



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Epitopanalyse des monoklonalen CN1-Antikörpers RYSK173 und
Charakterisierung der Bindungseigenschaften in Abhängigkeit von
zwei unterschiedlichen CN1-Konformationen im Serum**

Autor: Sarah Kabtni
Institut / Klinik: V. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. B. Yard

Es gilt als gesichert, dass die Empfänglichkeit für eine diabetische Nephropathie genetisch durch den Polymorphismus des CNDP1-Signalpeptids determiniert ist. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass das Carnosin-Carnosinase-System auch durch hiervon unabhängige Faktoren relevant beeinflusst wird. Unsere Hypothese ist, dass Konzentration und Aktivität der humanen Serum-Carnosinase (CN1) im Serum neben einer genetischen Determinante durch Hyperglykämie und Enzymkonformation entscheidend verändert werden. Vordaten unserer Arbeitsgruppe wiesen darauf hin, dass im Serum zwei strukturell verschiedene Konformationsvarianten von CN1 existieren, die mit zwei verschiedenen Antikörpern detektiert werden können. Hierbei werden der Antikörper von ATLAS, der die gesamte CN1 detektiert und der Antikörper RYSK173, der lediglich die nicht-komplexierte Form der CN1 (ncCN1) mit niedriger Aktivität erkennt, unterschieden. Ob die beiden Konformationsvarianten von CN1 im Serum an eine Bindung mit Metallionen gekoppelt sind, war bislang ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb der Einfluss von Metallionen auf die CN1-Konformation bzw. auf das Bindungsverhalten von RYSK173 näher untersucht werden. Die vorliegenden Daten zeigen, dass sich die Detektionen der durch ATLAS erkannten CN1 und der durch RYSK173 erkannten CN1 in humanem Serum signifikant unterschieden, sich jedoch keine qualitativen Unterschiede zwischen beiden Antikörpern bei der Detektion von rekombinanter CN1 (rCN1) in COS-7-Zellysaten ergaben. Es wurde daher angenommen, dass das RYSK173-Epitop durch einen bisher nicht identifizierten Faktor in humanem Serum maskiert wird. Da aus der Zugabe von EDTA zu CN1 im Serum eine signifikante Zunahme der CN1-Detektion im RYSK173-ELISA resultierte, wird vermutet, dass die Erkennung des RYSK173-Epitops durch das Vorhandensein von Metallionen im Serum beeinflusst wird. Diese Annahme wurde unterstützt durch eine signifikante Abnahme der rCN1-Detektion durch RYSK173 nach Inkubation von rCN1 in Humanserum. CN1 besitzt als Mitglied der M20-Familie innerhalb der katalytischen Domäne ein Zentrum für die Bindung zweier Metallionen; an dieser Stelle sind insbesondere Zinkionen beschrieben. Innerhalb der Metall-bindenden Domäne vermuteten Adelman et al. den von RYSK173 erkannten Epitopbereich. Um den Einfluss von Metall-bindenden Ionen auf das Bindungsverhalten von RYSK173 zu untersuchen, wurde eine Strategie zur Epitopanalyse von RYSK173 entwickelt (sog. Epitop-Mapping). Hierfür wurden zunächst verschieden lange Teilfragmente der CNDP1-cDNA konstruiert und anschließend in COS-7-Zellen als Myc-Fusionsproteine exprimiert. Im Immunoblot und ELISA wurde die Reaktivität des monoklonalen Antikörpers gegenüber den CN1-Expressionsprodukten geprüft. In mehreren Schritten wurde die Lokalisation der Erkennungsregion von RYSK173 auf CN1 schließlich auf eine Sequenz aus wenigen Aminosäuren (HLDVQPADRGDGWL) eingegrenzt. Mithilfe von weiteren CN1-Fragmenten wurde die Epitopanalyse präzisiert und bestätigt, dass das RYSK173 Epitop gänzlich in der Zn^{2+} -bindenden Domäne lokalisiert war und keine Überschneidung zur Hybridisierungsdomäne aufwies. Innerhalb dieser Sequenz befand sich an Aminosäureposition 132 das für die Zinkbindung vermutlich essentielle Histidin (H132). Um die Relevanz des Histidins H132 für die Bindung von RYSK173 an CN1 zu prüfen, wurde das Histidin gegen ein Glutamin in der Wildtyp-CN1 substituiert. Dies resultierte in einem signifikanten Abfall der CN1-Detektion im RYSK173-ELISA und erhärtete die Hypothese, dass die Aminosäure H132 einen integralen Bestandteil des RYSK173-Epitops darstellt. Zusammenfassend belegen unsere Daten die Gegenwart verschiedener CN1-Konformationen im Serum. Diese werden durch eine Komplexierung von Metallionen im aktiven Zentrum von CN1 bedingt. Da das RYSK173-Epitop innerhalb der Metall-bindenden Domäne von CN1 liegt, wird eine Bindung von RYSK173 an die komplexierte Form der CN1 verhindert.