

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Prostaglandin-15-Hydroxydehydrogenase (PG-15-HDH; E.C. 1.1.1.141.) aus Humanplazenta über vier Säulenchromatographieschritte isoliert und 171,1-fach angereichert. Die spezifische Aktivität nach dem letzten Isolierungsschritt betrug 1 540 mU/mg und die Ausbeute 4 %. Durch die SDS-Gelelektrophorese wurde festgestellt, daß die erhaltenen Proteinlösung homogen ist.

Zur Gewinnung von Antikörpern wurden mit dieser hochgereinigten Enzymlösung zwei Meerschweinchen immunisiert. Für die Blutentnahme aus der Vena cava cranialis von Meerschweinchen wurde eine bei kleinen Labortieren neu entwickelte Methode angewendet.

Durch Anwendung der Ouchterlonydoppeldiffusionsmethode und durch eine immunhistologische Untersuchung wurde gezeigt, daß das Meerschweinchenserum Antikörper gegen die Human-PG-15-HDH enthielt. Diese Antikörper wurden mittels einer Anionenaustausch- und einer Protein G-Affinitätschromatographie angereichert.

Sowohl die unkonjugierte als auch die mit Tyrosin-Glycin konjugierte PG-15-HDH wurden nach der Chloramin-T-Methode mit ^{125}Jod markiert. Die parallel durchgeführten Bindungsstudien erbrachten keine verwertbaren Ergebnisse, da wahrscheinlich die Antigenität des Enzyms durch Radiolyse verändert worden war.

Für eine weitere Bindungsstudie wurde die PG-15-HDH über eine Bindung von Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) mit Europium markiert. Diese Studien wurden als zeitlich aufgelöstes kompetitives Verfahren durchgeführt. Auch mit dieser Methode wurde gezeigt, daß kaum eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung vorlag, und diese wahrscheinlich von unspezifischen Effekten überlagert wurde.

Des weiteren wurde die PG-15-HDH aus Meerschweinchenplazenta über zwei Säulenchromatographieschritte isoliert und 72,4-fach angereichert. Die Ausbeute betrug 12 % und die spezifische Aktivität 33,3 mU/mg. Durch eine SDS-Gelelektrophorese wurde die Homogenität der Enzymlösung demonstriert.

Es konnte gezeigt werden, daß die Enzyme aus Human- und Meerschweinchenplazenta bei den Säulenchromatographien das gleiche Elutionsverhalten aufweisen, über die gleiche molekulare Masse verfügen, und daß die kinetischen Daten (K_m und v_{max}) bei beiden Proteinen fast übereinstimmen. Hierdurch konnte auf große strukturelle Homologien bezüglich der Aminosäuresequenzen zwischen beiden Proteinen rückgeschlos-

sen werden, aufgrund derer das Immunsystem der Meerschweinchen eine natürliche immunologische Toleranz gegen die Human-PG-15-HDH besitzt.

Hierdurch lassen sich die nicht verwertbaren Ergebnisse bei den durchgeführten Bindungsstudien erklären.

6.1. Summary

Heinrich Zumbusch

Antibody production against the human Prostaglandin -15-hydroxydehydrogenase (PG-15-HDH, E.C. 1.1.1.141.):

Comparative studies on PG-15-HDH from guinea pig placenta and human placenta.

The PG-15-HDH was isolated from human placenta by four chromatographic steps. After the final step of isolation the specific activity of the PG-15-HDH has been increased up to a maximum of 1540 mU/mg corresponding to a 171,1-fold enrichment (overall yield 4 %). Homogeneity of the final protein fraction was confirmed by SDS polyacrylamide electrophoresis.

In order to induce antibodies two guinea pigs were immunized with highly purified enzyme preparations.

Furthermore, a new method for obtaining blood from small laboratory animals was developed by puncturing the vena cava cranialis.

An Ouchterlony-test and an immunohistochemical examination revealed that the guinea pig antiserum contained antibodies against human PG-15-HDH.

The purification of these antibodies was achieved by using an anion exchange chromatography column and by protein G-affinity chromatography.

The unconjugated PG-15-HDH fractions and those conjugated with tyrosin-glycin were labelled with ¹²⁵Iodine using the chloramine-T-method. The parallel performed binding studies showed no significant results. This effect may be caused by radiolysis of the enzyme.

Another attempt for labelling the enzyme was carried out by complexing PG-15-HDH with diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and europium. These studies were

performed as a time-resolved competitive technology. These experiments showed again, that the specific antigen-antibody-binding was not sufficient and was likely overlapped by nonspecific effects.

The PG-15-HDH from guinea pig placenta was isolated in two chromatographic steps. The specific activity of the PG-15-HDH increased up to a maximum of 33,3 mU/mg corresponding to a 72,4-fold enrichment (overall yield 12 %). The homogeneity of the final protein fraction was confirmed by SDS polyacrylamide electrophoresis. It has been shown that the elution of both enzymes occurred similarly during the chromatographic steps, they both have the same molecular mass and almost the same kinetic data. From these observations one may conclude that the amino acid sequences of both enzymes have great homologies. Therefore, the immune system of guinea pigs have a natural immunological tolerance against human PG-15-HDH. This effect may explain the negative results of the performed binding studies.