

Hans-Peter Köst
Dr. med.

D-Aspartat Oxidase: Aufreinigung des Proteins, Herstellung von Antikörpern und Immunlokalisation des Enzyms in Niere und Zentralnervensystem

Geboren am 16.08.1945 in Jesberg
(Staats)-Examen am 11.04.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. K. Zaar

D-Aspartat Oxidase-Protein (D-ASPOX) wurde aus Cortex-Gewebe der Rinderniere gewonnen und durch Hitzebehandlung, Chromatographie an Phenylsepharose, Trennung nach Molekulargewicht und Ionenaustauschchromatographie bis zur Einheitlichkeit aufgereinigt. Die maximal erhaltene Enzymaktivität war 11 U/mg. Bei der SDS Elektrophorese ergab sich ein Molekulargewicht von 37 kD.

Das isolierte Protein wurde zur Herstellung eines D-ASPOX Protein Antikörpers in Kaninchen eingesetzt.

In Zusammenarbeit mit dem Labor Dr. Pineda, Berlin, wurden polyklonale Peptid-Antikörper gegen ein aus der Sequenz der Rinder-D-Aspartat Oxidase abgeleitetes Peptid gewonnen. Hierzu wurden Daten aus früheren Versuchen zur Expressionsklonierung von D-Aspartat Oxidase aus Rinderniere ausgewertet und die Aminosäuresequenz des Proteins bestimmt. In dieser Sequenz wurde eine carboxyterminale SKL Sequenz gefunden, die ein peroxisomales PTS1 Targeting Signal darstellt.

Zur Herstellung eines D-ASPOX Peptid-Antikörpers wurde die Aminosäuresequenz des Proteins auf geeignete immunogene Abschnitte überprüft. Dazu wurde eine Epitopanalyse durchgeführt. Als am besten geeignet erwies sich die Sequenz PTPDTPPIQKQKQWF (entspricht den AS 54-68 des Proteins). Die Synthese eines kopplungsfähigen Peptids CTYPDTPPIQKQKQWF („K-1“) sowie die Gewinnung hiergegen gerichteter Antikörper wurden in Auftrag gegeben. Das an (KHL)-Protein gekoppelte Peptid wurde zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt und verursachte bei der 2. Boosterinjektion den Tod aller drei eingesetzter Tiere. Es gelang dennoch die Gewinnung eines Antiserums („anti-K1“).

Zur Immuno-Affinitätsreinigung polyklonaler *anti*-D-ASPOX Antikörper wurde das gereinigte D-ASPOX-Protein an eine mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) derivatisierte Sepharose 4B Säule (Hi Trap® der Fa. Pharmacia) gebunden. Etwa 65% des eingesetzten D-ASPOX Proteins wurden dabei an das NHS-Säulenmaterial gebunden. Zur Reinigung des Peptid-Antikörpers wurde auch an Trägergel gekoppeltes Peptid K1 eingesetzt.

Der Aufreinigungseffekt der Antikörper wurde durch Western Blot Analyse überprüft. Als geeignetste Methoden zur Haltbarmachung der Antikörper erwiesen sich die Aufbewahrung unter 60% gesättigtem Ammoniumsulfat bei +8 °C bzw. die Lagerung aliquotierter, bei -20 °C in PBS-Puffer, 10% Glycerin und 0,01% Natriumazid oder 0,01% Merthiolat als Konservierungsmittel eingefrorene Lösungen (ohne Ammoniumsulfat).

Die durch Affinitätsreinigung erhaltenen Antikörper *anti*-D-Aspartat Oxidase Protein und *anti*-Peptid K1 wurden zunächst zur Lokalisation des D-Aspartat Oxidase Proteins in flottierenden Gefrierschnitten durch den Cortexbereich der Rinderniere eingesetzt. Man verwendete die ABC Methode, bei welcher die gebundenen Antikörper durch Biotin-markierte Sekundärantikörper und einem makromolekularen Komplex aus Avidin und Biotin-Peroxidase nachgewiesen wurde. Am Ort der Antikörperbindung entstand durch den Nachweis der Peroxidase mit AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) ein braunrotes unlösliches Präzipitat.

Die höchste D-ASPOX Konzentration enthalten die proximalen Tubuli (PT). Das Protein tritt in Form intensiv braun-rot gefärbter Granula auf, die vorwiegend basolateral-radiär zu Streifen angeordnet sind. Distale Tubuli (DT) enthalten nur vereinzelt braune Granula.

Die Lokalisation von D-ASPOX Protein ist mit beiden benutzten Antikörpern, *anti*-D-ASPOX Protein und *anti*-Peptid K1, grundsätzlich die gleiche. Die D-Aspartat Oxidase Protein-haltigen

Granula haben Durchmesser zwischen ca. 0,1 und 1,5 μm . Bei gleicher Lokalisation im Nephron erscheinen die Granula nach Darstellung mit dem Peptidantikörper allerdings viel feiner.

Das granuläre, punktförmige Auftreten des Proteins D-Aspartat Oxidase ist in Übereinstimmung mit einer beschriebenen peroxisomalen Lokalisation und mit dem bei der Sequenzierung gefundenen „SKL-Tag“ für den Import in Peroxisomen.

Menschliches Hirngewebe und Gewebe aus dem Rattenhirn wurde in gleicher Weise untersucht. Im Hippocampus, Cornu ammonis Region 1-3 (CA 1-3) ist D-ASPOX Protein sowohl im Soma, als auch in dendritischen Fortsätzen von Pyramidenzellen massiv in Granula unterschiedlicher Größe konzentriert.

In der CA4 Region des Hippocampus wurden Nervenzellen mit zum Teil erheblichem Gehalt an D-Aspartat Oxidase Protein gefunden, insbesondere in einzelnen großen multipolaren Neuronen. Auch hier ist das Protein in Granula verschiedener Größe im Soma und in den dendritischen Fortsätzen der Zellen lokalisiert.

Ähnliche Verhältnisse wie beim Menschen sind auch bei der Ratte zu finden.

Auch in den multipolaren Ganglienzellen des Ganglion cervicale superius (Mensch) kommt D-Aspartat Oxidase Protein in den Perikaryen in Form tief braunrot gefärbte Granula verschiedener Größe vor.

Im menschlichen Cerebellum wurde in der Körnerzellschicht, direkt unterhalb des Stratum ganglionare (Purkinje-Zellschicht) zwischen mehreren Hundert Körnerzellen vereinzelt größere Neurone mit circa fünfzehnfacher Größe einer Körnerzelle gefunden. Während D-Aspartat Oxidase Protein im Cytoplasma der Körnerzellen nicht eindeutig nachzuweisen war, wurde es in den großen Neuronen und ihren Fortsätzen in hoher Konzentration in intensiv braunrot angefärbten Granula verschiedener Größe vorgefunden; wahrscheinlich handelt es sich bei diesen Neuronen um die Golgi-Zellen der Kleinhirnrinde. Purkinjezellen des Stratum ganglionare enthielten eine eher geringe Mengen an D-ASPOX Protein.

Im menschlichen Plexus choroideus wurden große Mengen an D-ASPOX Protein im einschichtigen kubischen bis niedrig zylindrischen Epithel gefunden. Braunrot gefärbte Granula sind in fast jeder Epithelzelle konzentriert und dicht gepackt.

In Gefrierschnitten des menschlichen Hippocampus (Gyrus dentatus, CA1, CA2) von Gehirnen älterer Patienten wurden nach immunhistochemischem Nachweis von D-ASPOX Protein häufig große, runde, extrazellulär liegende intensiv angefärbte Globuli gefunden, die mit allen Erstantikörper/Zweitantikörper-Kombinationen anfärbbar waren. Es handelt sich hier sehr wahrscheinlich um Corpora amylacea. Die meist runden Globuli scheinen in Form konzentrischer Kugelschalen organisiert zu sein. An Orten, an denen viele Corpora amylacea vorliegen, findet man weniger Neurone mit einer positiven immunhistochemischen Reaktion auf D-Aspartat Oxidase Protein.

Beim Auswerten von Gefrierschnitten von Paravertebralganglien nach immunhistochemischem Nachweis auch nach Kontrollen ohne Primärantikörper fielen dunkle Ablagerungen in den Ganglienzellen auf. Diese Ablagerungen wiesen bei stärkerer Vergrößerung ein regelmäßiges Muster paralleler Streifen auf, so dass an quasi-kristalline Strukturen zu denken war. Möglicherweise liegt eine intrinsische Peroxidase-ähnliche Aktivität vor, die zur Oxidation von AEC führt.

In Kultur befindliche embryonale Hippocampusneurone aus der Ratte (DIV 8 bis 29) wurden auf das Vorkommen von D-Aspartat Oxidase Protein untersucht. Außerdem wurde die Wirkung der Zugabe von 25 μM D-Aspartat auf die embryonale Zellkultur getestet (DIV 8 bis DIV 29). Nach DIV 21 sind in den Dendriten und dem Axon offensichtlich kein, in den Perikaryen nur wenig D-ASPOX Protein nachzuweisen. In weiteren Experimenten wurden die Hippocampuskulturen von Tag 8 bis Tag 29 zusätzlich mit 25 μM D-Aspartat inkubiert (DIV 8 bis DIV 29). Nach 21-tägiger Inkubation mit D-ASPOX sind in den Perikaryen und Dendriten vieler Neurone jetzt Anhäufungen granulärer, D-ASPOX Protein positiver Strukturen sichtbar. Somit könnte D-ASPOX Protein in embryonalen Hippocampus-Zellkulturen von Ratten durch die externe Gabe von D-Aspartat induzierbar sein. Bei Hippocampus-Kulturen, die ohne D-Aspartat gehalten wurden (Kontrolle) fehlt die Anhäufung von D-ASPOX positivem granulärem Material.

Die Funktion von D-ASPOX in den jeweils untersuchten Geweben wird diskutiert.