

Das „Prinzip des fixierten Partners“ als Werkzeug auf dem Gebiet der Molekularbiologie*

Von

W. A. Engelhardt, L. L. Kisselev und R. S. Nezlin

Aus dem Institut für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften,
USSR, Moskau

(Eingegangen am 8. Juni 1970)

Das „Prinzip des fixierten Partners“, wobei eines der aufeinander einwirkenden Objekte in Form einer heterogenen, festen Phase, an Träger gebunden vorliegt, bietet bedeutende Vorzüge beim Isolieren, Nachweis oder anderen Untersuchungen biologischer Objekte. Es wird die Anwendung dieses Prinzips auf den Gebieten der Isolierung von Fermenten, Untersuchung der Codon—Anticodon-Beziehungen, Studium immunologischer Fragen beschrieben.

The Principle of "Fixed Partner" as Experimental Tool in Molecular Biology Research

The high selectivity obtained in systems where one of the interacting partners is present in a fixed state, as solid phase, is demonstrated for three cases: isolation of individual enzymes from a mixture of closely related; specific removal of one kind of *t-RNA* by a corresponding synthetic template; extraction of the specific antibody by a genetically defined (allotypic) immunoglobulin.

Das Selektivitätsvermögen der Teilnehmer an biologischen Umsetzungen und Wechselwirkungen übertrifft bei weitem die Spezifität der für den Chemiker üblichen analytischen Reagentien. Man denke nur an die Schärfe der Enzym—Substrat-Beziehungen oder der gegenseitigen Codon—Anticodon-Erkennung oder der Antigen—Antikörper-Reaktion. Es wird die Grenze der selektiven Unterscheidung erreicht — Erkennung von individuellen Substanzen unter einem Gemisch verschiedenster Stoffe, darunter auch Populationen aufs engste verwandter Verbindungen.

Es ist verlockend, von dieser, von der Natur selbst geschaffenen äußerst hohen Auswahl-fähigkeit Gebrauch zu machen in verschiedenen Fällen, wo es sich um Isolierung, Identifizierung oder auch Untersuchun-

* Herrn Prof. Dr. E. Broda zum 60. Geburtstag gewidmet.

gen über gewisse Wirkungsmechanismen biologischer Objekte handelt, und die üblichen chemischen Wege versagen. Große Vorteile können hier erreicht werden, wenn einer der Teilnehmer, festgebunden an einem entsprechenden Träger, in unlöslicher, fester Form vorhanden ist, ohne dabei seine spezifische Affinität gegenüber seinem Partner eingebüßt zu haben. Es können hierbei ganz neue, oft unerwartete Versuchsmöglichkeiten geschaffen werden, die unter gewöhnlichen Bedingungen schwer zu erzielen oder überhaupt nicht möglich sind. Die Grundlage einer solchen Arbeitsweise kann man als „Prinzip des fixierten Partners“ bezeichnen. Zwei Bedingungen müssen erfüllt werden: die Bindung des fixierten Partners an den Träger muß genügend fest sein, damit er bei weiterem Experimentieren nicht ausgewaschen wird; zugleich darf diese Bindung die Affinität des gebundenen Teilnehmers gegenüber dem in Lösung befindlichen nicht ungünstig beeinflussen, und mögliche sterische Hinderungen müssen vermieden werden. Verschiedene Arten der Bindung kommen in Betracht: Adsorption an Oberflächen, Hauptvalenzbindung, Einbetten in eine netzartige Polymerstruktur.

Soweit uns bekannt, wurde dieses Prinzip zum erstenmal von einem von uns^{1, 2} benutzt in Versuchen, bei denen es sich um die Fähigkeit von Immunantikörpern, mit den entsprechenden Antigenen zu reagieren, handelte. Als Antigene dienten Fermente — Phenolase und Invertase. Der Vorzug der angewandten Methode trat deutlich im zweiten Falle hervor. Während das antiphenolatische Serum seine hemmende Wirkung auf das Ferment sowohl in Lösung wie auch in adsorbierten Zustände ausübt, hat das nach Immunisierung mit Invertasepräparaten erhaltene Serum, wenn man in der üblichen Weise in Lösung prüft, keine hemmende Wirkung. Jedoch erlaubt die Methode des fixierten Partners nachzuweisen, daß auch in diesem Falle Antikörper entstehen, mit der ungewöhnlichen Eigenschaft, das Enzym zu binden, ohne dessen katalytische Wirkung zu beeinflussen. Wenn das Immunserum an Kaolin adsorbiert und in dieser Form der Invertaselösung zugesetzt wird, beobachtet man nach Abzentrifugierung der Suspension ein Verschwinden der Invertasewirkung aus der Lösung, während das fehlende Enzym im Sediment quantitativ wiedergefunden werden kann. Es wird von dem fixierten Partner — dem entsprechenden Antikörper — gebunden, ohne seine katalytische Funktion eingebüßt zu haben. Selbstverständlich tritt im Kontrollversuch mit normalem Serum nicht die geringste Bindung der Invertase auf.

Dieses in den ebenerwähnten Versuchen erstmalig auf immunologischem Gebiet angewendete Prinzip ist gegenwärtig unter dem Namen

¹ W. Engelhardt, *Biochem. Z.* **148**, 463 (1924).

² A. Bach, W. Engelhardt und A. Samysslav, *Biochem. Z.* **160** (1925).

„Immunsorption“ zu einer der am weitesten verbreiteten Methoden geworden. Wie im nachfolgenden gezeigt wird, hat sich dieses Prinzip nicht nur in der Immunitätsforschung gut bewährt, sondern es läßt sich auch mit großem Erfolg auf dem Gebiet der Fermentisolierung anwenden und kann zur Aufklärung der Mechanismen gewisser Etappen der Eiweißsynthese behilflich sein.

Anwendung zur Isolierung von Fermenten

Alle gegenwärtig üblichen Methoden zur Isolierung von Enzymen beruhen auf Verfahren, die äußerst beschränkte Spezifität besitzen und grundsätzlich stets rein empirisch sind. Eine rationelle Grundlage kann dadurch geschaffen werden, daß man die von der Natur verliehene individuelle Eigenschaft des Enzyms, seine spezifische Affinität zum Substrat, ausnützt. Gerade auf diesem Wege kann das Prinzip des fixierten Partners sich als besonders fruchtbar erweisen. Es wurde von uns zur Isolierung von Fermenten, die zu der zahlreichen Gruppe der Aminoacyl-*t-RNS*-Synthetasen gehören³. Wir werden der Kürze halber die für diese Fermente früher vorgeschlagene Bezeichnung „Codasen“⁴ gebrauchen; die biologische Funktion dieser Fermente besteht in der Versorgung der für die Eiweißsynthese bestimmten Aminosäuren mit ihrem spezifischen Code-Merkmal, indem sie an die entsprechenden, das nötige Code-Triplett (Anticodon) enthaltenden Transport-Nucleinsäuren (*t-RNS*) gebunden werden. Es sind also die „codierenden“ Enzyme, daher der Name „Codasen“. Die Zahl der bekannten Codasen ist groß: Sie kann selbstverständlich nicht kleiner als 20 sein, nach der Zahl der verschiedenen Aminosäuren; tatsächlich aber handelt es sich um beinahe ein halbes Hundert, entsprechend der Zahl der Anticodone.

Man hat keinen Grund anzunehmen, daß die einzelnen Vertreter dieser großen Familie sich in ihren Eigenschaften wesentlich voneinander unterscheiden, soweit sie funktionell identisch sind und ihre Substrate nur äußerst feine Unterschiede im chemischen Aufbau besitzen. Diese große Ähnlichkeit fand ihren Ausdruck schon in der ehemaligen Bezeichnung als „pH-5-Fermente“, weil sie alle (oder doch die meisten) im Bereich von pH 5 am schwersten löslich sind. Somit kann wohl ihre Aufteilung und Isolierung als eine der schwierigsten Aufgaben der präparativen Enzymologie betrachtet werden. Hier erscheint die Anwendung des Prinzips des fixierten Partners als besonders aussichtsvoll.

³ O. Nelidova und L. Kisselev, Mol. Biol. [USSR] 2, 60 (1968).

⁴ V. Engelhardt und L. Kisselev, Current Aspects of Biochemical Energetics, 213, Acad. Press, N.Y. (1966).

Wir berichten über Versuche mit zwei Codasen, die spezifisch sind für Lysin bzw. für Valin⁵. Das Ziel bestand darin, die individuellen Codasen an mit den entsprechenden Substraten beladenen Kolonnen festzuhalten und auf diese Weise von den anderen Gliedern der Enzymfamilie und Fremdkörpern möglichst zu befreien.

Die Codasen sind bifunktionelle Enzyme. Einerseits reagieren sie mit den entsprechenden Aminosäuren und „aktivieren“ sie durch Überführung in das Aminoacyl-adenylat. Andererseits reagieren sie mit der zugehörigen *t-RNS* und übertragen auf sie den aktivierten Aminosäurerest. Demgemäß sind, im Grunde genommen, zwei Möglichkeiten vorhanden: als fixierten Partner entweder die Aminosäure anzuwenden oder die entsprechende *t-RNS*. Das erste Verfahren hat bis jetzt keine befriedigenden Resultate ergeben. Offenbar ist in diesem Falle der Ferment—Substrat-Komplex stark dissoziiert. Dagegen scheinen die Bedingungen bei der zweiten Versuchsanordnung bedeutend günstiger zu sein.

Als Fermentpräparat diente der Zellsaft aus Lebergewebe der Ratte. Er wurde einer leichten Vorreinigung unterworfen: Ammonsulfatfällung mit nachträglicher Dialyse. Er enthielt die Gesamtheit der Codasen und nicht unbeträchtliche Mengen inaktiver Eiweißstoffe.

Als fixierte Partner dienten Präparate zweier individueller *t-RNS*-Arten, nämlich spezifisch für Valin bzw. für Lysin. Das erstere war ein praktisch reines Präparat, das zweite war an *t-RNS*^{Lys} hoch angereichert. Die Nucleinsäuren wurden mit Perjodat oxydiert und an Polyacrylhydrazid gebunden, das nach Knorre⁶ in Agar-Gel eingebettet wurde. Das Produkt wurde in eine chromatographische Kolonne gefüllt und die Fermentlösung aufgetragen. Die Elution geschah mit Phosphatpuffer mit steigendem Gehalt an KCl (0,0 → 0,25M → 1,5M). In der austretenden Flüssigkeit wurde der Eiweißgehalt und die Aktivität der Codasen⁷ unter Anwendung von ¹⁴C-markierten Aminosäuren bestimmt.

Aus den Zahlen der Tab. 1 geht hervor, daß im Versuch mit gebundener Valin-spezif. *t-RNS* in Fraktion mit 0,25M-KCl 24% der gesamten aufgetragenen Aktivität auf nur 1% der ursprünglichen Eiweißmenge entfallen, also der Reinheitsgrad auf das 24fache gestiegen ist. Im zweiten Versuch ist in der Fraktion mit 1,5M-KCl 28% der ursprünglichen Lysin-spezifischen Codase-Aktivität vorhanden, mit nur 0,3% der anfangs vorhandenen Eiweißmenge, also eine Steigerung des Reinheitsgrades beinahe um das Hundertfache. Die hohe Selektivität geht deut-

⁵ L. Kisselev und B. Gottikh, Abstr. VIIth Internat. Congr. Biochem. Tokyo, 815 (1967).

⁶ D. Knorre, S. Mysina und L. Ssandakhtchiev, Abh. sibir. Abt. Akad. Wiss. USSR, Chem. Serie 11, 143 (1964).

⁷ A. Parin, M. Kuchanova und L. Kisselev, Biokhimiya 32, 735 (1967).

lich hervor aus dem unbedeutenden Betrag der Änderung des Reinheitsgrades der Valin-spezifischen Codase.

Tabelle 1. Spezifische Anreicherung von Codasen an mit *t-RNS*-beladenen Kolonnen

Versuch Nr.	Kolonne, beladen mit gebundener:	Objekt der Bestimmung	Aufge- tragen	Eluiert mit Puffer				
				Ohne KCl- Zu- satz	Mit 0,25 Mol/l KCl	Mit 1,25 Mol/l KCl		
1	Valin-spezif. <i>t-RNS</i>	Eiweiß-	mg	20,1	18,1	0,2	—	
		gehalt	%	100	90	1	—	
		Valin-Codase-						
		Aktivität	%	100	26	24		
		Reinheits-						
		steigerung			0,3	24 Mal	—	
2	Lysin-spezif. <i>t-RNS</i>	Eiweiß-	mg	19,7	15,9	2,0	0,05	
		gehalt	%	100	81	10	0,3	
		Lysin-Codase-						
		Aktivität	%	100	15	20	28	
		Reinheits-						
		steigerung				0,2	1,5	90 Mal
		Valin-Codase-						
		Aktivität	%	100	34	32	0	
		Reinheits-						
		steigerung	%		0,4	3,2 Mal	0	

Fixierung der Fermente auf einem unlöslichen Träger, d. h. Überführung in eine feste Phase, ist während der letzten Jahre in verschiedenen Formen entwickelt worden. Von *Katchalski* und Mitarb.⁸ sind verschiedenartige „gebundene Fermente“ hergestellt und zur Lösung mannigfaltiger Probleme herangezogen worden, z. B. der Permeabilitätserscheinungen. „Incapsulierte Fermente“ wurden auf geistreiche Weise von *Chang*⁹ hergestellt, mit guten Aussichten für verschiedene therapeutische Anwendungen. Die von *Merrifield* vorgeschlagene Methode der Synthese an fester Phase hat zur erstmaligen chemischen Synthese eines Fermentmoleküls geführt. Nach Abschluß unserer Versuche an Codasen erschien die Arbeit aus *Anfinsens* Laboratorium¹⁰, in welcher ebenfalls das Prinzip des fixierten Partners als Mittel zur Reinigung von Fermenten (Nuclease, Chymotrypsin, Carboxypeptidase) angewandt wurde.

⁸ *I. Silman* und *E. Katchalski*, Ann. Rev. Biochem. **35**, Part II, 873 (1966).

⁹ *T. Chang*, Science Tools **16**, 33 (1969).

¹⁰ *P. Cuatrecasas*, *M. Wilchek* und *C. Anfinsen*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) **61**, 636 (1968).

Zur Fixierung in der festen Phase wurden dabei nicht die eigentlichen Substrate benutzt, sondern spezifische Inhibitoren, die das Ferment binden, ohne von ihm angegriffen zu werden.

Das System Codon—Anticodon

Der Zentralpunkt der gegenwärtigen Vorstellungen über den Mechanismus der genetischen Codierung besteht in der Annahme einer auf Wasserstoffbindungen beruhenden Paarung komplementärer Trinucleotide, des Codons der Matrizen-*RNS* und des Anticodons der *t-RNS*. Experimentell ließ sich diese Vorstellung gewissermaßen nur indirekt durch Versuche begründen, bei denen immer Ribosomen beteiligt waren. Bis in die jüngste Zeit gelang es nicht, die Paarung der komplementären Partner in Lösung nachzuweisen. Somit blieb die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß bei dieser Reaktion gewisse strukturelle oder andersartige Bedingungen nötig sind, die in den Ribosomen existieren. Die Anwendung des Prinzips des fixierten Partners hat gestattet, diese Frage eindeutig zu beantworten.

Oligo- oder Polyuridylsäure wurde mit Perjodat oxydiert, an ein Polyacryl-hydrazid-Agargel covalent gebunden und in dieser Form in eine chromatographische Kolonne eingefüllt. Durch die Kolonne wurde dann eine Lösung des natürlichen, in der Zelle vorhandenen unfraktionierten Gemisches aller verschiedenen *t-RNS*-Arten geleitet. In der ursprünglichen Lösung und in der austretenden Flüssigkeit wurde die Akzeptorfähigkeit gegenüber verschiedenen Aminosäuren bestimmt. Bekanntlich entspricht die UUU-Anordnung dem Codon für Phenylalanin. Es war zu erwarten, daß — falls die Phenylalanin-spezifische *t-RNS* (*t-RNS*^{Phe}) mit ihrem Anticodon die an der Kolonne gebundene UUU-Gruppierung erkennen kann und sich an letzterer verankert — das Akzeptorvermögen der durchgegangenen Lösung selektiv gegenüber Phenylalanin vermindert wird. Wie aus Tab. 2 ersichtlich, ist dies

Tabelle 2. Akzeptor-Aktivität von Präparaten unfraktionierter *t-RNS* nach Durchleiten durch eine mit Poly-U beladene Polyacryl-hydrazid-Agar-Kolonne, in imp/min · mg

Versuch Nr.	Akzeptierte Aminosäure	Aufgetragene Lösung	Durch Poly-U-Kolonne durchgegangene Lösung	%
I	Phenylalanin	115 950	49 100	43
	Valin	11 880	11 800	100
	Lysin	9 500	8 700	91
	Glycin	6 930	6 930	100
II	Phenylalanin	142 380	36 540	25

tatsächlich der Fall. In der durchgegangenen Flüssigkeit ist die Akzeptorfähigkeit gegenüber Phenylalanin im Vergleich zur aufgetragenen Größe auf die Hälfte bis ein Viertel herabgesetzt, während die für andere Aminosäuren spezifischen *t-RNS*-Arten die Kolonne praktisch unvermindert passieren. Dieses Ergebnis zeigt unzweideutig, daß die Codon—Anticodon-Bindung sich auch im Ribosomen-freien System vollziehen kann.

Das System Antigen—Antikörper. Immunogenetische Betrachtungen

Wie schon anfangs betont, hat das Prinzip des fixierten Partners besonders weite Anwendung auf dem Gebiet der Immunologie gefunden. Die Kombination dieses Prinzips mit dem Verfahren der isotopischen Markierung hat das Anwendungsgebiet außerordentlich erweitert. Fragen aus dem besonders schwierigen Grenzgebiet zwischen Immunität und Genetik sind einem genauen Studium zugänglich geworden dadurch, daß die Empfindlichkeit so weit gesteigert werden kann, daß es möglich wird, mit Substanzmengen im Nanogramm-Bereich zu arbeiten, mit einer Selektivität, die es ermöglicht, eine individuelle Substanz aus einem beliebig komplizierten Gemisch zu erfassen.

Es wurden Versuche vorgenommen, um Aufschluß zu gewinnen über die Beziehungen zwischen der Spezifität der Antikörper und der genetischen (allotypischen) Zugehörigkeit. Es handelt sich um die Feststellung der Anwesenheit allotypischer Determinanten, die in den leichten Ketten der Antikörper lokalisiert sind.

Drei verschiedene, genetisch reine, durch Inzucht erhaltene Linien Ratten wurden für die Versuche benutzt („Augusta“, „WAG“, „MSU_{B1}“). Die der Klasse G zugehörigen Immunoglobuline (*IgG*) wurden untersucht. Sie wurden auf übliche Weise aus den Sera der drei genannten Linien in reiner Form erhalten. Sie dienten in unserem Falle als Antigene, indem eine kreuzweise Immunisierung durchgeführt wurde: mit den *IgG* einer jeden Linie wurden die Ratten beider anderen Linien immunisiert. Die Gesamtmenge der Eiweißkörper der so gewonnenen Immunsera wurde unter Anwendung von Na¹³¹I jodiert¹¹. Die Überführung der als Antigene fungierenden Immunoglobuline in die fixierte Form geschah durch kovalente Bindung an Diazocellulose¹².

Der Nachweis der Antikörper gegen die verschiedenen *IgG*-Arten bestand darin, daß die Lösung der jodierten Immunserumproteine mit einer Suspension der an Cellulose fixierten Immunoglobuline versetzt,

¹¹ W. Bale, R. Helmkamp, T. Davis, M. Izzo, R. Goodland, M. Contreras und J. Spar, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **122**, 407 (1966).

¹² A. Gurwitch, O. Kuzovleva und A. Tumanova, Biokhimiya **31**, 934 (1961).

nach Abzentrifugierung und Nachwaschen die feste Phase auf Filtrierpapierscheiben gesammelt und im Szintillationszähler die sorbierte Radioaktivität gemessen wurde, die der gebundenen Menge des *IgG*-Antikörpers entsprach.

In Tab. 3 sind die Resultate eines solchen Versuches wiedergegeben. Zu den an Cellulose fixierten *IgG* der drei Linien wurde mit ^{131}J -markiertes Serum zugesetzt, welches von Ratten der Augusta-Linie nach Immunisierung mit den *IgG* der MSU-Linie gewonnen war. Nur das *IgG* der MSU-Linie sorbiert Radioaktivität (also bindet Antikörper) aus dem Serum mit derselben *IgG*-Art immunisierter Tiere. Mit beiden anderen *IgG*-Arten war das Resultat rein negativ.

Tabelle 3. Antigen-Verschiedenheit zwischen drei genetischen Linien von Ratten

Fixiertes Immunoglobulin der Linie:	^{131}J -markierter Antikörper gegen <i>IgG</i> der Linie MSU sorbiert, Imp/Min.
Augusta	0
WAG	0
MSU	9000

Es gelingt somit, mittels fixierter Antigene genetisch determinierte (allotypische) Verschiedenheit nachzuweisen. In weiteren Versuchen in dieser Richtung konnte festgestellt werden, daß die allotypischen genetischen Determinanten durch die Struktur der leichten Ketten des *IgG*-Moleküls bedingt sind. In einer unlängst erschienenen Arbeit kommt *Wistar*¹³ auf Grund in anderer Weise angestellter Versuche zu ähnlichen Schlüssen.

¹³ R. *Wistar*, *Immunology* **17**, 23 (1969).