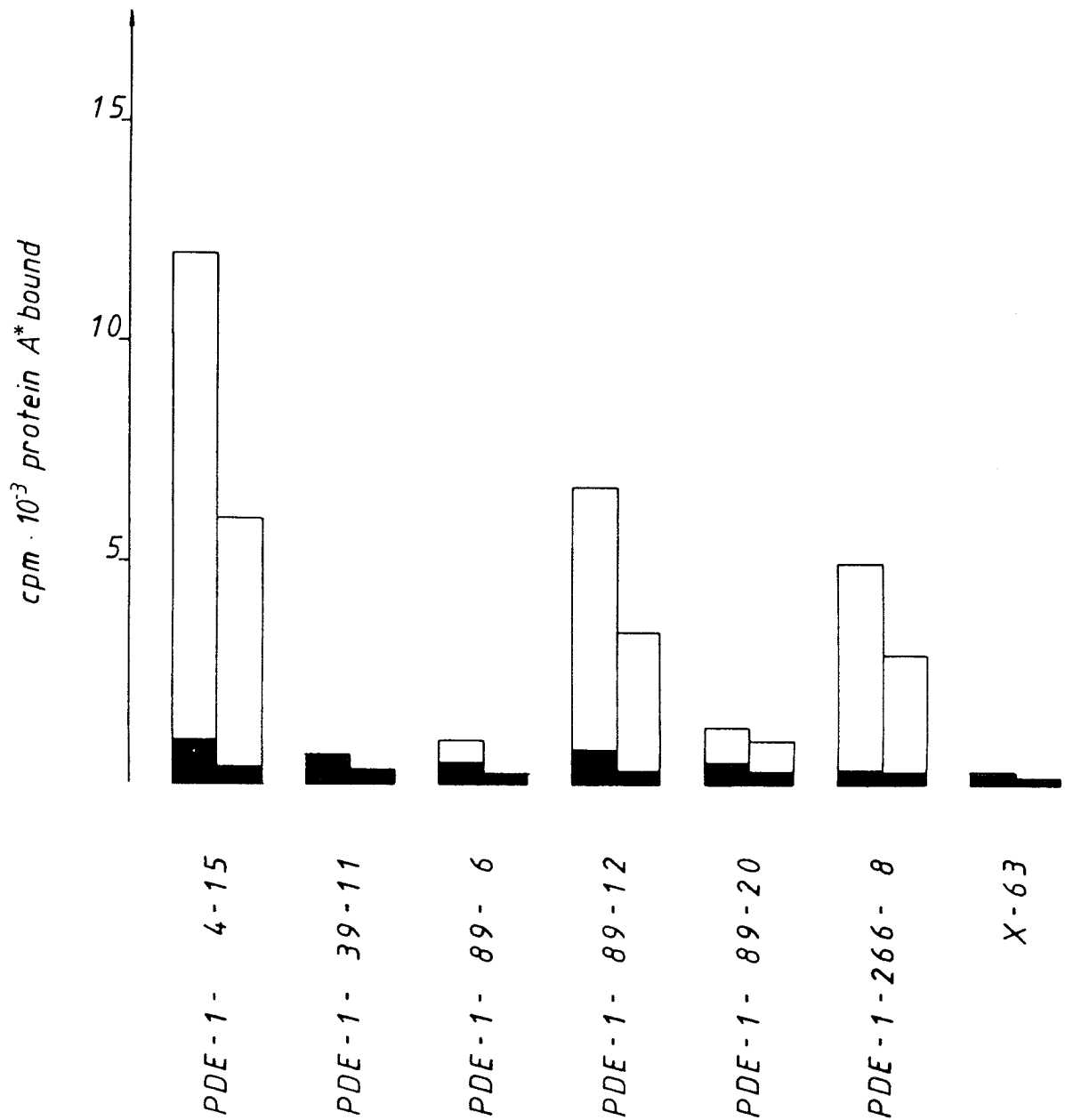


Abb. 17: Indirekter PVC-RIA mit einer nativen GBP-Präparation als Antigen (s. Abb. 8). Die Konzentration des Antigens betrug 1,9 µg/ml in PBS-Natriumazid. Die Antikörperverdünnungen wurden mit PBS-Natriumazid hergestellt, die 1 % Gelatine enthielt. Schwarz eingezeichnet ist die unspezifische Bindung.

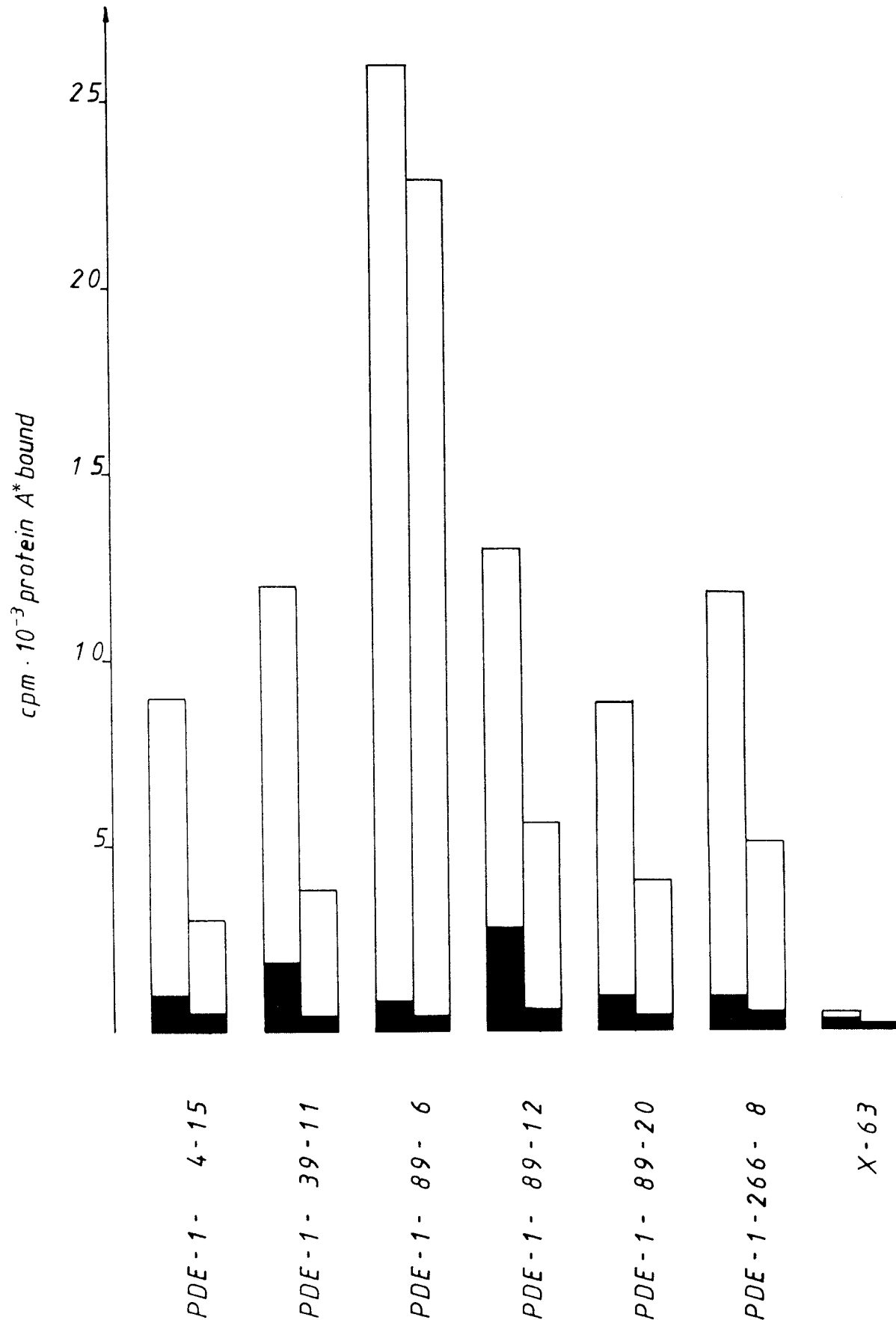


Abb. 18: Indirekter PVC-RIA mit einer PDE-Präparation als Antigen, die zuvor mit SDS-denaturiert worden war (0,1 % SDS Endkonzentration). Die Konzentration des Antigens betrug 3,8 µg/ml. Die Ascitesverdünnungen wurden mit PBS-Natriumazid hergestellt, die 1 % Gelatine enthielt. Schwarz eingezeichnet ist die unspezifische Bindung.

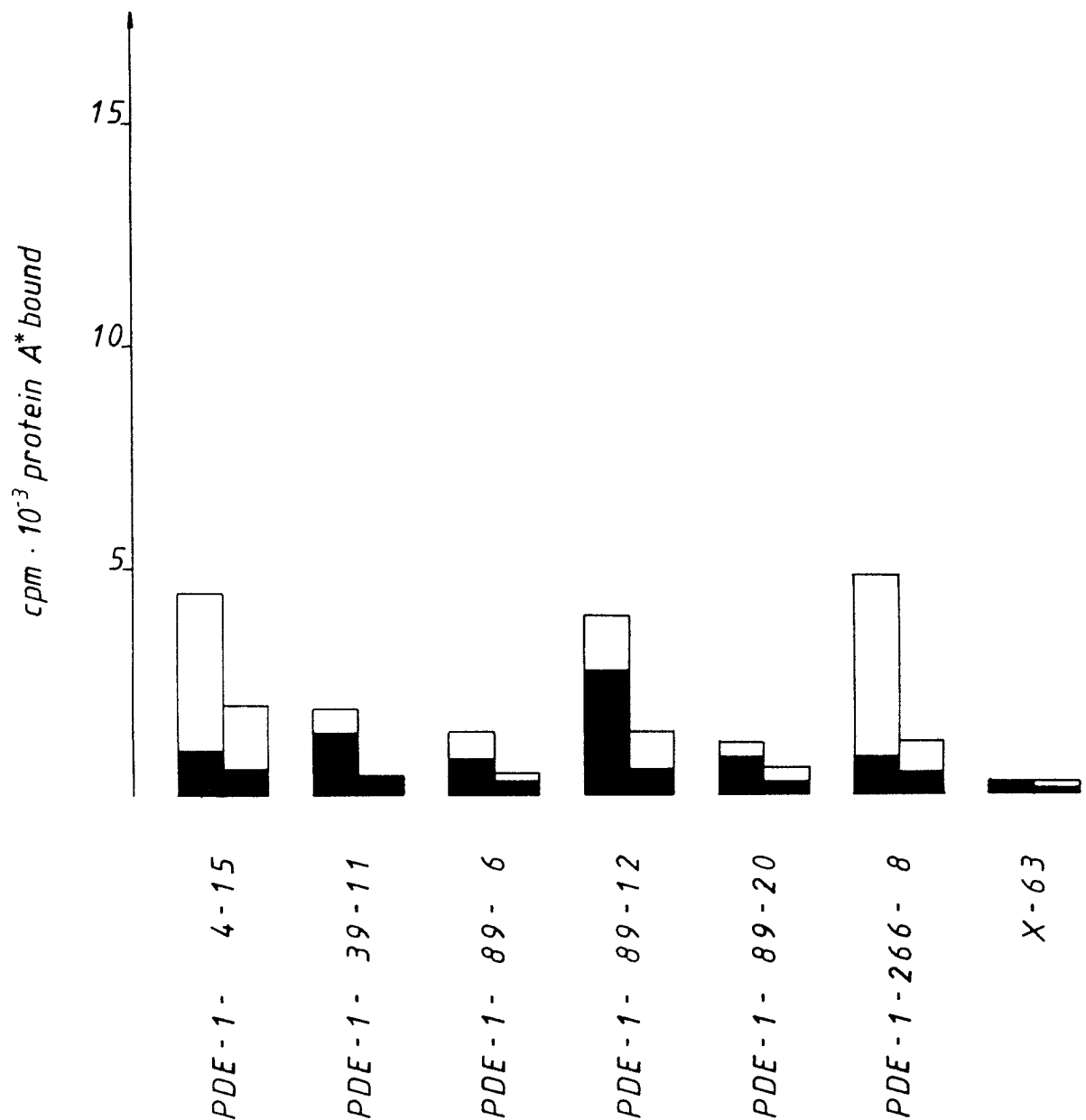


Abb. 19: Indirekter PVC-RIA mit einer GBP-Präparation als Antigen, die zuvor mit SDS-denaturiert worden war (0,1 % SDS Endkonzentration). Die Konzentration des Antigens betrug 1,9 µg/ml. Die Antikörperverdünnungen wurden mit PBS-Natriumazid hergestellt, die 1 % Gelatine enthielt. Schwarz eingezeichnet ist die unspezifische Bindung.

3.2.5 Feinspezifität der isolierten mAK IgM-Antikörper auf verschiedenen isolierten nativen Proteinen

Neben der in 3.2.4 bereits dargestellten Feinspezifität der mAK wurden gegen Ende der Arbeit einige Proteine in ihrem isolierten Zustand verfügbar. Dabei handelte es sich um die beiden schweren Untereinheiten des GBP, G_{α} und G_{β} , und um das 48 Kd-Protein.

Diese drei Proteine wurden im nativen Zustand mit allen kreuz-reagierenden mAK aus Fusion I und II im indirekten Radioimmunoassay getestet (s. Abb. 20 bis 22).

Auffällig ist, daß die isolierten mAK mit G_{β} (verwendete Konzentration 2 $\mu\text{g/ml}$) die stärksten Reaktionen zeigen, gefolgt von G_{α} (verwendete Konzentration 4 $\mu\text{g/ml}$) und 48 Kd (verwendete Konzentration 5 $\mu\text{g/ml}$). Hervorstechend sind bei diesem Vergleich die mAK PDE-1-4-15 und PDE-1-266-8.

Titrationsskurven waren durch die begrenzten Antigenmengen nicht möglich.

Diese Ergebnisse bestätigen die mit der Western-Blotting-Technik erzielten Ergebnisse (s. 3.2.6).

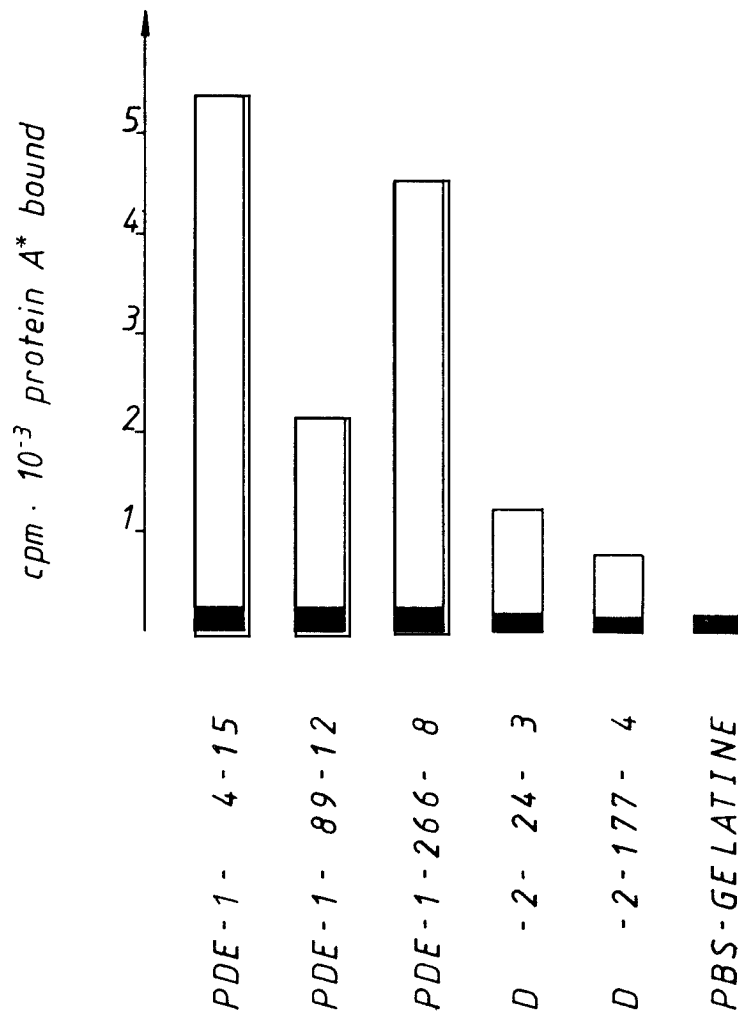


Abb. 20 : Indirekter Radioimmunoassay auf Terasaki-Platten mit gereinigtem GBP_α (4 µg/ml) in PBS-Natriumazid. Alle mAK lagen in nativem, gereinigtem Zustand vor und wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. Die Verdünnungen wurden mit PBS-Natriumazid durchgeführt, die 1 % Gelatine enthielt. Schwarz eingezeichnet ist die unspezifische Bindung.

3.2.6 Charakterisierung der Antikörperspezifität mit der "Western-Blotting-Technik"

Alle bisher erstellten Daten über Bindungsreaktionen der sechs mAK aus der "Fusion II" beruhen auf der Anwendung des Radioimmunoassays. Diese Charakterisierung (s. 3.2.4 und 3.2.5) legt die Vermutung nahe, daß möglicherweise ähnliche Kreuzreaktionen beobachtet werden könnten, wie bei den mAK D-2-24-3 und D-2-177-4. Daher mußten die beteiligten Polypeptide im nativen oder denaturierten Zustand elektrophoretisch aufgetrennt werden, um

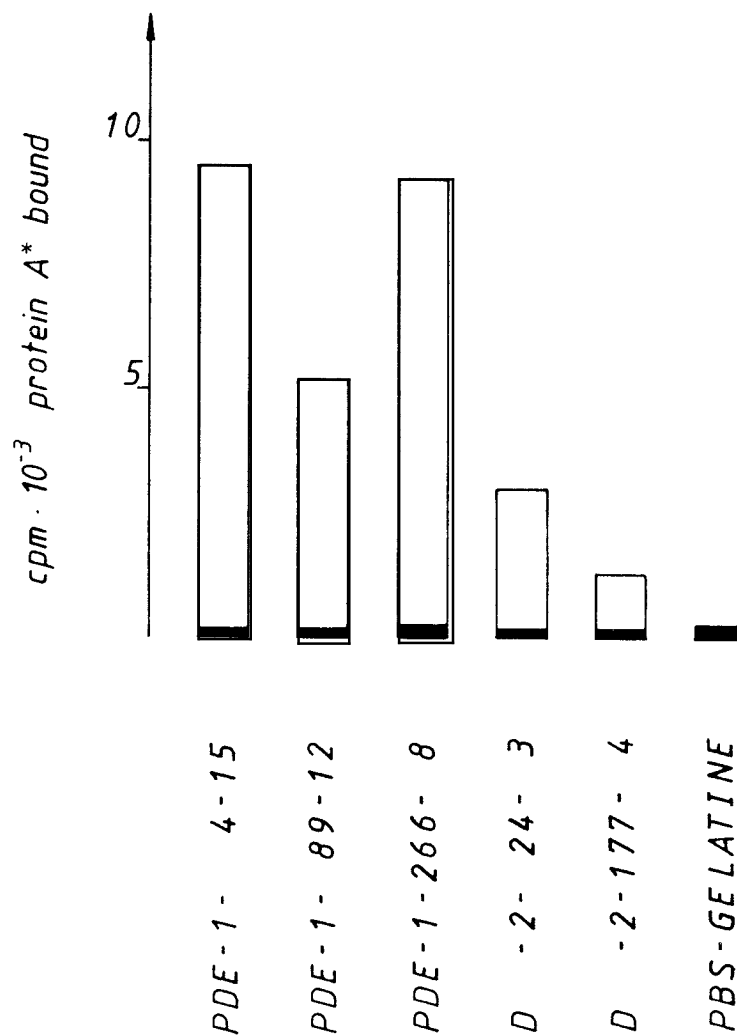


Abb. 21: Indirekter Radioimmunoassay auf Terasaki-Platten mit gereinigtem, nativem GBP β (2 μ g/ml) in PBS-Natriumazid. Alle mAK lagen in gereinigtem Zustand vor und wurden mit einer Konzentration von 10 μ g/ml verwendet. Die Verdünnungen wurden mit PBS-Natriumazid durchgeführt, die 1 % Gelatine enthielt. Schwarz eingezeichnet ist die unspezifische Bindung.

anschließend mit der "Western-Blotting-Technik" eine genauere Spezifitätsbestimmung der mAK durchzuführen. Eine Auftrennung im nativen Zustand wurde mit der Elektrofokussierung und dem nativen Polyacrylamidgel versucht. Die Anwendung beider Techniken für die zu analysierenden Proteine ist problematisch und führte zu keinem befriedigenden Ergebnis.

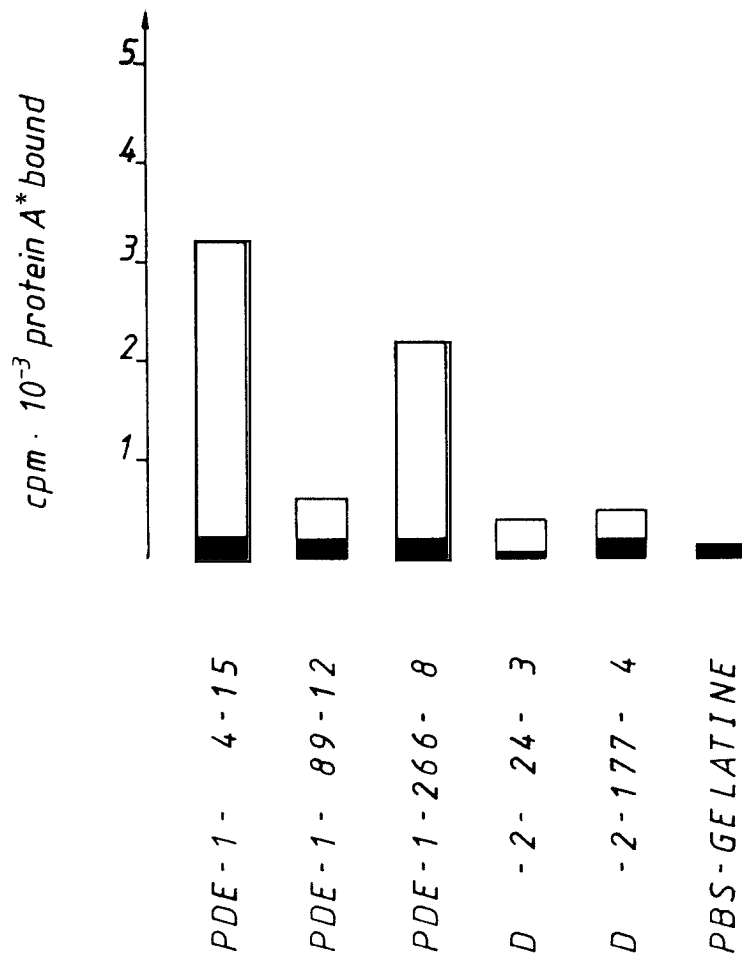


Abb. 22: Indirekter Radioimmunoassay auf Terasaki-Platten mit gereinigtem, nativem 48 Kd Protein (5 µg/ml) in PBS-Natriumazid. Alle mAK lagen in gereinigtem Zustand vor und wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. Die Verdünnungen wurden mit PBS-Natriumazid durchgeführt, die 1 % Gelatine enthielt. Schwarz eingezeichnet ist die unspezifische Bindung.

Um alle möglichen Reaktionen der selektionierten mAK abdecken zu können, wurden entsprechend der "Strategie 2" (s. 3) Extrakte aller peripheren und löslichen Proteine des Rinderaußensegmentes in SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Extraktion der Proteine wurde in 2.1.4.1 beschrieben.

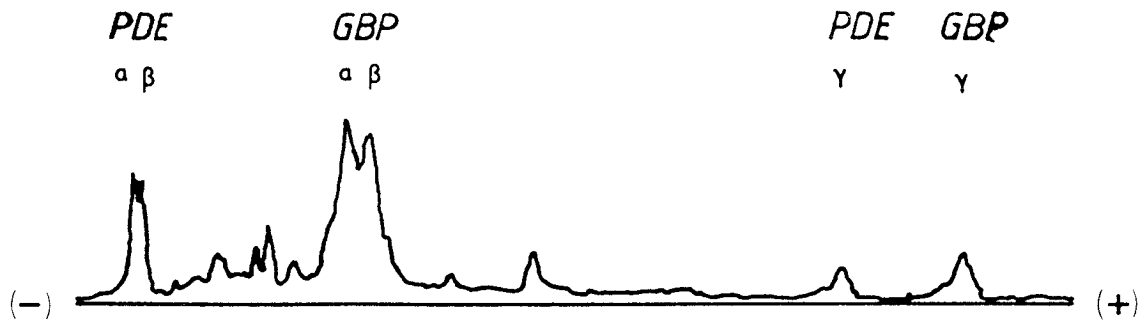


Abb. 23: Densitogramm eines Nitrozellulosekontrollstreifens nach dem Western-Blotting. Dazu wurden 20 μ g Gesamtextrakt aus Rinderauensegmenten in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Ein Kontrollstreifen wurde mit Amido-schwarz 10B angefärbt und anschließend bei 620 nm gescannt.

Eine weitere Voraussetzung für die Charakterisierung der möglicherweise PDE spezifischen mAK war die Auftrennung der beiden schweren Untereinheiten der PDE, α und β , mit einem entsprechenden Gelsystem. Dafür boten sich 15 %ige SDS-Polyacrylamidgele an (Baehr et al., 1979). Für die Auftrennung wurden etwa 20 μ g Gesamtextrakt pro Trog verwendet. In Abb. 23 ist ein so aufgetrennter Gesamtextrakt nach einem Elektrotransfer auf Nitrozellulose und Anfärben mit Amido-Schwarz 10B densitographisch dargestellt. Oberer Rand des Gels ist gleichbe-

deutend mit dem linken Rand des Nitrozellulosestreifens. Die übrigen Nitrozellulosestreifen waren dann Ausgangsmaterial für die Charakterisierung der Antikörperspezifität, deren technische Einzelschritte entsprechend 2.9.3 durchgeführt wurden. Als Nachweisreagenz für eine antigenspezifische Bindung der mAK (Antikörperklasse der schweren Kette γ_1) PDE-1-39-11, PDE-1-89-6 und PDE-1-89-20 wurde ^{125}J -markiertes Schaf-anti-MIg Antiserum benutzt. Bei den mAK PDE-1-4-15, PDE-1-89-12 und PDE-1-266-8 (Antikörperklasse der schweren Kette μ) wurde das monospezifische ^{125}J -markierte Ziege-anti- μ Antiserum benutzt. Bei diesen Experimenten wurde für den Nachweis der Antikörperspezifität verdünnter Ascites (10^{-2} in PBS-Natriumazid, die 1 % Gelatine enthielt) oder unverdünnter Kulturüberstand verwendet. Als Kontrolle diente dabei 10^{-2} verdünnter X63-Ascites oder Kulturüberstand von X63-Myelomzellen.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt, daß die " γ_1 -Antikörper" absolut spezifisch für eine der beiden schweren Untereinheiten der PDE sind. Eine Zuordnung zu einer der beiden schweren Untereinheiten α oder β ist auf Grund der nur leicht differierenden RF-Werte noch nicht abschließend möglich (s. Abb. 24 und 25). Mit den drei für Vertebraten PDE spezifischen mAK wurde versucht, ein ähnliches, möglicherweise kreuzreagierendes Enzym bei Evertebraten zu identifizieren. Dazu wurden die peripheren und löslichen Proteine des Rhabdoms von *Sepia officinalis* in einem 11,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Vandenberg et al., 1984) und anschließend ebenfalls durch Elektrotransfer auf Nitrozellulose immobilisiert.

Als Nachweisreagenz wurde wiederum ^{125}J -markiertes Schaf-anti-MIg Antiserum verwendet. Es konnte bei diesen Versuchen bisher kein Protein bei *Sepia officinalis* identifiziert werden, das mit den mAK PDE-1-39-11, PDE-1-89-6 und PDE-1-89-20 kreuzreagierte.

Ganz anders dagegen verhielten sich die " μ -Antikörper", die nur mit den peripheren und löslichen Proteinen des Stäbchenaußensegmentes von Rinderaugen getestet wurde, PDE-1-4-15, PDE-1-89-12 und PDE-1-266-8. Es lassen sich Bindungsreaktionen nachweisen, die hauptsächlich die beiden schweren Untereinheiten α und β der PDE bzw. die beiden schweren Untereinheiten α und β des GBP betreffen. Bei längeren Expositionen lassen sich noch zusätzliche Reaktionen mit weiteren Proteinen des Stäbchenaußensegmentes von Rinderaugen feststellen. Dies ist möglicherweise ein quantitatives Problem (s. Abb. 24).

Die mit der "Western-Blotting-Technik" feststellbaren Kreuzreaktionen lassen sich teilweise durch Radioimmunoassay-Daten bestätigen. Allerdings scheinen die mAK PDE-1-4-15, PDE-1-89-12 und PDE-1-266-8 möglicherweise besser an natives GBP zu binden (s. 3.2.4, Abb. 16 bis 19 und 3.2.5, Abb. 20 bis 22). Verdünnter X63-Kontrollascites zeigte nur sehr schwache Reaktionen mit den genannten Proteinen. Diese schwachen Reaktionen traten jedoch nicht auf, wenn Kulturmedium verwendet wurde.

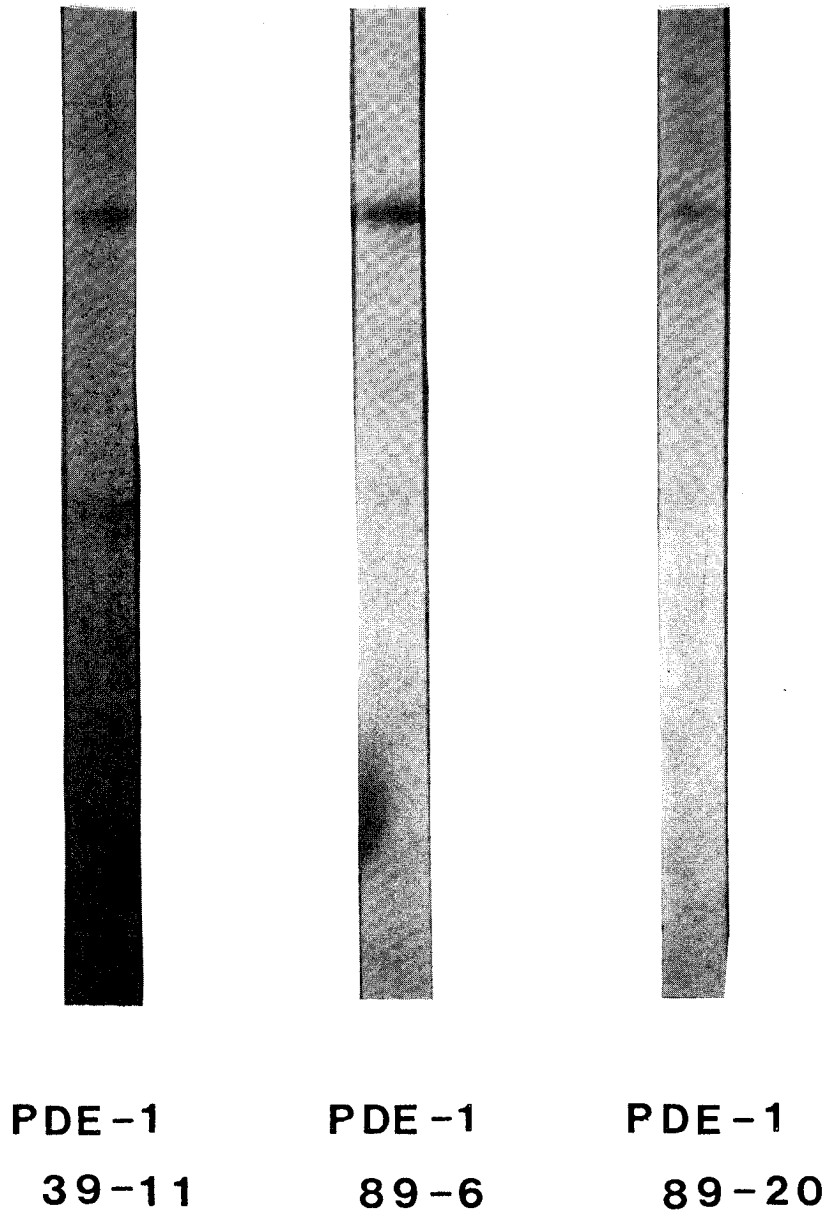


Abb. 24 : Periphere und lösliche Proteine des Rinderaußensegmentes wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (15 %) aufgetrennt und durch Elektrotransfer auf Nitrozellulose immobilisiert. Die weiteren Schritte zur Identifizierung der für die mAK spezifischen Antigene wurden entsprechend 2.9.3 durchgeführt. Es wurden mAK enthaltende Hybridomkulturüberstände verwendet.



Abb. 25.: Periphere und lösliche Proteine des Rinderaußensegmentes wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel 15 % aufgetrennt und durch Elektrotransfer auf Nitrozellulose immobilisiert. Die weiteren Schritte zur Identifizierung der für die mAK spezifischen Antigene wurde entsprechend 2.9.3 durchgeführt. Es wurden mAK enthaltende Asciten verwendet (10^{-2} verdünnt in PBS-Natriumazid, die 1 % Gelatine enthielt).

3.2.7 Ascites-Produktion, Reinigung und Charakterisierung der mAK im Radioimmunoassay

Nach Isolierung und Vermehrung der sechs aus "Fusion II" stammenden Hybridklone wurden sobald als möglich in BALB/c Mäusen Asciten produziert. Für den Nachweis myelomspezifischer Banden wurden die beschriebenen Techniken benutzt (s. 2.8.1). Exemplarisch sind in Abb. 26 die Densitogramme der Ascites PDE-1-89-6 und des Kontrollascites X63 dargestellt. Deutlich erkennbar ist die im Ascites PDE-1-89-6 vorhandene zusätzliche myelom-spezifische Bande. Diese eindeutige Identifizierung ist nicht immer in allen Fällen möglich. Es wurde beobachtet, daß die Myelombanden der mAK PDE-1-39-11 und PDE-1-89-20 nach elektrophoretischer Auftrennung mit der β_2 -Makroglobulinbande die gleiche Position einnehmen. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um relativ saure Myelomproteine (pers. Mitteilung, M. Cramer, Köln). Alle sechs aus "Fusion II" stammenden mAK wurden aus den Asciten gereinigt und im indirekten Radioimmunoassay auf verschiedenen Antigenen titriert. Dabei ergaben sich keinerlei spezifische Reaktionen mit gereinigtem Rhodopsin im Emulvogen. Die drei kreuzreaktiven mAK PDE-1-4-15, PDE-1-89-12 und PDE-1-266-8 wurden auf nativem GBP als Antigen titriert (s. Abb. 27).

Die drei für die cGMP abhängige Phosphodiesterase spezifischen mAK PDE-1-39-11, PDE-1-89-6 und PDE-1-89-20 wurden dagegen auf nativer PDE titriert (Abb. 28).

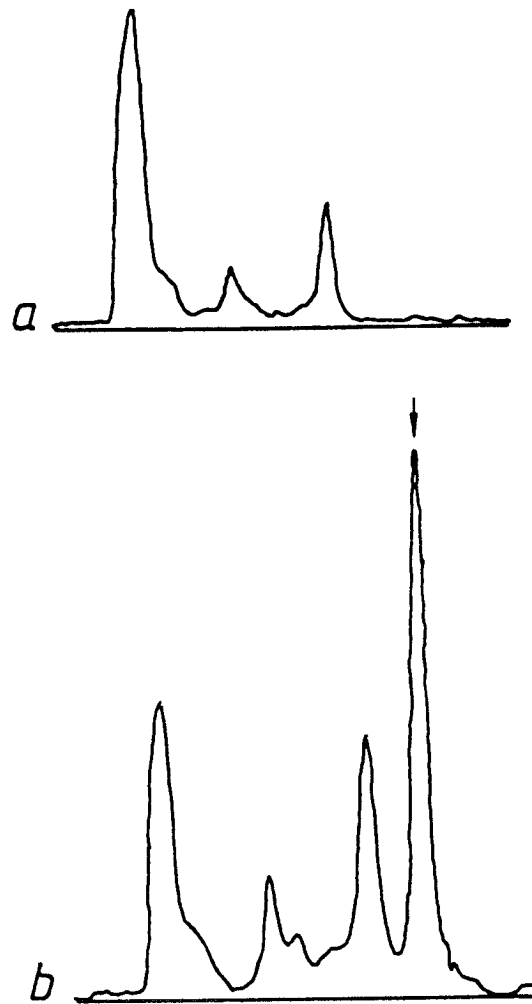


Abb. 26: Mikrozonenelektrophorese in einem fertigen Agarosefilm (Corning, USA) (a) 1 μ l X63 Kontrollascites und (b) 1 μ l PDE-1-89-6 Ascites ($\rightarrow$ Myelombande).

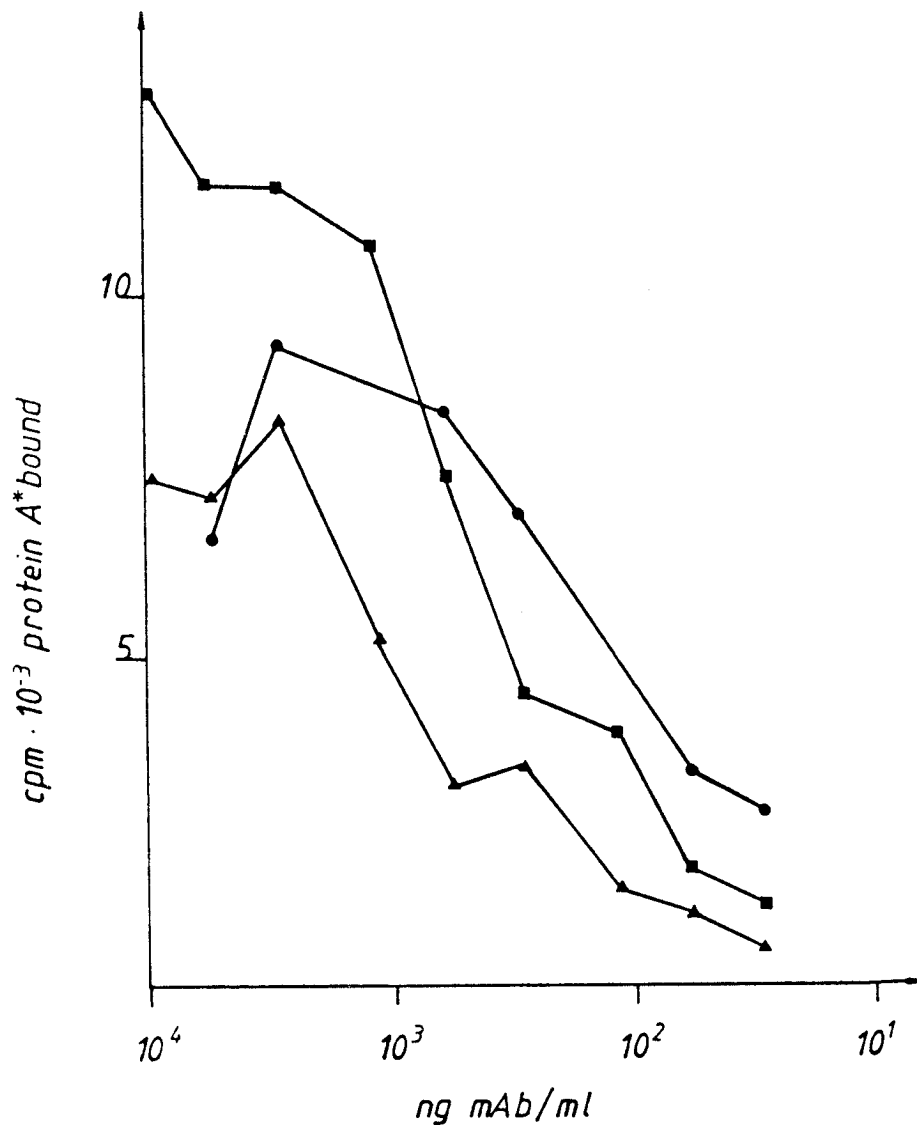


Abb. 27: Indirekter Radioimmunoassay auf PVC-Platten mit GBP (1,9 µg/ml) als Antigen. Die Mittelwerte der unspezifischen Bindungsreaktionen auf PBS-Natriumazid wurden von den Mittelwerten der spezifischen Bindungsreaktionen subtrahiert. Die mAK (▲) PDE-1-4-15, (■) PDE-1-89-12 und (●) PDE-1-266-8 lagen in isolierter Form als Ausgangsmaterial vor und wurden in PBS-Natriumazid verdünnt, die 1 % Gelatine enthielt.

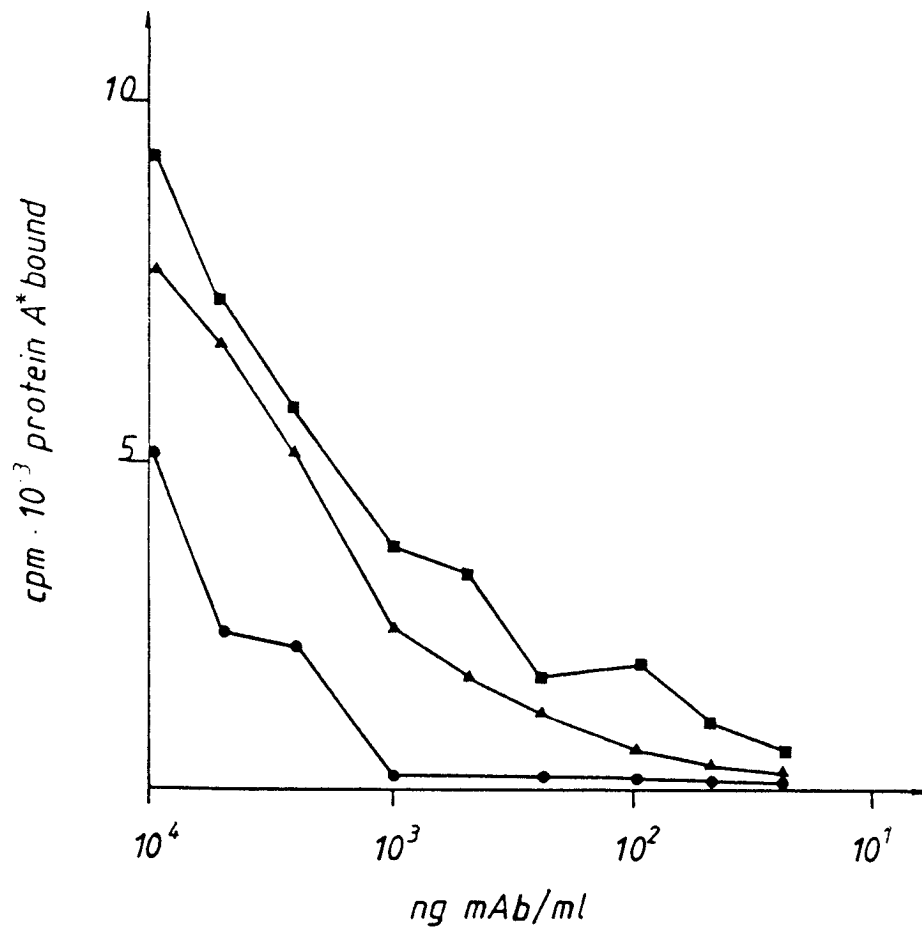


Abb. 28: Indirekter Radioimmunoassay auf PVC-Platten mit PDE (3,8 $\mu\text{g/ml}$) als Antigen. Die Mittelwerte der unspezifischen Bindungsreaktionen auf PBS-Natriumazid wurden von den Mittelwerten der spezifischen Bindungsreaktionen subtrahiert. Die mAK (▲) PDE-1-39-11, (■) PDE-1-89-6 und (●) PDE-1-89-20 lagen in isolierter Form als Ausgangsmaterial vor und wurden in PBS-Natriumazid verdünnt, die 1 % Gelatine enthielt.

3.2.8 Inhibition der durch Licht aktivierbaren cGMP abhängigen Phosphodiesterase des Rinderaußensegmentes

Die mAK PDE-1-39-11, PDE-1-89-6 und PDE-1-89-20 zeigten im indirekten Radioimmunoassay und in der Western-Blotting-Technik spezifische Reaktionen mit der cGMP abhängigen Phosphodiesterase. Mit diesen drei mAK wurde versucht, die Enzymaktivität der Phosphodiesterase, die Hydrolyse von cGMP, zu inhibieren. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit U. Wilden (INB) durchgeführt. Alle präparativen Schritte bzw. Versuchsschritte wurden entweder in vollständiger Dunkelheit oder bei Rotlicht durchgeführt. Die Konzentration an cGMP abhängiger Phosphodiesterase konnte in den vorbereiteten und aliquotierten ROS-Präparationen nur abgeschätzt werden. Daher wurde pro Versuchsansatz ein fünffacher Überschuß an isolierten und gegen PDE-Testpuffer dialysierten mAK dazu gegeben. In die Kontrollen wurden nur entsprechende Volumina des PDE-Testpuffers gegeben. Diese verschiedenen Versuchsansätze wurden für 30 Minuten oder über Nacht auf Eis vorinkubiert. Bei Versuchsbeginn wurden die Präparationen jeweils in eine Küvette pipettiert und mit einer pH-sensitiven Elektrode dann zunächst die bei Dunkelheit durch Hydrolyse von cGMP freigesetzten Protonen gemessen.

Nach wenigen Sekunden wurde dann durch einen Lichtblitz eine definierte Anzahl Rhodopsinmoleküle gebleicht. Im vorliegenden Fall waren dies 0,004 % Rhodopsinmoleküle pro Versuchsansatz.

Die stärksten inhibitorischen Effekte wurden nach Inkubation der Versuchsansätze über Nacht beobachtet. Während die mAK PDE-1-39-11 und PDE-1-89-6 wahrscheinlich keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf die Funktion der cGMP abhängigen Phosphodiesterase zeigten, wurde mit dem mAK PDE-1-89-20 nach Abzug der Dunkelaktivität eine Reduktion der Hydrolyse von cGMP beobachtet, die zwischen 40 % und 50 % lag. In Abb. 29 sind die Messungen der Enzymaktivität mit und ohne mAK und die Dunkelaktivität der PDE dargestellt. Es ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unklar, ob genügend aktiver mAK im Versuchsansatz vorhanden war. Bei einer möglicherweise verbesserten Isolierung und Weiterverarbeitung des mAK PDE-1-89-20, könnte die beobachtete Inhibition der Enzymaktivität unter Umständen verbesserbar sein.

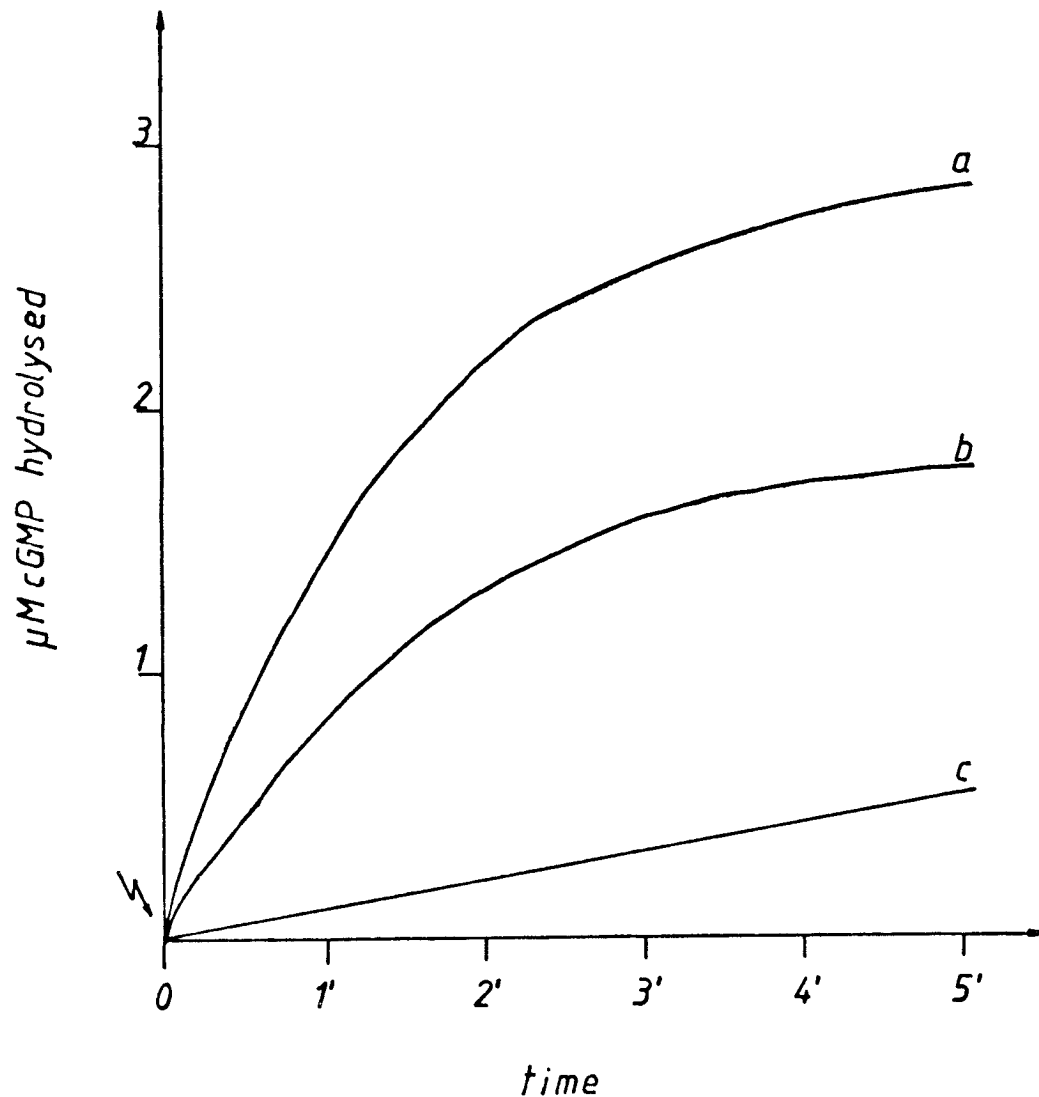


Abb. 29: Inhibition der lichtabhängigen Aktivität der cGMP abhängigen Phosphodiesterase durch den mAK PDE-1-89-20
a) Kurve der Kontrollpräparation nach Belichtung
b) Kurve der Präparation in Gegenwart von mAK PDE-1-89-20
c) Kurve der Dunkelaktivität der ROS-Präparation.
Zeitpunkt der Belichtung.

4. Diskussion

Antikörper sind ein gutes Werkzeug zur Aufklärung von Struktur, Funktion und Lokalisation antigen wirkender Substanzen. Für diesen Zweck eignen sich ganz besonders monoklonale Antikörper (mAK), die nur für eine immunogene Determinante spezifisch sind und durch die von Köhler and Milstein (1975) eingeführte Technik unbegrenzt zur Verfügung stehen.

Es bestand das Interesse, diese Eigenschaften auszunutzen, um über die bisher bekannten Informationen hinaus weitere Daten bezüglich der Proteine zu erhalten, die an den Initialschritten der Reizverarbeitung des visuellen Systems der Vertebraten beteiligt sind. Bei diesen Initialschritten handelt es sich um eine Enzymkaskade, die in ihren wesentlichen Einzelschritten in der Einleitung beschrieben wurden (s. auch Abb. 1).

Im Idealfall sollte ein mAK produziert werden, der eine Determinante funktioneller Bedeutung erkennt und außerdem spezifisch für die cGMP abhängige Phosphodiesterase ist. Eine Funktionsänderung bzw. -bestätigung eines Proteins durch mAK konnte in verschiedenen anderen Systemen bereits erfolgreich gezeigt werden (Clark et al., 1981; Frackelton and Rotman, 1980; Gabuy and Schwarz, 1981; Jay et al., 1981; Kaltoft et al., 1982)

Aus den zwei beschriebenen Fusionen wurden acht mAK antigen-spezifisch selektioniert und in dieser Arbeit näher charakterisiert. Fünf mAK davon zeigen kreuzreaktive Bindungsreaktionen

mit Proteinen des Stäbchenaußensegmentes von Rinderaugen während die übrigen drei mAK spezifisch für die cGMP abhängige Phosphodiesterase sind.

4.1 Kreuzreaktive monoklonale Antikörper

Die aus Fusion I und II isolierten fünf kreuzreagierenden monoklonalen Antikörper D-2-24-3, D-2-177-4, PDE-1-4-15, PDE-1-89-12 und PDE-1-266-8 gehören zur μ -Antikörperklasse.

In der Western-Blotting-Technik lassen sich mit diesen mAK Kreuzreaktionen zwischen den beiden schweren Untereinheiten α und β der PDE und denjenigen des GBP feststellen. Bei längerer Exponierung lassen sich noch zusätzliche Bindungsreaktionen feststellen. Dabei handelt es sich unter anderem um das 48 Kd Protein (Kühn et al., 1984). Die mit der Western-Blotting-Technik beobachteten Bindungsreaktionen konnten zumindest für die isolierten Proteine G_{α} , G_{β} und 48 Kd mit dem Radioimmunoassay bestätigt werden.

Allen diesen Proteinen ist gemeinsam, daß sie Wechselwirkungen mit der cytoplasmatischen Membran oder dem integralen Membranprotein Rhodopsin eingehen.

Da die genannten mAK IgM Antikörper sind, könnte man das Phänomen als IgM spezifisch interpretieren. IgM Antikörper haben einen hohen Karbohydratanteil und bei den Reaktionen könnte es sich um Bindungen von Karbohydraten an die genannten Proteine handeln. Eine unspezifische passive Bindung von Karbohydraten an die genannten Proteine ist jedoch bisher nicht beobachtet worden.

Das beobachtete Phänomen der Kreuzreaktionen monoklonaler Antikörper ist kein Einzelfall. Eine Einführung in die Problematik der Kreuzreaktionen von mAK wird von Lane und Koprowsky (1982) gegeben. In der Literatur werden weiterhin eine Reihe von Beispielen beschrieben, die hier erwähnt werden sollen.

- 1) Bei der Autoimmunerkrankung, des systemischen lupus erythematosus (SLE) reagieren anti-DNA Antikörper mit verschiedenen Zelloberflächenantigenen verschiedener Zelltypen (Jacob et al., 1984) und mit Phospholipiden (Lafer et al., 1984).
- 2) Durch mAK spezifisch für den Katecholamin-Rezeptor lassen sich "antiidiotypische Antikörper" gewinnen. Diese Antikörper können die Aktivität der Adenylatzyklase beeinflussen (Schreiber et al., 1980). Diese Befunde zeigen, daß der Katecholamin-Rezeptor und anti-Katecholamin-Rezeptor Antikörper strukturelle Eigenschaften teilen, um kreuzreagierende Antikörper zu induzieren (Strosberg et al., 1981).
- 3) Hier sollen drei Beispiele von Kreuzreaktionen zusammengefaßt werden. Dulbecco et al. (1981) berichteten über einen mAK der Kreuzreaktionen zwischen dem Thy-1-Antigen, einem Glykoprotein der T-Lymphozyten und einem intermediären Filamentprotein des Zytoskeletts zeigt.

Pruss et al. (1981) und Dellagi et al. (1982) beschrieben einen mAK der verschiedene biochemische und immunologische Klassen der intermediären Filamentproteine erkennt.

Bloze et al. (1982) beschrieben einen mAK, der mit vimentin und tropomyosin kreuzreagiert.

- 4) Die bisherigen Beispiele stammen alle aus fremden Systemen. Inzwischen gibt es jedoch auch eine Publikation über kreuzreagierende mAK spezifisch für Proteine des Stäbchenaußensegmentes von Rinderaugen (Witt et al., 1984).

Zwei mAK zeigten Kreuzreaktionen zwischen zwei Proteinen, deren Funktion bisher jedoch noch nicht identifiziert werden konnte.

Dieses Kapitel sollen einige Spekulationen bezüglich der eigenen kreuzreagierenden Antikörper und der sich daraus ergebenden Versuchsansätze abschließen.

Es bestehen zwei Alternativen:

- 1) Die Kreuzreaktivität ist eine Eigenschaft der Antigenbindungsstelle, und ist rein zufällig, da gleiche Probleme auf gleiche Art gelöst werden. Es wäre nämlich durchaus denkbar, daß kleine Bereiche der peripher an die cytoplasmatische Seite der Membran und/oder dem Rezeptor-Protein Rhodopsin bindenden Proteine identisch oder zumindest ähnlich sind. Als Funktion solcher Bereiche sind Anheftungs- bzw. Bereitstellungsmechanismen für Proteine denkbar, wie sie bereits für Membranproteine gefunden wurden (Sabatini et al., 1982; Walter and Blobel, 1981; Wickner, 1980).

Diese Hypothese ließe sich testen, indem gereinigte Antikörper mit gewaschenen photosensorischen Membranen des Stäbchenaußensegmentes und den entsprechenden Protein-Fraktionen unter Bedingungen inkubiert werden, unter denen normalerweise die Proteine an die photosensorische Membran binden. Als Ergebnis sollte dann keinerlei oder

eine reduzierte Bindung an die Membran feststellbar sein.

- 2) Die zweite und weitergehende Alternative wäre, das ähnliche Bereiche bzw. Sequenzen bei den Proteinen vorliegen. Dies kann erst durch Sequenzanalysen der beteiligten Gene bzw. der durch sie codierten Proteine geklärt werden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, ob sich die Kreuzreaktionen der mAK auch mit anderen Mitgliedern der GBP-Genfamilie beobachten lassen (Abood et al., 1982; Gilman and Manning, 1983; Gilman, 1984; Houslay, 1983, 1984). Auf diese Möglichkeit weisen Untersuchungen hin, die nach Aminosäurezusammensetzung fragen. Hier scheinen alle untersuchten Mitglieder der GBP-Genfamilie zumindest in der β -Untereinheit nahezu identisch zu sein (Manning and Gilman, 1983).

4.2 Feinspezifität der charakterisierten mAK auf nativen und SDS denaturiertem Antigen

Sieben mAK wurden nicht nur auf nativen Antigenpräparationen im Radioimmunoassay getestet, sondern auch mit SDS denaturierten Antigenpräparationen. Diese Versuche wurden durchgeführt, um eine erfolgreiche Charakterisierung der mAK mit der Western-Blotting-Technik unter denaturierenden Bedingungen sicherzustellen. Bei diesen Tests wurden folgende interessante Bindungsreaktionen beobachtet, die möglicherweise auf verschiedene Gruppen von immunogenen Determinanten hinweisen.

Gruppe I

Der mAK D-2-24-3 reagiert mit nativen und denaturiertem GBP etwa gleich gut. Anders dagegen verhält sich die Bindung des mAK D-2-24-3 an PDE. Im nativen Zustand läßt sich zwar eine geringe Bindungsreaktion nachweisen, die aber auf eine Verunreinigung der PDE mit der β -Untereinheit des GBP zurückführbar sein könnte. Die starke Bindungsreaktion an denaturierte PDE läßt sich allerdings damit nicht alleine erklären. Es müssen zusätzliche Determinanten für den mAK zugänglich geworden sein. Dies läßt sich durch die Western-Blotting-Technik bestätigen.

Gruppe II

Die mAK PDE-1-4-15, PDE-1-89-12 und PDE-1-266-8 charakterisieren möglicherweise Determinanten, die sich genau umgekehrt wie Gruppe I verhalten. Diese drei Antikörper reagieren mit nativer und denaturierter PDE etwa gleich gut. Dafür ändert sich ihr Verhalten gegenüber GBP. Eindeutig zeigt sich dies mit dem mAK PDE-1-4-15, der verminderte Reaktionen mit GBP im denaturierten Zustand aufweist. Die beiden anderen mAK lassen diesen Schluß nicht eindeutig zu. Eine verminderte Bindungsreaktion mit denaturiertem GBP als Antigen steht im Gegensatz zu den beobachteten Bindungsreaktionen der drei PDE-spezifischen mAK.

Gruppe III

Die mAK PDE-1-39-11, PDE-1-89-6 und PDE-1-89-20 charakterisieren möglicherweise eine dritte Gruppe von antigenen Determinanten. Diese drei mAK sind spezifisch für die PDE und reagieren mit dem SDS-denaturierten Protein besser als mit dem nativen Protein, d.h. die Zugänglichkeit des Antigens für die Antikörper ist verbessert worden. Dies ist besonders interessant, da das Antigen bei der Immunisierung im nativen Zustand vorlag. Ob dies auch eine Bedeutung für die Funktion der PDE hat, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht entschieden werden.

4.3 Monospezifische monoklonale Antikörper

Die monoklonalen Antikörper PDE-1-39-11, PDE-1-89-6 und PDE-1-89-20 zeigen im Radioimmunoassay und in der Western-Blotting-Technik spezifische Bindungsreaktionen für die cGMP-abhängige Phosphodiesterase. Mit diesen drei Antikörpern konnte sichergestellt werden, daß es möglich ist, Antikörper mit "Monospezifität" für Proteine des Stübchenaußensegmentes zu produzieren.

Die Antikörperklassenbestimmung ergab nach dem Ausschlußprinzip für die schwere Kette der Antikörper die Klasse γ_1 . Daß es sich um γ_1 Antikörper handelt, wird durch die Art der quantitativen Isolierungsmethode erhärtet (Ionenaustauscherchromatographie).

Aus folgenden Versuchsergebnissen läßt sich ableiten, daß es sich um drei verschiedene monoklonale Antikörper handelt.

- 1) In der Mikrozonenelektrophorese besitzen die myelom-spezifischen Banden der mAK PDE-1-39-11 und PDE-1-89-20 zwar gleiche Mobilitäten, jedoch unterscheiden sich beide mAK funktionell (s. unten). Die Mobilität des mAK PDE-1-89-6 ist von den beiden genannten mAK verschieden.
- 2) Die antigen-spezifischen Bindungsreaktionen der isolierten mAK im Radioimmunoassay sind unterschiedlich (s. Abb. 27 und 28). Die Spezifität der drei mAK wurde nicht nur mit Hilfe des Radioimmunoassays sondern auch mit der Western-Blotting-Technik festgestellt. Welche der beiden schweren Untereinheiten der cGMP abhängigen Phosphodiesterase α oder β von diesen Antikörpern erkannt wird, kann auf Grund der geringen Unterschiede in den RF-Werten von α - und β -Untereinheiten auf Nitro-Zellulose nicht sicher festgelegt werden.

Die Lokalisation der erkannten antigenen Determinanten ist von besonderer Bedeutung, wenn es sich bei dem untersuchten Protein um ein Enzym handelt, das aus mehr als einer Polypeptidkette besteht. Wenn ein mAK einen Einfluß auf die Funktion des Enzymes hat, kann möglicherweise eine Verbindung zwischen dem aktiven Zentrum des Enzyms und dessen Lokalisierung durch den mAK hergestellt werden. Im vorliegenden Fall wurde daher mit den drei spezifischen isolierten mAK versucht, die Funktion des Enzyms zu beeinflussen. Während die mAK PDE-1-39-11 und PDE-1-89-6 die Funktion der PDE garnicht oder nur geringfügig beeinflussten, reduziert der mAK PDE-1-89-20 die Freisetzung von Protonen zwischen 40 % und 50 %. Damit stellt dieser mAK den Idealfall dar und erfüllt das wichtigste Ziel dieser Arbeit.

In den Rhabdomen von Evertebratenaugen (*Sepia officinalis*) konnte bisher kein Protein nachgewiesen werden, das mit diesen drei mAK mit der Western-Blotting-Technik reagierte. Dafür gibt es mehrere Interpretationsmöglichkeiten:

- 1) Diese drei mAK erkennen nur PDE des Stäbchenaußensegmentes und sind daher Vertebraten spezie-spezifisch. Da das Peptidmuster von verschiedenen Stäbchenaußensegment-spezifischen Phosphodiesterasen der Vertebraten jedoch nahezu identisch ist (Takemoto et al., 1984), kann durchaus davon ausgegangen werden, daß die erkannten immunogenen Determinanten auch auf anderen Phosphodiesterasen anderer Vertebraten-Stäbchenaußensegmente vorhanden sind.
- 2) Evertebraten PDE besitzt diese Determinanten nur im nativen Zustand. Dies sollte durch Radioimmunoassays feststellbar sein.
- 3) Evertebraten besitzen kein vergleichbares Enzym. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da der Spiegel an cGMP während der Belichtung im Rhabdom ansteigt (Saibil, 1984).
- 4) Evertebratenaugen besitzen ein vergleichbares Enzym, das jedoch ein integrales Membranprotein ist. Dies könnte durch die Verwendung von photosensorischen Membranen in der Western-Blotting-Technik untersucht werden.

Im folgenden Abschnitt soll die beobachtete Beeinträchtigung der Enzymaktivität (Hydrolyse von cGMP) mit ihren möglichen Auswirkungen auf die Reizverarbeitung des visuellen Systems diskutiert werden.

Nach den bisherigen Vorstellungen wird davon ausgegangen, daß es einen linearen biochemischen Reaktionsweg gibt, der mit der Belichtung des Rhodopsins beginnt. Die dabei auftretende Konformationsänderung führt zur Interaktion mit GBP. Nach Aktivierung des GBP bindet die α -Untereinheit in ihrer GTP-Form die γ -Untereinheit, den Inhibitor der PDE. Durch Entfernung dieses Inhibitors wird die PDE aktiviert und sie kann nun cGMP abbauen.

Diese Funktion der PDE hat in jüngster Zeit wieder verstärkt Beachtung gefunden.

Zum einen konnte gezeigt werden, daß durch Veränderung des Gehaltes an cGMP die Aktivität einer cGMP abhängigen Kinase im Außensegment von Vertebratenaugen beeinträchtigt wird. Die Aktivitätsbeeinträchtigung der Kinase führt beim Frosch zur Dephosphorylierung von zwei Proteinen (Komponente I und II) mit dem MG von 12 KD und 14 KD (Hermolin et al., 1982; Polans et al., 1974).

Die Bedeutung dieser Beobachtung ist noch unbekannt. Feststellbar war dieses Ergebnis erst durch das Unterbrechen des biochemischen Reaktionsweges durch mAK, die spezifisch für GBP_α sind. Diese und weitere mAK für verschiedene Komponenten des biochemischen Reaktionsweges wurden von Witt et al. (1984) und Hamm and Bownd (1984) charakterisiert. Der mAK PDE-1-89-20 unterbricht den biochemischen Reaktionsweg einen Schritt weiter und inhibiert die cGMP abhängige Phosphodiesterase.

Mit diesem mAK ist es möglich, Auswirkungen von cGMP direkt

zu untersuchen. Dies gewinnt besondere Bedeutung durch die Beobachtung einer direkten Beteiligung von cGMP an der Regulation der lichtabhängigen Natriumkanäle. Dies konnte durch "patch-clamp-Versuche" nachgewiesen werden (Fesenko et al., 1985). Mit diesen von Fesenko et al. durchgeführten Versuchen konnte eine der beiden in der Einleitung erwähnten Hypothesen wahrscheinlicher gemacht werden. Der Nachweis einer direkten Regulationswirkung von cGMP und die Bedeutung der lichtaktivierten cGMP abhängigen Phosphodiesterase. Diese Versuche und ihre Bedeutung für den Transduktionsmechanismus im Stäbchenaußensegment von Vertebratenaugen ist ausführlich von J. Altman (1985) und Lewin (1985) diskutiert worden.

5. Zusammenfassung

Periphere und lösliche Proteine des Stäbchenaußensegmentes von Rinderaugen wurden als Antigen für die Produktion von Hybridomen verwendet. Mit isolierten oder angereicherten Proteinpräparationen von Transducin (GBP) oder der cGMP abhängigen Phosphodiesterase (PDE) wurden acht Hybridklone selektioniert. Die Spezifitätsbestimmung der von den Hybridklonen produzierten monoklonalen Antikörper (mAK) erfolgte mit Hilfe des Radioimmunoassays und der Western-Blotting-Technik. Es wurden dafür mAK enthaltende Kulturüberstände, Asciten oder isolierte mAK verwendet.

Drei mAK (γ_1 -Klasse) zeigen spezifische Bindungsreaktionen mit der PDE von Stäbchenaußensegmenten von Rinderaugen. Einer dieser Antikörper inhibiert die Enzymaktivität der PDE (Hydrolyse von cGMP) zwischen 40 % und 50 %. Proteinpräparationen von Evertebraten Photorezeptorzellen (*Sepia officinalis*) reagieren mit den drei PDE-spezifischen mAK nicht.

Fünf mAK (μ -Klasse) zeigen Kreuzreaktionen mit mehreren verschiedenen peripheren und löslichen Proteinen des Stäbchenaußensegmentes von Rinderaugen. Diese wurden durch zwei verschiedene Kriterien bestätigt.

- 1) Verwendung von angereicherten und isolierten Proteinpräparationen des Stäbchenaußensegmentes im Radioimmunoassay.
 - 2) Benutzung von Extrakten peripherer und löslicher Proteine des Stäbchenaußensegmentes in der "Western-Blotting-Technik".
- Alle durch diese mAK erkannten Proteine gehen Interaktionen mit der photosensorischen Membran von Stäbchenaußensegmenten von Rinderaugen ein.

Von sieben mAK wurde weiterhin das Bindungsverhalten an native und SDS-denaturierte Präparationen von Transducin-(GBP)- und PDE-Präparationen mit Hilfe des Radioimmunoassays untersucht. Es lassen sich dabei drei verschiedene Reaktionstypen feststellen, die in der Arbeit näher beschrieben werden.

6. Literaturverzeichnis

- Altman, J. (1985)
New visions in photoreception.
Nature, Vol. 313, 264-265
- Abood, M.E., Hurley, J.B., Pappone, M.C., Bourne, H.R.,
Stryer, L. (1982)
Functional homology between signal-coupling proteins.
J. Biol. Chem. 257 (18), 10540-10543
- Baehr, W., Devlin, M.J., Applebury, M.L. (1979)
Isolation and characterization of cGMP phosphodiesterase
from bovine rod outer segments.
J. Biol. Chem. 254 (22), 11669-11677
- Bio-Rad Laboratories, Chemical Division
Product-Information 2060E, 1978
Radioiodination of proteins with enzymobeads
- Bloze, S.H., Matsumura, F., Lin, J.J.C. (1981)
Structure of vimentin 10 nm filaments probed with a
monoclonal antibody that recognizes a common antigenic
determinant on vimentin and tropomyosin.
C.S.H. Symposia on Quantitative Biology Vol. XLVI,
Organization of the Cytoplasm, 455-463
- Boime, I., Aviv, H., Leder, P. (1971)
Protein synthesis directed by lucephalomyocarditis
virus RNA: II. The in vitro synthesis of high molecular
weight proteins and elements of the viral capsid.
B.B.R.C. 45, 789-795
- 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
- Buzdygon, B.E., Liebman, P.A. (1984a)
Bovine Serum Albumin inhibits interaction of GTP-
binding protein with metharhodopsin II
ARVO Abstract
- Buzdygon, B.E., Liebman, P.A. (1984b)
Albumin inhibition of light activation of cGMP-
phosphodiesterase
ARVO Abstract
- Carpenter, G., Cohen, S. (1979)
Epidermal growth factor.
Ann. Rev. Biochem, 48, 193-216

- Carpenter, G. (1984)
Properties of the receptor for epidermal growth factor
Cell, Vol. 37, 357-358
- Clark, R., Lane, D.P., Tjian, R. (1981)
Use of monoclonal antibodies as probes of simian virus
40 T antigen ATPase activity.
J. Biol. Chem. 256 (22) 11854-11858
- Colombatti, A. (1982)
Monoclonal antibodies: A powerfull tool in studies on
cell surface structure and composition.
Basic and Applied Histochemistry 26, Supp. XXIII-XXIV
- Daemen, F.J.M. (1973)
Vertebrate rod outer segment membranes.
Biochim. Biophys. Acta, 300, 255-288
- Dratz, E.A., Hargrave, P.A. (1983)
The structure of rhodopsin and the rod outer segment
disc membrane.
TIBS Apr. 128-131
- Dellago, K., Bronet, J.C., Perveau, J., Paulin, D. (1982)
Human monoclonal IgM with autoantibody activity against
intermediate filaments.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 446-450
- Dubbecco, R., Unger, M., Bologna, M., Battifora, H.,
Syka, P., Okada, S. (1981)
Crossreactivity between Thy-1 and a component
of intermediate filaments demonstrated using a monoclonal
antibody.
Nature, 292, 772-774
- Edwards, P.A.W. (1981)
Some properties and applications of monoclonal
antibodies.
Biochem. J. 200, 1-10
- Eisenbarth, G.S. (1981)
Application of monoclonal antibody techniques to
biochemical research.
Anal. Biochem. 111, 1-16
- Fazekas De St. Groth, S., Scheidegger, D. (1980)
Production of monoclonal antibodies: Strategy and
tactics.
J. Imm. Meth. 35, 1-21

Fesenko, E.E., Kolesmikow, S.S., Lynbarsky, A.L. (1985)
Induction by cyclic GMP of cationic conductance in
plasma membrane of retinal rod outer segment.
Nature, 313, 310-313

Frackelton, A.R. jr., Rotman, B. (1980)
Functional diversity of antibodies elicited by
bacterial β -D-galactosidase. Monoclonal activating,
inactivating, protecting and null antibodies to normal
enzyme.
J. Biol. Chem. 255 (11) 286-290

Fung, B.K.K., Stryer, L. (1980)
Photolysed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP
for bound GDP in retinal rod outer segments.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (5), 2500-2504

Fung, B.K.K., Hurley, J.B., Stryer, L. (1981)
Flow of information in the light-triggered cyclic
nucleotides cascade of vision.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1) 152-156

Gabay, J., Schwartz, M. (1982)
Monoclonal antibody as a probe for structure and
function of an Escherichia coli outer membrane protein.
J. Biol. Chem. 257 (12) 6627-6630

Galfre, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W.
Howard, J.L. (1977)
Antibodies to major histocompatibility antigens produced
by hybrid cell lines
Nature, Vol. 266, 550-552

Gilman, A.G., Manning, D.R. (1983)
The regulatory components of adenylate cyclase and
transducin. A family of structurally homologous
guanine nucleotide binding proteins.
J. Biol. Chem. 258 (11) 7059-7063

Gilman, A.G. (1984)
G-Proteins and dual control of adenylate cyclase.
Cell, 36, 577-579

Godchaux, W.III, Zimmermann, W.F. (1979)
Membrane-dependent guanine nucleotide binding and
GTPase activities of soluble protein from bovine
rod cell outer segments.
J. Biol. Chem. (16) 7874-7884

- Goding, J.W. (1980)
Antibody production by hybridomas.
J. Immunol. Meth. 39, 285-308
- Hagins, W.A. (1972)
The visual process: Excitatory mechanism in the
primary receptor cells.
Ann. Rev. Biophys. Bioenerg. 1, 131-158
- Hamm, H.E., Bownds, M.D. (1984)
A monoclonal antibody to guanine nucleotide binding
protein inhibits the light-activated cyclic GMP
pathway in frog rod outer segments.
J. Gen. Physiol., Vol. 84, 265-280
- Helenius, A., Simons, K. (1975)
Solubilization of membranes by detergents.
BBA 415, 29-79
- Hermolin, J., Karell, M.A., Hamm, H.E., Bownds, M.D. (1982)
Calcium and cyclic GMP regulation of light-sensitive
protein phosphorylation in frog photoreceptor membranes.
J. Gen. Physiol. 79, 633-655
- Hoebeke, J., Durien, O., Delavie, C., Schmitz, A.,
Strosberg, A.D. (1984)
Biochemical and immunological studies of β -adrenergic
receptors on various cell types
in: Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation
research, Vol. 17, ed. P. Greengard et al., Raven Press,
New York
- Houslay, M. (1983)
Cell signalling: Dual control of adenylate cyclase.
Nature, 303, 133
- Houslay, M.D. (1984)
A family of guanine nucleotide regulatory proteins.
TIBS Febr. Vol. 9 (2)
- Hunter, W.M., Greenwood, F.C. (1962)
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone
of high specific activity.
Nature 194, 495-496
- Hunter, W.M. (1982)
Radioimmunoassay
in: Handbook of Experimental Immunology, Chapter 14,
by Weir, D.M.
- Hunter, T. (1984)
The epidermal growth factor receptor gene and its
product.
Nature, 311, 414-416

Jacob, L., Tron, F., Bach, J.F., Louvard, D. (1984)
A monoclonal anti-DNA antibody also binds to cell-
surface proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3843-3845

Jay, G., Khoury, G., DeLeo, A.B., Dippold, W.G., Old, L.J.
(1981)
p 53 transformation-related protein: Detection of an
associated phosphotransferase activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (5), 2932-2936

Kaltoft, K., Nielson, L.S., Zenthen, J., Dan, K. (1982)
Monoclonal antibody that specifically inhibits a human
M 52000 plasminogen-activating enzyme.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3720-3723

Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.
(1979)
A new mouse myeloma cell line that has lost immuno-
globulin expression but permits the construction of
antibody secreting hybrid cell lines.
J. Immunol. Meth. 123 (4), 1548-1550

Knowles, A. (1984)
Phosphodiesterase activation in rod outer segments.
in: Progress in Retinal Reserach, Vol. 3, Chapter 6,
157-184, ed. N.N. Osborne and G.J. Chader

Kohnken, R.E., Eadie, D.M., Revzin, A., McConnell, D.G.
(1981)
The light-activated GTP-dependent cyclic GMP phospho-
diesterase complex of the bovine retinal rod outer
segments. Dark resolution of the catalytic and regulatory
proteins.
J. Biol. Chem. 256 (23) 12502-12509

Kohnken, R.E., Eadie, D.M., McConnell, D.G. (1981)
The light-activated GTP-dependent cyclic GMP phospho-
diesterase complex of bovine retinal rod outer segments.
Reconstitution from catalytic and regulatory proteins
in the presence of membranes depleted of soluble proteins.
J. Biol. Chem. 256 (23) 12510-12516

Köhler, G., Milstein, C. (1975)
Continous cultures of fused cells secreting antibody
of predefined specifity.
Nature, 256, 495-497

Köhler, G., Howe, S.C., Milstein, C. (1976)
Fusion between immunoglobulin-secreting and non-
secreting myeloma cell lines.
Eur. J. Imun. 6, 292-295

- Köhler, G., Milstein, C. (1976)
Derivation of specific antibody-producing
tissue culture and tumor lines by cell fusion.
Eur. J. Immun. 6, 511-519
- Krebs, W., Kühn, H. (1977)
Structure of isolated bovine rod outer segment
membranes.
Exp. Eye Res. 25, 511-526
- Kühn, H. (1978)
Light-regulated binding of rhodopsin kinase and
other proteins to cattle photoreceptor membranes.
Biochem. 17, 4389-4395
- Kühn, H. (1980)
Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and
other proteins with bovine photoreceptor membranes.
Nature 283 (5747) 587-589
- Kühn, H. (1982)
Interactions of rod cell proteins with the disk membrane:
influence of light, ionic strength and nucleotides.
in: Current Topics in Membrane and Transport, Vol. 15,
172-199
- Kühn, H., Hall, S.W., Wilden, U. (1984)
Light-induced binding of 48 k Da protein to photoreceptors
membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin.
FEBS Lett. 176 (2), 473-478
- Laboratory Manual
LKB 2005
Transphor Elektroblotting Unit
- Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly
of the head of bacteriophage T 4.
Nature, 227, 680-685
- Lafer, E.M., Rauch, J., Andrzejewski, jr. C., Mudd, D.,
Furie, B., Furie, B., Schwartz, R.S., Stollar, B.D. (1981)
Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with
polynucleotides and phospholipids.
J. Exp. Med., 153, 897-909
- Lane, D., Koprowski, H. (1982)
Molecular recognition and the future of monoclonal
antibodies.
Nature, 296, 200-202

- Lee, R.H., Brown, B.M., Lolley, R.N. (1981)
Protein kinases of retinal rod outer segments:
Identification and partial characterization of
cyclic nucleotide dependent protein kinase and
rhodopsin kinase.
Biochem., 20, 7532-7538
- Levin, R. (1985)
Research news:
Unexpected progress in photoreception
- Lemke, H., Hämmerling, G.J., Hämmerling, K. (1979)
Time specificity analysis with monoclonal antibodies
of antibodies controlled by the major histocompatibility
complex and by the Qa/Tl. region in mice.
Imun. Rev. 47, 175-206
- Liebman, P.A., Pugh, E.N. jr. (1980)
ATP mediates rapid reversal of cyclic GMP phospho-
diesterase activation in visual receptor membranes.
Nature, 287, 734-736
- Litman, B.J., Aton, B., Hartley, J.B. (1982)
Functional domains of rhodopsin.
Vis. Res. 22, 1439-1442
- Littlefield, J.W. (1964)
Selection of hybrids from matings of fibroblasts
in vitro and their presumed recombinants.
Science 145, 709-710
- Manning, D.R., Gilman, A.G. (1983)
The regulatory components of adenylate cyclase and
transducin. A family of structurally homologous guanine
nucleotide-binding proteins.
J. Biol. Chem. 258 (11) 7059-7063
- Milstein, C. (1981)
12th Sir Hans Krebs lecture: From antibody diversity
to monoclonal antibodies.
Eur. J. Biochem. 118, 429-436
- Moore, G.E., Gerner, R.E., Franklin, H.A. (1967)
Culture of normal human leukocytes.
J.A.M.A. 199, 519-524
- Mullen, E., Akhtar, M. (1981)
Topographic and active-site studies on bovine
rhodopsin.
FEBS Lett. 132 (2) 261-265
- Papermaster, D.S., Schneider, B.G. (1982)
Biosynthesis and morphogenesis of outer segment membranes
in vertebrate photoreceptor cells.
in: Cell Biology of the Eye, Chapter 10, 475-581

- Polans, A.S., Hermolin, J., Bownds, H.D. (1981)
Light-induced dephosphorylation of the protein in frog
rod outer segments. Influence of cyclic nucleotides and
calcium.
J. Gen. Physiol. 74, 595-613
- Pruss, R.M., Mirsky, R., Raff, M.C., Thorpe, R., Dowding, A.M.
Anderton, B.M. (1981)
All classes of intermediate filaments share a common
antigenic determinant defined by a monoclonal antibody.
Cell 27, 419-428
- Saibil, H.R. (1984)
A light-stimulated increase of cyclic GMP in squid
photoreceptors.
FEBS Lett. 168 (2), 213-216
- Sabatini, D.D., Kreibich, G., Morimoto, T., Ademik, M. (1982)
Mechanisms for incorporation of proteins in membranes
and organelles.
J. Cell Biol. 92, 1-22
- Shichi, H., Somers, R.L. (1978)
Light-dependent phosphorylation of rhodopsin. Purification
and properties of rhodopsin kinase.
J. Biol. Chem. 253, 7040-7046
- Sitaramayya, A., Virmaux, N., Mandel, P. (1977)
On a soluble system for studying light activation of rod
outer segment cyclic GMP phosphodiesterase.
Neurochem. Res. 2, 1-10
- Skelley, D.S., Brown, L.P., Besch, P.K. (1973)
Radioimmunoassay (Review).
Clinical Chemistry, 18 (2), 146-186
- Stein, P.J., Rasenick, M.M., Bitensky, M.W. (1983)
Biochemistry of the cyclic nucleotide-related enzymes
in rod photoreceptors.
in: Progress in Retinal Research, Vol. 1, Chapter 8,
227-243, ed. N.N. Osborne, G. Chader
- Stieve, H. (1982)
Biophysik der Photoreption.
in: Biophysik - Ein Lehrbuch, 2. völlig neubearbeitete Auflage,
Springer-Verlag, ed. W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler
- Strosberg, A.D., Courand, P.O., Schreiber, A. (1981)
Immunological studies of hormone receptors of two-way
approach
Immunology Today, 4, 75-79

- Takemoto, L.J., Hansen, J., Farber, D.B., Sonza, B.,
Takemoto, D.J. (1984)
Cyclic GMP phosphodiesterase from bovine retinal.
Evidence for interspecies conservation.
Biochem. J., 217, 124-133
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from poly-
acrylamide gels to nitrocellulose sheets:
Procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (9) 4350-4354
- Vandenberg, C.A., Montal, M. (1984)
Light-regulated biochemical events in invertebrate
photoreceptors: I. Light-activated GTPase guanine
nucleotide binding and cholera Toxin-catalyzed
labeling of squid photoreceptor membranes.
Biochemistry, Engl. Tr. 23 (11) 2339-2346
- Walter, P., Blobel, G. (1981)
Translocation of proteins across the endoplasmic
reticulum. III. Signal recognition protein (SRP)
causes signal sequence-dependent and site-specific
arrest of chain elongation that is released by
microsomal membranes.
J. Cell Biol. 91, 557-561
- White, A.A., Karr, D.B. (1980)
Inhibition of soluble guanylate cyclase by bovine
serum albumin.
J. Cycl. Nucl. Res. 6 (4), 271-282
- Wickner, W. (1980)
Assembly of proteins into membranes.
Science, 210, 861-868
- Wilden, U. (1981)
Experimente zur lichtabhängigen Rhodopsin-Phosphorylierung
an Stäbchenaußensegment-Suspensionen.
Jül-Berichte 1741, Sept. (Dissertation)
- Wilden, U., Kühn, H. (1982)
Light-dependent phosphorylation of rhodopsin:
Number of phosphorylation sites.
Biochem. 21, 3014-3021
- Witt, P.L., Hamm, H.E., Bownds, M.D. (1984)
Preparation and characterisation of monoclonal antibodies
to several frog rod outer segment proteins.
J. Gen. Physiol. 84, 251-263

- Woodruff, M.L., Bownds, M.G. (1979)
Amplitude kinetics, and reversibility of light
induced decreased in guanosine 3',5'-cyclic
monophosphate in frog photon receptor membranes.
J. Gen. Physiol. 73, 629-654
- Yamazaki, A., Stein, P.J., Chernoff, N., Bitensky, M.W.
(1983)
Activation mechanism of rod outer segment cyclic GMP
phosphodiesterase. Release of inhibitor by the GTP/
GTP-binding protein.
J. Biol. Chem. 258 (13), 8188-8205
- Yee, R., Liebman, P.A. (1978)
Light-activated phosphodiesterase of the rod outer
segment. Kinetics and parameters of activation and
deactivation.
J. Biol. Chem. 24, 8902-8909
- 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 notwendigen immunologischen Arbeitstechniken konnte ich während meiner Immunologie-Ausbildung am Institut für Genetik der Universität Köln erlernen. Ein Teil des von mir verwendeten Materials (anti-Immunglobulin-Antikörper, klassenspezifische anti- μ -Antikörper und die Tumorzelllinie X63 Ag 8 653) wurde mir von diesem Institut zur Verfügung gestellt.

Dafür möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Rajewsky und Herrn Dr. A. Radbruch danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Neurobiologie, insbesondere Herrn Prof. Dr. H. Stieve möchte ich meine Anerkennung für die großzügige Förderung aussprechen.

Meine Ausbildung konnte ich nach den Bereichen Retrovirologie und Immunologie jetzt durch einen Einblick in einen aktuellen Schwerpunkt der modernen Biologie, dem der Transduktionsmechanismen abrunden.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. W. Schröder für die Überlassung des Themas, für die Freizügigkeit beim Aufbau des Labors und für seine Hilfe am Cold Spring Harbor Course "Molecular and Cellular Neurobiology" 1983 teilnehmen zu dürfen.

Besonders erwähnen möchte ich noch folgende Herren:

Herrn Dr. M. Cramer, der meine immunologische Ausbildung in Köln betreute und die vorliegende Arbeit in den immunologischen Aspekten diskutierend begleitete.

Herrn Dr. H. Kühn, der mich durch seine stete Diskussionsbereitschaft und Geradlinigkeit beeindruckte.

Herrn Dr. T. Tanaka, dessen Gespräche zur Etablierung des Radioimmunoassays auf Terasaki-Platten führten.

