

Diss. ETH 6172

BAKTERIELLE SYNTHESE EINER
PARATHYROIDHORMON - AEHNLICHEN SUBSTANZ

ABHANDLUNG

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE

vorgelegt von

ADELHEID KLAUS
dipl. Chem. ETH
geboren am 3. Mai 1950
von Uzwil (Kt. St. Gallen)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. R. Hütter, Referent
Prof. Dr. J.A. Fischer, Korreferent

1978

ZUSAMMENFASSUNG

In Zellextrakten und bebrüteten Nährmedien verschiedener Bakterien und Pilze wurde mit Hilfe des Radioimmunotests nach Parathyroidhormon-ähnlichen Substanzen gesucht. Bei diesen Screening-Versuchen fand man zahlreiche Aktivitäten, die jedoch mit einer Ausnahme alle auf Artefakte im Radioimmunotest zurückgeführt werden konnten.

In bebrüteten Nährmedien von Pseudomonas aeruginosa Stamm PAO-1 wurde eine Substanz gefunden, die mit Antikörper gegen Parathyroidhormon aus Rindern (bPTH) reagierte. Dieses kreuzreagierende Material (CRM) wurde vorallem in der stationären Phase ins Nährmedium ausgeschieden. In Zellextrakten von Pseudomonas aeruginosa Stamm PAO-1 wurde das CRM nie gefunden. Dem Verhalten nach scheint es sich beim CRM um eine im Sekundärmetabolismus gebildete Substanz zu handeln.

Die im Ueberstand von Stamm PAO-1 gefundene Aktivität wird nicht durch proteolytischen Abbau von markiertem Antigen oder Antikörper verursacht, und stellt also kein Artefakt dar. Zudem fand man bei Stamm PAO-1 auch in anderen Radioimmunotests z.B. für Insulin, adrenocorticotropes Hormon und menschliches Choriosomatammotropin keine Aktivität.

Das Verhalten des CRM bei der Verwendung verschiedener Anti-bPTH-Antikörper wurde untersucht. Das CRM reagierte mit einem Antikörper, der gegen eine Sequenz im mittleren Teil des bPTH-(1-84)-Moleküls gerichtet war, aber auch mit einem Antikörper gegen das synthetische, aminoternale bPTH-(1-34) gerichtet ist, welches für die biologische Aktivität des bPTH verantwortlich ist. Diese Resultate lassen vermuten, dass das CRM aus Stamm PAO-1 immunologisch mit bPTH verwandt ist.

Das CRM eluierte bei der Gelfiltration in den gleichen Fraktionen wie bPTH (9'500 Dalton). Bestimmte man das Molekulargewicht des CRM jedoch unter Verwendung globulärer Markerproteine, so erhielt man ein ungefähres Molekulargewicht von 21'500 Dalton.

Im Elektrophoresesystem, das normalerweise zur Charakterisierung von bPTH verwendet wird, zeigte das CRM eine von bPTH verschiedene Mobilität. Es wurde festgestellt, dass der isoelektrische Punkt des CRM ca. bei pH 8 lag, und dass es sich beim CRM damit ebenso wie beim bPTH um ein basisches Protein handelt.

Das CRM wurde mit Hilfe einer Ammoniumsulfatfällung, einer Gelfiltration an Sephadex G-75 und einer Ionentauscher-Chromatographie an Carboxymethylcellulose hundertfach gereinigt (Ausbeute 7%). Dabei zeigten CRM und bPTH in der Gelfiltration und in der Ionentauscher-Chromatographie gleiche Elutionsprofile. Die geringe Ausbeute bei der Reinigung hat bis jetzt die vollständige Charakterisierung verhindert.

Biotests mit dem angereicherten CRM ergaben vorerst noch keine positiven Resultate; dies ist jedoch möglicherweise auf die geringe Reinheit des CRM zurückzuführen.

S U M M A R Y

A substance in the culture liquid of Pseudomonas aeruginosa strain PAO-1 reacted with antibodies to bovine parathyroid hormone (bPTH). The immunoreactive material appeared in the culture liquid mainly during the stationary phase. It was never observed in crude cellular extracts of the organism. The radioimmunoassay technique was used for detection and immunological characterization of the PTH-like material. The inhibition of the antigen-antibody reaction by the PTH-like material was not due to proteolytic degradation of labelled ligand or antibody. The PTH-like material was recognized with antibodies to a sequence in the middle part of bPTH-(1-84), but also with antibodies to synthetic bPTH-(1-34), suggesting that the PTH-like material was related to the biologically active NH₂-terminal part of the native molecule. The PTH-like material was purified hundredfold by salt precipitation, gelfiltration on Sephadex G-75, and ion exchange chromatography on carboxymethyl cellulose (recovery 7%). The elution profiles of the PTH-like material and bPTH were similar on gel filtration and ion exchange chromatography. The PTH-like material (isoelectric point at pH 8) was found to be a basic protein as bPTH.