

Weitere Untersuchungen an einem kristallisierten humanen Immunglobulin von monoklonalem Ursprung*

Von

W. H. Palm

Aus dem Institut für medizinische Biochemie der Universität Graz,
Österreich

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 31. Juli 1972)

Further Studies of a Crystalline Human Immunoglobulin of Monoclonal Origin

An immunoglobulin („Goe”), previously believed to be homogeneous, was resolved into five bands by disc electrophoresis. Preparative isolation of the five fractions is described, and possible causes of heterogeneity discussed. It is shown that a major fraction could be crystallized; the crystals were not suitable for a single-crystal X-ray structural study.

Ein bislang für einheitlich gehaltenes Immunglobulin („Goe“) wurde mittels der Disk-Elektrophorese in fünf Banden aufgetrennt. Die präparative Isolierung der fünf Fraktionen durch die Methode der Elektrofokussierung wird beschrieben und die möglichen Ursachen der Heterogenität werden diskutiert. Es wird gezeigt, daß eine Hauptfraktion kristallisiert werden konnte; die Kristalle waren für eine Röntgenfeinstrukturuntersuchung am Einzelkristall nicht geeignet.

Einleitung

Monoklonale Immunglobuline, die bekanntlich von einer einzigen Zellpopulation synthetisiert werden, besitzen eine einheitliche Aminosäuresequenz in den je zwei identischen „leichten“ und „schweren“ Polypeptidketten, aus denen sie aufgebaut sind¹. Diese Proteine bieten als Modellsubstanz die Möglichkeit für verschiedene Studien, wenn es gelingt, sie aus dem Gemisch aller vorhandenen Immunglobuline abzutrennen. Im vorliegenden Fall konnte das Protein aus dem Serum des Patienten kristallin isoliert werden².

Das mehrfach gereinigte Protein wurde verschiedenen Kristallisationsbedingungen unterworfen; die dabei konstant auftretende

* Herrn Univ.-Prof. Dr. techn. Dipl.-Ing. *Otto Kratky* zum 70. Geburtstag gewidmet.

sphärolithische Kristallform ließ jedoch vermuten, daß das Protein nicht einheitlich war, obwohl es physikochemisch alle Kriterien von Homogenität aufwies².

Davon ausgehend, konnte in weiterer Folge das Protein unter bestimmten Versuchsbedingungen in der Block-Polyacrylamidelektrophorese in drei Banden aufgetrennt werden³.

Mit Hilfe der Disk-Elektrophorese ließ sich schließlich das Material in fünf Banden trennen. Darauf wurde versucht, kristallisierbare Mengen der einzelnen Fraktionen durch isoelektrische Fokussierung zu isolieren, um Einzelkristalle zu präparieren, die sich für eine Röntgenfeinstrukturanalyse eignen würden.

Derartige Messungen sind von großer Bedeutung für die Struktur- aufklärung des Immunglobulinmoleküls⁴ und dessen Untereinheiten⁵⁻⁷ sowie weiters für das Verständnis des molekularen Mechanismus der Antigen—Antikörperreaktion.

Material und Methoden

1. Isolierung und Reinigung

Die Isolierung und Reinigung des Proteins „Goe“ ist bereits eingehend beschrieben worden²; es sollen hier nur die für die vorliegende Arbeit wesentlichen Punkte hervorgehoben werden. Das aus dem Serum des Patienten isolierte Protein wurde über Diäthylaminoäthyl (*DEAE*)-Cellulose chromatographisch nachgereinigt. Die Säule von 40 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser war mit Whatman De 32-Cellulose gefüllt. Das System war mit dem Laufmittel, 0,01*m*-Tris und 0,1*m*-NaCl, äquilibriert. Insgesamt wurden auf diese Weise 2500 mg Protein chromatographiert und als jeweils symmetrischer, einzelner peak ohne Nebenfraktionen eluiert, in Viskingmembranen gegen eine 0,15*m*-NaCl-Lösung konzentriert und tiefgefroren.

Die chemische² und serologische³ Typisierung des Proteins als Immunglobulin IgG (γ 1; Gm f⁺ a⁻) ist bereits beschrieben worden.

2. Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration der Proteinlösungen basierte auf UV-Messungen bei 280 nm unter Verwendung der bei normalem gepooltem humanem Immunglobulin gefundenen UV-Absorption (E mg⁻¹ ml⁻¹).

3. Bestimmung des Molekulargewichtes

Die Berechnung des Molekulargewichtes (178 000) erfolgte mittels der Gleichung von *Svedberg*⁸ auf Grund der in einer analytischen Ultrazentrifuge (Typ Phywe U 50 L) gefundenen Werte für die Sedimentationskonstante $S_{20} = 7,1 \cdot 10^{-13}$ sec und die in einer Diffusionszelle (Meßzelle an die Optik der obigen analytischen Ultrazentrifuge angeschlossen) gemessene Diffusionskonstante von $D_{20} = 3,8 \cdot 10^{-7}$ cm²/sec. Alle Messungen waren auf die Konzentration null extrapoliert.

4. Disk-Elektrophorese

Für die Disk-Elektrophorese wurden Gläseröhren von 6 cm Länge und 6 mm Durchmesser verwendet; das Trägermaterial war 7,5proz. (g/v) Polyacrylamidgel (Fa. Serva, Heidelberg) in einem 0,02*m*-Tris—Glycin-Puffer von pH 8,3. Die Stromstärke wurde während der Laufzeit (2 Stdn.) auf 14 mA konstant gehalten, nach beendetem Versuch wurden die Protein-

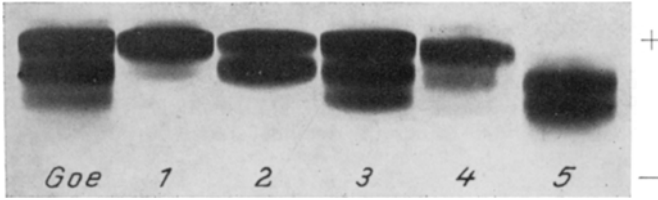


Abb. 1. Disc-Elektrophorese des Immunglobulins „Goe“ (ganz links) und der durch Elektrofokussierung erhaltenen Fraktionen 1 bis 5. Exper. Details s. Text

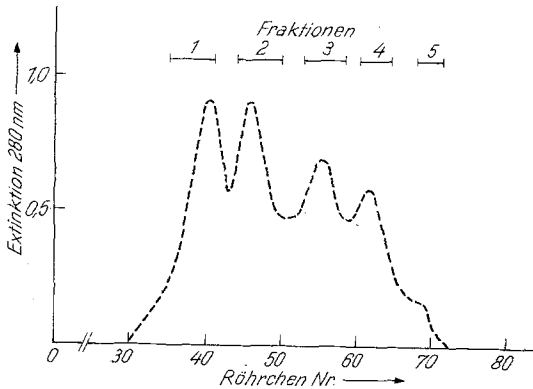


Abb. 2. Elutionsdiagramm des Immunglobulins „Goe“ nach beendeter präparativer Elektrofokussierung

banden mit Amidoschwarz 10 B sichtbar gemacht. Abb. 1 „Goe“ zeigt die Auftrennung des Proteins in fünf Banden.

5. Präparative Elektrofokussierung

Für die Durchführung der präparativen Elektrofokussierung wurde die Apparatur der Fa. LKB, Schweden, Typ 8102 verwendet. Das Trägermaterial für die Auftrennung war Ampholine vom pH-Bereich 7—10 (Fa. LKB, Schweden); die Lösung war 1proz. (g/v) an Glycin. Die ebenfalls 1% (g/v) Glycin enthaltende Proteinlösung wurde mit der Ampholine-Lösung geringerer Dichte vermischt; die Menge Protein pro Auftrennung war 45 mg.

Nach Aufbau des Saccharose-Dichtegradienten in der Apparatur wurde die Auftrennung gestartet. Die Startbedingungen waren 300 V bei 11 mA, die Kühlung erfolgte durch fließendes Leitungswasser. Das Ende der Wande-

rung der aufzutrennenden Komponenten wurde durch Erreichen eines konstanten Milliamperewertes angezeigt: im vorliegenden Fall waren dies 2 mA nach 65—70 Stdn. Laufzeit.

Danach wurde die Lösung durch eine Durchflußzelle mit angeschlossenem Schreiber geleitet (System Uvicord I, Fa. LKB, Schweden) und in Fraktionen zu je 2 ml eluiert. Das vom Schreiber aufgezeichnete Elutionsdiagramm ist in Abb. 2 wiedergegeben.

6. Bestimmung der isoelektrischen Punkte der einzelnen Komponenten

Die Messung der isoelektrischen Punkte erfolgte auf einem pH-Meter (Fa. Metrohm, Herisau, Schweiz, Typ E 300 B) mit gedehnter Skala. Zur Messung selbst wurde das Eluat mit der höchsten Extinktion in jeder der fünf Fraktionen verwendet.

7. Aufarbeitung der isolierten Fraktionen

Die laut Elutionsdiagramm (Abb. 2) gefundenen fünf Fraktionen wurden, wie aus der Abbildung ersichtlich, gesammelt und mittels Druckdialyse in Viskingschläuchen so lange gegen 0,2*m*-Acetatpuffer, pH 4,7, dialysiert, bis keine Saccharose mehr im Dialysat nachweisbar war. Anschließend wurden die einzelnen Dialysate tiefgefroren.

Die Konzentrationsbestimmung der einzelnen Fraktionen erfolgte wie unter 2. beschrieben.

Die Reinheitsprüfung mittels Disk-Elektrophorese wurde wie unter 4. beschrieben durchgeführt und ist zum Vergleich zusammen mit dem Ausgangsmaterial in Abb. 1, Fr. 1—5, wiedergegeben.

8. Versuche zur Kristallisation der aufgetrennten Komponenten

Nach der Methode der Gleichgewichtsdialyse wurden die Proteinfraktionen auf ihre Kristallisierbarkeit getestet. Wie bereits beschrieben³, kamen hierfür Lösungen von Ammoniumsulfat, Natriumsulfat, Magnesiumsulfat, Dinatriumhydrogenphosphat, Natrium-dihydrogenphosphat und Natriumchlorid unterschiedlicher Ionenstärke zur Verwendung.

Diskussion

Die Kristallisation eines gesamten einheitlichen Immunglobulins bzw. die Kristallisation von dessen definierten Untereinheiten würde es gestatten, die atomare Struktur dieses Moleküls aufzuklären, wenn das Kristallmaterial den Untersuchungsbedingungen entspricht. Damit wäre ein entscheidender Schritt zur Aufklärung des Mechanismus einer Antigen—Antikörperreaktion getan.

Da das beschriebene Immunglobulin bislang trotz verschiedenster Versuchsbedingungen nicht in einer Form kristallisiert werden konnte, wie sie für eine Röntgenfeinstrukturuntersuchung an einem Einzelkristall erforderlich ist, wurde mittels der oben beschriebenen Methode der präparativen Elektrofokussierung versucht, möglichst reine Einzelaktionen des Proteins in einer Menge darzustellen, die es erlaubt, die

Versuchsbedingungen zum Wachstum von Einzelkristallen zu ermitteln. Wie aus Abb. 1 ersehen werden kann, war eine völlige Auftrennung in die einzelnen fünf Fraktionen nicht möglich; alle Fraktionen enthalten Anteile der benachbarten Komponenten. Dennoch war eine deutliche Anreicherung in einzelne Hauptfraktionen möglich; dies gilt besonders für die Fraktion 1.

Die Untersuchungen der einzelnen Komponenten in der analytischen Ultrazentrifuge ergaben übereinstimmende Daten; es konnte kein voneinander abweichendes Verhalten beobachtet werden.

Da der monoklonale Ursprung des Proteins eindeutig festgestellt werden konnte³, kann die Mikroheterogenität auch nicht durch verschiedene Aminosäureaustausche in den Polypeptidketten erklärt werden; der Kohlehydratanteil am Molekül war ebenfalls nicht merklich verschieden gegenüber normalem, gepooltem Human- γ -Globulin³. Allerdings könnte die Anzahl und Reihenfolge der Monosaccharide, die aneinandergelüpft den Gesamtkohlehydratanteil ausmachen, in den einzelnen Proteinkomponenten verschieden sein.

Die Frage, ob Änderungen der Tertiärstruktur die verschiedene Ladung der einzelnen fünf Komponenten bedingt, kann hier nicht entschieden werden. Erst die Kenntnis der detaillierten atomaren Struktur gäbe uns die Möglichkeit zu entscheiden, ob das Immunglobulinmolekül die Fähigkeit besitzt, strukturell festgelegte Untereinheiten definiert, aber gleichbleibend zu verändern.

Versuche zur Kristallisation der einzelnen Fraktionen ergaben, daß unter den gewählten Bedingungen nur die Fraktion 1 kristallisiert werden konnte. Diese Fraktion kristallisierte unter denselben Bedingungen wie das unaufgetrennte Gesamtprotein, d. h. bei einer Proteinkonzentration von 0,2 — 1,5% (g/v) in Gegenwart von 9% (g/v) Ammoniumsulfat und bei einer Temperatur von 8—10 °C.

Leider ergab die Kristallisation dieser hochgereinigten Fraktion 1 dieselben, aus kleinen Plättchen aufgebauten Sphärolithe, wie sie bei weniger diffiziler Reinigung schon erhalten wurden³ und die eine Röntgenstrukturanalyse am Einkristall bislang nicht gestatteten. Experimente, die darauf hinzielen, die Kristallform zu verändern, sind Gegenstand nun laufender Untersuchungen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Holasek für sein Interesse und die Unterstützung dieser Arbeit sowie Herrn G. Radspieler für seine technische Assistenz.

Literatur

- ¹ R. R. Porter, *Biochem. J.* **73**, 119 (1959).
- ² W. H. Palm, *Z. klin. Chem. klin. Biochem.* **6**, 344 (1968).
- ³ W. H. Palm, *Z. Physiol. Chem.* **351**, 1423 (1970).

⁴ V. R. Sarma, D. R. Davies, L. W. Labaw, E. W. Silvertown und W. D. Terry, in: Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biology **36**, 413 (1972).

⁵ R. J. Poljak, L. M. Amzel, H. P. Avey, L. N. Becka und A. Nisonoff, Nature New Biol. **235**, 137 (1972).

⁶ A. B. Edmundson, M. Schiffer, M. K. Wood, K. D. Hardman, K. R. Ely und C. F. Ainsworth, in: Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biology **3** 427 (1972).

⁷ O. Epp, W. Palm, H. Fehlhammer, A. Rühlmann, W. Steigemann, P. Schwager und R. Huber, J. Mol. Biol. **69**, 315 (1972).

⁸ T. Svedberg und K. O. Pedersen, The Ultrazentrifuge. Oxford: Clarendon Press. 1940.