

Aus dem
Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin D
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Pavenstädt-

Isolierung einer Tartrat-resistenten sauren Phosphatase aus Humanplazenta
und
Entwicklung eines spezifischen ELISA

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Dr. rer. nat. Markus Michael Dietrich

aus Gladbeck

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Schäfer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-U. Spiegel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin D
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Pavenstädt-
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Schäfer
Koreferent: Prof. Dr. H.-U. Spiegel

Zusammenfassung

Isolierung einer Tartrat-resistenten sauren Phosphatase aus Humanplazenta und Entwicklung eines spezifischen ELISA

Dr. rer. nat. Markus Michael Dietrich

Saure Phosphatasen gehören der Klasse der sauren Orthophosphorsäuremonoesterasen (EC3.1.3.2.) an und katalysieren die Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern unter Freisetzung von Phosphat mit einem Hydrolyseoptimum zwischen pH 5 bis pH 6. Eine Untergruppe dieser sauren Phosphatasen stellt die Isoform Typ-5 dar. Das katalytische Zentrum dieser Untergruppe besteht aus einem charakteristischen Zwei-Eisen-Zentrum, das diesen Phosphatasen in konzentrierter Lösung eine violette Farbe verleiht. Hieraus leitet sich auch der Name dieser Typ-5-Phosphatase als saure Violette Phosphatase ab. Im Humangewebe konnten bisher 7 Isoformen der sauren Phosphatase identifiziert werden, die durch ihre unterschiedliche Lokalisation in den Zellen und ihre verschiedenen elektrophoretischen Eigenschaften unterschieden werden. Die humane Typ-5-Phosphatase findet man unter meist pathologischen Bedingungen in Leukozyten und den von ihnen abgeleiteten Zellen, wie Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten. Unter physiologischen Bedingungen lässt sich nur eine sehr niedrige TRAP-Aktivität in Zellen des Monozyten-Phagozytensystems, wie Osteoklasten, Makrophagen oder Mikroglia sowie Lebermakrophagen nachweisen.

Durch die Entwicklung eines verkürzten Isolierungsprotokolls gelang erstmals unter Zuhilfenahme von spezifischen Immunoaffinitätssäulen, entwickelt aus Antikörpern des homologen Uteroferrins, die Isolierung und Aufreinigung der labilen humanen Typ-5-Phosphatase aus Plazenta. Für das Humanplazenta-Isoenzym-5 konnte eine monomere Struktur mit einem Molekulargewicht von 34000 Da festgestellt werden.

Nach Aufreinigung des Enzyms bis zur elektrophoretischen Reinheit konnte ein spezifischer und hoch sensitiver ELISA-Test zur Detektion auch geringster Konzentrationen der Typ-5-Phosphatase entwickelt werden. Hierbei konnte die Detektionsgrenze bis in den pg/ml-Bereich gesenkt werden. Bei guter Reproduzierbarkeit gelang erstmals die Detektion auch kleinster Mengen der sauren Typ-5-Phosphatase ohne Beeinträchtigung durch störende Fremdeiweiße. Damit kann erstmals die violette Phosphatase aus Humanplazenta, unabhängig von ihrem Oxidationszustand und Aktivitätszustand hoch sensitiv und reproduzierbar erfasst werden. Dieses Detektionssystem sollte in einem weiteren Schritt auf die Anwendbarkeit zur Konzentrationsbestimmung in Humansenen getestet werden und soll so einen besseren Einblick in den physiologischen und pathologischen Wirkmechanismus der humanen Phosphatase im Organismus beitragen.

Genemigung des Tierversuchs: AZ23.0835.1.0 (G45/97)

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2009

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	I
1.	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1.	Das Zwei-Eisen-Zentrum der Violetten Phosphatasen	5
1.2.	Enzymhistochemischer Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatasen (TRAP 5)	8
1.3.	Sequenzhomologie und Genlokalisierung der Violetten Phosphatasen	9
1.4.	Immunologische Kreuzreaktion der Violetten Phosphatasen	10
1.5.	Nachweis der TRAP 5 im Serum	11
1.6.	Funktion der TRAP 5	12
1.7.	Zielsetzung	14
2.	Isolierung und Charakterisierung der Violetten Phosphatase aus Humanplazenta	16
2.1.	Isolierung der Typ 5 Phosphatase aus Humanplazenta	16
2.1.-1.	Herstellung und Isolierung polyklonaler Antikörper gegen Schweineuterusphosphatase	17
2.1.-2.	Aufreinigung der Humanplazentphosphatase durch Affinitätschromatographie an Anti-Uteroferrin Antikörper-Sepharose 4-B	19
3.	ELISA zur Detektion der Humanplazenta Phosphatase	22
3.1.	Entwicklung eines spezifischen ELISA	22
3.2.	Optimierung des Färbekomplexes	26
3.3.	Optimierung der Antikörperkonzentration zur Immobilisierung an der Mikrotiterplatte	28
3.4.	Bestimmung der optimalen Konzentration an biotinyliertem Antikörper	30
3.5.	Erfassung der Meßgrenze des optimierten Biotin-Streptavidin-Assays	32
3.6.	Quantifizierung der Kreuzreaktion homologer Tartrat-resistenter saurer Phosphatase-Spezies durch ELISA	34
4.	Diskussion	37

5.	Zusammenfassung	48
6.	Material und Methoden	50
6.1.	Bestimmung der Enzymaktivität	50
6.2.	Bestimmung der Enzymkonzentration	50
6.3.	Isolierung der Violetten Phosphatase aus Schweineuterus	51
6.4.	SDS-Gelelektrophorese	51
6.5.	Immunoaffinitätschromatographie	54
6.6.	Arbeitsvorschrift für die Erstellung des Biotin-Streptavidin- ELISA	54
6.6-1.	Biotinylierung der Antikörper	55
6.6.2.	Protokoll zur Biotinylierung der Antikörper	55
6.6.3.	Biotinylierung der Peroxidase	56
6.6.4.	Optimierung des Färbekomplexes	56
6.6.5.	Optimierte Standardarbeitsvorschrift	57
7.	Literaturverzeichnis	59
8.	Lebenslauf	69

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	aquired immune deficiency syndrome
AK	Antikörper
Akt.	Aktivität
Asc.	Ascorbat
bzgl.	bezüglich
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESR	Elektronen Spin Resonanz
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FLV	Friend Leukämie Virus
HIV	Human immune deficiency virus
HTLV	Human T-cell leukemia virus
IgG	Immunglobulin G
kat	katal
Lsg.	Lösung
M.	Morbus
NaAc	Natriumacetat
NP	Naphthylphosphat
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
spez.	spezifische
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Buffered Saline

TCA	Trichloressigsäure
TRAP	Tartrat-resistente Saure Phosphatase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
VIS	Visible
VP	Violette Phosphatase
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung und Zielsetzung

Saure Phosphatasen gehören der Klasse der sauren Orthophosphorsäuremonoesterasen (EC 3.1.3.2) an und katalysieren die Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern unter Freisetzung von Phosphat. Das Hydrolyseoptimum dieser enzymatischen Reaktion liegt im sauren pH-Bereich, meist zwischen pH 5.0 - pH 6.0.

Im menschlichen Gewebe konnten bisher sieben Isoformen der sauren Phosphatase identifiziert werden, die durch ihre unterschiedliche Lokalisation in den Zellen, sowie ihrer elektrophoretischen Eigenschaften unterschieden werden (Li et al., 1970). Ein weiteres Einteilungskriterium der sauren Phosphatasen stellt die Beeinflussung der enzymatischen Aktivität durch L(+)-Tartrat dar. Hierbei zeigen nur die Erythrozyten-Phosphatase und die Isoform 5 eine enzymatische Resistenz gegenüber L(+)-Tartrat, während die übrigen Enzymformen in ihrer spezifischen Aktivität durch L(+)-Tartrat gehemmt werden.

Zu diesen Tartrat-sensitiven Phosphatasen gehören die saure Prostata-Phosphatase (Isoenzym 2) und die lysosomale Phosphatase (Isoenzym 4), die unspezifisch in vielen Organen zu finden ist. Im klinischen Bereich wird vor allem das Vorkommen der Prostata-Phosphatase untersucht. Als Markerenzym im Serum ergeben sich hierdurch Hinweise auf das Vorliegen eines Prostata-Adenokarzinoms. Aber auch der Therapieerfolg läßt sich durch den Serumspiegel des Isoenzym 2 überprüfen.

Die größte Gruppe unter den sauren Phosphatasen stellt die Typ 5 Form dar. Das katalytische Zentrum dieser Unterklasse besteht aus einem charakteristischen Zwei-Eisen-Zentrum, daß diesen Phosphatasen in konzentrierter Lösung eine violette Farbe verleiht. Diese Spezies wird daher als saure Violette Phosphatase bezeichnet. Ihre enzymatische Aktivität wird durch L(+)-Tartrat nicht beeinflusst (Antanaitis und Aisen, 1983).

Eine solche Phosphatase wurde 1959 aus der Rindermilz (Glomset, 1959), dann auch aus der Spülflüssigkeit von Schweineuteri isoliert, wo diese nach Progesteroninduzierung in besonders hoher Konzentration auftritt (Chen et al., 1973).

In der Milz konnte das Enzym in den Lysosomen der Zellen lokalisiert werden, die dem retikulo-phagocytären System angehören (Schindelmeiser et al., 1987). Beim Menschen wurde diese Isoform erstmals bei Patienten mit Haar-Zell Leukämie identifiziert (Drexler and Gignac, 1994).

Tab.1-1: Vergleichende Übersicht bisher isolierter Violetter Tartrat-resistenter saurer Phosphatasen aus Säugetiergewebe

Herkunft	Lokalisation	Referenzen
Schweine-		
- Endometrium	Drüsenzellen	Chen et al. (1973), Schlosnagle et al.(1974)
Rinder-		
- Milz	Makrophagen	Sundararajan et al. (1959)
- Knochen	Osteoklasten	Lau et al. (1987a)
- Lunge	Alveolar- makrophagen	Schindelmeiser et al(1989b)
- Leber	v. Kupffer'sche Sternzellen	Fischer (1991)
Ratten-		
- Milz	Makrophagen	Hara et al. (1983), Ketcham et al. (1985)
- Knochen	Osteoklasten	Kato et al. (1986), Anderson et al. (1986)
- Epidermis	Langerhanszellen	Hara et al. (1985)
Human-		
- Knochen	Osteoklasten	Allen et al. (1989), Miyazaki et al.(2001)
- Knochen	Riesenzellen (Riesenzelltumor)	Hayman et al. (1989), Stepan et al. (1990)
- Milz	Gaucher-Zellen (M. Gaucher)	Robinson und Glew (1980 a und b)
- Milz	Haarzellen (Haarzelleukämie)	Yam et al. (1971), Minkin (1982)

Herkunft	Lokalisation	Referenzen
- Plazenta	Granulocyten	Schindelmeiser und Münstermann (1991), Ketcham et al. (1989)
- Lunge	Alveolar- makrophagen	Efstratiadis und Moss (1985)
- Ureter	Epithelzellen	Schindelmeiser et al. (1996)
- Leber	v. Kupffersche Sternzellen	Yaziji et al. (1995)
- Gehirn - (Enzephalitiden)	Mikrogliazellen	Schindelmeiser et al (1989a)
- Nabelschnurplasma		Cheung et al. (1995)

Intensiver als die Typ 5 Phosphatasen aus menschlichem Gewebe sind die beiden Violetten Phosphatasen aus der Rindermilz (Glomset 1959; Antanaitis u. Aisen, 1983; Que u. Scarrow, 1988; Vincent u. Averill, 1990a) und der Spülflüssigkeit aus Schweineuterus (Uteroferrin) (Chen et al., 1973; Antanaitis u. Aisen, 1983; Que u. Scarrow, 1988; Vincent u. Averill, 1990a) untersucht. Ein Vergleich der Eigenschaften der menschlichen Typ 5 Phosphatase mit denen der Violetten Phosphatasen aus verschiedenen Säugetiergeweben, zeigt eine große Übereinstimmung.

Hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz, Proteinstruktur und ihres Eisenclusters besteht eine große Ähnlichkeit (Hunt et al., 1987; Vincent u. Averill, 1990a,b). Die Homologie in der Aminosäuresequenz beträgt über 90% (Hunt et al., 1987; Vincent u. Averill, 1990b). Beide Säugetierenzyme sind basische Glycoproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa, die einen N-glycosidisch gebundenen Oligosaccharidrest tragen (Campbell et al., 1978). Während das Uteroferrin als Monomer vorliegt, scheint das

Rindermilzenzym durch eine Spaltung in der Peptidkette aus zwei Untereinheiten von 15.5 kDa und 21 kDa zu bestehen (Davis et al., 1981).

Trotz der geringen Substratspezifität der Violetten Phosphatasen werden aktivierte Phosphorsäuremonoester mit aromatischen Resten, wie L-Tyrosin-Phosphat, α -Naphthylphosphat, p-Nitrophenylphosphat oder Pyrophosphate wie Nukleosidtriphosphate, wesentlich schneller hydrolysiert als aliphatische Phosphorsäuremonoester. Die erhöhte Aktivität gegenüber aromatischen Phosphorsäuremonoestern weist auf die physiologische Bedeutung dieses Enzyms als Phosphoprotein-Phosphatase mit einer besonderen Spezifität gegenüber Tyrosinphosphat hin.

Durch Oxo- Anionen, wie Phosphat, Arsenat oder Molybdat, wird die enzymatische Aktivität der sauren Phosphatasen stark gehemmt. Die Oxo-Anionen binden dabei fest an das katalytische Metallzentrum (Dietrich, 1991).

1.1 Das Zwei-Eisen-Zentrum der Violetten Phosphatasen

Da eine Kristallisation der Violetten Säugetierphosphatasen bisher nicht gelang, konnten röntgenkristallographische Untersuchungen zur Strukturaufklärung nicht durchgeführt werden. Um die Struktur des neuartigen Zwei-Eisen-Zentrums aufzuklären, wurden daher verschiedene andere spektroskopische Meßmethoden herangezogen.

Im VIS-Spektrum zeigen die Violetten Phosphatasen eine breite ungegliederte Absorptionsbande ($\epsilon_{\text{VIS}_{\text{max}}} = 4000$) mit einem Maximum zwischen 500nm und 570 nm, die durch einen charge-transfer Übergang von Tyrosin auf ein Fe(III) hervorgerufen wird. Aufgrund dieser Farbe werden sie als 'Purple Acid Phosphatasen' (PAP) bezeichnet.

Eine der Besonderheiten dieses ungewöhnlichen Zwei-Eisen-Zentrums der Violetten Phosphatasen ist der Wechsel der Oxidationsstufen der Metalle im katalytischen Zentrum. Hieraus lassen sich zwei verschiedene Enzymspezies ableiten: eine oxidierte, violette Form mit einem Fe(III)-Fe(III)-Zentrum und eine rosa Form, die ein gemischt-valentes Fe(III)-Fe(II)-Zentrum enthält.

Die oxidierte violette Enzymspezies zeigt im Elektronenspektrum ein Absorptionsmaximum um 550 nm ($\epsilon_{\text{VIS}_{\text{max}}} = 4000$). Gegenüber der reduzierten Enzymform besitzt das Fe(III)-Fe(III)-Zentrum eine Restaktivität von 5% (Dietrich et al. 1991). Durch Mößbauer- und ESR-Untersuchungen konnte die oxidierte Form als antiferromagnetisch gekoppelter Fe(III)-Fe(III)-high-spin Komplex mit diamagnetischem Grundzustand und der Gesamtspinquantenzahl $S=0$ charakterisiert werden.

Durch Inkubation mit milden Reduktionsmitteln, wie Ascorbat, 2-Mercaptoethanol oder Ammoniumeisen(II)-sulfat, entsteht die katalytisch voll aktive rosa Form mit einem Absorptionsmaximum bei 515 nm (Sabel et al., 1961; Schlosnagle et al., 1976). Das Eisenzentrum dieser reduzierten Enzymspezies liegt hier als paramagnetischer Fe(II)-Fe(III)-high-spin-Komplex vor. Im ESR zeigt sich ein pH-abhängiges Signal rhombischer Symmetrie mit g -Werten um $g_{\text{av}}=1.75$ (Averill et al., 1987).

Durch $^1\text{H-NMR}$ -Studien, wie auch durch die Ergebnisse aus Elektronen-Spin-Echo Experimenten konnte gezeigt werden, daß eine Koordination von den Aminosäuren Tyrosin, Aspartat und Histidinen vorliegt, die den Metallcluster unsymmetrisch ligandieren. Diese Ergebnisse, gestützt durch Resonanz Raman Messungen, ermöglichten es, die charakteristische VIS-Absorptionsbande einem Tyrosin-Fe charge-transfer Übergang zum nicht reduzierbaren Eisen zuzuordnen (Averill et al., 1987). Die Kopplung der beiden Eisenatome erfolgt dabei über eine μ -Oxo- oder eine μ -Hydroxobrücke.

Unterschiedliches Verhalten zeigen die beiden Enzymspezies gegenüber dem Inhibitor Phosphat. Während die oxidierte Form Phosphat sehr fest bindet und somit in einem stabilen 1:1-Komplex vorliegt (Keough et al., 1982; Burmann et al., 1986), ist die reduzierte Form des Enzym-Phosphat Komplexes instabil. Das pH-abhängige Elektronenspektrum des phosphatgebundenen reduzierten Enzyms zeigt bei pH 4.9 ein Maximum von 530 nm (Pyrz et al., 1986). Die oxidierte Form erfährt nach Phosphatzugabe eine hypsochrome Verschiebung des Maximums nach 540 nm (Münstermann, 1987). Auch nach Zugabe anderer Oxoanionen, wie Arsenat oder Molybdat, die unterschiedlich stark an das Eisenzentrum binden, zeigen sich charakteristische Elektronenspektren mit pH-abhängiger Verschiebung des Absorptionsmaximums.

Aufgrund der ähnlichen spektroskopischen Eigenschaften konnte in Analogie zu den kristallographisch besser untersuchten pflanzlichen Phosphatasen ein Strukturmodell für die Gruppe der Violetten Säugetierphosphatasen entwickelt werden.

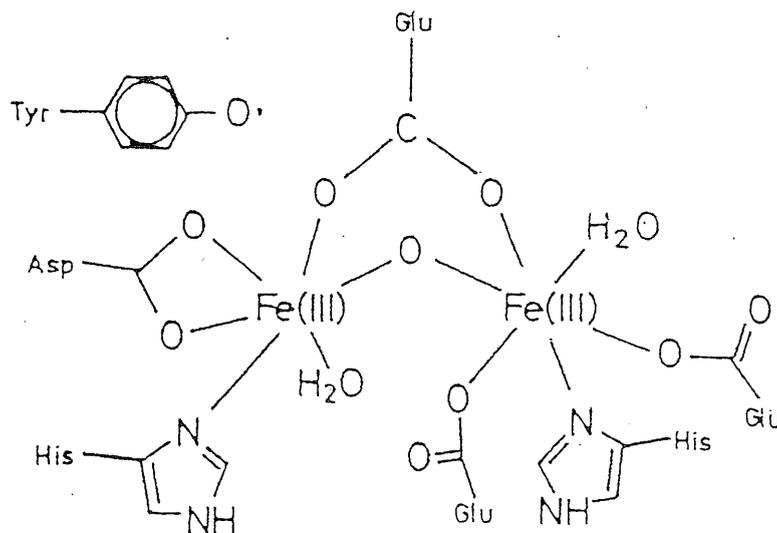


Abb. 1.1 Strukturmodell des aktiven Zentrums der Violetten Phosphatasen

1.2 Enzymhistochemischer Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatasen (TRAP 5)

In die gleiche Klasse, wie die Rindermilzphosphatase und das Uteroferrin, gehört auch das Isoenzym 5, das unter meist pathologischen Bedingungen, in Leukocyten und den von ihnen abgeleiteten Zellen, wie Makrophagen, Monocyten, Lymphocyten und Granulocyten beim Menschen nachzuweisen ist (Lau et al., 1987; Efstradiadis et al., 1985; Ketcham et al., 1989; Schindelmeiser et al., 1990). Die TRAP 5 ließ sich überwiegend in Lysosomen und lysosomenähnlichen Organellen sowie im Zytoplasma differenzierter Monozyten lokalisieren (Katayama et al., 1972; Anderson et al., 1986; Clark et al., 1989; Schindelmeiser et al., 1987). Unter physiologischen Bedingungen findet man eine TRAP-Aktivität in Zellen des Monocyten-Phagozyten-Systems, wie Osteoklasten (Minkin, 1982) und Alveolarmakrophagen (Efstradiadis und Moss, 1985). Makrophagen und Granulocyten in anderen Organen, wie z.B. Lymphknoten, Milz, Leber, Gastrointestinaltrakt, Niere, Haut, Gehirn und seröse Höhlen weisen nahezu keine enzymatische Aktivität auf (Drexler und Gignac 1994).

Phosphatase- exprimierende Alveolar- Makrophagen lassen sich nach massivem Antigen-Kontakt, z. B. infolge einer akuten Infektion im Lungengewebe signifikant erhöht auffinden (Efstradiadis et al., 1985; Schindelmeiser et al., 1989 u.90).

Im ZNS konnten bei Encephalitiden, u. a. verursacht durch das HIV (Human immunodeficiency Virus), TRAP- positive Mikroglia, ebenfalls Makrophagenabkömmlinge, lokalisiert werden. Über die Blut-Hirn-Schranke gelangen diese in das Hirnparenchym (Schindelmeiser et al., 1989).

Nicht stimulierte Monozyten wie Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophile und basophile Granulocyten, Erythroblasten, Retikulocyten und Megakaryocyten im Blut oder im Knochenmark zeigen keine TRAP-

Aktivität (Kass und Munster, 1979; Radzun et al., 1983; Snipes et al., 1986).

Im physiologischen Zustand sezernieren die humanen Milzmakrophagen keine meßbaren Mengen an TRAP. Bei Menschen, die an Morbus Gaucher oder Morbus Hodgkin erkrankt sind, zeigen ortsständige Milzmakrophagen, detektiert durch immunhistochemische Kreuzreaktion mit Anti-Rindermilz- TRAP- Antikörpern, einen erheblichen Anstieg der Phosphatase-Aktivität (Schindelmeiser et al., 1991; Chen et al., 1979; Robinson u. Glew, 1980; Davis et al., 1981).

Erhöhte Konzentrationen an Phosphatase wurden in Lebermakrophagen (von Kupffer'schen Sternzellen) und Lymphocyten aufgefunden, die aufgrund einer lymphatischen Leukämie pathologisch verändert waren (Yam et al., 1972; Ketcham et al., 1985). Obwohl das Ansteigen der TRAP nicht pathognomonisch für die Haar-Zell Leukämie ist und auch nicht allen B-Zellen zu detektieren ist, kann doch der Nachweis des Enzyms zu einem hilfreichen Testverfahren für die Haar-Zell- Leukämie werden.

1.3 Sequenzhomologie und Genlokalisierung der Violetten Phosphatasen

Die gute immunologische Kreuzreaktion der verschiedenen TRAP-Arten sind auf die hohen Homologien in der Primärstruktur der Enzyme zurückzuführen (Kraenzlin et al., 1990; Echetebeu et al., 1987). So beträgt die Homologie der Aminosäuresequenz zwischen der Rindermilzphosphatase und dem Uteroferrin 90% (Hunt et al., 1987). Die Sequenzierung der c-DNA- Klone der TRAP 5 aus menschlicher Plazenta und Gaucher-Milz (Lord et al., 1990; Ketcham et al., 1989) zeigte im Vergleich zur proteinchemischen Sequenz des Uteroferrins eine Übereinstimmung von 85-94%. Eine ähnlich große Homologie haben auch die proteinchemisch bestimmten Sequenzen der TRAP 5 aus Haarzelleukämie-Milz (Janckila et al., 1992a; Stepan et al., 1989) und

Riesenzelltumorgewebe (Stepan et al., 1990; Hayman et al., 1989). Die Sequenzanalyse zeigt, daß der N-terminale Anteil bei den violetten Phosphatasen nahezu identisch ist, wohingegen die weitere Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Spezies stärker differiert.

Zunächst wurde daher angenommen, daß die verschiedenen TRAP-Spezies zu einer großen Gruppe von Proteinen gehören, die von unterschiedlichen Genen codiert werden (Janckila et al., 1992a; Stepan et al., 1989). Spätere Untersuchungen ergaben jedoch, daß es nur ein Gen für die TRAP 5 beim Menschen gibt (Ling und Roberts, 1993). Molekularbiologische Untersuchungen erbrachten den Nachweis einer einzelnen Genkopie und die Transkription einer einzelnen m-RNA (Hayman et al., 1991; Lord et al., 1990; Ketcham et al., 1989). Danach erscheint es wahrscheinlich, daß alle violetten Phosphatasen einer Spezies Produkte des gleichen Gens sind. Die Größe der gesamten c- DNA der TRAP beträgt 1.4 kb. Unterschiede in der Enzymstruktur scheinen daher in einer Post-Translationalen Modifizierung begründet zu liegen und nicht das Ergebnis einer multigenen Transkription zu sein. Das menschliche TRAP 5 Gen konnte auf dem kurzen Arm des Chromosomens 19 lokalisiert werden (Lord et al., 1990).

1.4 Immunologische Kreuzreaktion der Violetten Phosphatasen

Die Antikörper gegenüber violetten Phosphatasen verschiedener Spezies besitzen eine hohe Kreuzreaktion. Uteroferrin-Antikörper reagieren spezifisch auf die Enzyme aus Rindermilz, Rattenmilz, Haarzell-Leukämiemilz, Gaucher-Milz, menschlichen Osteoklasten und Alveolarmakrophagen (Ketcham et al., 1985; Echeteu et al., 1987). Ebenso kann mit polyklonalen Antikörpern gegen das Rindermilzenzym eine starke Kreuzreaktivität gegenüber der humanen TRAP 5 aus Gaucher-Milz, Plazenta, Alveolar- und Gehirnmakrophagen nachgewiesen werden (Schindelmeiser et al., 1987, 1989 a und b; Schindelmeiser und

Münstermann, 1991). Diese mono- und polyklonalen Antikörper gegen das menschliche Enzym werden für immunhistochemische Untersuchungen sowie für serologische Bestimmungen der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase eingesetzt (Janckila et al., 1995; Chamberlain et al., 1995; Cheung et al., 1995; Kraenzlin et al., 1990).

1.5 Nachweis der TRAP 5 im Serum

Bei knochenabbauenden Prozessen, wie Knochenmetastasen, Knochtumoren und Osteoporose wird durch die Osteoklasten eine erhöhte Konzentration an TRAP expremiert (Hayman et al., 1989). Diese aktivierten Knochenmakrophagen sezernieren die Typ 5 Phosphatase auch ins Serum, so daß ein signifikant erhöhter Enzym-Serumspiegel die vermehrte Osteoklastentätigkeit anzeigt (Lau et al., 1987). Die Normalkonzentration des Enzyms liegt zwischen 0.8-1.5 U/l. Bei dem semimalignen Riesenzelltumor werden in den Osteoklasten des mesenchymalen Gewebes des Knochenmarks größere TRAP-Konzentrationen detektiert (Hayman et al., 1989). Allerdings ist auch in physiologischen Prozessen, wie dem Knochenumbau bei Kindern in der Wachstumsphase eine höhere TRAP-Konzentration infolge der vermehrten Osteoklastenaktivität festzustellen (Schindelmeiser, 1990). In allen Fällen ist der Nachweis erhöhter Serumkonzentrationen des Enzyms verbunden mit dem Auftreten aktivierter Leukocytenformen, wie sie bei diversen Infektionen, lysosomalen Speicherkrankheiten oder Tumoren auftreten können.

An Kulturen von humanen Makrophagen läßt sich die Expremierung der Typ 5 Phosphatase durch Gamma-Interferon und bakterielle Lipopolysaccharide hemmen. Diese Mediatoren bewirken auch die funktionelle Differenzierung dieser Zellen. Im Gegensatz dazu konnte durch Aktivatoren der Proteinkinase C wie z. B. Phorbol ester, die auch den

intrazellulären Kalzium-abhängigen Stoffwechsel beeinflussen, die Bildung des Isoenzym 5 und seiner m-RNA vermehrt werden (Bevilacqua et al., 1991). Durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration läßt sich diese Induktion hemmen (Drexler et Gignac, 1994). Faktoren, die die Osteoklasten aktivieren wie Vitamin D3, Parathormon, sowie Interleukin 1 und 6, bewirken eine stärkere Expression (Miller, 1985). Aus klinischen Beobachtungen läßt sich daraus eine enge Beziehung zwischen der ansteigenden Serumkonzentration an Tartrat-resistenter saurer Phosphatase unter den Bedingungen ansteigender Knochenresorption ableiten, so daß die Osteoklastenaktivität eine starke Rolle bei der Expression zu spielen scheint.

1.6 Funktion der TRAP 5

Obwohl die biochemische Funktionsweise der Enzymspezies weitgehend aufgeklärt ist, läßt sich derzeit kein physiologisch vorkommendes Substrat zuordnen. Für die Funktion der Zwei-Eisen Phosphatase beim Menschen läßt sich bisher weder für den physiologischen, noch für den pathologischen Zustand eine sichere Erklärung ableiten.

Das Schweineenzym Uteroferrin, das Progesteron-induziert synthetisiert wird, gelangt in den fetalen Kreislauf. Radioaktiv markiertes Eisen, das in das katalytische Zentrum der Phosphatase eingebaut wurde, konnte danach auch im fetalen Hämoglobin nachgewiesen werden. Daraus wird auch für das menschliche Plazentaenzym eine Eisentransportfunktion abgeleitet (Roberts et Bazer, 1984).

Für das Milzenzym, das überwiegend in Zellen lokalisiert ist, die auch Ferritin enthalten, wird eine Funktion als Phospho-Protein-Phosphatase diskutiert. Durch Dephosphorylierung an der Erythrozytenmembran können

so gealterte Erythrozyten in der Milz abgebaut werden (Schindelmeiser et al., 1987).

Die Phosphatase, isoliert aus Haarzelleukämiemilz, dephosphoryliert Tyrosinphosphatreste von Proteinen. Da die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Tyrosin ein wichtiger Steuerungsmechanismus bei zellulären Prozessen darstellt, wird hier eine Regulation durch die TRAP vermutet (Janckila et al., 1992b).

Signifikant erhöhte Serumkonzentrationen der TRAP konnten bei Erkrankungen mit erhöhter Osteoklastentätigkeit bei knochenabbauenden Prozessen, wie Morbus Gaucher und Morbus Paget, detektiert werden (Li et al., 1973; Lau et al., 1987; Lam et al., 1981). Hierbei ließ sich die Knochenresorption durch Inhibierung des Enzyms hemmen (Zaidi et al., 1989).

Uteroferrin, wie auch das Rindermilzenzym katalysieren die Bildung von Hydroxylradikalen (Sibille et al., 1987). In vitro wird die Bildung von Hydroxyl- und Peroxidradikalen, katalysiert durch das Zwei-Eisen-Zentrum, nachgewiesen (Hayman et Cox, 1994). Aufgrund dieser Eigenschaften wird auch für die menschliche Phosphatase eine mikrobiozide Wirkung im Ureter in Zusammenhang mit der Radikalbildung durch die Violette Phosphatase vermutet (Schindelmeiser et al., 1996).

In Zellkulturen von Erythrocyten, Megakaryocyten, Granulocyten, Monocyten und Makrophagen konnte eine Wachstumsstimulierung dieser Zellen unter dem Einfluß der humanen Plazentaphosphatase und des Uteroferrins nachgewiesen werden, so daß eine Stimulierung der Hämatopoese, sowie eine Kolonisation der hämatopoetischen Organe zu Beginn der Schwangerschaft diskutiert wird (Bazer et al., 1991). Da die Expression der Typ 5 Phosphatase auf m-RNA- und Proteinebene gesteuert

werden kann, läßt sich daraus auch eine mögliche Bedeutung beim Zellwachstum und -differenzierung ableiten.

1.7 Zielsetzung

Während der Schwangerschaft wird die Säugetierphosphatase nach der Uterussektion durch Plazentaerolae in den foetal/plazentären Kreislauf transportiert. Durch immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen die Violette Phosphatase aus Rindermilz konnte eine starke Reaktion in den Lysosomen einer Reihe von Leukocyten im mütterlichen Blut zwischen den Plazentazotten und innerhalb der foetalen Kapillaren detektiert werden. Eine schwache Kreuzreaktion konnte ebenfalls in der apikalen Ebene der Syncytiotrophoblastenschicht und in den mütterlichen Dezidualzellen festgestellt werden. Dahingegen konnte in den Makrophagenabkömmlingen der Plazenta, den Hofbauer- Zellen, im Stroma der Plazentazotten keine spezifische Immunantwort gefunden werden.

Aufgrund der Instabilität der menschlichen Plazenta- Phosphatase konnte bisher dieses Enzym nicht hinreichend isoliert werden.

Neben diesem physiologischen Vorkommen zeigt gerade das vermehrte Auffinden der Typ 5 Phosphatase in pathologischen Zuständen die klinische Bedeutung der Entwicklung eines diagnostischen Verfahrens zur quantitativen Erfassung dieses Enzyms im Serum. Bislang wird die Konzentration der Serumphosphatasen durch kinetische Messungen bestimmt. Durch Aktivitätstests mit p-Nitrophenylphosphat (Lau et al., 1987) oder α - Naphthylphosphat (Schiele et al., 1988) als Substrat können die Phosphatasen quantitativ erfaßt werden. Zur Differenzierung von Tartrat-sensitiven Phosphatasen, wie der sauren Prostata-Phosphatase, wird den Enzymtests L(+)- Tartrat zur Inhibierung zugesetzt.

Einen spezifischeren Nachweis der TRAP bietet der Nachweis durch histo- und immunhistochemische Methoden. Durch die gute Kreuzreaktivität läßt sich die Typ 5 Phosphatase hochspezifisch in Enzyme- linked- Immuno- Assays (ELISA) nachweisen. Damit kann die Violette Phosphatase unabhängig von ihrem Oxidationszustand und Aktivitätszustand hochsensitiv erfaßt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Typ 5 Phosphatase aus Humanplazenta isoliert. Durch die anschließende Produktion hochspezifischer Antikörper wurde ein ELISA zur sensitiven und spezifischen Erfassung der Human-TRAP entwickelt. Weiterführend wurde dieses neue Detektionssystem auf die Anwendbarkeit zur Konzentrationsbestimmung in Humanseren ausgetestet und seine Reproduzierbarkeit verbessert.

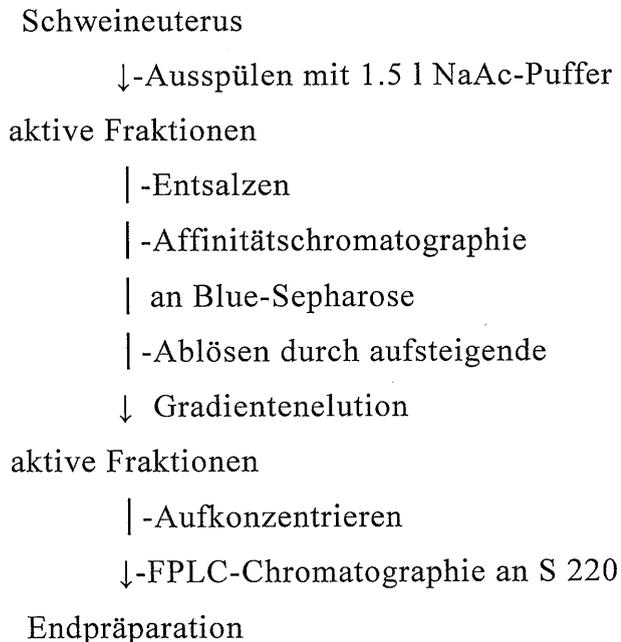
2. Isolierung und Charakterisierung der Violetten Phosphatase aus Humanplazenta

2.1. Isolierung der Typ 5 Phosphatase aus Humanplazenta

Die Typ 5 Phosphatase ist selbst unter pathologischen Bedingungen beim Menschen nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Zudem ist Humangewebe zur Isolierung dieses Enzyms nur schwer zugänglich.

Deshalb wurde zunächst Uteroferrin, eine violette saure Phosphatase aus Schweineuterus mit großer Strukturhomologie zu dem menschlichen Enzym nach einer modifizierten Methode nach Aisen und Antanaitis isoliert. Nach Applikation von Progesteron in den ersten Zyklustagen entwickelten die Schweine eine Scheinschwangerschaft mit maximaler Enzymsezernierung nach 60 Tagen. In einem Mehrschritt-Isolierungsgang mit Affinitäts- und Säulenchromatographie konnte die Schweineuterusphosphatase in hoher Ausbeute von 90 mg/Uterus ausgespült werden und bis zur Homogenität aufgereinigt werden.

Abb. 2-1 gibt einen schematischen Überblick über die einzelnen Isolierungsschritte.



2.1.-1. Herstellung und Isolierung polyklonaler Antikörper gegen Schweineuterusphosphatase

Begrenzt durch die niedrige Konzentration der Typ 5 Phosphatase im menschlichen Gewebe, wie auch aufgrund der geringen Stabilität des Humanenzym ließ sich durch ein solch aufwendiges Isolierungsverfahren, wie es bei den übrigen Säugetierphosphatasen angewendet werden konnte, das homologe menschliche Enzym nicht isolieren. Eine weit bessere Methode zur Aufreinigung der menschlichen Typ 5 Phosphatase zeigte sich in der Anwendung einer Immunoaffinitäts-Chromatographie mit Kaninchen-Antikörpern gegen das Enzym isoliert aus dem Uterus scheinträchtiger Schweine. Durch die spezifische Wechselwirkung von Antigen und Antikörper mit hoher Affinität zueinander, lassen sich Fremdproteine durch die gezielte Affinitäts-Chromatographie selektiv abtrennen.

Nach Kontakt mit Antigenen produziert der Säugetierorganismus als Immunantwort auf diese fremden Substanzen Antikörper. Nach einem ersten Kontakt mit einem neuen Antigen reagiert der Organismus in einer Primärantwort mit der Ausschüttung von Immunglobulinen der Unterklasse M (IgM). Bei weiterem Kontakt mit dem Antigen erfolgt in einer Sekundärantwort weitgehend die Bildung von IgG-Antikörpern.

Für die erste Immunisierung des Kaninchens wurden 0.5 mg Uteroferrin, gelöst in 0.01M NaAc-Puffer, in komplettem Freund 'schen Adjuvans emulgiert und appliziert. Das Freund' sche Adjuvans bewirkt eine langsamere und kontinuierliche Freigabe des Antigens. Um eine Erhöhung der IgG-Antikörper zu erreichen, wurden drei und fünf Wochen später zwei "Booster"-Injektionen mit je 0.5 mg des Schweineenzym, gelöst in inkomplettem Freund' schen Adjuvans, verabreicht. Zur Gewinnung der IgG-Antikörper wurde 6 Wochen nach der ersten Immunisierung durch eine Punktion der Ohrvene etwa 50 ml Kaninchenserum gewonnen.

Eine schnelle und spezifische Abtrennung der Anti-Uteroferrin Antikörper von den übrigen Serumproteinen ermöglichte eine Affinitätschromatographie. Hierzu wurde Violette Phosphatase an einer Matrix aus CH-aktivierter Sepharose 4-B immobilisiert und das Kaninchen-Antiserum in PBS-Puffer pH 7.4 eluiert. Die spezifisch gebundenen Uteroferrin-Antikörper wurden nach weiterem Spülen mit 0.1M Glycin-Puffer pH 2.8 desorbiert. Zur Reinheitsüberprüfung wurde die Isolierung der Antikörper SDS-gelelektrophoretisch verfolgt.

Die so gewonnenen 10.5 mg Anti-Uteroferrin Antikörper wurden an eine CH-aktivierte Sepharose 4-B Matrix kovalent gebunden.

Mit dieser Chromatographie über eine Immunoaffinitätssäule bietet sich nun eine neue Methode zur effektiven und spezifischen Abtrennung der menschlichen Tartrat-resistenten Typ 5 Phosphatase von begleitenden Fremdproteinen in einem schnellen Isolierungsverfahren an.

2.1.-2. Aufreinigung der Humanplazentaphosphatase durch Affinitätschromatographie an Anti-Uteroferrin Antikörper-Sepharose 4-B

Zur Isolierung der Violetten Phosphatase aus Humangewebe wurde eine Plazenta unmittelbar nach der Entbindung mit 300 ml 0.1 M Acetatpuffer pH 5.0 ausgespült. Die Waschlösung wurde anschließend bei 10.000 x g für 30 min. bei 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in dem gleichen Volumen 0.1 M PBS Puffer pH 7.4 aufgenommen und über die Anti-Uteroferrin Antikörpersäule eluiert. Dabei wird die Humanplazentaphosphatase über die Anti-Schweineuterus-Phosphatase Antikörper an das Säulenmaterial gebunden. Ein anschließendes Spülen der Säule mit PBS-Puffer wäscht nicht gebundene Begleitproteine vom Säulenmaterial. Abb. 2-1 zeigt das Elutionsprofil nach Spülen der Säule mit PBS-Puffer und anschließender Desorption mit Glycin-Puffer pH 2.8.

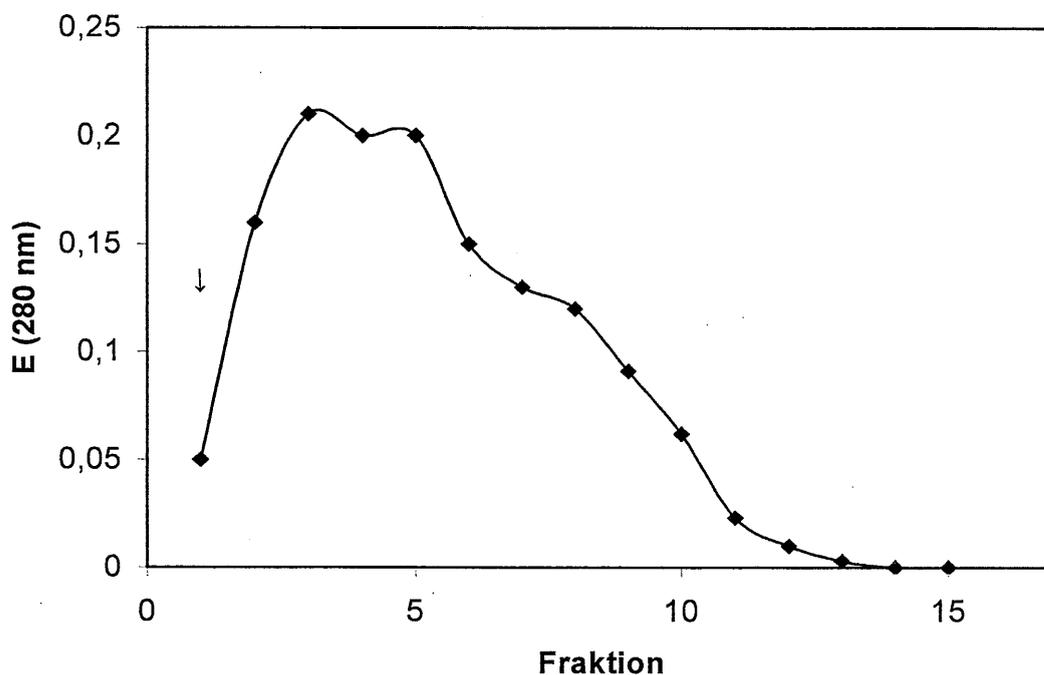


Abb.2-1 Affinitätschromatographie an Anti-Uteroferrin-Antikörper-Sephrose 4-B,
Elution mit 0.1M PBS-Puffer pH 7.4 und anschließender (↓) Desorption des Uteroferrins mit 0.1M Glycin- Puffer pH 2.8

Durch Elution mit 50ml PBS-Puffer konnten störende Begleitproteine, wie das Hämoglobin, abgetrennt werden. Mit Glycin-Puffer wird anschließend die spezifische Bindung zwischen Humanplazenta-Phosphatase und Anti-Schweineuterus-Phosphatase Antikörpern aufgehoben, so daß das menschliche Protein vom Säulenmaterial abgewaschen werden kann. Die in Glycin-Puffer pH 2.8 eluierte menschliche Phosphatase wurde anschließend sofort auf pH 5.5 umgepuffert, um die Stabilität des Proteins nicht zu gefährden. In den vereinigten Hauptfraktionen konnten 0.8 μ kat spezifischer Aktivität bestimmt werden. Die SDS-Gelelektrophorese mit Enzymproben aus den Hauptfraktionen einer Anti-Uteroferrin Antikörper Sephrose 4-B, dargestellt in Abb. 2-2, veranschaulicht den Reinigungseffekt der Affinitätschromatographie gegenüber der Spüllösung.

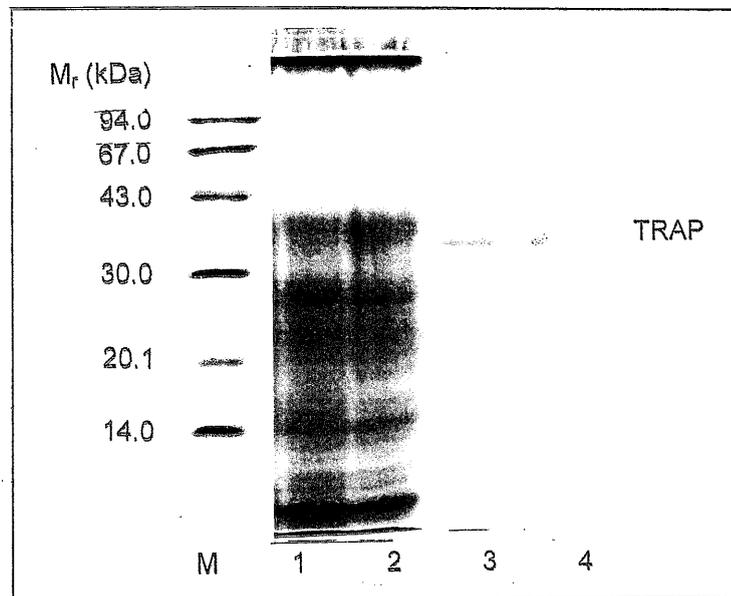


Abb. 2-2 SDS-Gelelektrophorese der Proteinproben aus dem Elutionsprofil der Anti-Uteroferrin Antikörper Sepharose 4-B (vergl. Abb. 2-1)

M- Marker; 1- Humanplazenta-Proteinlösung vor der Auftrennung; 2- Proteinlösung aus dem Durchlauf (Fr.2); 3 u. 4- Humanplazenta-phosphatase (TRAP) (Fr. 3)

Durch die hochspezifische Wechselwirkung des Humanplazentaenzym mit der Immunoaffinitätssäule kann diese Methode den Isolierungsgang zeitlich deutlich verkürzen und so, trotz der geringen Stabilität der Humanphosphatase, hinreichend Enzym erhalten werden, um immunologische Untersuchungen durchführen zu können.

3. ELISA zur Detektion der Humanplazenta Phosphatase

3.1. Entwicklung eines spezifischen ELISA

Enzym-Immuno-Assay (EIA) ist ein Meßverfahren zur Quantifizierung kleinster Substanzmengen durch hochspezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen. Durch unterschiedliche Reaktionsführung lassen unterschiedliche EIAs differenzieren.

In der klinischen Analytik werden zur Bestimmung von Pharmaka und Hormonen häufig homogene EIA angewandt. Bei diesem Meßprinzip wird in einer einstufigen Reaktion in einer Flüssigphase durch die Antigen-Antikörper-Bindung ein verändertes Meßsignal erzeugt. Da Trenn- und Waschschrte entfallen, bietet das homogene Assay eine schnelle Bestimmungsmöglichkeit, jedoch mit deutlich schlechterer Empfindlichkeit gegenüber einem heterogen geführten EIA.

Bei einem heterogenen EIA wird entweder das Antigen oder der Antikörper unspezifisch an eine feste Matrix gekoppelt. Durch eine Mehrschritt-Reaktion läßt sich die Sensitivität des Nachweises erhöhen. Heterogene Assays lassen sich kompetitiv oder nicht kompetitiv durchführen. Bei der kompetitiven Methode konkurrieren ein markiertes und ein unmarkiertes Antigen um die gleich Antikörperbindungsstelle. Durch Zugabe von nicht-markierter Antigenprobe wird das markierte Antigen von seiner Bindungsstelle verdrängt. Das Meßsignal ist hierbei umgekehrt proportional zu der bestimmenden Antigenkonzentration (Friemel und Holzheidt, 1984). Bei dem kompetitiven EIA entfällt die Verdrängungsreaktion und man erhält ein Meßsignal proportional der Antigenkonzentration. Das Meßsignal läßt sich direkt durch Kopplung des farbgebenden Komplexes an den spezifischen Antikörper erzeugen oder durch ein indirektes Verfahren. Hierbei wird in einem weiteren Reaktionsschritt ein zweiter Antikörper, der mit dem farbgebenden

Komplex verbunden ist, spezifisch an den ersten Antikörper gekoppelt. Durch diesen weiteren Reaktionsschritt läßt sich die Signalintensität weiter verstärken. Die Auswahl der richtigen Assaymethode wird beeinflusst durch Probendurchsatz, Zeitaufwand und Empfindlichkeit und muß auf die jeweilige Fragestellung angepasst werden.

Für die Untersuchungen zur Quantifizierung der Tartrat-resistenten Human-Phosphatase wurde ein heterogener, nicht kompetitiver, direkter Biotin-Streptavidin-ELISA entwickelt.

Die Vorzüge dieses Biotinsystems gegenüber dem direkten Antikörper-Peroxidase-Konjugat-System bestehen in seiner sehr einfachen Reaktionsführung bezüglich der Derivatisierung der Immunglobuline und Enzyme, einem minimalen apparativen Aufwand und einer niedrigen Antikörperkonzentration bei der Konjugierung. So sind für die Herstellung des Peroxidase-Antikörper-Komplexes Konzentrationen von 6-8 mg/ml Antikörper notwendig (Tijssen, 1985), für eine Kopplung über die Biotinylierung reicht eine Antikörperkonzentration von 0.5-3 mg/ml (Harlow and Laue, 1988).

Das Biotin, häufig als N-Hydroxysuccinimidester genutzt, reagiert mit den Proteinaminogruppen unter milden Reaktionsbedingungen zwischen pH 7-9 unter Ausbildung einer Amidbindung. Biotin wird mit großer Affinität von Avidin und Streptavidin gebunden. Beide Proteine besitzen vier nichtkovalente Bindungsstellen für das Biotin mit einer Bindungskonstanten von 10^{15}M^{-1} (Chaiet, 1964). Das Avidin ist ein 68 kDa Glycoprotein aus Hühnereiweiß mit einem pI um 10 (Greene, 1975). Das Streptavidin, isoliert aus *Streptomyces avidinii*, ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 60 kDa und einem pI im schwach sauren Bereich. Der Zuckeranteil des Avidins, sowie der basische pI, führen häufig zu unspezifischer Adsorption und resultiert damit gegenüber dem Streptavidin in einem höheren Hintergrundsignal in heterogenen Enzym-Immuno-Assays

(Peters and Baumgarten, 1990). Das Streptavidin verbrückt den Antikörper-Antigen-Antikörper-Sandwich Komplex über Biotingruppen mit einem biotinylierten farbgebenden Komplex. Als farbgebender Marker wird häufig eine Enzymreaktion genutzt, wobei die Enzyme, wie alkalische Phosphatase, β -Galaktosidase oder, wie hier, die Peroxidase an den Streptavidinkomplex gekoppelt werden. Die Peroxidase aus Meerrettich (HRP) zeichnet sich durch besonders geringe Aktivitätsverluste durch die Biotinylierungsreaktion aus (Ternynck and Avrameas, 1990).

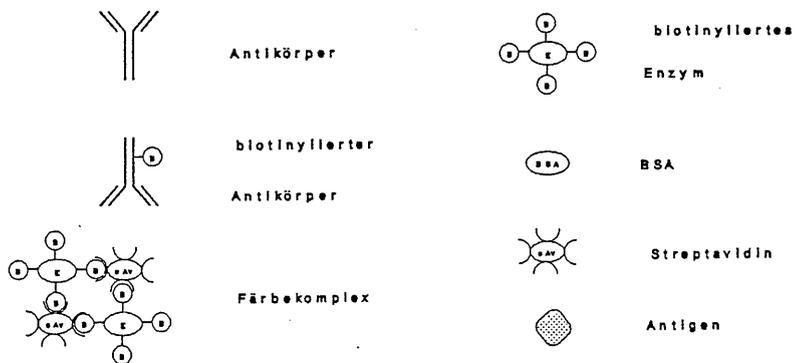
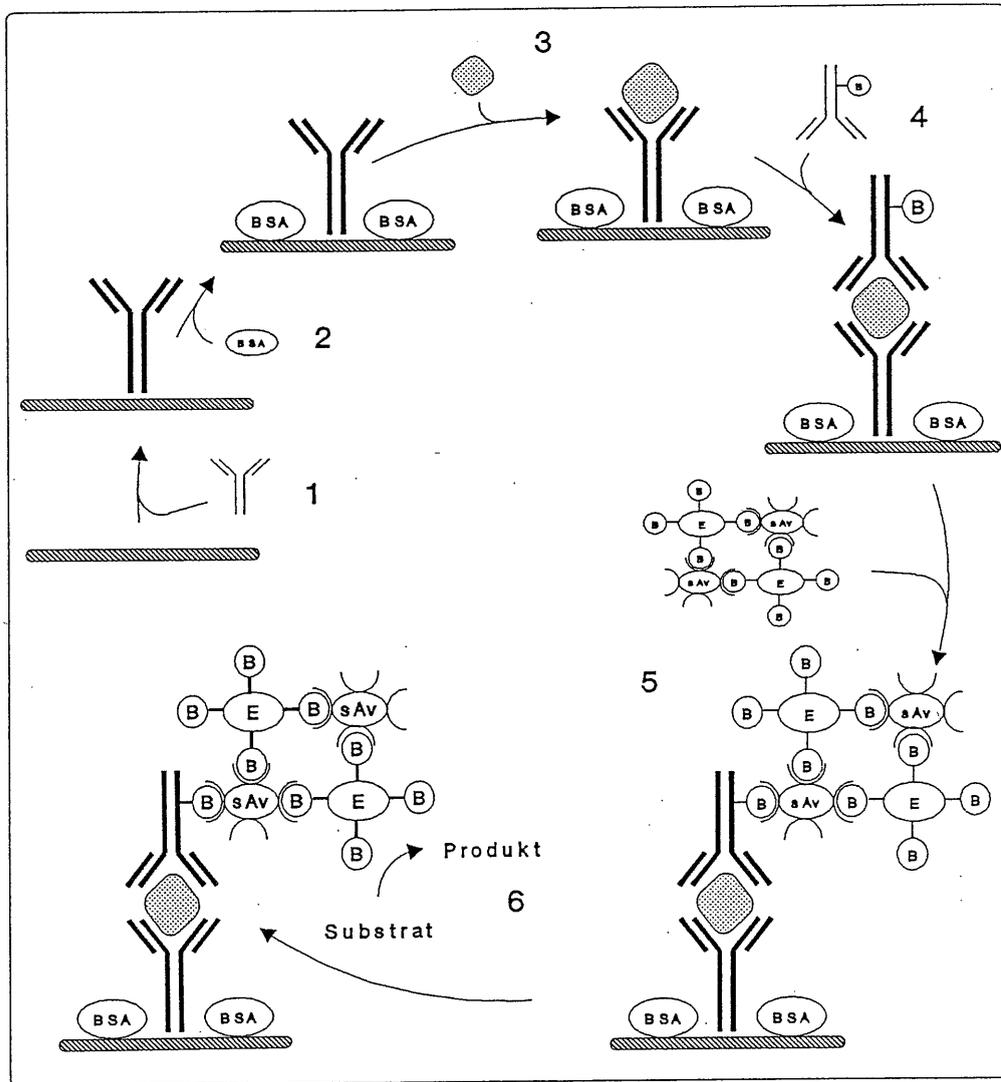


Abb. 3.-1 Biotin-Streptavidin-ELISA (schematisch)

In Abb. 3.-1 ist das Prinzip des Biotin-Streptavidin-ELISA dargestellt. Zunächst wird ein spezifischer Antikörper für das zu bestimmende Antigen auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert (1). Die Anbindung dieses ersten Antikörpers an die feste Matrix erfolgt durch unspezifische Adsorption. Noch vorhandene freie Bindungsstellen an der Matrix werden durch Inkubation mit Rinderserumalbumin (BSA) abgesättigt (2). Dadurch wird verhindert, daß das Antigen, welches im nachfolgenden Schritt zugesetzt wird, ebenfalls an die Mikrotiterplatte anbindet. Nach Inkubation mit dem Antigen (3), das sich spezifisch an den ersten Antikörper anlagert, wird im Folgeschritt ein zweiter biotinylierter spezifischer Antikörper an das Antigen gebunden (4). Daneben wird zur Bildung des Färbekomplexes die ebenfalls biotinylierte Peroxidase mit dem Streptavidin inkubiert. Der so gebildete Färbekomplex besteht aus mehreren Enzymmolekülen, die durch Streptavidin miteinander verbrückt sind. Dieser Komplex wird zu dem Sandwich aus erstem Antikörper, Antigen und biotinyliertem zweiten Antikörper gegeben. Der Färbekomplex besitzt über das Streptavidin noch genügend freie Bindungsstellen, um sich an das kovalent gebundene Biotin am zweiten Antikörper anzulagern (5). Im letzten Reaktionsschritt wird das Substrat zugegeben (6). Die enzymatische Umsetzung kann photometrisch verfolgt werden und ist proportional der Enzymmenge und somit auch der Antigenkonzentration.

3.2. Optimierung des Färbekomplexes

Bei dem hier genutzten ELISA setzt sich der Färbekomplex (bHRP-sAv-Komplex) aus biotinylierter Peroxidase (bHRP) und Streptavidin (sAv) zusammen. Ein optimierter Komplex besitzt eine größtmögliche Anzahl von Streptavidin-verbrückten Peroxidasen, aber auch eine ausreichend große Menge freier Bindungsstellen zur Ankopplung des Komplexes an den biotinylierten zweiten Antikörper. So kann eine maximale Menge an Substrat pro gebundenen biotinylierten Antikörper umgesetzt werden. Über

diese Anlagerungsschritte wird die Sensitivität eines ELISA entscheidend beeinflusst. Zur Bestimmung des optimalen bHRP-sAv-Verhältnisses wurde die Streptavidinkonzentration mit 10 nM und die Antigenkonzentration mit 2 ng/ml Tartrat-resistente Phosphatase konstant gehalten. Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten wurde jeweils mit 2,5 µg/ml Anti-TRAP-Antikörper immobilisiert. Der biotinylierte zweite Anti-TRAP-Antikörper wurde mit einer Konzentration von 2.0 µg/ml eingesetzt. Als variabler Parameter wurde die Konzentration der bHRP zwischen 12 nM und 144 nM ausgetestet.

Abb. 3.2 gibt den Verlauf der relativen Absorption bei 490 nm, hervorgerufen durch die enzymatische Umsetzung des o-Phenylendiamins, in Abhängigkeit von dem bHRP-sAv-Verhältnis wieder. Als optimal für den ELISA mit diesem Antigen-Antikörper Größenverhältnissen wurde ein bHRP-sAv-Verhältnis von 3.2 ermittelt.

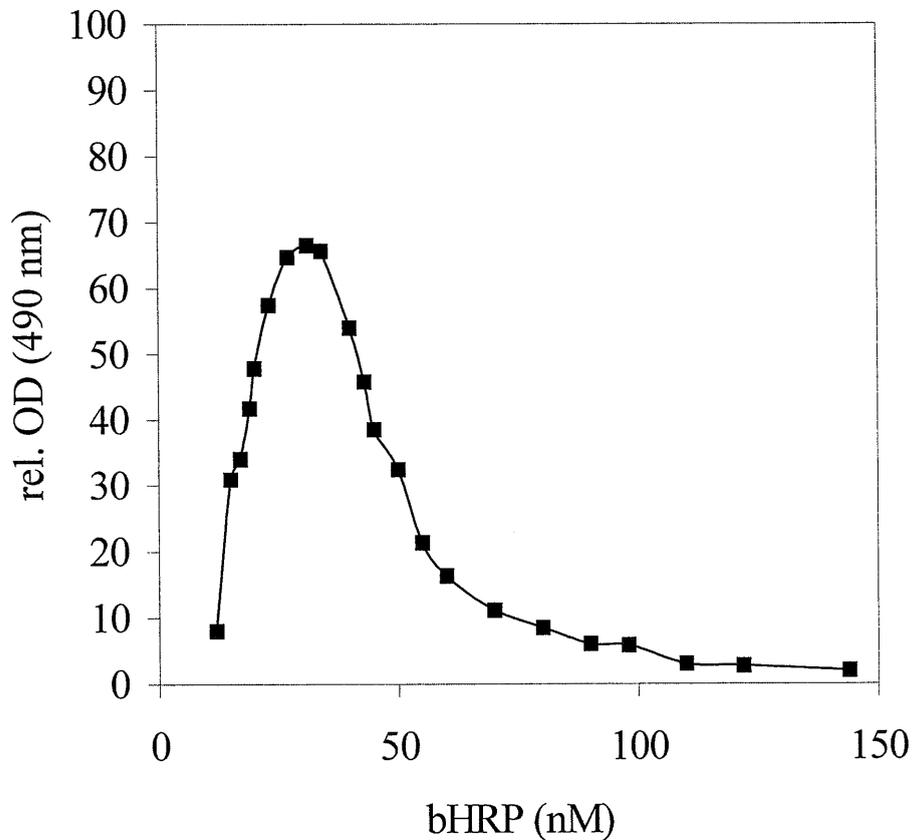


Abb. 3.-2 Optimierung des Färbekomplexes bestimmt durch die Absorption bei 490 nm in Abhängigkeit eines variablen bHRP-sAv-Verhältnis

Streptavidin 10 nM, TRAP 2 ng/ml, Anti-TRAP-AK 2,5 µg/ml

3.3. Optimierung der Antikörperkonzentration zur Immobilisierung an der Mikrotiterplatte

Neben der Optimierung des Farbkomplexes stellt das Adsorptionsvermögen der Festphase, sowie die auf ihr immobilisierte Antikörperkonzentration ein entscheidendes Kriterium dar, daß die Detektionsgrenze eines ELISA mit beeinflußt. So konnte gezeigt werden, daß PVC-Mikrotiterplatten gegenüber einer Matrix aus Polystyrol eine geringere

Proteinbindungskapazität besitzen. Auch die Art der Nachbehandlung bei der Plattenherstellung zeigt Einfluß auf die Bindungseigenschaften. Platten, die mit γ -Strahlung sterilisiert wurden, hatten kaum Antikörperverlust durch die Waschprozeduren (Peters and Baumgarten, 1990). Das größte Adsorptionsvermögen und ein linearer Verlauf zwischen der Extinktion und der Antigenkonzentration wurde für NUNC-Mikrotiterplatten aus Polystyrol (Immunoplatte II F) festgestellt (Rump, 1991). Die weiteren Optimierungsstudien wurden deshalb mit diesen Polystyrolplatten unternommen.

Um eine Minimierung der Antikörperkonzentration für die Immobilisierung bei ausreichender Sättigung der Matrix zu erzielen, wurde der ELISA mit variablen Antikörperkonzentrationen durchgeführt. Der Meßbereich wurde zwischen 0.5 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ gewählt. Die Antigenkonzentration wurde mit 0.1, 1.0 und 50 ng/ml TRAP so ausgewählt, daß über einen großen Antigenmeßbereich die Beschichtung der Polystyrolplatte mit primärem Antikörper ausreichende Bindungsstellen lieferte. Der biotinylierte spezifische zweite Antikörper wurde bei allen Tests in einer Konzentration von 2.5 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Abb. 3.-3 zeigt in Abhängigkeit von der immobilisierten Antikörperkonzentration die relative Extinktion für verschiedene Antigenkonzentrationen, gemessen bei 490 nm. Ab 2 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper wurde auch für die Detektion von größeren Antigenmengen lineares Verhalten festgestellt. Eine höhere Beschichtungsdichte mit Anti-Phosphatase-Antikörper erbrachte keine Steigerung der Detektions-empfindlichkeit.

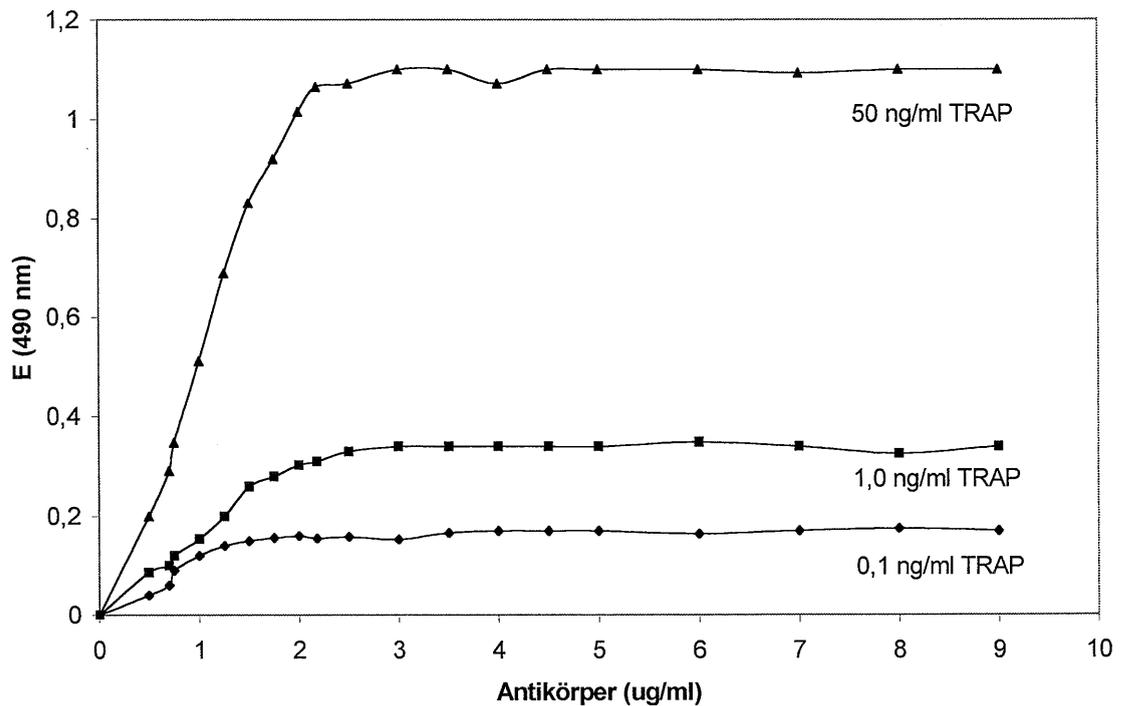


Abb. 3.-3 Optimierung der Konzentration der immobilisierten Antikörper im ELISA

Beschichtung der Mikrotiterplatte mit 0,5-10 $\mu\text{g/ml}$ AK, 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml sowie 50 ng/ml PAP, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ biotinylierter AK, Färbekomplex aus 12 nM sAv/34 nM bHRP

3.4. Bestimmung der optimalen Konzentration an biotinyliertem Antikörper

In dem hier angewandten ELISA mit Sandwich-Technik folgt nach Absättigung der Festphase mit Antikörper und anschließender Kopplung des Antigen, die direkte Andockung des biotinylierten spezifischen Antikörpers. Auch für diesen Reaktionsschritt wurden die Bedingungen für den Nachweis der humanen Phosphatase verbessert. Der Konzentrationsbereich für den biotinylierten Anti-TRAP-Antikörper wurde zwischen 0,5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ untersucht. Die Beschichtung der Mikrotiterplatte wurde mit 2,0 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper durchgeführt. Die

Antigenkonzentration wurde, wie auch bei den Untersuchungen zur Verbesserung der Beschichtungskonzentration, auf 0,1, 1,0 und 50 ng/ml eingestellt.

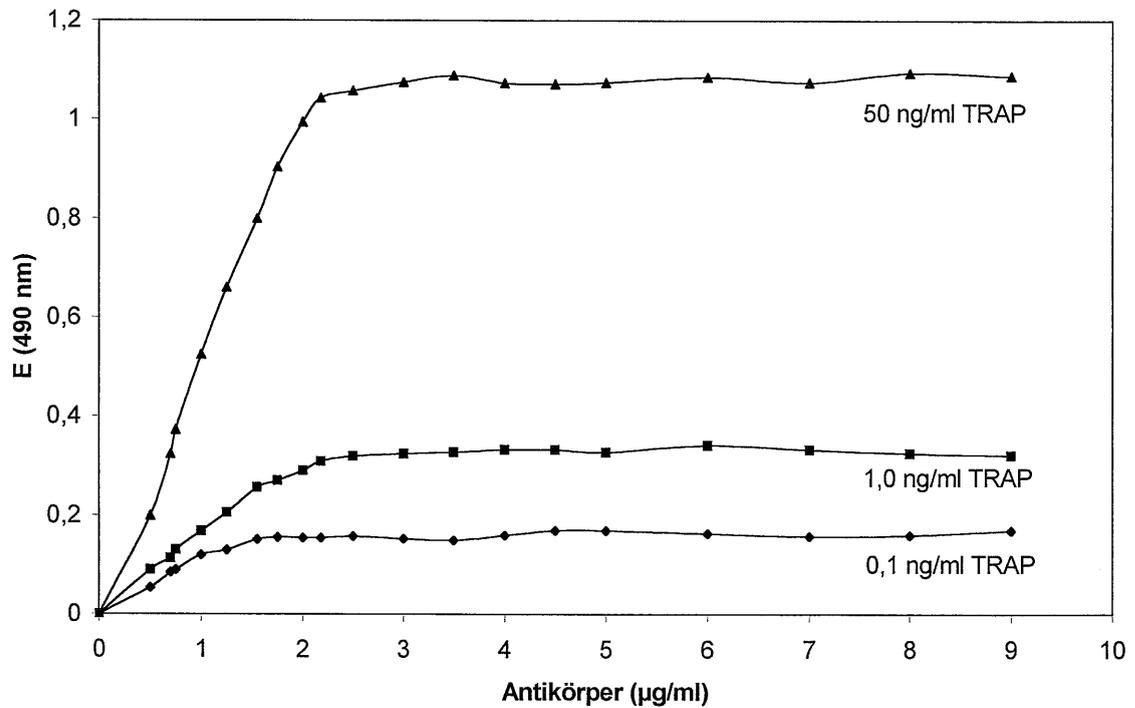


Abb. 3.-4 Optimierung der Konzentration der biotinylierten Antikörper im ELISA

Beschichtung der Mikrotiterplatte mit 2 µg/ml AK, 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml sowie 50 ng/ml PAP, 0,5 µg/ml - 10 µg/ml biotinylierter AK, Färbekomplex aus 12 nM sAv/34 nM bHRP

Selbst bei höheren Konzentrationen an Antigen konnte bei einer Konzentration von 2,0 µg/ml biotinyliertem Anti-Phosphatase-Antikörper ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration des zugesetzten biotinylierten Antikörpers und der Absorption bei 490 nm festgestellt werden.

Die optimierten Bedingungen für die quantitative Erfassung der humanen Tartrat-resistenten Phosphatase in einem heterogenen, indirekten ELISA sind im Folgenden zusammengefaßt:

1. Immobilisieren der Mikrotiterplatten mit 2 µg/ml spezifischem Antikörper.
2. Absättigen der freien Bindungsstellen mit Rinderserumalbumin.
3. Zugabe von Antigenstandardreihen und Antigenmeßproben bis 50 ng/ml.
4. Ankopplung des biotinylierten spezifischen Antikörpers mit 2 µg/ml.
5. Inkubation mit dem Färbekomplex aus Peroxidase und Streptavidin M/M=3.2.
6. Photometrische Detektion bei 490 nm.

3.5. Erfassung der Meßgrenze des optimierten Biotin-Streptavidin-Assays

Die Variabilität der einzelnen Reaktionsschritte, wie Inkubationszeiten und Konzentrationen, verändern die Meßsignale, so daß eine Standardisierung der Assays unumgänglich ist. Aus diesem Grund muß jeder ELISA-Ansatz mit einer Konzentrationsreihe des Antigens geeicht werden.

Zur Bestimmung der Detektionsgrenzen des ELISA wurde das Antigen in einer Eichreihe von 1 pg/ml bis 50 ng/ml aufgetragen. Der lineare Erfassungsbereich konnte bis zu 5 pg/ml TRAP gesenkt werden. Höhere Konzentrationen an Antigen als 50 mg/ml führten unter den angegebenen Bedingungen zu einer Sättigung des Systems und ließen sich somit nicht mehr getrennt erfassen. Eine Eichgrade zur Bestimmung des humanen Isoenzym 5 ist in Abb. 3.5 dargestellt.

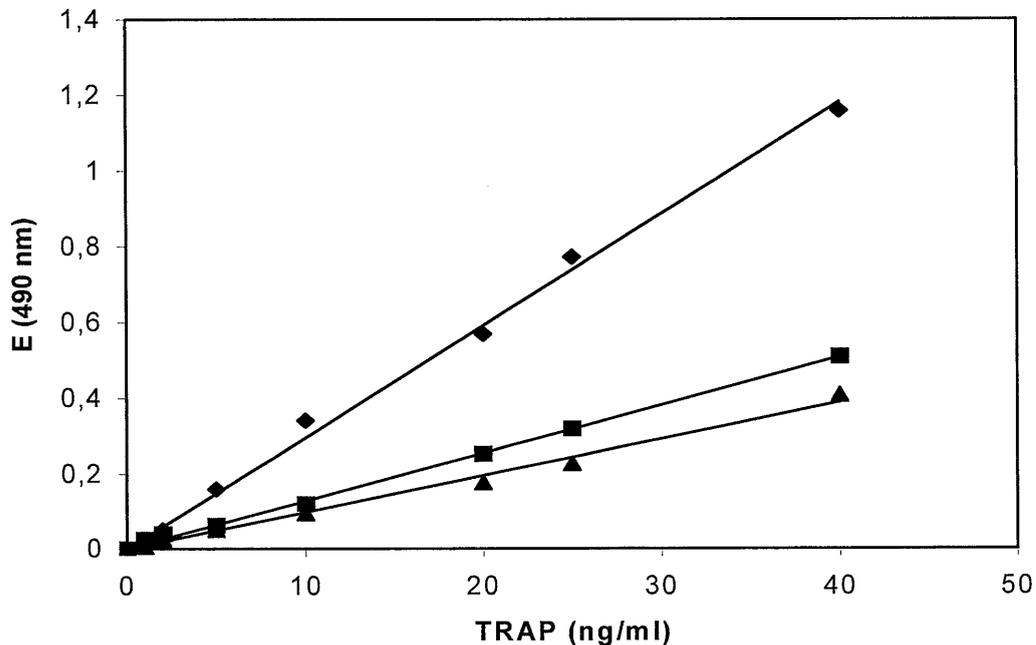


Abb. 3.-5 Eichung des Biotin-ELISA für Human-PAP

Beschichtung der Mikrotiterplatte mit 2 µg/ml AK, 1 pg/ml - 50 ng/ml PAP, 2,5 µg/ml biotinylierter AK, Färbekomplex aus 12 nM sAv/34 nM bHRP

Störeinflüsse, die die Spezifität und auch die Sensitivität eines Assays negativ beeinflussen, können unter anderem durch unspezifische Wechselwirkungen der immobilisierten Antikörper mit nicht verwandten Fremdproteinen entstehen. Vor allem beim Bestimmen der TRAP aus Blutseren liegt neben dem spezifischen Antigen ein Übermaß an Fremdproteinen und unspezifischen Antikörpern vor. Die Qualität der spezifischen Antikörper trägt hierbei entscheidend dazu bei, die unspezifische Anbindung von Fremdproteinen zu verhindern und nur die Determinanten der spezifischen Antigene zu erkennen.

Deshalb wurde der Eichreihe an human TRAP Albumin in einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Gegenüber der Eichreihe ohne

Fremdproteinzusatz konnte, selbst bei kleinen Antigenmengen kein Unterschied in der Detektionsgröße festgestellt werden.

3.6. Quantifizierung der Kreuzreaktion homologer Tartrat-resistenter saurer Phosphatase-Spezies durch ELISA

Wie aus Tab.3.-1 ersichtlich, konnte eine Typ 5 Phosphatase bei einigen Säugetieren in unterschiedlicher Gewebeverteilung gefunden werden. Durch Western-Blot-Analyse konnte eine gute Kreuzreaktivität auch zwischen den Isoformen verschiedener Spezies gefunden werden. Durch einen Vergleich der Aminosäure- und Basensequenz zeigt sich die große Homologie nicht nur bei Phosphatasen aus unterschiedlichen Geweben einer Säugetierspezies, sondern auch zwischen den verschiedenen Klassen mit einer Übereinstimmung von bis zu 90% (Ketcham et al.,1989).

Die große Ähnlichkeit der Epitope läßt darauf schließen, daß durch einen Antikörperklon entsprechende antigene Determinanten von mehreren Spezies mit ausreichender Bindungsaffinität gebunden werden. Die unterschiedliche Homologie läßt jedoch unterschiedlich starke Affinität der verschiedenen Typ 5 Phosphatasen zu jeweils einem Antikörper vermuten.

Zur Quantifizierung der Affinität von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen verschiedener homologer Phosphatasespezies wurde der optimierte Biotin-Streptavidin-ELISA mit Antikörpern gegen die humane Plazenta Typ 5 Phosphatase angewandt.

Als Antigene wurden die Violetten sauren Phosphatasen isoliert aus Rindermilz, Schweineuterus (Uteroferrin) und Human Plazenta untersucht. Die homologen Proteine wurden in Verdünnungsreihen zwischen 1 ng/ml und 40 ng/ml zugesetzt. Die Proteinkonzentrationen wurden spektrophotometrisch kontrolliert.

In Abb. 3.-6 ist das Ergebnis der Bestimmung der drei verwandten Antigene mit dem gleichen Assay wiedergegeben. Bei allen untersuchten Antigenen besteht eine lineare Beziehung zwischen der eingesetzten Konzentration an Phosphatase und der Absorption über den gesamten Antigenkonzentrationsbereich. Diese lineare Beziehung setzt eine hinreichend große Affinität der verschiedenen Antigene zu den Anti-Human Phosphatase-Antikörpern voraus. Aus der Steigung der Geraden läßt sich jedoch die unterschiedlich starke Bindungsaffinität zu dem Antikörper ermitteln. Dabei wurde die Bindungsstärke der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung in Beziehung gesetzt zum Meßsignal aus dem Humanplazenta-Phosphatase/Humanplazenta-Phosphatase-Antikörper-ELISA. Aus der geringeren Steigung bei der Detektion des Uteroferrins mit dem gleichen Assay läßt sich etwa eine 35 %ige Bindungsschwächung ableiten. Bei der Bestimmung der sequenzhomologen Rindermilzphosphatase ist die Affinität gegenüber der Humanphosphatase um 45 % kleiner.

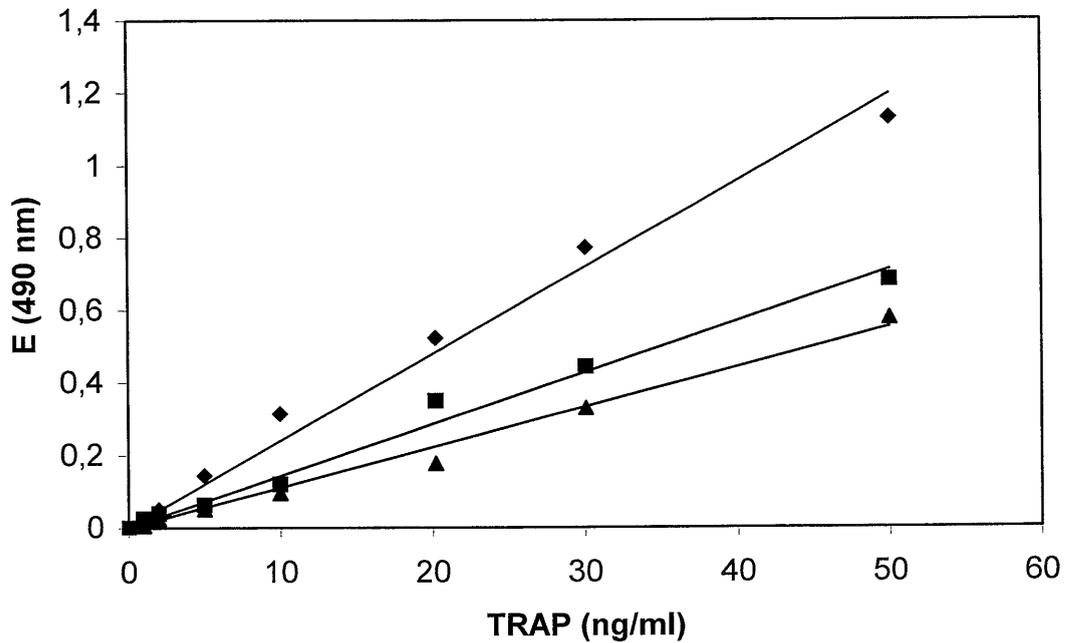


Abb. 3.-6 Vergleich der Detektion verschiedener PAP mit dem Biotin-Streptavidin-ELISA

Beschichtung der Mikrotiterplatte mit 2 $\mu\text{g/ml}$ AK, 1,0 ng/ml - 50 ng/ml PAP (1.) Humanplazenta, 2.) Rindermilzphosphatase, 3.) Uteroferrin), 2,5 $\mu\text{g/ml}$ biotinylierter AK, Färbekomplex aus 12 nM sAv/34 nM bHRP

Diese Auswertung zeigt, daß zwar homologe Proteine mit diesem ELISA erfaßt werden können, die Sensitivität jedoch etwas erniedrigt wird und ein Korrekturfaktor für die quantitative Bestimmung notwendig wird.

4. Diskussion

Die sauren Phosphatasen repräsentieren eine Gruppe von Enzymen, die sich bezüglich der strukturellen und immunologischen Eigenschaften sowie in Organvorkommen und subzellulärer Lokalisation unterscheiden. Bei der Spaltung von Phosphorsäureestern als Substrat weisen diese Enzymspezies ähnliche katalytische Eigenschaften auf und besitzen ein Hydrolyseoptimum im sauren pH-Bereich.

In humanem Gewebe sind bislang 7 Isoformen der sauren Phosphatase bekannt. So ist v. a. die tartratsensitive, saure Prostataphosphatase (Isoenzym 2) und die lysosomale Phosphatase (Isoenzym 4) von klinisch-relevanter Bedeutung. Das Isoenzym 2 der sauren Phosphatase gilt als Markerenzym für das Prostata-Adeno-Karzinom und läßt im Verlauf den Therapieerfolg überprüfen.

Die saure Phosphatase aus Haarzell-Leukämiezellen, die zuerst als rekombinantes Enzym isoliert wurde, wurde aufgrund der elektrophoretischen Eigenschaften später als saure Phosphatase Isoenzym 5 eingestuft. Andere Bezeichnungen sind die humane Typ-5-Phosphatase sowie tartratresistente saure Phosphatase (TRAP). Unterschiede in den verschiedenen physikochemischen Eigenschaften, die Varianz der Aminosäuresequenzen und die verschiedenen chromosomalen Lokalisationen der koordinierenden Gene zeigt, daß die vier vorbeschriebenen Isoenzyme mit der sauren Typ 5 Phosphatase nicht vergleichbar sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine saure Phosphatase aus Humangewebe, die der Isoenzymsubgruppe 5 zuzuordnen ist, bis zur elektrophoretischen Einheit isoliert und charakterisiert werden.

Aufgrund des geringen Vorkommens der Typ-5-Phosphatase im menschlichen Organismus sowie der großen Instabilität des Enzyms war es bislang trotz mehrfacher Versuche nicht gelungen, dieses Enzym durch konventionelle Chromatographien in einem Mehrschrittverfahren, wie es auch bei den anderen Säugetierphosphatasen möglich ist, zu isolieren.

Aus tierischem Gewebe wurde eine solche Phosphatase bereits in den sechziger Jahren von Glomset et al. 1961 aus Rindermilz isoliert. 1973 konnte auch von Chen et al. eine saure tartratresistente Phosphatase aus der Spülflüssigkeit von Schweineuteri isoliert werden, wo es nach Progesterongabe in erhöhter Konzentration gebildet wird.

Als biochemische Besonderheit gilt die hier erstmals isolierte Typ-5-Phosphatase aus Humangewebe, da sie ähnliche biochemische und physikalische Merkmale, wie die besser untersuchten tierischen Typ-5-Phosphatasen aufweisen. Aufgrund der neuartigen Enzymstrukturen der murinen Enzymanaloga mit ihrem katalytischen Zwei-Eisenzentrum, zeigte sich ein großes Interesse an der strukturellen Aufklärung und biochemischen Wirkweise dieses humanen Enzyms. Durch den Einbau von Eisenionen in das aktive Zentrum der murinen Enzyme ist das Protein in gereinigtem Zustand von violetter Farbe.

Von großem Interesse ist daher, ein derart strukturell interessantes Zwei-Eisenenzym auch aus menschlichem Gewebe zu isolieren und die Wirkweise der enzymatischen Aktivität aufzuklären. Parallel zur Struktur sollte auch die Funktion dieser Enzymklasse und ihr Vorkommen im menschlichen Organismus untersucht werden.

Die biochemischen Eigenschaften der tartratresistenten Phosphatase sind ähnlich: Ihre Hydrolyseeigenschaft läßt sich durch Tartrat nicht inhibieren, jedoch scheint eine Molybdatzugabe die Enzymaktivität zu reduzieren. Bei den bekannten tartratresistenten Phosphatasen handelt es sich um ein

Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 30 und 40 kDa, die zum Teil in zwei Isoformen mit unterschiedlich langen Kohlenhydratketten vorkommen. Die Proteine bestehen aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten von jeweils 16 und 23 kDa, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die Hydrolyseaktivität der Enzymgruppe zeigt ein pH-Optimum im sauren Bereich zwischen pH 5 und pH 6. Der PI dieser Enzymgruppe liegt im Basischen bei einem pH zwischen 8,5 und 9,0.

Obwohl die biochemische Funktionsweise der Violetten Phosphatasen weitgehend aufgeklärt erscheint, läßt sich bislang kein physiologisch vorkommendes Substrat eindeutig zuordnen. Weder für den physiologischen, noch für den pathologischen Zustand des menschlichen Organismus läßt sich eine sichere Erklärung für die Funktion des Zwei-Eisen-Enzyms beim Menschen ableiten. Dem Schweineenzym Uteroferrin, das Progesteron-induziert synthetisiert in den fetalen Kreislauf gelangt, wird eine Eisentransportfunktion zugeschrieben, da radioaktiv markiertes Eisen, das in das katalytische Zentrum eingebaut wurde, auch im fetalen Hämoglobin nachgewiesen wurde. Der Milzphosphatase, die überwiegend in ferritinhaltigen Zellen lokalisiert erscheint, wird die Funktion einer Phospho-Protein-Phosphatase zugeschrieben, die durch Dephosphorylierung an der Erythrozytenmembran die gealterten Erythrozyten in der Milz lysiert (Schindelmeiser et al., 1987). Deutlich erhöhte Konzentrationen der Violetten Phosphatase konnten bei Erkrankungen mit erhöhter Osteoklastentätigkeit bei osteodestruktiven Prozessen wie Morbus Gaucher und Morbus Paget im Serum nachgewiesen werden (Li et al., 1973; Lau et al., 1987). In späteren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, daß durch die Enzyminhibierung auch die Knochenresorption gehemmt werden konnte (Zaidi et al., 1989). In vitro dephosphoryliert die Haezcell-Leukämie-Phosphatase, aktivierte Tyrosin-Phosphat-Reste von Proteinen. Da die Phosphorylierung und die Dephosphorylierung von Tyrosinen einen Steuerungsmechanismus bei

zellulären Prozessen darstellt, wird hier ein Regulationsmechanismus durch die Phosphatase vermutet (Janckila et al., 1992).

Für Uteroferrin und die Rindermilzphosphatase konnte eine katalytische Wirkung auf Hydroxylradikale festgestellt werden (Sybille et al., 1987). Heimann konnte nachweisen, daß auch in vitro die Bildung von Hydroxyl- und Peroxidradikalen durch ein Zwei-Eisen-Zentrum mit ähnlich strukturellem Aufbau durchgeführt werden kann. Aufgrund dieser Eigenschaften des synthetischen Komplexes wird auch für die menschliche Phosphatase eine mikrobiozide Wirkung im Ureter in Zusammenhang mit der Radikalbildung durch die tartratresistente saure Phosphatase diskutiert (Schindelmeier et al., 1996). Unter dem Einfluß der humanen Plazentaphosphatase und des Uteroferrins konnte in Zellkulturen von Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Megakaryozyten eine Wachstumsstimulierung der Zellen nachgewiesen werden. Hieraus wurde abgeleitet, daß eine Stimulierung der Hämatopoese und eine Kolonisation der hämatopoetischen Organe zu Beginn der Schwangerschaft gesteuert wird (Bazer et al., 1993). Da auf m-RNA- und Proteinebene die Bildung der Isoenzym 5-Phosphatase geregelt wird, läßt sich daraus auch eine mögliche Bedeutung für das Zellwachstum und die Differenzierung ableiten.

Ähnlich wie die humane Typ-5-Phosphatase, die meist unter pathologischen Bedingungen in Leukozyten und den von ihm abgeleiteten Zellen wie Makrophagen, Lymphozyten, Monozyten oder Granulozyten vorkommt, gehört auch die saure Rindermilzphosphatase und das Uteroferrin morphologisch zur gleichen Substanzklasse (Efstradiadis et al., 1985; Ketcham et al., 1989). Physiologisch findet man eine höhere Konzentration der tartratresistenten, sauren Phosphatase in Zellen, die vom Monozyten-Phagozyten-System abgeleitet sind, wie Osteoklasten (Minkin, 1982) und Alveolarmakrophagen (Efstradiadis et Moss, 1985). Auch Alveolarmakrophagen zeigen nach massiven Antigen-Kontakt, z. B. infolge

einer akuten Infektion signifikant erhöhte Phosphatase-exprimierende Alveolarmakrophagen (Schindelmeiser et al., 1989 und 1990). TRAP-positive Mikrogliazellen, die ebenfalls zur den Makrophagenabkömmlingen zählen, konnten bei HIV-positiven Patienten detektiert werden. Von Schindelmeiser et al. 1989 wurde beschrieben, daß die Makrophagen über die Blut-Hirn-Schranke ins Hirnparenchym gelangen.

Obwohl die humanen Milzmakrophagen unter physiologischen Bedingungen keine erhöhten Mengen der tartratresistenten sauren Phosphatase produzieren, zeigen hingegen ortsständige Milzmakrophagen bei Patienten mit Morbus Hodgkin oder Morbus Gaucher eine deutlich erhöhte Aktivität. Erhöhte Phosphatasekonzentrationen wurden auch in Lebermakrophagen (von Kupffer'schen Sternzellen) und Lymphozyten gefunden, die bei Patienten mit lymphatischer Leukämie pathologisch erhöht waren (Ketcham et al., 1985).

Die erhöhte immunologische Kreuzreaktivität der Typ-5-Phosphatasen aus unterschiedlichem Säugetiergewebe sind auf die Homologien in der Primärstruktur der Enzyme zurückzuführen (Echitebo et al., 1987). Sequenzanalysen der Rindermilzphosphatase und des Uteroferrins zeigen eine Homologie zwischen beiden Aminosäuresequenzen um 90 % (Hunt et al., 1987). Im Vergleich zur proteinchemischen Sequenz ergab die Sequenzierung des c-DNA-Klons der Typ-5-Phosphatase aus Humanplazenta und Gauchermilz eine Analogie von 85-94 % (Lord et al., 1990). Eine vergleichbare Homologie zeigten auch die Sequenzen der TRAP 5 aus Haarzell-Leukämie-Milz und Riesenzelltumorgewebe (Stephan et al., 1990 und Janckila et al., 1992). Ein Vergleich der unterschiedlichen Sequenzanalysen ergab, daß der N-terminale Anteil bei den Typ-5-Phosphatasen nahezu identisch erscheint. Größere Abweichungen liegen in der übrigen Aminosäuresequenz der einzelnen Spezies vor. Initial war man der Auffassung, daß die unterschiedlichen TRAP-Enzyme zu einer heterogenen Gruppe von Metalloproteinen gehört, die von verschiedenen

Genen kodiert werden (Janckila et al., 1992). Durch die große Sequenzhomologie und spätere molekularbiologische Untersuchungen mit dem Nachweis nur einer einzigen Genkopie und die Transkription einer einzigen m-RNA, konnte gezeigt werden, daß auch bei Menschen nur ein Gen für die Synthese der TRAP 5 beim Menschen existiert (Ling et Roberts, 1993). Weitere Untersuchungen zeigten, daß alle Violetten Phosphatasen einer Spezies vom gleichen Gen transkribiert werden. Die Größe der gesamten humanen c-DNA der Typ-5-Phosphatase wurde mit 1,4 Kb bestimmt. Lokalisationsorte des Gens wurde 1990 von Lord et al. auf dem großen Arm des Chromosom 19 lokalisiert. Aufgrund der gleichen Genkopie sind die Differenzierungen in der Enzymstruktur daher auf post-translationaler Modifizierung begründet und nicht durch eine multigene Transkription bedingt. Die Antikörper verschiedener Violetter Phosphatasen unterschiedlicher Spezies besitzen untereinander eine Kreuzreaktion. Uteroferrin-Antikörper reagieren spezifisch mit der Typ-5-Phosphatase aus Rindermilz, Haarzell-Leukämie-Milz, Gauchermilz, Rattenmilz, menschlichen Osteoklasten und Alveolarmakrophagen (Ketcham et al., 1985, Echitebo et al., 1987). Durch Schindelmeier et al., 1989, konnte mit Rindermilzphosphatase-Antikörpern eine erhöhte Kreuzreaktivität gegenüber der humanen Isoenzym-5-Variante aus Gauchermilz, Plazenta, Alveolar- und Gehirnmakrophagen gezeigt werden.

Durch immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen die violette tartratresistente Phosphatase aus Rindermilz konnte eine starke Antikörperreaktion in den Lysosomen einer Reihe von Leukocyten während der Schwangerschaft im maternalen Kreislauf zwischen den Plazentazotten und innerhalb der fetalen Kapillaren nachgewiesen werden. Ebenso konnte eine Kreuzreaktion in den Syncytiotrophoblastenschichten und in den maternalen Dezidualzellen festgestellt werden. Neben dem physiologischen Vorkommen der TRAP während der Schwangerschaft deutet das gehäufte Vorkommen der Typ-5-Phosphatase im pathologischen Zustand auf eine mögliche klinische Bedeutung zur Entwicklung eines diagnostischen

Nachweisverfahrens zur quantitativen Erfassung dieser Enzymklasse im Humanserum.

Die Kreuzreaktivität von Uteroferrin zu der humanen Isoenzym-5-Phosphatase wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um einen hoch spezifischen Isolierungsweg für die in geringer Konzentration vorkommende humane TRAP zu entwickeln.

Als erster Schritt zur Gewinnung der humanen Phosphatase wurde die Isolierung der Progesteron-induzierten violetten Schweineuterusphosphatase bis zur elektrophoretischen Reinheit entwickelt. Nach einem Mehrschritt- Isolierungsverfahren zeigte sich in der SDS-Gelelektrophorese nach Aufreinigung des Uteroferrins eine singuläre Bande, die dem Monomer des Uteroferrins mit einem Molekulargewicht von 36000 Da entspricht.

Als Immunantwort des Säugetierorganismus nach Kontakt mit hoch aufgereinigtem Uteroferrin als Antigen konnten in einem weiteren Schritt polyklonale IgG-Antikörper isoliert werden. Die so gewonnenen Anti-Uteroferrin-Antikörper wurden kovalent an eine aktive Sepharose-4-B-Matrix angebunden. Dadurch waren die Voraussetzungen gegeben, die labile humane tartratresistente saure Phosphatase durch spezifische chromatographische Abtrennung aus dem Zellextrakt der Plazentaspülflüssigkeit in einem zeitlich sehr kurzen Isolierungsgang zu gewinnen. Nach Abtrennen der Begleitproteine konnte SDS-Gelelektrophoretisch die humane TRAP aus Plazenta bis zur elektrophoretischen Reinheit isoliert werden. Unter nicht reduzierenden Bedingungen liegt die humane tartratresistente Phosphatase als Monomer mit einem Molekulargewicht von 34000 Da vor. Im Unterschied dazu zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Rindermilzphosphatase eine enzymatische Auftrennung in 2 Untereinheiten von ca. 21 und 15,5 kDa. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, daß das humane Isoenzym 5, wie

auch das Uteroferrin das gleiche Molekulargewicht zeigen, jedoch im Unterschied zur Rindermilzphosphatase eine größere Resistenz gegenüber einer Hydrolyse in 2 Untergruppen zeigt.

Die so gewonnene humane saure Phosphatase reicht aus, um weitergehende immunologische und immunhistochemische Untersuchungen durchzuführen. Für weitere physikochemische und vor allem kristallographische Untersuchungen zur Aufklärung der dreidimensionalen Molekülstruktur konnten jedoch keine ausreichenden Mengen des humanen Enzyms isoliert werden.

Damit die violette Phosphatase unabhängig von ihrem Oxidationszustand und Aktivitätszustand hoch sensitiv in geringen Konzentrationen erfaßt werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit ein spezifischer enzyme-linked-immuno-assay (ELISA) erarbeitet.

Die quantitative Bestimmung der Isoenzym-5-Phosphatase war bislang nur durch die Bestimmung der enzymatischen Aktivität möglich. Durch kinetische Messungen konnte im Aktivitätstest mit para-Nitrophenylphosphat als Substrat und Zusatz von Tartrat eine Differenzierung der tartratsensitiven Phosphatasen, wie der sauren Prostataphosphatase von den übrigen tartratresistenten Phosphatasen, wie der hier untersuchten Typ-5-Phosphatase vorgenommen werden. Gerade der Nachweis sehr geringer Konzentrationen konnte durch diesen enzymatischen Aktivitätstest jedoch nicht erfaßt werden.

Einen spezifischeren und sensitiveren Nachweis von sehr geringen Konzentrationen der TRAP gelingt durch die Detektion mit immunhistochemischen Methoden. Durch die hohe Kreuzreaktivität ist es in der vorliegenden Arbeit erstmals gelungen, die humane Typ-5-Phosphatase durch einen hochspezifischen enzyme-linked-immuno-assay (ELISA)

quantitativ zu erfassen. Hierzu wurde ein direkter, nicht kompetitiver, heterogener Sandwich-Biotin-Streptavidin-ELISA entwickelt.

Die Grundvoraussetzung für die Entwicklung des ELISA war homogenes, standardisierbares Antigen aus Plazenta, von dem Antiseren produziert werden konnten. Durch Affinitätsreinigung konnten Antikörper isoliert werden, aus denen spezifische, biotinylierte Antikörper produziert wurden. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend mit den biotinylierten Antikörpern anstelle von Antiseren beschichtet, um so ein hohes Maß an Empfindlichkeit und Spezifität zu gewinnen, insbesondere für die späteren Untersuchungen zur Kreuzreaktivität der verschiedenen TRAP-Spezies.

Die Markierung der Antikörper mit Biotin hat gegenüber der direkten Konjugierung der Antikörper mit farbgebenden Enzymen größere Vorteile. Für einen ELISA mit konjugierten Antikörpern müssen Konzentrationen der Antikörper zwischen 6-8 mg/ml vorliegen (Tijssen, 1985), während biotinylierte Antikörper in geringeren Konzentrationen von 1-2 mg/ml ausreichend sind (Harlow und Laue, 1988). Da mehrere Biotingruppen an einen Antikörper gekoppelt werden und somit durch Komplexbildung mehrere Bindungsstellen für die farbgebenden Peroxidasemoleküle zur Verfügung stehen, erzielt man über den Biotin-Streptavidin-ELISA eine größere Sensitivität. Hingegen kann bei dem Konjugatsystem nur ein Molekül Peroxidase pro Antikörper gebunden werden (Peters & Baumgarten, 1990). Ein weiterer Vorteil der biotinylierten Antikörper ist die einfache Handhabung der stabilen biotinylierten Antikörper und die einfachere Aufbereitungsmaßnahme der Antikörper durch Dialyse in PBS-Puffer zur Entfernung des überschüssigen Biotins. Hingegen müssten die Enzymkonjugate durch aufwendige Affinitätschromatographie aufgearbeitet werden.

Die optimale Anfärbung des Färbekomplexes liegt in einem kleinen Varianzbereich mit einem Optimum für ein bHRP/sAv-Verhältnis von 3,2.

Diese Abweichungen sind auf variierende Biotinylierungsgrade der Antikörper zurückzuführen.

Um die Empfindlichkeit des entwickelten ELISA zu maximieren, wurde eine Reihe von Optimierungsversuchen vorgenommen. Der Sättigungsbereich der Mikrotiterplatte mit Antikörpern lag bei 4 µg/ml. Durch die untersuchten Testreihen wurde ein optimaler Sättigungsbereich der Mikrotiterplatten mit Antikörpern bei 2 µg/ml bestimmt. Selbst bei höheren Konzentrationen des Phosphatase-Antigens konnte bei einer Mikrotiterbeschichtung mit 2,0 µg/ml biotinylierter Anti-Phosphatase-Antikörper ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Absorption bei 490 nm festgestellt werden. Je spezifischer die Antigen/Antikörper-Reaktion ist, desto geringere Konzentrationen des Antigens lassen sich durch den ELISA detektieren (Tijssen 1985). In dem hier entwickelten ELISA für humane Typ-5-Phosphatase aus Plazenta wurde zunächst der Standard mit einem Meßbereich zwischen 1 und 50 ng/ml erarbeitet. Durch mehrfache Optimierungen des ELISA-Aufbaus konnte die Erfassungsgrenze des Detektionsbereiches auf 5 pg/ml humane Phosphatase gesenkt werden.

Die Spezifität und die Sensitivität des hier vorgestellten ELISA's für die Detektion von humaner Typ-5-Phosphatase konnte selbst durch Zugabe von Fremdproteinen im Überschuß nicht gestört werden.

Bis heute ist es, abgesehen von wenigen spezifischen Aktivitätstests (Schiele et al., 1988) nicht möglich, schnelle und v. a. sensitive Bestimmungen der tartratresistenten sauren Phosphatasen in geringer in vivo-Konzentration vorzunehmen. Durch den Test mit verschiedenen Typ-5-Phosphatasen der unterschiedlichen Spezies als Antigene wurde eine Quantifizierung der Affinität von Antigen-Antikörper-Wechselwirkung der verschiedenen homologen Phosphatase-Spezies durch das lineare Absorptionsverhalten in dem hier entwickelten ELISA-Test abgeleitet. So

ließ sich im ELISA eine 25 %-ige Bindungsschwächung des Uteroferrins als Antigen gegenüber den humanen Typ-5-Phosphatase-Antikörpern feststellen. Mit der Rindermilz-Phosphatase besteht zu den humanen Isoenzym-5-Phosphatase-Antikörpern eine Bindungsaffinität von 65 %. Die unterschiedliche Bindungsaffinität ist bedingt durch die unterschiedliche Anzahl von Epitopen, mit denen die Typ-5-Phosphatasen der verschiedenen Spezies an den humanen Typ-5-Phosphatase-Antikörpern anbinden.

Das Ergebnis der Sequenzierung der c-DNA der Typ-5-Phosphatase aus menschlicher Plazenta im Vergleich zur proteinchemischen Sequenz des Uteroferrins zeigt analog zur oben beschriebenen Bindungsaffinität eine Übereinstimmung von etwa 85 % (Lord et al., 1990). Für die Homologie der Aminosäuresequenz zwischen der Rindermilz-Phosphatase und dem Uteroferrin wurde von Hundt et al., 1987, eine Homologie von 90 % festgestellt.

Durch die spezifische immunologische Detektion der Typ-5-Phosphatase mittels des vorgestellten ELISA ließ sich nach Optimierung des Assays die Nachweisgrenze gegenüber den konventionellen Enzym-Aktivitäts-Tests um den Faktor 10^3 verbessern. Damit gelang es erstmalig die Enzymklasse im pg/ml-Konzentrationsbereich aufzuspüren. Mit Hilfe des enzymkinetischen Assays sollte es gelingen, im humanen Blutserum die Typ-5-Phosphatase nachzuweisen. Unter nicht-pathologischen Bedingungen konnten beim Menschen diese Enzym-Spezies aufgrund der geringen Konzentration im Serum bisher durch den Aktivitätstest nicht erfaßt werden.

Durch den vorgestellten ELISA erschließt sich damit die Möglichkeit hochspezifisch und sensitiv die humane Typ-5-Phosphatase nachzuweisen und damit einen Anhalt über die physiologische und pathologische Wirkweise dieser Enzym-Spezies beim Menschen zu erzielen.

5. Zusammenfassung

Saure Phosphatasen gehören der Klasse der sauren Orthophosphorsäuremonoesterasen (EC3.1.3.2.) an und katalysieren die Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern unter Freisetzung von Phosphat mit einem Hydrolyseoptimum zwischen pH 5 bis pH 6. Eine Untergruppe dieser sauren Phosphatasen stellt die Isoform Typ-5 dar. Das katalytische Zentrum dieser Untergruppe besteht aus einem charakteristischen Zwei-Eisen-Zentrum, das diesen Phosphatasen in konzentrierter Lösung eine violette Farbe verleiht. Hieraus leitet sich auch der Name dieser Typ-5-Phosphatase als saure violette Phosphatase ab. Im Humangewebe konnten bisher 7 Isoformen der sauren Phosphatase identifiziert werden, die durch ihre unterschiedliche Lokalisation in den Zellen und ihre verschiedenen elektrophoretischen Eigenschaften unterschieden werden. In die gleiche Klasse des humanen Isoenzym-5 gehören auch die besser untersuchte Rindermilz-Phosphatase sowie das Uteroferrin, eine Typ-5-Phosphatase, die progesteroninduziert aus dem Schweineuterus isoliert werden kann. Die humane Typ-5-Phosphatase findet man unter meist pathologischen Bedingungen in Leukozyten und den von ihnen abgeleiteten Zellen, wie Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten. Unter physiologischen Bedingungen findet man eine sehr niedrige TRAP-Aktivität in Zellen des Monozyten-Phagozytensystems, wie Osteoklasten, Makrophagen oder Mikroglia sowie Lebermakrophagen.

Durch die Entwicklung eines verkürzten Isolierungsprotokolls gelang es erstmals unter Zuhilfenahme von spezifischen Immunoaffinitätssäulen, entwickelt aus Antikörpern des homologen Uteroferrins, die Isolierung und Aufreinigung der labilen humanen Typ-5-Phosphatase aus Plazenta. In Analogie zu dem Schweineuterusenzym zeigte auch das Humanplazenta-Isoenzym-5 eine monomere Struktur mit einem Molekulargewicht von 34000 Da.

Nach Aufreinigung des Enzyms bis zur elektrophoretischen Reinheit konnte ein spezifischer und hoch sensitiver ELISA-Test zur Detektion auch geringster Konzentrationen der Typ-5-Phosphatase erarbeitet werden. Hierbei konnte die Detektionsgrenze bis in den pg/ml-Bereich gesenkt werden. Bei guter Reproduzierbarkeit gelang erstmals die Detektion auch kleinster Mengen der sauren Typ-5-Phosphatase ohne Beeinträchtigung durch störende Fremdeiweiße. Damit kann erstmals die violette Phosphatase aus Humanplazenta, unabhängig von ihrem Oxidationszustand und Aktivitätszustand hoch sensitiv und reproduzierbar erfaßt werden. Dieses Detektionssystem sollte in einem weiteren Schritt auf die Anwendbarkeit zur Konzentrationsbestimmung in Humanseren getestet werden und soll so einen besseren Einblick in den physiologischen und pathologischen Wirkmechanismus der humanen Phosphatase in Organismus beitragen.

6. Material und Methoden

6.1. Bestimmung der Enzymaktivität

Die katalytische Aktivität der violetten Phosphatase wurde in einem Standardtest gegenüber α -Naphthylphosphat in 0.1 M NaAc-Puffer pH 5.5 bestimmt. Die enzymkatalysierte Hydrolyse des α -Naphthylphosphats zu α -Naphthol und Orthophosphat führt zu einer Extinktionszunahme bei 323 nm, die spektralphotometrisch verfolgt werden kann. In einem Testvolumen von 1ml steigt die Extinktion durch die Hydrolyse von 1 μ Mol α -Naphthylphosphat um 1,975 an. Eine spektrale Änderung von $1\Delta\epsilon/s$ entspricht damit einer Enzymaktivität von 0.5 μ kat.

Zur Bestimmung der maximalen enzymatischen Aktivität der violetten Phosphatase wurde der Test nach Uwira (1980) unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von 0.2M Natriumascorbat und 1×10^{-3} M Ammoniumeisen(II)-sulfat durchgeführt. Unter nichtaktivierenden Bedingungen wurde der Aktivitätstest ohne Reduktionsmittel durchgeführt.

6.2. Bestimmung der Enzymkonzentration

Während der Isolierung wurde der Proteingehalt spektroskopisch durch die Absorption bei 280nm bestimmt. Ein Extinktionswert von 1, detektiert bei 280 nm, entspricht etwa einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. Bei Endpräparationen wurde die Konzentration der TRAP bei 280 nm mit $\epsilon_{280}=58500$ zugrunde gelegt.

Zur Bestimmung des Proteingehalts hochkonzentrierter Phosphatase-Präparationen dient das Absorptionsmaximum im VIS-Bereich bei 550 nm, mit $\epsilon_{VIS}=4000$.

6.3. Isolierung der violetten Phosphatase aus Schweineuterus

Mit der Waschlösung eines Schweineuterus wurde eine Affinitätschromatographie an Phenylsepharose durchgeführt. Die Elution der Proteine erfolgte in einem linearen Ammoniumsulfatgradienten von 2 M bis 0.1 M Ammoniumsulfat in je 500 ml 0.1M NaAc pH 4.9. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und in einer Ultrafiltrationszelle entsalzt. Nach Verdünnen der Enzymlösung auf etwa 1l mit dest. Wasser wurde eine Chromatographie an Blue-Sepharose CL-6B vorgenommen. Die beladene Säule wurde mit einem linearen KCl-Gradienten von 0.1M bis 1M KCl in je 500 ml 0.1 M NaAc eluiert.

Die aktiven Fraktionen mit einer spezifischen Phosphataseaktivität über 0.1 μ kat/ml wurden vereinigt und auf etwa 10 ml eingeeengt. Durch Gelfiltration an Sephadex G 75 Superfine mit 0.1 M NaAc pH 4.9 und 0.25 M KCl als Laufmittel wurde die Enzymlösung weiter gereinigt. Die violetten Fraktionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese untersucht. Die homogenen Fraktionen wurden gesammelt und bei -20°C aufbewahrt.

6.4. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophoresen wurden in einer Vertikalelektrophoreseeinheit nach einer Vorschrift von Laemmli (1970) durchgeführt.

Für die Herstellung der Gele wurden folgende Stammlösungen angesetzt:

- Acrylamid-Stammlösung:

29.2%	Acrylamid (w/v)
0.8%	Bisacrylamid (w/v)
0.5g/10ml	Amberlite MB6

- Sammelgelpuffer:

0.5M Tris/HCl pH 6.8
0.4% SDS (w/v)

- Trenngelpuffer:

1.5M Tris/HCl pH 8.8
0.4% SDS (w/v)

- Probenpuffer:

0.25M Tris/HCl pH 6.8
8% SDS (w/v)
40% Glycerin (v/v)
10% 2-Mercaptoethanol (v/v)
0.01% Bromphenolblau (w/v)
4mM EDTA

- TEMED

- Starter:

100mg Ammoniumperoxodisulfat/ml dest. Wasser (APS-Lösung)

- Elektrodenpuffer:

0.05M Tris/HCl pH 8.3
0.38M Glycin
0.1% SDS (w/v)

Für die Elektrophorese wurden 1.5mm dicke Gele (12x15 cm) mit einer 12.5%-igen Vernetzung verwendet.

Für das Trenngel wurden folgende Lösungen vermischt:

6ml Trenngelpuffer
10ml Acrylamid-Stammlösung
8ml dest. Wasser

Die Lösung wurde entgast. Nach Zugabe von 12 µl TEMED und 40 µl APS-Lösung wurde die Trenngellösung in die Polymerisationskammer 10 cm hoch eingefüllt.

Nach etwa einer Stunde war das Gel polymerisiert.

Anschließend wurde das Sammelgel aus folgenden Lösungen vorbereitet:

3ml Sammelgelpuffer
1ml Acrylamid-Stammlösung
8ml dest. Wasser

Nach dem Entgasen wurden 12 μ l TEMED und 10 μ l APS-Lösung zugesetzt. Vor dem Einfüllen der Trenngellösung in die Polymerisationskammer wurde ein Probenkamm in die Kammer eingesetzt. Nach etwa 30 min war das Gel vollständig polymerisiert.

Die Proteinproben (10-40 μ l) wurden mit 20 μ l Probenpuffer versetzt und 5min bei 100°C inkubiert. Bei einer Auftrennung unter nichtreduzierenden Bedingungen wurde ein Probenpuffer ohne 2-Mercaptoethanol benutzt. Nach dem Einfüllen der Proteinlösungen in die Geltaschen wurde die Elektrophorese ca. 15 h bei 50 V und 10 mA durchgeführt.

Nach Beendigung der elektrophoretischen Trennung wurde das Gel 2h in 20%-iger Trichloressigsäure fixiert und mit 0.25% Coomassie Brilliant Blue G-250 in Ethanol/Essigsäure/Wasser (1:1:8; v/v/v) angefärbt. Nach Entfärbung des Untergrundes mit Ethanol/Essigsäure/Wasser (1:1:8; v/v/v) wurde das Gel in einem Slab Dryer unter Vakuum getrocknet.

Um die auftretenden Proteinbanden zuordnen zu können, wurde ein Eichkit aus sechs Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 14.4 und 96 kDa als Vergleich bei jeder Elektrophorese mitaufgetragen.

Phosphorylase	Mr=94	kDa
Rinderserumalbumin	Mr=67	kDa
Ovalbumin	Mr=43	kDa
Carboanhydrase	Mr=30	kDa
Trypsininhibitor	Mr=20.1	kDa
Lactalbumin	Mr=14.4	kDa

6.5 Immunoaffinitätschromatographie

Zur Isolierung der spezifischen PAP-Antikörper wurde eine CH-aktivierte Sepharose 4-B nach der Vorschrift des Herstellers (Pharmacia, 1986) kovalent mit dem Enzym belegt. Die Abtrennung der Antikörper von den übrigen Serumproteinen wurde durch Affinitätschromatographie über eine 5cm x 1cm Gelmatrix ermöglicht. Das Antiserum wurde in einem doppelten Volumen 0.1M PBS-Puffer pH 7.4 aufgenommen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0.5ml/min aufgegeben. Nach dem Spülen mit PBS-Puffer pH 7.4 für 30min werden die spezifisch gebundenen Antikörper mit 0.1M Glycin-Puffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 0.5ml/min eluiert und durch Vorlage von Phosphatpuffer neutralisiert. Die Affinitätsreinigung der Humanphosphatase erfolgte in der gleichen Präparationsweise nach Anbindung der Uteroferin-Antikörper an das Gelmaterial.

Zum Aufkonzentrieren der Proben wurden die Enzymlösungen in membrane-cones der Fa. Amicon durch Zentrifugation bei 7000 U/min eingeengt.

6.6. Arbeitsvorschrift für die Erstellung des Biotin-Streptavidin-ELISA

Lösungen:

Beschichtungspuffer	0.05 M Na ₂ CO ₃ , pH 9.6
PBS	10 mM Na-Phosphat, 0.145 M NaCl, pH 7.4
PBS-Tween	10 mM Na-Phosphat, 0.145 M NaCl, 0.05 % (v/v) Tween, pH 7.4
Sättigungspuffer	0.5 % BSA in PBS
Probenpuffer	0.5 % BSA in PBS-Tween

Färbelösung 10 mg o-Phenylendiamin, 10 ml 0.1 M Na-Citrat, pH 5 und 5 µl 30 % H₂O₂

Den hier angegebenen proteinhaltigen Puffern wurde 0.02 % Thiomersal als Bakteriostatikum zugesetzt.

Für die hier beschriebene Entwicklung des ELISA für die humane Phosphatase mussten die Antikörper-, die biotinylierten Antikörper- und die Färbekomplexlösungen (bHRP/sAv-Komplex) auf Optimalkonzentrationen ihrer Bestandteile für den Standardgebrauch untersucht werden, bevor sie routinemäßig eingesetzt werden konnten.

6.6.-1 Biotinylierung der Antikörper

Die Biotinylierung der Antikörper wurde nach der Vorschrift von Harlow und Laue (1988) durchgeführt. Hierbei wird das Biotin über eine reaktive Vorstufe in Form des N- Hydroxysuccinimidesters an das Protein angelagert. Die Bindung des Biotins an den Antikörper erfolgt über die ε-Aminogruppe des Lysins.

Lösungen zur Biotinylierung der Antikörper

BNHS-DMSO 10 mg/ml BHNS in Dimethylsulfoxid

PBS-Azid 10 mM Na-Phosphat, (pH 7.4), 0, 154 M NaCl, 0.02 % NaN₃

Carbonat- Lösung 0.1 M NaCO₃, pH 8,8

NH₄Cl- Lösung 1 M NH₄Cl

6.6.-2 Protokoll zur Biotinylierung der Antikörper

Dialyse der Antikörper gegen Natriumcarbonatlösung mit anschließendem Aufkonzentrieren auf etwa 2 mg/ml durch Ultrafiltration im Centricon.

Zugabe von 100 μl der BNHS-DMSO-Lösung pro mg Antikörper. Die Reaktionslösung wurde eine 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 20 μl NH_4Cl pro 250 μl BNHS wurde die Biotinylierungsreaktion durch 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur gestoppt. Anschließend erfolgte eine 20 h Dialyse bei 4°C gegen PBS-Azid, um überschüssiges Biotin zu entfernen. Die biotinylierten Antikörper konnten bei 4°C gelagert werden.

6.6.-3 Biotinylierung der Peroxidase

In Analogie zu der Biotinylierungsvorschrift der Antikörper erfolgte auch die Biotinylierung der Peroxidase. Die Aktivität der Peroxidase aus Meerrettich (HRP) ist unabhängig vom Biotinylierungsgrad. Nach der Biotinylierung wurde der bHRP-Lösung 50 % Glycerin (v/v), 10 mM Natriumphosphat, 0.145 M NaCl, pH 7.4 zugesetzt, um ein Erstarren der Lösung bei einer Lagerungstemperatur von -20°C zu vermeiden.

6.6.-4 Optimierung des Färbekomplexes

Arbeitsprotokoll:

Adsorption des ersten Antikörpers in Beschichtungspuffer an die Mikrotiterplatte (je 100 μl pro Vertiefung). 1 h Inkubation bei 37 °C.

- Überschüssige Proteine und Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween-Puffer entfernt.
- Absättigen freier Bindungsstellen auf der Platte durch 1 h Inkubation mit 100 μl Sättigungspuffer bei 37 °C. Waschen wie im ersten Arbeitsschritt.
- Inkubation der Platte mit 1ng/ml Phosphatase in Probenpuffer, 100 μl pro Vertiefung für 1 h bei 37 °C. Weitere Schritte wie oben aufgeführt.

- Inkubation der Platte mit 100 µl biotinylierten Antikörpern in Probenpuffer pro Vertiefung bei 37°C. Weitere Schritte wie vor.
- Herstellen verschieden konzentrierter Lösungen des Färbekomplexes mit konstanter sAv-Konzentration (12 nM) und variabler Konzentration der bHRP (15 bis 142 nM) in Probenpuffer. 30 min. Inkubation bei Raumtemperatur. Auftragen der verschieden konzentrierten bHRP/sAv- Proben zu je 100 µl auf die Tieterplatte und erneut 30 min. Inkubation. Anschließend Waschen wie in den Vorschriften.
- 5 bis 15 min. Inkubation mit der Färbelösung
- Abstoppen der Färbereaktion mit 2M Schwefelsäure.
- Extinktionsmessung bei 490 nm.

Die Überprüfung des Färbekomplexes sollte erneut durchgeführt werden, wenn neue sAv- Stammlösungen angesetzt wurden oder Peroxidase neu biotinyliert wurde. Aus der Extinktionsrate der unterschiedlichen bHRP/sAv- Zusammensetzungen konnte der optimale Konzentrationsbereich ermittelt werden, in dem der bHRP/sAv- Färbekomplex am besten anfärbte.

6.6.-5 Optimierte Standardarbeitsvorschrift

Färbeprotokoll

- Beschichtung der Mikrotiterplatte mit 4 µg/ml Anti-PAP-Antikörper in je 100 µl Beschichtungspuffer durch 1h Inkubation bei 37 °C. Anschließend dreimaliges Waschen mit PBS- Tween.
- Inkubation der Mikrotiterplatte mit 100 µl Sättigungspuffer je Vertiefung unter Schütteln. Waschen wie vorbeschrieben.
- Auftragen der Antigenproben und -standards als Doppelbestimmung in je 100 µl Probenpuffer. Der Messbereich des ELISA erstreckt sich

über einen Antigenkonzentrationsbereich von 0.25 – 40 ng/ml PAP. Anschließend erneut dreimaliges Waschen.

- Inkubation der Mikrotiterplatte mit 4.5 µg/ml biotinyliertem Antikörper in je 100 µl Probenpuffer unter Schütteln bei 37°C für 1h. Waschvorgang wie bei den vorangehenden Schritten.
- 30 min. Inkubation der Mikrotiterplatte mit je 100 µl des optimierten bHRP/sAv- Komplexes in 100 µl Probenpuffer bei Raumtemperatur und anschließender Waschvorgang.
- Inkubation mit 100 µl Färbelösung pro Vertiefung für 15 min.
- Abstoppen des Färbeprozesses durch Zugabe von 100 µl 2 M H₂SO₄ je Vertiefung.
- Extinktionsmessung bei 490 nm.

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Kreuzreaktivität der verschiedenen PAP- Lösungen wurden mit den gleichen Lösungen und Arbeitsvorschriften, wie oben dargestellt, durchgeführt. Die Biotinylierung der Anti-Human-PAP-Antikörper wurde analog zur Biotinylierung der Uteroferin-Antikörper durchgeführt. Die Antikörper und die biotinylierten Antikörper der humanen PAP wurden bei den Messungen jeweils im Überschuß eingesetzt, sodaß die nicht an die Mikrotiterplatten gebundenen Antikörper und Antigene durch die Waschschrirte entfernt wurden.

7. Literaturverzeichnis

- Allen, S.H., Nuttleman, P.R., Ketcham, C.M., Roberts, R.M. (1989)
J. Bone Miner. Res. 4, 47-55
- Anatantaitis, B. C., Aisen, P.(1982)
J. Biol. Chem. 257, 1855-1859
- Anderson, G.N., Ek-Rylander, B., Hammarström, L.E., Lindskog, S.,
Toverud, S.U. (1986)
J. Histochem. Cytochem. 34: 293-298
- Anderson, T.R., Toverud, S.U. (1986)
Arch. Biochem. Biophys. 247, 131-139
- Antanaitis, B. C. und Aisen, P. (1983)
Adv. Inorg. Biochem. 5, 111-136
- Antanaitis, B. C. und Aisen, P. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 2066-2069
- Antanaitis, B. C. und Aisen, P. (1985)
J. Biol. Che. 260, 751-756
- Antanaitis, B. C., Aisen, P. und Lilienthal, H. R. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 3166-3172
- Antanaitis, B. C., Aisen, P., Lilienthal, H. R., Roberts, R. M. und Bazer, F.
W. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 11204-11209
- Antanaitis, B. C., Peisach, J., Mims, W. B. und Aisen, P. (1987)
J. Biol. Chem. 260, 4572-4574
- Averill, B. A., Davis, J. C., Burmann, S., Zirino, T., Sanders-Loehr, J.,
Loehr, T. M., Sage, J. T. und Debrunner, P. B. (1987)
J. Am. Chem. Soc. 109, 3760-3767
- Backes, G., Sahlin, M., Sjöberg, B.-M., Loehr, T. M. und Sanders-Loehr, J.
(1989)
Biochemistry 28, 1923-1929
- Baumbach, G. A., Ketcham, C. M., Richardson, D. E., Bazer, F. W. und
Roberts, R. M. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 12869-12878

- Baumbach, G. A., Saunders, P. T. K., Bazer, F. W. und Roberts, R. M. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 2985-2989
- Bazer, F.W., Worthington-White, D., Fliss, M.F.V., Gross, S. (1991)
Exp. Hematol. 19, 910-915
- Beck, J. L., De Jersey, J. und Zerner, B. (1988)
J. Am. Chem. Soc. 110,3317-3318
- Beck, J. L., Keough, D. T., De Jersey, J. und Zerner, B. (1984)
Biochem. Biophys. Acta 791, 357-363
- Beck, J. L., Mc Conachie, L. A., Summors, A. C., Arnold, W. N., De Jersey, J. und Zerner, B. (1986)
Biochim. Biophys. Acta 869, 61 - 68
- Bevilacqua, M.A., Lord, D.K., Cross, N.C.P., Whitaker, K.B., Moss, D.W., Cox., T.M. (1991)
Mol. Biol. Med. 8: 135-140
- Borovik, A. S., Papaefthymiou, V., Taylor, L. F., Anderson, O. P. und Que, L. Jr. (1989)
J. Am. Chem. Soc. 111, 61833-6195
- Buhi, W. C., Ducsay, C. A., Bazer, F. W. und Roberts, R. M. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 1712-1723
- Burmann, S., Davis, J. C., Weber und Averill, B. A. (1986)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 136, 490-497
- Butcher, W. W. und Westheimer, F. H. (1955)
J. Am. Chem. Soc. 77, 2420-2424
- Campbell, H. D., Dionysius, D. A., Keough, D. T., Wilson, B. E., De Jersey, J. und Zerner, B. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 615-620
- Chaiet, L. und Wolf, F.J. (1964)
Arch. Biochem. Biophys. 106, 1-5
- Chen, J., Yam, L. T., Janckila, A. J., Li, c. Y. und Lam, W. K. W. (1979)
Clin. Chem. 25, 719-722

Cheung, C.K., Panesar, N.S., Haines, C., Masarei, J., Swaminathan, R. (1995)

Clin. Chem. 41, 679-686

Cichutek, K. (1984)

Dissertation, Universität Münster

Clark, S.A., Ambrose, W.W., Anderson, T.R., Terrell, R.S., Toverud, S.U. (1989)

J. Bone Min. Res. 4, 399-405

David, S. S. und Que, Jr., L. (1990)

J. Am. Chem. Soc. 112, 6455-6463

Davis, J. C. und Averill, B. A. (1982)

Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 4623-4627

Davis, J. C., Lin, S. S. und Averill, B. A. (1981)

Biochem. 20, 4062-4067

Dietrich, M. (1988)

Diplomarbeit, Universität Münster

Dietrich, M., Münstermann, D. und Witzel, H. (1990)

Hoppe-Seyler 371, 779

Dietrich, M., Münstermann, D., Suerbaum, H., Witzel, H. (1991)

Eur. J. Biochem. 199, 105-113

Dietrich, M., Suerbaum, H., Münstermann, D. und Witzel, H. (1989)

Hoppe-Seyler 370, 887-888

Dirac, P (1929)

Proc. Roy. Soc. 123, 714-720

Drexler, H.G., Gignac, S.M. (1994)

Leukemia 8, 359-368

Drüeke, S., Wieghard, K., Nuber, B., Weiss, J., Fleischhauer, H.-P., Gehring, S. und Haase, W. (1989)

J. Am. Chem. Soc. 111, 8622-8631

Echetebe, Z.O., Cox, T.M., Moss, D.W. (1987)

Clin. Chem. 33, 1832-1836

Efstratiadis, T. und Moss, D. W. (1985)

Enzyme (Basel) 33, 34-40

- Friemel, H. (1984)
„Immunologische Arbeitsmethoden“, 3rd edn. Gustav Fischer, Stuttgart
- Gaber, B. P., Miskowsky, V. und Spiro, T. G. (1974)
J. Am. Chem Soc. 96, 6868-6873
- Gaber, B. P., Sheridan, J. P., Bazer, F. W. und Roberts, R. M. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 8340-8342
- Gehring, S. (1990)
Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt
- Glew, R. H. und Heath, E. C. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 1556-1565
- Glomset, J. (1959)
Biochim. Biophys. Acta 32, 349-354
- Glomset, J. und Porath, J. (1961)
Biochim. Biophys. Acta 39, 1-8
- Gomez-Romero, P., Witten, E. H., Reiff, W. M., Backes, G., Sanders-Loehr, J. und Jamson G. B. (1989)
J. Am. Chem. Soc. 111, 9039-9047
- Greene, N. M. (1975)
“Adv. Protein Chem.” 29, 85-133, Academic Press, New York
- Hara, A. und Sawada, H. (1983)
J. Biochem. 94, 721-727
- Hara, A., Sawada, H., Nakayama, T. und Matsumoto, Y. (1983)
J. Biochem. 94, 721-727
- Hara, A., Sawada, H., Nakayama, T. und Matsumoto, Y. (1984)
J. Biochem. 95, 67-74
- Harlow, F. und Laue, D. (1988)
„Antibodies: A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor, New York
- Harris, D. (1946)
J. Biol. Chem. 165, 541-545
- Hayman, A. R., Warburton, M. J., Pringle, J. A. S., Coles, B. und Chambers, T. J. (1989)
Biochem. J. 261, 601-609

- Hayman, A.R., Cox, T.M (1994)
J. Biol. Chem. 269, 1294-1300
- Hegenauer, J., Saltman, P. und Nance, G. (1979)
Biochemistry 18, 3865-3879
- Hendrikson, W.A., Co, M. S. und Smith, J. L. (1987)
J. Mol. Biol. 197, 273-296
- Hunt, F. D., Yates III, J. R., Shabanowitz, J., Zhu, N.-Z., Zirino, T. Averill, B. C., Daurat-Larroque, S. T., Roberts, R. M. und Brew, K. (1987)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 144, 1154-1160
- Janckila, A.J., Cardwell, E.M., Yam, L.T., Li, C.-Y. (1995)
Blood 85, 2839-2844
- Janckila, A.J., Latham, M.C., Lam, K.W., Chow, K.C., Li, C.Y., Yam, L.T. (1992a)
Clin. Biochem. 25, 437-443
- Janckila, A.J., Woodford, T.A., Lam, K.W., Li, C.Y., Yam, L.T. (1992b)
Leukemia 6, 199-203
- Kass, L., Munster, D. (1979)
Exp. Hematol. 7, 272-274
- Katayama, I., Li, C. Y. und Yam, L. T. (1972)
Am. J. Pathol. 69, 471-482
- Kato, T., Hara, A., Nakayama, I. T., Sawada, H., Hamatake, M. und Matsumoto, Y. (1986)
Comp. Biochem. Physiol. 838, 813-817
- Kauzlarich, S. M., Teo, B. K., Burmann, S., Davis, J. C. und Averill, B. A. (1986)
Inorg. Chem. 25, 2781-2785
- Keough, D. T., Beck, J. L., De Jersey, J. und Zerner, B. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 1643-1648
- Keough, D. T., Dionysius, D. A., De Jersey, J. und Zerner, B. (1980)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 600-605
- Ketcham, C. M., Baumbach, G. A., Bazer, F. W. und Roberts, R. M. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 5768-5776
- Ketcham, C. M., Roberts, R. M., Simmen, R. C. M. und Nick, H. S. (1989)
J. Biol. Chem. 264, 557-563

- Kraenzlin, M.E., Lau, K. H., Liang, L., Freeman, T.K., Singer, F.R., Stepan, J., Baylink, D.J. (1990)
J.Clin. Endocrinol. Metab. 71, 442-451
- Laemmli, U. K. (1970)
Nature 227, 680-685
- Lam, K. W. und Desnick, R. J. (1982)
In: Desnick, R. J., Gatt, S., Grabowski, G. A. (eds) Gaucher disease: A century of delineation and research. Alan R. Liss, New York, 267-278
- Lam, K. W. und Yam, L. T. (1977)
Clin. Chem. 23, 89-94
- Lam, K. W., Li, C. Y., Yam, L. T. und Desnick, R. J. (1981)
Clin. Biochem. 14, 177-181
- Lau, K.-H. W., Freeman, T. K., Baylink, D. J. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 1389-1397
- Lauffer, R. B., Antanaitis, B. C., Aisen, P. und Que, Jr., L. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 14212-14218
- Li, C.Y., Yam, L.T., Lam, K. W. (1970a)
J. Histochem. Cytochem. 18, 473-481
- Li, C.Y., Yam, L.T., Lam, K. W. (1970b)
J. Histochem. Cytochem. 18, 901-910
- Li, E., Demmer, L. A., Sweetser, D. A., Ong, D.E. und Gordon, J. I. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5779-5783
- Li, L.Y., Chuda, R.A., Lam, K.W., Yam, L.T. (1973)
J. Lab. Clin. Med. 82, 446-460
- Ling, E., Danilov, Y. N. und Cohen, C. M. (1988)
J. Biol. Chem. 263, 2209-2216
- Ling, P., Roberts, R.M. (1993)
J. Biol. Chem. 268, 6896-6902
- Loehr, T. M. und Shiemke, A. K. (1988)
In Biological Applications of Raman Spectroscopy; Spiro, T. G. Ed: Wiley; New York, 3, 439-490

Lord, D.K., Cross, N.C.P., Bevilacqua, M.A., Rider, S.H., Gorman, P.A., Groves, A.V., Moss, D.W., Sheer, D., Cox, T.M. (1990)
Eur. J. Biochem. 189, 287-293

Miller, S.C. (1985)
Calcif. Tissue Int. 37, 526-529

Minkin, C. (1982)
Calcif. Tissue Int. 34, 285-290

Miyazaki, S, Igarashi, M., Nagata, A., Komoda, T. (2001)
Exp. Clin. Pharmacol. 23, 433-439

Mukherjee, R. N., Stack, T. D. P. und Holm, R. J. (1988)
J. Am. Chem. Soc. 110, 1850-1861

Münstermann, D. (1987)
Dissertation, Universität Münster

Murray, K. S. (1974)
Coord. Chem. Rev. 12, 1-35

Nochumson, S., O'Ranger, J. J. und Dimitrov, N. V, (1974)
Fed. Proc. 33, 1378-1385

O'Conner, C. J. (1982)
Prog. Inorg. Chem. 29, 203-283

Ohara, A. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 10664-10670

Peters, H. J. und Baumgarten, H. (1990)
„Monoklonale Antikörper“, 2. Auflage, Springer- Verlag, Berlin

Pyrz, J. W., Sage, J. T., Debrunner, P. B. und Que, Jr., L. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 11015-11020

Que, L. Jr. und Scarrow, R. C. (1988)
In Metal Clusters in Proteins, ACS Symposium Series No 372, American Chemical Society: Washington DC, 152-178

Radzun, H.J., Kreipe, H., Parwaresch, M.R. (1983)
Hematol. Oncol. 1, 321-327

Radzun, H.J., Kreipe, H., Parwaresch, M.R. (1983)
Hematol. Oncol. 1, 321-327

- Roberts, R. M. und Bazer, F. W. (1985)
Bio Essays 1, 8-11
- Robinson, D. B. und Glew, R. H. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 5864-5870
- Robinson, D. B. und Glew, R. H. (1981)
Arch. Biochem. Biophys. 210, 186-199
- Sabel, K.-G., Glomset, J. und Porath, J. (1961)
Biochim. Biophys. Acta 50, 135-140
- Sanders-Loehr, J., Wheeler, W. D., Shiemke, A. K., Averill, B. und Loehr, T. M. (1989)
J. Am. Chem. Soc. 111, 8084-8093
- Saunders, P. T. K., Reneger, R. H., Raub, T. J., Baumbach, G. A., Atkinson, P. H., Bazer, F. W. und Roberts, R. M. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 3658-3665
- Schiele, F., Artur, Y., Floch'n, A.Y., Siest, G. (1988)
Clin. Chem. 34, 685- 690
- Schindelmeiser, J., Gullotta, F., Münstermann, D. (1989a)
Pathol. Res. Pract. 185, 184-186
- Schindelmeiser, J., Gulotta, F. und Münstermann, D. (1989)
Path. Res. Pract. 185, 184-189
- Schindelmeiser, J., Münstermann, D. (1991)
Histochem. J. 23, 38-42
- Schindelmeiser, J., Münstermann, D. und Witzel, H. (1987)
Histochemistry 87, 13-19
- Schindelmeiser, J., Münstermann, D., Mayer, B., Holstein, A.F., Davidoff, M.S. (1996)
Cell Tissue Res.,128, 243-246
- Schindelmeiser, J., Radzun, H.J., Münstermann, D. (1991)
Pathol. Res. Pract., 187, 209-213
- Schindelmeiser, J., Schewe, P.,Zonka, T. und Münstermann, D. (1989)
Histochemistry 92, 81-85
- Schlosnagle, D. C., Sanders, E. G., Bazer, F. W. und Roberts, R. M. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 4680-4685

- Sibille, J.-C., Doi, K. und Aisen, P. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 59-62
- Sibille, J.-C., Doi, K., Aisen, P. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 59-62
- Sinn, E., O'Connor, C. J., De Jersey, J. und Zerner, B. (1983)
Inorg. Chim. Acta 78, L 13-L 15
- Sjöberg, B.-M., Loehr, T. M. und Sanders-Loehr, J. (1982)
J. Biochemistry 21, 96-102
- Snipes, R.G., Lam, K.W., Dodd, R.C., Gray, T.K., Cohen, M.S. (1986)
Blood 67, 729-734
- Stepan, J.J., Lau, K.H.W., Mohan, S., Kraenzlin, M., Baylink, D.J. (1989)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 165, 1027-1034
- Stepan, J.J., Lau, K.H.W., Mohan, S., Singer, F.R., Baylink, D.J. (1990)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 168, 792-800
- Sundararajan, T.A., Sarma, P.S. (1959)
Biochem. J. 71, 537-544 65
- Ternynck, T. und Avrameas, S. (1990)
Methods Enzymol. 184, 469-481
- Tijssen, P. (1985)
„Practice and Theory of Enzyme Immunoassays“, Elsevier, Amsterdam
- Toftlund, H., Murray, K., Zwack, P. R., Taylor, L. F. und Anderson, O. p.
(1986)
J. Chem. Soc., Chem Commun. 191-193
- Ueyama, N. und Nakamura, A. (1988)
in Metalloproteins, Kodanska LTD., Tokyo, 8, 153-176
- Uwira, N. (1980)
Dissertation, Universität Münster
- Vincent, J. B. und Averill, B. A. (1990a)
J. Am. Chem. Soc. 110, 265-268
- Vincent, J. B. und Averill, B. A. (1990b)
FEBS Letters 263, 265-268
- Yam, L. T., Li, C. Y. und Lam, K. W. (1971)
N. Eng. J. Med. 284, 357-359

Yaziji, H., Janckila, A.J., Lear, S.C., Martin, A.W.M., Yam, L.T. (1995)
Am. J. Clin. Pathol. 104, 397-402

Zaidi, M., Moonga, B., Moss, D.W., Macintyre, I. (1989)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, 68-71

9. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. R. M. Schaefer und Herrn Prof. Dr. J. Schindelmeiser danke ich herzlich für die engagierte Betreuung der vorliegenden Dissertation und ihre zahlreichen Anregungen.

Für die langjährige freundschaftliche Zusammenarbeit und die lebhaften Fachdiskussionen danke ich herzlich Herrn Dr. Dr. D. Münstermann.



Durchschrift

Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster . 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Institut für Biochemie
Herrn Prof. Dr. Friedrich Spener
Wilhelm-Klemm-Str. 2

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Moellers

Aktenzeichen
23.0835.1.0 (G 45/97)

22 . Mai 1998

48149 Münster

Betr.: Tierschutz;
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 29.08.1997 - hier eingegangen am 07.11.
1997 - und Änderungsantrag vom 04.04.1998

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Spener,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Neufassung vom 17.
Februar 1993 (BGBl. I S. 254) in geltender Fassung wird Ihnen
die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens
erteilt:

Struktur-Funktions Beziehungen dinuklearer Metalloproteine.

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
Prof. Dr. Friedrich Spener
Institut für Biochemie
Wilhelm-Klemm-Str. 2

Frau
Dr. Annette Rompel
Institut für Biochemie
Wilhelm-Klemm-Str. 2

48149 Münster

48149 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300
Telex 892870 rpms . Telefax (0251) 411-2525

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 10 . 12 . 14 bis Domplatz

Diese Genehmigung gilt bis zum 31. 05. 2001.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

18 Kaninchen.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag

gel.

(Dr. Piontkowski)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und kein weiteres gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet sowie keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen wurde. Weder in der vorliegenden Form noch in einer anderen Fassung habe ich die Arbeit einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Münster, den 21. August 2008