

2 Versuchstiere, Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden Wistar-Ratten und deutsche Fischer-344-Ratten verwendet. Die Tiere wurden bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten. Sie erhielten Altromin R (19 % Proteingehalt, Altromin GmbH, Lage-Lippe) und Leitungswasser ad libitum. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden am 13. 1. 1997 vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit unter dem Aktenzeichen G 0106/96 (Projektbezeichnung "Membrankomponenten Tumor/Entzündung") genehmigt.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Kühlzentrifuge Centrikon H-401 mit Rotoren A 8.24 und A 6.14	Kontron Analytik, München
Ultrazentrifuge Kontron TGA 50 mit Rotoren TZT 32 und TFT 65.13	Kontron Analytik, München
Tischzentrifuge Hermle Z 231 M	Hermle, Gosheim
Ultra-Turrax	Janke & Kunkel, Staufen/Breisgau
Gefriertrockner Lyovac GT 2	Leybold-Heraeus, Köln
Mini-Elektrophorese-System Protean II	BioRad, München
Elektrophorese-System Protean II xi Cell	BioRad, München
Mini-Tank-Blot Electrophoretic Transfer	BioRad, München
Power Supply 250/2.5	BioRad, München
Electrophoresis Power Supply ST 606	Gibco BRL, Detroit, USA
Eppendorf-Photometer 1101 M	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
F10 DCC-Kamera	Panasonic, Hamburg
Lichtmikroskop Axiophot	Carl Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Power Macintosh G3	Apple Comp., Cupertino, USA
AGFA ARCUS II Scanner	
pH-Meter	Knick, Berlin
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Kryostat, Frigocut 2700	Reichert-Jung, Heidelberg
Potter S-Homogenisator	Braun, Melsungen
Wärme-und Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Memmet, Schwabach
Schüttelmaschine GFL 3005	GFL, Burgwedel

2.2.2 Chemikalien und Verbrauchswaren

Laborchemikalien und Verbrauchswaren wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Kodak (Paris), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) in analytischer Qualität bezogen. Die eingesetzten Kollagene stammen von Sigma (Deisenhofen): Kollagen Typ I (C 8897), Kollagen Typ II (C 1188), Kollagen Typ III (C 4407), Kollagen Typ IV (C 7521) und Kollagen Typ V (C 3657). Die *Clostridium histolyticum*-Kollagenase (EC 3.4.24.3) wurde ebenfalls von Sigma (Deisenhofen) bezogen (C 0773). Diprotin A und B stammen von Bachem (Bubendorf). Reagenzien und Feinchemikalien, die von anderen Herstellern geliefert wurden, sind im Kapitel „Methoden“ eigens aufgeführt.

2.2.3 Antikörper

mAk 13.4 Hybridoma-Zellkulturüberstand (Hartel et al. 1988b)

Anti-Prokollagen III-Kaninchenserum (pAk RPC I b/2), dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dr. D. Schuppan, Erlangen

Anti-Kollagen I-Kaninchenserum, dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H.J. Merker, Berlin

Rabbit-Anti-Mouse-IgG, Peroxidase-konjugiert (Dakopatts, P260)

Goat-Anti-Rabbit-IgG, Peroxidase-konjugiert (Dakopatts, P217)

Goat-Anti-Rabbit-IgG, Cy3-konjugiert (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA)

2.2.4 Puffer

PBS (phosphate buffered saline):

8,77 g NaCl 150 mM

0,20 g KCl 3 mM

1,15 g Na₂HPO₄•2H₂O 8 mM

0,20 g NaH₂PO₄•2H₂O 1 mM

auf 1 l mit Aq. bidest. (pH mit 10 M HCl auf 7,2 einstellen)

TBS (tris buffered saline):

8,77 g NaCl 150 mM

1,21 g Tris 10 mM

auf 1 l mit Aq. bidest. (pH mit 10 M HCl auf 7,4 einstellen)

Um eine Kontamination mit Bakterien zu vermeiden, wurde allen an der Gewinnung von DPP IV sowie an Spaltungsassays beteiligten Puffern NaN₃ (mindestens 0,2 g/l) zugesetzt.

2.3 Methoden

2.3.1 Proteinchemische Methoden

2.3.1.1 Allgemeine proteinbiochemische Verfahren

2.3.1.1.1 Proteinbestimmung

Da Detergenzien wie Triton X-100 bei vielen Proteinbestimmungsmethoden störend wirken, aber bei Arbeiten mit Membranproteinen eingesetzt werden müssen, wurde die von Detergenzien unabhängige BCA-Methode (Bicinchoninsäure-Methode) verwendet. Der "BCA Protein Assay Reagentkit" wurde von Pierce, Rockford, USA, bezogen und nach Firmenvorschrift durchgeführt.

2.3.1.1.2 Bestimmung der DPP IV-Exopeptidase-Aktivität

Die Bestimmung der DPP IV-Exopeptidase-Aktivität wurde in Anlehnung an Nagatsu et al. (1976) und Kreisel et al. (1982) durchgeführt. Als Substrat wurde Glycyl-prolyl-p-nitroanilid-tosylat (Bachem, Bubendorf, Schweiz) eingesetzt.

Substratlösung:

6,5 mg Glycyl-prolyl-p-nitroanilid-tosylat auf 10 ml Aq. bidest. (0,2 mM)

Inkubationspuffer:

0,1 M Tris-HCl, pH 8,0

Stopplösung :

1 M Na-Acetat, pH 4,5

10 µl der Probe wurden mit jeweils 10 µl der Substratlösung versetzt und mit Inkubationspuffer auf 200 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 800 µl der Stopplösung beendet. Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm gemessen. Unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten von p-Nitroanilid konnte nun die DPP IV Exopeptidase-Aktivität (A) mit folgender Formel berechnet werden: Aktivität = Extinktion x 333 [U/l]

2.3.1.2 Verfahren zur Isolierung von Membranfraktionen

2.3.1.2.1 Gewinnung von Rohmembranen aus Nierenrinden

Perfusionslösung:

8,77 g NaCl 150 mM
73,5 mg CaCl₂ 0,5 mM
0,2 g NaN₃ 0,2 g/l
auf 1 l mit Aq. bidest.

Homogenisationspuffer:

84,0 mg NaHCO₃ 1,0 mM
73,5 mg CaCl₂ 0,5 mM
0,2 g NaN₃ 0,2 g/l
auf 1 l mit Aq. bidest.

Unter Ethernarkose wurden die Nieren der Ratte durch Punktion der Vena cava unter gleichzeitigem Öffnen der Vena portae blutleer gespült. Die Nieren wurden entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Nieren aus den Kapseln gelöst. Durch Herausschneiden des Nierenmarks wurden die Nierenrinden isoliert. Die Nierenrinden wurden homogenisiert, indem sie in Homogenisationspuffer aufgenommen und im Ultra-Turrax (Stellung 6, 10 Hübe) zerkleinert wurden. PMSF (1 mM) wurde zugegeben. Anschließend wurde das Homogenat in der Kühlzentrifuge bei 20000 min⁻¹ (40000 g) für 20 min zentrifugiert. Sofort wurden die Überstände (lösliche, zumeist zytosolische Proteine) abgegossen. Die Pellets (Rohmembranfraktion) wurden in Homogenisationspuffer im L-Dounce (ca. 20 Hübe) resuspendiert.

2.3.1.2.2 Solubilisierung von Membranproteinen

Solubilisationspuffer:

8,77 g NaCl 150 mM
0,2 g Mg Cl₂ 1 mM
0,15 g CaCl₂ 1 mM
1,21 g Tris 10 mM
10 ml Triton X-100 10 ml/l
10 ml PMSF (100 mM in Methanol) 1 mM
0,2 g NaN₃ 0,2 g/l
auf 1 l mit Aq. bidest., mit 5 M HCl pH 7,8 einstellen

Die in Homogenisationspuffer resuspendierten Rohmembranen wurden in der Kühlzentrifuge bei 20000 min^{-1} (40000 g) für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Solubilisationspuffer im L-Dounce (ca. 20 Hübe) resuspendiert, wobei eine Proteinkonzentration von ca. 5 g/l eingestellt wurde. Die Suspension wurde für 1 h bei 6°C gerührt, bevor sie in der Kühlzentrifuge bei 20000 min^{-1} (40000 g) für 20 min zentrifugiert wurde. Im Überstand befanden sich die solubilisierten Proteine.

2.3.1.3 Chromatographische Verfahren

2.3.1.3.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde nach Siegmund et al. (1976) durchgeführt.

Laufmittel:

120 ml n-Butanol
30 ml Eisessig
30 ml Aq. bidest.

Färbelösung:

0,3 g Ninhydrin, gelöst in
100 ml n-Butanol, dann
3 ml Eisessig zugegeben

Probenvorbereitung:

Im löslichen proteolytischen Assay wurde $240 \mu\text{g}$ natives Kollagen mit $6 \mu\text{g}$ *Clostridium histolyticum*-Kollagenase für 5 h bei 37°C inkubiert, so dass eine weitgehende Verdauung des Kollagens zu erwarten war. Die Probe wurde dann zur Entfernung von Proteinen durch ein Centrisart I-Röhrchen filtriert. Chromatographische Trennungen werden durch größere Mengen Fremdsalze beeinträchtigt. Daher wurde die Probe über eine Octodecyl-Säule von Fremdsalzen (Puffer und Essigsäure) gereinigt, im Lyovac GT 2 gefriergetrocknet und in $50 \mu\text{l}$ 50% Acetonitril, das beim Eintrocknen flüchtig ist, aufgelöst. Als Kontrollen dienten Glycin ($0,5 \text{ g/l}$) und Ansätze ohne Kollagenase bzw. Kollagen.

Auftrennung und Färbung:

Auf eine Kieselgel-Platte wurden im Abstand von $2,5 \text{ cm}$ je $20 \mu\text{l}$ der Proben aufgetragen. Um die Flecken möglichst klein zu halten, wurden die Flecken zwischendurch mit Hilfe eines Föns getrocknet. Die Kieselgel-Platte wurde dann aufrecht in eine mit Filterpapier ausgekleidete DC-Kammer in Laufmittel gestellt. Es wurde bis zu einer 10 cm oberhalb des Auftrags markierten Frontlinie entwickelt. Die Platte wurde anschließend unter laufendem Abzug getrocknet, mit Färbelösung besprüht und mit dem Fön für 10 min erhitzt.

2.3.1.3.2 Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose

Kovalent immobilisiertes Concanavalin A (Con A, an Sepharose 4B) kann zur Anreicherung von Proteinen mit Mannose-haltigen Kohlenhydratketten verwendet werden (Baenziger et al. 1979, Narasimhan et al. 1979). Für diese Bindung sind zweiwertige Metallionen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} notwendig.

Puffer A:

1,21 g	Tris	10 mM
8,76 g	NaCl	150 mM
0,2 g	MgCl ₂	1 mM
0,15 g	CaCl ₂	1 mM
0,2 g	NaN ₃	0,2 g/l
1 ml	Triton X-100	1 ml/l

auf 1 l mit Aq. bidest., mit 5 M HCl pH 7,8 einstellen

Puffer B:

Puffer A mit 10 ml/l Triton X-100

Elutionspuffer:

9,5 g Alpha-Methyl-Mannopyranosid (0,25 M)

auf 200 ml mit Puffer A mit 5 M HCl pH 7,8 einstellen

30 ml Con A-Sepharose wurden in eine Chromatographiesäule (I.D. 10 mm) gepackt. Für die Chromatographie wurde BioLogic LP (BioRad, München) eingesetzt. Die Säule wurde bei einer Flussrate von 2,5 ml/min folgendermaßen gewaschen:

- (1) Waschen mit 3 Säulenvolumina Puffer A
- (2) Waschen mit 1 Säulenvolumen Puffer B
- (3) Waschen mit 3 Säulenvolumina Puffer A
- (4) Waschen mit 1 Säulenvolumen Elutionspuffer
- (5) Waschen mit 3 Säulenvolumina Puffer A

Anschließend wurden 100-300 mg solubilisierete Membranproteine aufgetragen, wobei die Probe mit Puffer A auf eine Konzentration von 1-3 g/l verdünnt wurde. Zum Abtrennen unlöslicher Bestandteile wurde die Probe vor dem Auftrag durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert. Der Probenauftrag erfolgte mit einer Flussrate von 1 ml/min und wurde gefolgt von Waschdurchgängen (1)-(3). Die Elution der gebundenen Glykoproteine erfolgte mit 2 Säulenvolumina Elutionspuffer unter einer Flussrate von 0,5 ml/min. Danach wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina Puffer A gewaschen. Die Auswertung der Chromatographie erfolgte durch Bilanzierung des Proteingehaltes in den Elutionsfraktionen, durch analytische SDS-PAGE und durch Bestimmung der DPP IV-Exopeptidase-Aktivität. Die Fraktionen mit DPP IV-Aktivität wurden vereinigt. Das Glykosid wurde aus dem Eluat mittels Dialyse gegen TBS, 0,5 ml/l Triton X-100 entfernt (Dialyseschläuche von Serva, Heidelberg; Ausschlussmolekulargewicht 10000).

2.3.1.3.3 Immunaffinitätschromatographie an mAk 13.4-Sepharose

2.3.1.3.3.1 Kopplung des mAk 13.4 an Protein G-Sepharose

Lösung A:

1,33 ml	Triethanolamin	200 mM
10 mg	NaN ₃	0,2 g/l

auf 50 ml mit Aq. bidest., mit 10 M HCl pH 8,2 einstellen

Lösung B:

130 mg	Dimethylpimelimidat (Sigma, Deisenhofen)	50 mM
2 mg	NaN ₃	0,2 g/l

auf 10 ml mit Lösung A, mit 100 mM NaOH pH 8,2 einstellen

Lösung C:

60 µl Ethanolamin 100 mM
2 mg NaN₃ 0,2 g/l
auf 10 ml mit Aq. bidest., mit 10 M HCl pH 8,2 einstellen

Die direkte kovalente Immobilisierung des mAk 13.4 an Protein G-Sepharose erfolgte in Anlehnung an Schneider et al. (1982). 1,9 ml Suspension von Protein G-Sepharose Fast Flow (Sigma, Deisenhofen) wurden für 3 min bei 1000 min⁻¹ (300 g) zentrifugiert. Auf diese Weise ergab sich 1 ml Trägermaterial. Anschließend wurde der Träger in PBS suspendiert. Bei den nun folgenden Wechseln der Lösungen wurde der Träger jeweils aus der Suspension durch Zentrifugation für 3 min bei 1000 min⁻¹ (300 g) gewonnen. Zunächst wurde der Träger zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurde er zweimal mit je 50 ml mAk 13.4 Hybridoma-Zellkulturüberstand für 18 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert, bevor er zweimal mit PBS und daraufhin mit Lösung A gewaschen wurde. Es folgte die Vernetzung von Antikörper und Protein G-Molekül. Dazu wurde der Träger in Lösung B suspendiert und für 45 min bei RT inkubiert. Der pH wurde kontrolliert und mit 100 mM NaOH nachgestellt. Die Reaktion wurde gestoppt, indem der Träger für 10 min bei RT mit Lösung C inkubiert wurde. Es folgten dreimaliges Waschen mit Lösung A und einmaliges Waschen mit PBS, bevor der Träger in PBS 0,2 g/l NaN₃ überführt wurde.

2.3.1.3.3.2 Immunaффinitätschromatographie an mAk 13.4-Sepharose

Mit der mAk 13.4-gekoppelten Sepharose wurde aus dem Eluat der Con A-Chromatographie die DPP IV isoliert.

Puffer A:

14,6 g NaCl 500 mM
3,0 g Tris 50 mM
0,1 g NaN₃ 0,2 g/l
auf 500 ml mit Aq. bidest.,
mit 5 M HCl pH 8,2 einstellen

Puffer B:

4,38 g NaCl 150 mM
3,0 g Tris 50 mM
146 mg EDTA 1 mM
2,5 ml Triton X-100 5 ml/l
0,1 g NaN₃ 0,2 g/l
auf 500 ml mit Aq. bidest.,
mit 5 M HCl pH 8,2 einstellen

Puffer C:

4,38 g NaCl 150 mM
3,0 g Tris 50 mM
0,5 ml Triton X-100 1 ml/l
0,1 g NaN₃ 0,2 g/l
auf 500 ml mit Aq. bidest., mit 5 M HCl pH 8,2 einstellen

Elutionspuffer 1:

0,26 ml Diethylamin 50 mM
10 mg NaN₃ 0,2 g/l
auf 50 ml mit Aq. bidest., pH 10,5

Elutionspuffer 2:

wie Elutionspuffer 1, pH 11,5

Ca. 1 ml mAk 13.4-Sepharose wurde in eine Kartusche (BioRad, München) gefüllt. Für die Chromatographie wurde BioLogic LP (BioRad, München) eingesetzt. Vorbereitend wurde die Säule mit je 30 ml Puffer A und Puffer C bei einer Flussrate von 2 ml/min gewaschen. Es folgte der Auftrag von 100-300 mg des Eluats der Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose, das zuvor mit Puffer C auf eine Konzentration von 1-3 g/l verdünnt worden war.

Die Flussrate des Probenauftrags betrug 1 ml/min. Anschließend wurde die Säule nacheinander mit je 15 ml Puffer A, B und C gewaschen (Flussrate 2 ml/min). Die Elution (Flussrate 0,5 ml/min) wurde mit 3 ml Elutionspuffer 1 begonnen, der dann über ein Flussvolumen von 8 ml sukzessive durch Elutionspuffer 2 ersetzt wurde, bevor die Elution mit 3 ml reinem Elutionspuffer 2 abgeschlossen wurde. Für die Elution wurde ein Gradient von pH 10,5 nach pH 11,5 gewählt, da die DPP IV bei pH > 10,5 zunehmend an Aktivität einbüßt, eine komplette Elution von Immunaффinitätssäulen aber erst bei pH 11,5 zu erreichen ist. Im Anschluss an die Elution wurde die Säule mit 30 ml Puffer C gewaschen (Flussrate 2 ml/min) und in PBS 0,2 g/l NaN₃ gelagert. Um (weitere) pH-bedingte Aktivitätsverluste zu verhindern, wurden die Elutionsfraktionen unverzüglich durch Ultrafiltration in Centrikon-Röhrchen (Amicon, Danvers, USA) oder in Centrisart I-Röhrchen (Sartorius, Göttingen) eingeeengt und in TBS umgepuffert. Dabei konnte auch eine Konzentrierung der Proben erzielt werden. Die Auswertung der Chromatographie erfolgte durch analytische SDS-PAGE.

2.3.1.4 Elektrophoretische Verfahren

2.3.1.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde in Anlehnung an Laemmli (1970) durchgeführt.

Lösung A:

30 g Acrylamid
0,8 g Bisacrylamid
auf 100 ml mit Aq. bidest.

Lösung B (Trenngelpuffer):

18 g Tris
0,4 g SDS
auf 100 ml mit Aq. bidest., mit
10 M HCl pH 8,8 eingestellt

Lösung C (Sammelgelpuffer):

6,0 g Tris
0,4 g SDS
auf 100 ml mit Aq. bidest., mit
10 M HCl pH 6,8 eingestellt

APS (100 g/l):

1,0 g Ammoniumpersulfat
auf 10 ml mit Aq. bidest.

Laufpuffer (10-fach konzentriert):

150 g Tris
720 g Glycin
50 g SDS
auf 5 l mit Aq. bidest., pH 8,8 (pH nicht mit HCl nachgestellt)

Reduzierender Probenpuffer (5x):

3 g	SDS	150 g/l
10 ml	Glycerin	500 ml/l
0,72 g	Tris-HCl	36 g/l
1 ml	3 g/l Bromphenolblau	0,15 g/l
5 ml	2-Mercaptopropandiol	250 ml/l

auf 20 ml Aq. bidest, pH 6,8

Nicht-reduzierender Probenpuffer

wurde wie der reduzierende Probenpuffer hergestellt, wobei jedoch Aq. bidest anstelle von 2-Mercaptopropandiol eingesetzt wurde.

Gelansätze für 2 Gele (7,5 %):

	<u>Trenngel (10 ml)</u>	<u>Sammelgel (4 ml)</u>
	7,5 %	4%
Lösung A (ml)	2,5	0,53
Lösung B (ml)	2,5	-
Lösung C (ml)	-	1,0
Aq. bidest. (ml)	5,0	2,47
APS-Lösung (μ l)	50	16
TEMED (μ l)	5	4

Elektrophorese-Bedingungen:

<u>Gel</u>	<u>Spannung (V)</u>	<u>Stromstärke (mA)</u>
9 x 8 cm, 0,75 mm dick	200	variabel

Probenvorbereitung:

- (1) SDS-PAGE unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen:
Die Proben wurden mit reduzierendem Probenpuffer 5 min im Wasserbad gekocht.
- (2) SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden und denaturierenden Bedingungen:
Die Proben wurden mit nicht-reduzierendem Probenpuffer 5 min im Wasserbad gekocht.
- (3) SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen:
Die Proben wurden mit nicht-reduzierendem Probenpuffer 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- (4) SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen:
Die Proben wurden mit reduzierendem Probenpuffer 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Lösungen für das Trenngel wurden auf Eis gemischt, bis 1,8 cm unter den oberen Rand der montierten Glasplatten gegossen und vorsichtig mit Aq. bidest. überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Aq. bidest. entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Mit einem Kamm wurden im Sammelgel Auftragsaschen für die Proben geformt. Die vorbereiteten Proben wurden mit Hilfe einer Hamilton-Pipette in die Taschen des auspolymerisierten Sammelgels überführt. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingebaut und mit Laufpuffer überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 200 V in vertikaler Richtung. Sie wurde beendet, wenn das Bromphenolblau den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte. Je eine Bahn eines Polyacrylamidgels wurde mit einem Marker zur Bestimmung der Molekulargewichte (Sigma, München) beschickt.

2.3.1.4.2 Western-Blotting

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in Anlehnung an Towbin et al. (1979) im Tank-Blot-Verfahren aus dem Gel auf eine Membran transferiert. Dabei wurden Nitrozellulosemembranen (Schleicher und Schüll, Düsseldorf) eingesetzt, wenn eine Immundetektion oder eine Substratfärbung zum Nachweis aktiver DPP IV nachfolgen sollten. War dagegen die Ansequenzierung von Proteinen vorgesehen, so wurden Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen (ProBlott, Applied Biosystems, Foster City, USA) benutzt, die chemisch resistent sind.

Transferpuffer für Nitrocellulosemembranen:

6 g Tris 25 mM
17,1 g Glycin 114 mM
200 ml Methanol 100 ml/l
auf 2 l mit Aq. bidest.

Transferpuffer für PVDF-Membranen:

4,42 g CAPS 10 mM
200 ml Methanol 100 ml/l
auf 2 l mit Aq. bidest., mit 10 M NaOH pH 11,0 eingestellt

10 min vor Abschluss der SDS-PAGE wurden die Membranen in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran musste zuvor noch für 5 min in Methanol inkubiert werden. Das Blot-Sandwich wurde nach Beendigung der Gelelektrophorese luftblasenfrei zusammengesetzt, wobei die Membran zur Anode, das Gel zur Kathode gerichtet war. Der elektrophoretische Transfer erfolgte im Eisbad über 2 h.

Transferbedingungen:

<u>Membrantyp</u>	<u>Spannung (V)</u>	<u>Stromstärke (mA)</u>
Nitrocellulosemembranen	100	variabel
PVDF-Membranen	variabel	150

2.3.1.5 Färbungen von PAGE-Gelen

2.3.1.5.1 Coomassie-Blue G-250

Färbelösung:

400 ml Methanol 400 ml/l
100 ml Eisessig 100 ml/l
1 g Serva Blue G-250 1 g/l
auf 1 l mit Aq. bidest.

Entfärbelösung:

Wie Färbelösung, aber ohne Serva Blue G-250.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in der Färbelösung, in der es etwa 0,5 cm unter der Oberfläche eingetaucht war, für 30 min geschüttelt. Eine vollständige Entfärbung wurde durch Schütteln des Gels in der Entfärbelösung für 3 h erreicht, wobei die Entfärbelösung alle 30 min gewechselt wurde.

2.3.1.5.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Methode zur Detektion von Proteinen in Elektrophoresegelen mit einer Detektionsgrenze von ca. 10 ng pro Bande. Sie wurde nach Blum et al. (1987) durchgeführt.

Fixierlösung:

500 ml/l Methanol
120 ml/l Eisessig
0,16 g/l Formaldehyd

Waschlösung:

500 ml/l Ethanol

Na-Thiosulfatlösung:

0,2 g/l Na₂S₂O₃

Silbernitratlösung:

2 g/l AgNO₃

0,25 g/l Formaldehyd

Entwicklerlösung:

60 g/l Na₂CO₃

0,25 g/l Formaldehyd

Stopplösung:

500 ml/l Methanol

120 ml/l Eisessig

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel mindestens 1 h in Fixierlösung, anschließend dreimal jeweils mindestens 20 min in der Waschlösung inkubiert. Die nun folgende Inkubation des Gels in Na-Thiosulfatlösung durfte 60 s nicht überschreiten. Das Gel wurde danach dreimal jeweils 20 s in Aq. bidest. gewaschen. Die anschließende Inkubation des Gels in Silbernitratlösung für 20 min stellte das latente Bild der Proteine her. Nach Entfernung überschüssiger Silberionen durch zweimalige Inkubation des Gels in Aq. bidest. für je 20 s konnte das latente Bild durch Inkubation in Entwicklerlösung sichtbar gemacht werden. Die Entwicklung wurde beendet durch Inkubation des Gels in Stopplösung für mindestens 10 min, nachdem das Gel zuvor zweimal wenige s mit Aq. bidest. gewaschen wurde. Das Gel wurde im Anschluss noch 20 min in Waschlösung inkubiert, bevor es in Aq. bidest. aufbewahrt werden konnte.

2.3.1.6 Nachweisverfahren auf Blot-Matrices

2.3.1.6.1 Ponceau-Rot

Die Färbung von Blot-Matrices mit Ponceau-Rot dient zur Überprüfung des Ergebnisses des elektrophoretischen Transfers von Proteinen aus SDS-PAGE-Gelen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen. Das Verfahren wurde in Anlehnung an Salinovich et al. (1986) durchgeführt. Diese Färbung ist reversibel.

Ponceau-Rot-Färbelösung (10-fach konz.):

20 g/l Ponceau-Rot S (Serva 33429)

1 ml/l Eisessig

15 g/l Trichloressigsäure

15 g/l Sulfosalicylsäure

Entfärbelösung:

50 ml/l Eisessig

Nach Beendigung des Western-Blottings wurde die Nitrocellulose für 5 min in der Ponceau-Rot-Färbelösung (1:10 mit Aq. bidest. verdünnt) inkubiert und daraufhin mit der Entfärbelösung entwickelt. Anschließend wurde die Membran in PBS wieder vollständig entfärbt.

2.3.1.6.2 Substratfärbung zum Nachweis aktiver DPP IV

Ähnlich wie bei der Bestimmung der DPP IV in Lösung erfolgt der Nachweis von DPP IV auf Blotmembranen mit einem derivatisierten Dipeptid. Jedoch ist bei diesem Assay an das Gly-Pro eine Naphthylamidgruppe gebunden (Gly-Pro-4-methoxy-2-naphthylamid, Bachem), die bei der Enzym-katalysierten Reaktion freigesetzt wird und nicht in Lösung geht, sondern auf der Membran (am Enzym) verbleibt. Durch Umsatz des Naphthylamins mit dem Diazoniumsalz Fast Garnet GBC Salz (Sigma F 8761) kann das Enzym sichtbar gemacht werden (Rotfärbung).

Substratlösung:

2,7 mg Gly-Pro-4- β -Naphthylamid 30 mmol/l
auf 250 μ l mit Aq. bidest.

Acetatpuffer:

4,1 g Natriumacetat 1 mol/l
auf 50 ml mit Aq. bidest

Waschpuffer:

1,21 g Tris 100 mmol/l
auf 100 ml mit Aq. bidest., mit 10 M
HCl pH 8,0 einstellen

Färbelösung:

5 mg Fast Garnet GBC Salz 0,5 g/l
auf 10 ml Acetatpuffer

Die Blotmembran wurde für 1 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend für 30 min bei 37 °C in 5 ml Waschpuffer mit 30 μ l Substratlösung inkubiert. Daraufhin wurde die Blotmembran mit Waschpuffer dreimal gewaschen, bevor sie in Färbelösung gegeben wurde. Nach Sichtbarwerden der Banden wurde die Membran mit Aq. bidest. gewaschen und anschließend getrocknet.

2.3.1.6.3 Immunblot

Nach dem Transfer der Proteine aus dem SDS-PAGE-Gel auf die Blot-Matrix (2.3.1.4.2.) sind die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine immunologischen Nachweisen durch Verwendung von spezifischen Primärantikörpern zugänglich. Die Primärantikörper, die an die auf der Nitrocellulose immobilisierten Antigene gebunden haben, werden dann in einem zweiten Schritt durch speziesspezifische Sekundärantikörper erkannt, an die ein Enzym (z.B. Peroxidase) kovalent gekoppelt ist. Durch Inkubation mit einem geeigneten Substrat kann dieses Enzym und somit der gesamte Immunkomplex visualisiert werden. Ein sehr empfindliches Substrat ist das Luminolreagenz, das bei der katalytischen Umsetzung durch die Peroxidase chemoluminisziert und dadurch Röntgenfilme schwärzt.

Waschpuffer:

1 ml/l Tween 20 in PBS, pH 7,2

Blockierungspuffer:

50 g/l Magermilchpulver
in Waschpuffer

Fixierer:

200 g Natriumthiosulfatpentahydrat 200 g/l
20 g Natriumdisulfit 20 g/l
auf 1 l mit Aq. bidest.

Entweder direkt nach dem Proteintransfer oder nach Entfärbung der Ponceau-Färbung wurden die Nitrocellulosemembranen mit Blockierungspuffer bei RT für 1 h geschüttelt und danach bei 4°C über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Der mAk 13.4 Hybridoma-Zellkulturüberstand wurde dabei unverdünnt eingesetzt, das Anti-Prokollagen III-Kaninchenserum (pAk RPC I b/2) 1:2500 in Waschpuffer verdünnt. Am nächsten Tag wurde der Blot 3x5 min mit Waschpuffer gewaschen, bevor er mit dem Sekundärantikörper (1:2000 mit Waschpuffer verdünnt) bei RT für 1 h inkubiert wurde. Nach sorgfältigem Waschen (5 x 30 min in Waschpuffer) wurde der Blot auf eine Plastikfolie gelegt, mit Filterpapier getrocknet und unter Rotlicht für 1 min mit 2 ml ECL-Luminol (je 1 ml Enhancer und Developer vermischt; Amersham, Braunschweig), bedeckt. Der Blot wurde erneut sorgfältig getrocknet und mit einer zweiten Lage Plastikfolie bedeckt und dann zügig auf Kodak XR-5-Film aufgelegt. Um das bestmögliche Verhältnis von Sensitivität und Auflösung/Hintergrund zu

erreichen, wurden üblicherweise mehrere Expositionszeiten (5 s; 15 s; 30 s und 1 min) verwendet. Die anschließende Entwicklung des Films erfolgte durch aufeinanderfolgende Inkubationen in Entwickler (Tetenal, Norderstedt), Leitungswasser und Fixierer unter Rotlicht.

2.3.1.7 Enzymatische Verdauungen

2.3.1.7.1 Gelatin-Zymographie

Die Gelatin-Zymographie zum direkten Nachweis einer Gelatinase-Aktivität wurde von Heussen und Dowdle (1980) erstmals beschrieben und später von Chen et al. (1987) modifiziert. Bei diesem Verfahren werden Peptidasen und Peptidasegemische unter nicht-denaturierenden Bedingungen einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen, bei der Gele zum Einsatz kommen, in deren Matrix Gelatin integriert ist. Die Gele werden anschließend inkubiert, bevor sie gefärbt werden. In dem auf diese Weise entstehenden Zymogramm stellen sich gelatinolytisch aktive Peptidasen in Negativ-Färbung dar.

Kollagenstammlösung:

25 mg Typ I-Kollagen vom Rattenschwanz (Sigma, Deisenhofen, C 8897) in 5 ml 10 ml/l Essigsäure gelöst und anschließend hitze-denaturiert. Wurde das Kollagen nicht denaturiert, so präzipitierte es später in der Gel-Matrix.

Zymographiegele unterschieden sich von gewöhnlichen 7,5%igen Polyacrylamidgelen allein dadurch, dass beim Ansatz der Trenngele (2 Gele) anstelle von 5 ml Aq. bidest. 1 ml Kollagenstammlösung und 4 ml Aq. bidest. eingesetzt wurden. So ergab sich eine Gelatin-Konzentration von 0,5 g/l im Trenngel. Im Zuge der Polymerisation des Acrylamids integrierte sich das Gelatin so fest in die Gel-Matrix, dass es später bei der Elektrophorese nicht wanderte.

Probenvorbereitung:

Als Proben wurden *Clostridium histolyticum*-Kollagenase oder isolierte DPP IV eingesetzt. Es konnte reduzierender oder nicht-reduzierender Probenpuffer verwandt werden. Um die proteolytische Aktivität der Enzyme zu erhalten, wurden die Proben nicht gekocht. Eine Bahn musste mit mindestens 1,6 µg (≈73 mU) aktiver DPP IV beschickt werden, damit eine Spaltung beobachtet wurde.

Elektrophorese:

Die Elektrophorese der Proben erfolgte im Eisbad (4 °C) bei konstanter Spannung von maximal 100 V und variabler Stromstärke. Auf diese Weise sollte die Inaktivierung der Peptidasen durch Hitze-Denaturierung und die vorzeitige Gelatinolyse möglichst gering gehalten werden. Vorzeitiger Gelatinolyse wurde bei der DPP IV-Zymographie auch durch das im Probenpuffer enthaltene SDS vorgebeugt.

Waschen des Zymographiegels:

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für zweimal 15 min in TBS, 0,5 ml/l Triton X-100 sowie für zweimal 10 s in TBS gewaschen. Auf diese Weise wurde das im Probenpuffer enthaltene SDS, welches die Peptidasen reversibel hemmte, aus dem Gel entfernt.

Inkubation des Zymographiegels:

Das Zymographiegel wurde in TBS auf dem Schüttler (langsame Stufe) bei 37 °C inkubiert. Für die DPP IV-Zymographie war eine Inkubationsdauer von mindestens 8 h erforderlich. Während der Inkubation spaltete die Peptidase das in das Gel integrierte Gelatin, dessen Fragmente daraufhin – unterstützt durch die Schüttelbewegung – aus dem Gel diffundierten.

Färbung des Zymographiegels:

Das Zymographiegel wurde einer Coomassie-Blue G-250-Färbung unterzogen. Durch die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure wurde gleichzeitig die Spaltungsreaktion gestoppt. Proteolytische Zonen wurden durch Coomassie-Blue nicht gefärbt, da hier die Gelatinspaltprodukte aus dem Gel diffundiert waren, während ungespaltenes Gelatin noch in die Gel-Matrix integriert war und sich blau darstellte. Marker wurden als noch dunklere Banden sichtbar.

Modifikation des Assays:

Um die Spalteigenschaften der DPP IV zu untersuchen, wurden die Zymographie-Bedingungen auf verschiedene Weise verändert. So wurde die Menge der eingesetzten DPP IV sowie die Inkubationsdauer variiert und wurden verschiedene Inhibitoren dem Inkubationspuffer zugegeben.

2.3.1.7.2 Löslicher proteolytischer Assay

Mit dem löslichen proteolytischen Assay lässt sich das Spaltverhalten von Peptidasen näher charakterisieren. Dieses Verfahren erlaubt eine vielfältige Variation der Spaltbedingungen sowie eine Quantifizierung des Abbaus des Substrates.

Komponenten des Spaltansatzes:

Kollagen-Stammlösung: 2 g/l Kollagen in 10 ml/l Essigsäure

TBS 0,2 g/l NaN₃

EDTA-Stammlösung: 40 mM EDTA in TBS 0,2 g/l NaN₃

Natrium-Bikarbonat 0,1 M bzw. 0,3 M

DPP IV-Stammlösung: 200 mg/l aktive DPP IV in TBS 0,2 g/l NaN₃

Clostridium histolyticum-Kollagenase in verschiedenen Konzentrationen

DPP IV-Spaltansatz:

Zunächst wurde eine Substrat-Lösung hergestellt:

50 µl Kollagen-Stammlösung

400 µl TBS 0,2 g/l NaN₃

50 µl EDTA-Stammlösung

Die Substrat-Lösung wurde 5 min gekocht, um das Kollagen zu denaturieren und potentielle kontaminierende Peptidasen zu inaktivieren. Dann wurde bei 37 °C in folgender Reihenfolge weiter pipettiert:

100 µl Kollagen-Stammlösung

20 µl Natrium-Bikarbonat (0,3 M)

40 µl DPP IV

Dabei wurde der Ansatz nach jedem Pipettierschritt im Vortex gründlich gemischt. Durch das geschilderte Vorgehen wurde sichergestellt, dass das denaturierte Kollagen nicht infolge des steigenden pH-Wertes präzipitierte und dass zugleich die DPP IV nicht durch die saure Substrat-Lösung inaktiviert wurde.

Das angegebene Pipettierschema ergab für den DPP IV-Spaltansatz ein Mengenverhältnis von denaturiertem Kollagen zu aktiver DPP IV von 2,5 :1 (20 µg Kollagen, 8 µg DPP IV) bei einer EDTA-Konzentration von 2,5 mM und einem pH 7,4. Als Kontrolle dienten analoge Ansätze ohne Kollagen bzw. ohne DPP IV, die für die gleiche Zeitdauer inkubiert wurden.

Kollagenase-Spaltansatz:

Vorgehen wie bei DPP IV-Spaltansatz, jedoch wurde die Substrat-Lösung nicht gekocht und durch ein leicht abgewandeltes Pipettierschema pH 5,6 eingestellt:

100 µl Kollagen-Stammlösung
10 µl Natrium-Bikarbonat (0,1 M)
5 µl *Clostridium histolyticum*-Kollagenase

Inkubation des Spaltansatzes:

Die Inkubation eines Spaltansatzes mit DPP IV erfolgte bei 37 °C für 80 h. Ansätze mit Kollagenase wurden deutlich kürzer inkubiert (z.T. nur 10 s). Während der Inkubation fand die proteolytische Reaktion statt, die durch Aufkochen des Spaltansatzes in reduzierendem SDS-PAGE-Probenpuffer gestoppt wurde.

Auswertung des Assays:

Der Verdauung des Kollagens wurde durch SDS-PAGE des Spaltansatzes und anschließende Färbung mit Coomassie-Blue indirekt nachgewiesen. Die Banden der Kollagenketten nahmen mit zunehmender Verdauung an Intensität ab. Die Banden der Alpha 1-Ketten wurden unter Einsatz eines AGFA ARCUS II Scanner und von IP Lab Gel H-Software densitometrisch quantifiziert. Die Nachweisgrenze betrug etwa 200 ng. Die Kollagenmenge, die ohne Peptidase gemessen wurde, wurde als 100 % definiert. Die angegebenen Prozentwerte stellen jeweils Durchschnittswerte aus drei Experimenten dar. Der Variationskoeffizient (VK) betrug zwischen 5 und 10 % für alle angegebenen Werte.

Alternativ zu dem hier beschriebenen Standard-Verfahren konnten anstelle der SDS-PAGE eine Dünnschichtchromatographie und anstelle der Coomassie-Blue-Färbung eine Silber-Färbung oder ein Immunblot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Prokollagen III (pAk RPC I b/2) durchgeführt werden.

Modifikation des Assays:

Zur näheren Charakterisierung des Spaltverhaltens der Kollagenase und der DPP IV wurde der Assay vielfältig abgewandelt. So wurden pH, Inkubationstemperatur, Peptidase-Konzentration und Inkubationsdauer variiert, verschiedene Substrate in nativem und denaturiertem Zustand eingesetzt sowie diverse Inhibitoren dem Assay zugefügt. Die Stammlösungen für Phenanthrolin (Komplexbildner für zweiwertige Ionen), TPCK und PMSF wurden in DMSO vorbereitet, das in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Endo- oder Exopeptidase-Aktivität der DPP IV hatte.

2.3.2 Histochemische Methoden

2.3.2.1 Kryostatschnittherstellung

Nieren-, Leber- und Sehnengewebe wurden Ether-narkotisierten adulten Fischer- und Wistar-Ratten entnommen und auf Korkplättchen aufgelegt, in Haushaltsfolie eingewickelt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. In luftdicht verschlossenen Plastikbeuteln wurden die Proben bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert. Später wurden 10 µm dicke Schnitte mit einem Kryostat hergestellt und auf zimmerwarme Objektträger montiert. Diese Schnitte konnten sowohl für die enzym- als auch für die immunhistochemischen Untersuchungen verwandt werden. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger benutzt. Die Schnitte wurden in mit Parafilm abgedichteten Küvetten bis zu mehrere Wochen bei -20°C gelagert.

2.3.2.2 DPP IV-Aktivitätshistochemie

Der histochemische Nachweis der DPP IV-Exopeptidase-Aktivität erfolgte an Kryostatschnitten (Niere, Leber und Sehne) von Wistar- und von deutschen Fischer-344-Ratten nach der Methode von Lojda et al. (1979).

DPP IV-Medium:

5 mg Gly-Pro-4-methoxy-2-naphthylamid (Substrat; Bachem, Bubendorf: J 1210)
250 µl Dimethylformamid (Substratlösungsmittel)
10 mg Fast-Blue-B (Kopplungsreagenz o-Dianisidin; Serva, Heidelberg)
in 9,75 ml 0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 7,0)

Kryostatschnitte wurden für 5 min in der Küvette in Chloroform-Aceton (1:2) bei 4°C fixiert, danach an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit DPP IV-Medium in einer feuchten Kammer im Inkubationsschrank (37 °C) für 60 min inkubiert. Nach Abgießen des Mediums wurden die Schnitte in Aqua bidest. gewaschen und in Glycerin-Gelatine eingedeckt. Als Kontrollen für die Spezifität der Färbung diente ein Ansatz mit substratfreiem DPP-IV-Medium. Der entstandene blaue Azofarbstoff wurde mit dem Axiophot-Lichtmikroskop analysiert.

2.3.2.3 Kollagen-Immunhistochemie mit polyklonalen Primärantikörpern

Zur Immunlokalisierung von fibrillären Kollagenen in Niere, Leber und Sehne wurden Kryostatschnitte kurz luftgetrocknet und 10 min in 40 g/l Formaldehyd (pH = 7,4) bei RT fixiert. Anschließend wurden die Schnitte für 60 min bei RT in einer Küvette mit 10 g/l BSA in PBS zur Blockierung inkubiert, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern. Da die Schnitte bis zum Ende der Reaktion nicht austrocknen durften, mussten alle Folgeschritte zügig durchgeführt werden. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei RT durchgeführt. Nach der Blockierung wurden die Schnitte ohne vorheriges Waschen mit polyklonalen Kollagen I-Antikörpern (Kaninchenserum 1:1000 in PBS verdünnt) für 2 h inkubiert. Nach sieben- bis zehnmalem schnellen Waschen in PBS wurden die Schnitte mit Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern (Goat-Anti-Rabbit, 1:200 in PBS) für 2 h inkubiert. Nach erneutem sieben- bis zehnfachen Waschen mit PBS wurden die Objektträger in Aquatex eingedeckt. In jeder Versuchsreihe wurden Negativkontrollen mit PBS ohne Kollagen I-Antikörper bei sonst identischen Arbeitsschritten mitgeführt. Die fertigen Schnitte wurden lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Immunreaktion der spezifisch gebundenen Antikörper wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.