

IDENTIFIZIERUNG DES Na^+ /D-GLUKOSEKOTRANSPORTSYSTEMS
IM KANINCHENDÜNNDARM MIT MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN
UND CHARAKTERISIERUNG EINER Na^+ /D-GLUKOSEBINDUNG AN
DEOXYCHOLAT-BÜRSTENSAUMMEMBRANFRAGMENTE.

A B H A N D L U N G

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

vorgelegt von
URSINA MARGHERITA SCHMIDT
dipl. Natw. ETH
geb. am 4. Januar 1954
von Basel Stadt/BS

Angenommen auf Antrag von:
G. Semenza Prof. Dr. G. Semenza....., Referent
Prof. Dr. J. Lindenmann....., Korreferent

1 9 8 4

VI. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung bzw. Isolierung des Na^+ /D-Glukosekotransportsystems im Kaninchendünndarm. Im ersten Teil wurden Membranfragmente charakterisiert, welche nach einer Extraktion von Bürstensaummembran-Vesikeln mit 2 mg Deoxycholat/mg Protein gewonnen wurden. Diese Membranfragmente zeigten eine Na^+ -abhängige, phlorizinhemmable D-Glukosebindung sowie eine Na^+ -abhängige, D-glukosehemmbare Phlorizinbindung. Wie beim D-Glukosetransport in Bürstensaummembran-Vesikel lagen die Dissoziationskonstante der Phlorizinbindung und die Hemmkonstante für Phlorizin auf die D-Glukosebindung im gleichen Konzentrationsbereich. Die D-Glukosebindungsstelle an deoxycholat-extrahierte Membranfragmente wurde deshalb der Zuckerbindungsstelle des Na^+ /D-Glukosekotransportproteins zugeschrieben. Eine Markierung des Na^+ /D-Glukosekotransportsystems mit einem hydrophilen Affinitätsmarker, 6-Deoxy-6-isothiocyanato-D-glukose, misslang. Im zweiten Teil wurden mit der Hybridomen-Technik monoklonale Antikörper gegen das Na^+ /D-Glukosekotransportsystem hergestellt. Maus-Myelomzellen-SP2/0 Ag-14 wurden mit Lymphozyten von BALB/c-Mäusen, die mit Transportproteinen angereicherten Membranfragmenten immunisiert worden waren, fusioniert. Die Bindung der von 528 wachsenden Hybridomen sezernierten Antikörper an Bürstensaummembranen wurde immunradiometrisch bestimmt. Anschliessend wurde die Hemmung der Na^+ -abhängigen Phlorizinbindung an intakte Vesikel durch monoklonale Antikörper von 59 Hybridomklone, welche mit einer limitierenden Verdünnung geklont worden waren, geprüft. Die monoklonalen Antikörper von 5 Hybridomklonen hemmten die Na^+ -abhängige Phlorizinbindung.

Wegen der Uebereinstimmung der Dissoziationskonstante der Phlorizinbindung mit der Hemmkonstante des Phlorizins auf den spezifischen Na^+ /D-Glukose-transport in intakte Vesikel wurde die Hemmung der Phlorizinbindung als Selektionskriterium für Antikörper gegen das Na^+ /D-Glukosekotransportsystem gewählt. Die monoklonalen Antikörper der Klone IM 11 und IM 34, welche mit Ammoniumsulfat aus Aszitesflüssigkeit ausgefällt und immunchromatographisch gereinigt worden waren, hemmten in Abhängigkeit der eingesetzten Immunglobulinkonzentration die Na^+ -abhängige D-Glukoseaufnahme in Vesikeln und die Phlorizinbindung an dieselben.

Eine mit Ammoniumsulfat ausgefällte Immunglobulinfraktion aus Aszitesflüssigkeit der Klone IM 11 und IM 34 wurde an CNBr-aktivierte Sepharose-4B gekoppelt und als Immunadsorbens für digitonin-solubilisierte Bürstensaummembranen (IM 11) oder digitonin-solubilisierte, deoxycholat-extrahierte Membranfragmente (IM 11, IM 34) gebraucht. Nach gründlichem Waschen der Immunaffinitätssäule wurden die spezifisch adsorbierten Proteine mit 10 mM D-Glukose oder 15 μM Phlorizin eluiert. Die Eluate wurden im 8.4% SDS/Polyacrylamidgel analysiert und zeigten eine angereicherte Polypeptidbande, resp. eine einzige Bande, mit einem Molekulargewicht von 72 kDa. Dieses Polypeptid wurde (einem Teil des) dem Na^+ /D-Glukosekotransportprotein(s) zugeschrieben, weil es mit monoklonalen Antikörpern gegen das Transportprotein interagierte und mit D-Glukose und Phlorizin eluiert werden konnte. Kontrollmaus-IgG-Säulen adsorbierten das Polypeptid nicht. 2 immunchromatographisch gereinigte monoklonale Antikörper aus Aszitesflüssigkeit der Klone IM 34 und IM 24 hemmten die Mannoseaufnahme in Erythrozyten. 5 monoklonale Antikörper gegen die Bande-4.5 der

Erythrozyten in Kulturmedien hemmten die Na^+ -abhängige Phlorizinbindung an intakte Bürstensaummembran-Vesikel. Die Kreuzreaktion der monoklonalen Antikörper gegen das Na^+ /D-Glukosekotrtransportprotein des Kaninchendünndarmes mit der Zuckerbindungsstelle des Monosaccharidtransportproteins der Erythrozyten und die Kreuzreaktion der monoklonalen Antikörper gegen Bande-4.5 der Erythrozyten mit dem Na^+ /D-Glukosekotrtransportprotein des Dünndarmes weisen auf eine gemeinsame Antigen-determinante in beiden Zuckerbindungsstellen hin.

VI. Summary

Two attempts to identify the Na^+ -D-glucose cotransport system in rabbit small intestine have been undertaken by labeling with an affinity label and by separation with immunaffinity columns, made from monoclonal antibodies selected against the transport protein.

The first part of this work deals with membrane fragments from deoxycholate extracted brush border membranes. In the presence of Na^+ , both phlorizin and D-glucose bound with high affinity to these membrane fragments and phlorizin inhibited the specific D-glucose binding. The dissociation constant of phlorizin binding and the inhibitory constant of phlorizin on the D-glucose binding to these fragments were equal. The binding sites of phlorizin and D-glucose are thought to be (a part of) the Na^+ -D-glucose cotransport system. But labeling of the transport protein with the hydrophilic 6-deoxy-6-isothiocyanato-D-glucose failed.

The second part of this work deals with monoclonal antibodies against the Na^+ -D-glucose cotransport system made by hybridoma technology.

Lymphocytes of mice immunized by membranes with enriched phlorizin binding sites were fused with mouse myeloma cells SP2/0 Ag-14. Antibodies secreted by 528 growing hybridomas were tested with radioimmunoassays for binding to brush border membranes.

Monoclonal antibodies of 59 growing hybridomas, cloned by limited dilution, were tested by a functional assay: the inhibition of phlorizin binding to brush border membranes. Fully competitive inhibitor binding to vesicles is generally accepted as a functional test for the Na^+ -D-glucose cotransport system because its K_d is equal to the inhibitory constant K_i of phlorizin on the D-glucose uptake into vesicles.

5 monoclonal antibodies successfully inhibited the Na^+ -dependent phlorizin binding.

2 immunaffinity purified monoclonal antibodies (IM 11 and IM 34) inhibited the specific Na^+ -D-glucose uptake into vesicles and the Na^+ -dependent phlorizin binding in a concentration-dependent manner. Partially purified immunoglobulins of ascites fluid IM 11 and IM 34, coupled to Sepharose 4B, were used as immunoadsorbents for brush border membrane proteins solubilized with digitonin, with or without a preceding deoxycholate extraction. When immunaffinity columns to which solubilised brush border proteins had been bound were eluted with 10 mM D-glucose or 15 μM phlorizin certain polypeptides were specifically released. Eluates analyzed with SDS/polyacrylamide gels showed enrichment of a polypeptide, or a homogenous polypeptide band, with a molecular mass of 72 kDa.

There is evidence that this polypeptide of $M_r=72$ kDa might be the Na^+ -D-glucose carrier because it interacts with monoclonal antibodies selected against the transport system and it elutes from the affinity column with moderate concentrations of D-glucose or phlorizin. Similar elutions from control mouse IgG columns did not enrich this polypeptide.

Two immunaffinity purified monoclonal antibodies (IM 34, IM 24) selected against the Na^+ -D-glucose cotransport system inhibited D-mannose uptake into erythrocytes. Monoclonal antibodies raised against the Na^+ -D-glucose cotransport system in small intestine crossreacted with the sugar binding site of this monosaccharide transport protein in erythrocytes.

Five monoclonal antibodies selected against the band 4.5 polypeptide of erythrocytes in culture media inhibited Na^+ -dependent phlorizin binding to brush border membrane vesicles. Monoclonal antibodies raised against the sugar transport protein of erythrocytes crossreacted with the Na^+ -D-glucose cotransport system of small intestine. It is proposed that the sugar binding sites of the two different D-glucose transport systems have a common epitope.