AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MOLEKULARE UND ZELLULÄRE ANATOMIE
PROF. DR. RALPH WITZGALL
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

# Entwicklung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor 1 beta

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
**Daniel Heudobler**

**2011**

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MOLEKULARE UND ZELLULÄRE ANATOMIE
PROF. DR. RALPH WITZGALL
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

# Entwicklung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor 1 beta

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
**Daniel Heudobler**

**2011**

| | |
|---|---|
| Dekan: | Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber |
| 1. Berichterstatter: | PD. Dr. rer. nat. Anne Rascle |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. rer. nat. Edward Geissler |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 27. Juli 2011 |

*Meiner Familie*
*In Liebe und Dankbarkeit*

**Inhaltsverzeichnis:**

**1. Einleitung ..... 1**

1.1 Die Niere (Ren) ..... 1
1.1.1 Der glomeruläre Filter ..... 1
1.1.2 Podozyten ..... 3
1.2 Das Nagel-Patella-Syndrom ..... 5
1.3 Der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor LMX1B ..... 6
1.4 Das humorale Immunsystem: Antikörper ..... 11
1.4.1 Struktur, Vielfalt und Funktion von Antikörpern ..... 12
1.4.2 Monoklonale Antikörper ..... 15
1.5 Zielsetzung der Arbeit ..... 18

**2. Material und Methoden ..... 20**

2.1 Material ..... 20
2.1.1 Chemikalien, Medien und Reagenzien ..... 20
2.1.2 Enzyme ..... 23
A. Restriktionsendonukleasen ..... 23
B. DNA- und RNA-modifizierende Enzyme ..... 23
C. Proteinasen ..... 23
2.1.3 Kits ..... 24
2.1.4 Verbrauchsmaterial ..... 24
2.1.5 Geräte und Instrumente ..... 25
2.1.6 Antikörper ..... 28
2.1.7 Oligonukleotide für die Polymerase-Ketten-Reaktion ..... 30
2.1.8 Plasmide ..... 30
2.1.9 Bakterienstämme ..... 31
2.1.10 Säugerzelllinien ..... 32
2.1.11 Medien, Lösungen und Puffer ..... 32
A. Arbeiten mit Bakterien ..... 33
B. Arbeiten mit Tieren ..... 34
C. Arbeiten mit Säuger-Zelllinien ..... 34
D. Arbeiten mit DNA ..... 37
E. Arbeiten mit Proteinen ..... 38
2.2 Methoden ..... 43
2.2.1 Arbeiten mit Bakterien ..... 43
A. Anzucht von Bakterien ..... 43
B. Messung der optischen Dichte ..... 43
C. Herstellung von kompetenten Zellen ..... 44
D. Transformation von Bakterien ..... 44
E. Produktion von Proteinen in *E. coli* ..... 44
2.2.2 Arbeiten mit Tieren ..... 47
A. Immunisierung von Mäusen mittels subkutaner oder intraperitonealer Injektionen ..... 47
B. Blutentnahme ..... 48
C. Bestimmung der Antikörpertiter im Serum mittels ELISA ..... 48
D. Präparation von Nierenglomeruli ..... 49
2.2.3 Arbeiten mit Säuger-Zelllinien ..... 50
A. Kultivierung von Säuger-Zellen ..... 50

B. Primäre Zellkultur: Isolierung peritonealer Makrophagen ..... 51
C. Primäre Zellkultur: Isolierung von Milz-Lymphozyten und Fusion mit Myelomzellen (Protokoll A) ..... 52
D. Primäre Zellkultur: Isolierung von Milz-Lymphozyten und Fusion mit Myelomzellen (Alternativprotokoll B) ..... 53
E. Passagieren von Zellen ..... 54
F. Kultur von Hybridomzellen: Von der Fusion bis zu den endgültigen Kulturbedingungen ..... 55
G. Zählen von Zellen ..... 57
H. Einfrieren und Auftauen von Zellen ..... 57
I. Transiente Transfektion von Zellen ..... 58
J. Ernte von Säuger-Zellen und Herstellung von Zelllysat ..... 59
K. Immunzytochemie ..... 59
2.2.4 Arbeiten mit DNA ..... 60
A. Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* ..... 60
B. Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* ..... 61
C. Konzentrationsbestimmung von DNA ..... 62
D. Phenolisierung von DNA ..... 62
E. Ethanol-Präzipitation von DNA ..... 62
F. Agarose-Gele ..... 63
G. Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen mittels „DNA Extraction Kit“ (Fermentas) ..... 63
H. Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen mittels Elutip-Säulen ..... 64
I. Verwendung von alkalischer Phosphatase (CIP) zur Dephosphorylierung von DNA ..... 64
J. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen ..... 65
K. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ..... 65
L. Ligation ..... 66
M. Sequenzierung ..... 67
2.2.5 Arbeiten mit Proteinen ..... 67
A. Bestimmung der Proteinkonzentration ..... 67
B. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) ..... 68
C. Coomassie Brilliant Blue-Färbung von SDS-Polacrylamidgelen ..... 69
D. Immundetektion von Proteinen (Western-Blot) ..... 69
E. Immunpräzipitation von Proteinen ..... 71
F. Immunpräzipitation von Proteinen unter Chromatin-Immunpräzipitationsbedingungen zum Test von Antikörpern ..... 73
G. Aufreinigung von Proteinen über Nickel-Säulen ..... 73
H. Aufreinigung von Antikörpern mit Protein A Sepharose-Säulen ..... 74
I. Dialyse von Proteinlösungen ..... 75
J. Abspaltung von Epitopen mittels Endoproteasen ..... 75

**3. Ergebnisse ..... 76**

3.1 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen LMX1B ..... 76
3.1.1 Konstrukte ..... 76
3.1.2 Produktion und Aufreinigung der Proteinprodukte von pET16b/hLMX1B (1-53) und pET16b/hLMX1B (322-395) ..... 78
A. hLMX1B (1-53) ..... 78
B. hLMX1B (322-395) ..... 83
3.1.3 Immunisierung von Mäusen und Serum-Antikörpertiterbestimmung (ELISA) ..... 86

A. Immunisierung ..... 86
B. Auswahl des Tieres mit der besten Immunantwort ..... 86
3.1.4 Herstellung von Hybridomzellen ..... 93
A. Vergleich unterschiedlicher Fusionsprotokolle ..... 93
B. Fusion ..... 95
C. Screening des Zellkulturüberstandes der Hybridomzellen (ELISA) ..... 95
3.2 Auswahl der besten Hybridomzelklone für die Subklonierung ..... 99
3.2.1 ELISA ..... 99
3.2.2 Klonierung von p3M/hLMX1B complete ..... 103
3.2.3 Western-Blot ..... 105
A. Hybridomzellklone aus Maus 422 [gerichtet gegen hLMX1B (1-53)] ..... 105
B. Hybridomzellklone aus Maus 193 [gerichtet gegen hLMX1B (322-395)] ..... 107
3.2.4 Immunpräzipitation ..... 108
A. Hybridomzellklone aus Maus 422 [gerichtet gegen hLMX1B (1-53)] ..... 108
B. Hybridomzellklone aus Maus 193 [gerichtet gegen hLMX1B (322-395)] ..... 110
3.3 Subklonierung der Hybridomzellen und endgültige Charakterisierung der monoklonalen Antiköper gegen LMX1B ..... 112
3.3.1 Subklonierung der ausgewählten Zellklone ..... 112
3.3.2 Endgültige Charakterisierung der monoklonalen Antiköper gegen LMX1B 114
A. ELISA ..... 114
B. Western-Blot ..... 115
C. Immunpräzipitation ..... 116
D. Immunzytochemie ..... 119
3.4 Detektion von endogenem LMX1B-Protein und Charakterisierung von LMX1B-Interaktionspartnern in Podozyten mit Hilfe der hergestellten monoklonalen Antikörper 123
3.4.1 Detektion von endogenem Lmx1b in Zelllysat aus murinen Podozytenzellen (mPCL) mittels Western-Blot ..... 123
A. Aufreinigung von Zellkulturüberstand von Klon 193-67 mittels Protein A-Sepharose-Säulen ..... 124
3.4.2 Detektion von endogenem Lmx1b in Zelllysat aus murinen Podozytenzellen (mPCL) mittels Immunpräzipitation ..... 125
3.4.3 Interaktion von LMX1B und LDB1 ..... 127
A. Murine Podozytenzelllinie (mPCL) ..... 127
B. Transient transfizierte COS-7-Zellen ..... 128
C. Gomeruli aus der Maus ..... 129
D. Glomeruli aus der Ratte ..... 130

**4. Diskussion ..... 133**

4.1 Herstellung von Antikörpern gegen LMX1B ..... 134
4.1.1 Polyklonal versus monoklonal ..... 134
4.1.2 Probleme bei der Produktion von hLMX1B (1-53) und hLMX1B (322-395) ..... 135
4.1.3 Prä-Fusions-Phase: Immunisierung, Etablierung einer Screening-Methode und Immunantwort der immunisierten Mäuse ..... 137
4.1.4 Optimierung der Fusions- und Zellkulturbedingungen ..... 140
4.1.5 Fusion, Screening und Subklonierung ..... 142
4.2 Charakteristika der hergestellten Antikörper ..... 145
4.2.1 Art der Epitope ..... 145
4.2.2 Ausblick ..... 147
4.3 Nachweis von endogenem LMX1B und Charakterisierung von möglichen Interaktionspartnern ..... 148

4.3.1 Nachweis von endogenem LMX1B ..... 148
4.3.2 Interaktion Lmx1b und Ldb1 ..... 150
4.4 Ausblick ..... 152

**5. Zusammenfassung ..... 154**

**6. Abkürzungsverzeichnis ..... 157**

**7. Literaturverzeichnis ..... 161**

**8. Veröffentlichungen ..... 173**
8.1 Originalarbeiten ..... 173
8.2 Posterbeiträge ..... 173

**9. Lebenslauf ..... 174**

**10. Eidesstattliche Erklärung ..... 175**

**11. Danksagung ..... 176**

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Niere (Ren)

Bei den Nieren handelt es sich um paarige, beiderseits der Wirbelsäule im Retroperitonealraum gelegene Organe, die eine exkretorische und endokrine Funktion ausüben. Im Längsschnitt lässt sich bereits mit bloßem Auge die dunkel gefärbte Nierenrinde (Cortex renalis) vom Nierenmark (Medulla renalis) unterscheiden; medial umgreifen Rinde und Mark den Sinus renalis, welcher Nierenkelche, das Nierenbecken, Fettgewebe und Blutgefäße enthält.
Die strukturelle und funktionelle Grundeinheit der Niere bildet das Nephron. Dieses ist in der Nierenrinde gelegen und setzt sich aus Nierenkörperchen (Corpusculum renale, Malpighi-Körperchen) und dem daran anschließenden, unverzweigten Nierenröhrchen (Nierentubulus), welches in ein Sammelrohr mündet, zusammen. Der Mensch besitzt pro Niere 1 bis 1,2 Millionen Nephrone.
Am Beginn eines jeden Nephrons befindet sich ein Nierenkörperchen bestehend aus der Bowmanschen Kapsel und einem Gefäßknäuel, das sich in diese einstülpt, dem Glomerulus. Hierdurch wird die Kapsel in ein viszerales und ein parietales Blatt gegliedert. Das parietale Blatt bestehend aus einschichtigem Plattenepithel, das nach außen durch eine Basalmembran unterlagert wird, bildet die äußere Begrenzung der Nierenkörperchen. Am Gefäßpol, der Ein- bzw. Austrittsstelle der afferenten bzw. efferenten Arteriole, geht das parietale Epithel der Bowmanschen Kapsel in das viszerale Epithel, die Podozyten (siehe 1.1.2) über und aus der parietalen Basalmembran entwickelt sich die glomeruläre Basalmembran (GBM). Zwischen beiden Blättern befindet sich der Kapselraum, der das im Nierenkörperchen erzeugte Ultrafiltrat (Primärharn) aufnimmt und am Harnpol in das Tubuluslumen übergeht (Übersicht zum Aufbau der Niere in Benninghoff & Drenckhahn, 2008 und Welsch, 2003).

### 1.1.1 Der glomeruläre Filter

Durch den Aufbau des Nephrons wird auch die Zusammensetzung der glomerulären Filtrationsbarriere vorgegeben. Diese gliedert sich traditionell in drei Schichten: das

fenestrierte Endothel der Blutkapillaren, die glomeruläre Basalmembran (GBM) und die Podozyten. Als zusätzliche Komponenten werden aktuell die endotheliale Oberflächenschicht und der Sub-Podozyten-Raum diskutiert (Salmon et al., 2009). Die glomeruläre Filtrationsbarriere ist die wohl komplexeste biologische Membran. Sie vereint scheinbar paradoxe Eigenschaften wie hohe Wasserdurchlässigkeit bei nahezu fehlender Filtration von Albumin und hochmolekularen Proteinen. So produzieren die menschlichen Nieren nahezu 180 Liter Primärharn pro Tag bei einem Kapillardruck, der den Druck in jedem anderen Organ übersteigt, wobei die Albuminkonzentration im Ultrafiltrat nur 0,06% der Plasma-Albumin-Konzentration beträgt (Haraldsson et al., 2008; Jarad & Miner, 2009). Die Frage, wie diese grandiose Leistung von der glomerulären Filtrationsbarriere erbracht werden kann, ist immer noch Gegenstand intensiver Forschung.

Der Beitrag der Endothelzellen des Glomerulus bei der Filtration ist aktuell noch wenig verstanden. Bei den Endothelzellen handelt es sich um nach allen Seiten flach ausgezogene Zellen mit einer Höhe von nur 50 bis 150 nm, die einen in sich geschlossenen Kapillarschlauch bilden (Haraldsson et al., 2008). Während die meisten Kapillaren im Körper über ein kontinuierliches Endothel verfügen, enthalten die ausgewalzten, dünnen Anteile des glomerulären Endothels in regelmäßiger Anordnung Fenestrierungen (50 bis 100 nm im Durchmesser), die kein Diaphragma besitzen und deren Anteil an der Gesamtoberfläche der Endothelzellen bei 20 bis 50% liegt (Bulger et al., 1983). Die Tatsache, dass Albumin mit einem Durchmesser von nur 3,6 nm problemlos die Fenestrierungen des Endothels passieren könnte, aber dennoch vom glomerulären Filter zurückgehalten wird, zeigt, dass in irgendeiner Form eine zusätzliche, filtrierende Struktur vorhanden sein muss. In diesem Zusammenhang wird die Bedeutung der endothelialen Oberflächenschicht diskutiert, einem kohlenhydrat-reichen Netzwerk, das der luminalen Zellmembran der Endothelzellen aufgelagert ist und auch die Fenestrierungen überbrückt (Salmon et al., 2009; Rostgaard & Qvortrup, 1997; Jeansson & Haraldsson, 2003). Für die Entwicklung und Differenzierung der Endothelzellen ist der von Podozyten sezernierte „vascular epidermal growth factor“ (VEGF) entscheidend (Gerber et al., 1999; Kitamoto et al., 1997).

Direkt an die Endothelzellen schließt sich die glomeruläre Basalmembran an, eine extrazelluläre Matrix von 240 bis 370 nm Dicke , die auch als Skelettgerüst des Glomerulus angesehen werden kann (Haraldsson et al., 2008; Tryggvason et al., 2006). Sie besteht aus Kollagen Typ IV (Kollagen α3-, α4- und α5-Ketten) (Miner & Sanes, 1994; Sanes et al.,

1990), Laminin (hauptsächlich Laminin 11) (Noakes et al., 1995), Nidogen/Entactin (Katz et al., 1991) sowie Proteoglykanen (Groffen et al., 1997). Obwohl Mutationen im Kollagen IV-Netzwerk der GBM Erkrankungen wie z.B. das Alport-Syndrom auslösen (Barker et al., 1990), wird die funktionelle Wichtigkeit der glomerulären Basalmembran kontrovers diskutiert. Lange Zeit wurde sie für das Hauptelement der Filtrationsbarriere gehalten (Batsford et al., 1987; Caulfield & Farquhar, 1974; Ghitescu et al., 1992). Dann zeigten allerdings in-vitro-Studien an isolierten GBMs, dass zusätzliche Komponenten von Nöten sind, um die selektive Permeabilität des Filters aufrechtzuerhalten (Bertolatus & Klinzman, 1991; Daniels et al., 1992). Dennoch wird der hydraulische, für die Größe des Wassertransfers entscheidende Widerstand, in großem Maße von der glomerulären Basalmembran bestimmt (Deen et al., 2001). In neuen Studien konnte überdies gezeigt werden, dass Laminin β2-defiziente Patienten ein kongenitales, nephrotisches Syndrom entwickeln, was ebenfalls die Wichtigkeit der GBM unterstreicht (Zenker et al., 2004).

### 1.1.2 Podozyten

Im Gegensatz zu den Endothelzellen und der glomerulären Basalmembran, deren Beitrag zur Ultrafiltration noch umstritten ist, gilt die fundamentale Wichtigkeit der Podozyten für den glomerulären Filter als bewiesen.

Podozyten sind hochdifferenzierte, epitheliale Zellen (viszerales Blatt der Bowmanschen Kapsel), die sich von Tubulusepithelien der S-förmigen Nephronanlage herleiten. Nach Abschluss der Ontogenese verlieren sie ihre mitotische Aktivität, weshalb sich ihre Adaptionsfähigkeit auf eine Zellhypertrophie beschränkt. Podozyten bestehen aus einem voluminösen Zellkörper, der in den mit Primärharn gefüllten Kapselraum hineinragt. Vom Zellkörper aus ziehen kräftige Primärfortsätze zur glomerulären Basalmembran, die die Kapillaren umgibt. Dort spalten sich die Primärfortsätze in Sekundärfortsätze (Fußfortsätze) auf, die sich in regelmäßiger Anordnung mit den Fußfortsätzen eines anderen Podozyten verzahnen, wobei sie mäandrierende Spalten von 30 bis 40 nm Breite und 300 bis 500 nm Tiefe offen lassen. Diese „Filtrationsschlitze“ werden von einer 4 nm dicken extrazellulären Membran mit 2 bis 5 nm weiten Poren, der Schlitzmembran, überbrückt. Ultrastrukturell ähnelt diese einer Adhäsionsjunktion. Sowohl die luminale Zellmembran der Podozyten als auch die Schlitzmembran werden von einer negativ geladenen Glykokalyx überzogen, die im

Wesentlichen aus dem Sialinsäure-reichen Glykoprotein Podocalyxin besteht. Die negative Ladung der Glykokalyx und die Schlitzmembran (mit ihren Poren) sind neben anderen Strukturen für die Ladungs- und Größenselektivität des glomerulären Filters verantwortlich. (Übersicht in Benninghoff & Drenckhahn, 2008 und Pävenstadt et al., 2003).

Als wichtige Proteine, die am Aufbau der Schlitzmembran beteiligt sind, sind Nephrin, Podocin, Zonula Occludens 1 (ZO-1), CD2AP, FAT1, neph1-3, densin-180 und P-Cadherin zu nennen (Huber & Benzing, 2005). Die Entdeckung von Nephrin, einem Transmembran-Adhäsions-Protein aus der Immunglobulin–Superfamilie, das durch das Gen *NPHS1* kodiert wird, welches beim kongenitalen, nephrotischen Syndrom vom Finnischen Typ mutiert ist, gilt hierbei als Meilenstein in der Podozytenforschung (Kestilä et al., 1998). Ein Mangel an Nephrin führt zum Verlust der Schlitzmembranen, dysmorphen Fußfortsätzen und massiver Proteinurie noch in utero (Putaala et al., 2001).
Podocin, ein Mitglied der Stomatin-Protein-Familie, das ausschließlich in Podozyten sich entwickelnder oder reifer Glomeruli exprimiert wird, interagiert mit Nephrin und verbessert so dessen Signaltransduktion (Huber et al., 2001). Mutationen im Gen für Podocin, *NPHS2*, führen zum autosomal-rezessiv vererbten, Steroid-resistenten nephrotischen Syndrom (Boute et al., 2000), das sich bereits in frühester Kindheit manifestiert und rasch zum Nierenversagen führt.

Obwohl es aktuell bereits eine Fülle an Informationen über in Podozyten produzierte Strukturproteine gibt, ist über die Transkriptionsfaktoren, die deren Produktion regulieren, nur sehr wenig bekannt (Rascle et al., 2007). Transkriptionsfaktoren, die nachweislich eine wichtige Rolle in Podozyten spielen, sind WT1 (Mundlos et al., 1993; Grubb et al., 1994), FOXC2 (Mfh2) (Takemoto et al., 2006), MafB (Maf-1, Kreisler) (Sadl et al., 2002), und LMX1B (siehe 1.3). Beispielhaft wird hier nur kurz über WT1 berichtet.

Bei WT1 handelt es sich ein Tumorsuppressorprotein aus der Familie der $Cys_2His_2$-Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren. Mutationen im für WT1 kodierenden Gen lösen neben dem Wilm's Tumor (Nephroblastom), der für *WT1* (Wilm's Tumor Gen 1) namensgebend war, auch folgende Nierenerkrankungen aus: das Denys-Drash Syndrom (Pelletier et al., 1991), das WAGR Syndrom (ein Akronym für Wilm's Tumor, Aniridie, urogenitale Fehlbildungen und mentale Retardierung) (Ton et al., 1991) und das Frasier-Syndrom (Barbaux et al., 1997). Bemerkenswerter Weise bindet WT1 auch an Sequenzen in den

Promotor-Regionen von *Podxl* (kodiert für Podocalyxin) (Palmer et al., 2001) und *NPHS1/Nphs1* (kodiert für Nephrin) (Guo et al., 2004; Wagner et al., 2004).

## 1.2 Das Nagel-Patella-Syndrom

Beim Nagel-Patella-Syndrom (NPS; OMIM 161200) handelt es sich um eine seltene autosomal dominant vererbte Erkrankung, die weltweit mit einer Inzidenz von 1 auf 50000 Lebendgeburten auftritt (Bongers et al., 2002). NPS wird ebenfalls als Österreicher-Syndrom (Österreicher W, 1930), Turner-Syndrom (Turner, 1933), Turner-Kieser-Syndrom (Kieser, 1939; Turner, 1933), Athrodysplasie (Turner, 1933), Touraine-Syndrom (Touraine, 1943), Fong-Krankheit (Fong, 1946) oder auch „Hereditäre Osteo-Onycho-Dysplasie“ (HOOD) bezeichnet (Roekerath, 1951).

Pathognomonisch und auch namensgebend für NPS ist das Auftreten von hypo- bzw. dysplastischen Finger- und seltener Zehennägeln gemeinsam mit hypoplastischen bzw. fehlenden Kniescheiben (Bongers et al., 2002). Daneben finden sich bei NPS-Patienten meist weitere Fehlbildungen des Skelettsystems, wobei Knochen, Sehnen, Bänder und Muskeln betroffen sein können. Malformationen des Ellbogens wie Hypoplasie des Radiusköpfchens und des lateralen Epicondylus humeri, die mit einer posterioren Luxation des Radiusköpfchens einhergehen, und das Auftreten von sog. Beckenhörnern, symmetrischen Exostosen im Bereich des Darmbeines, sind hierbei besonders typisch. Klumpfüße, Veränderungen der Wirbelsäule oder Deformitäten diverser anderer Gelenke bis hin zur Maximalvariante, der Arthrogryposis multiplex congenita, treten deutlich seltener auf. Zusätzlich zu den skeletalen Abnormitäten sind häufig auch andere Körpersysteme wie das Auge (primäres Offenwinkelglaukom, okuläre Hypertension), der Gastrointestinaltrakt, das Nervensystem oder die Vasomotorik betroffen (Übersicht bei Sweeney et al., 2003). Insgesamt ist die klinische Manifestation des Nagel-Patella-Syndroms allerdings - sowohl was die Häufigkeit als auch was die Schwere anbelangt – sehr unterschiedlich und es besteht eine inter- und intra-familiäre Variabilität (McIntosh et al., 2005; Turner JW, 1933).

Prognosebestimmend für NPS-Patienten ist die mögliche Beteiligung der Nieren, wie sie bei 12 bis 55% der Patienten auftritt (Sweeney et al., 2003). Als erstes Zeichen einer Nierenbeteiligung tritt zumeist eine Proteinurie mit oder ohne Hämaturie auf (Gubler et al.,

1980). Diese Proteinurie kann bereits von Geburt an bestehen oder sich in jedem Alter entwickeln. Eine spontane Rückbildung der Symptome ist möglich (Daniel et al., 1980; Similä et al., 1970), es kann aber auch zur Entwicklung eines nephrotischen Syndroms und bei bis zu 15% der Patienten zum terminalen Nierenversagen kommen (Sweeney et al., 2003; Sood et al., 2009). Über die Faktoren, die das Fortschreiten der Erkrankung beeinflussen, ist aktuell noch wenig bekannt.

Als morphologisches Korrelat der Erkrankung konnten ultrastrukturelle Veränderungen des Glomerulus gefunden werden. Sie beinhalten eine irregulär verdickte glomeruläre Basalmembran mit fribrillären Einschlüssen und aufgehellten Arealen, die „mottenfraßartig" erscheinen (Ben Bassat et al., 1971; Del Pozo & Lapp, 1970). Zusätzlich konnte ein Verlust podozytärer Fußfortsätze beobachtet werden (Chen et al., 1998). Derartige Schäden im glomerulären Filter erhöhen natürlich stark dessen Durchlässigkeit und führen konsekutiv zu Proteinurie.

Obwohl NPS eine der ersten Erbkrankheiten war, bei der eine genetische Kopplung an die Loci für das ABO-Blutgruppen-System (Renwick & Lawler, 1955) und das Adenylatkinase 1-Gen (Schleutermann et al., 1969) etabliert werden konnte, dauerte die Eingrenzung des NPS-Gens auf einen 1 cM Bereich auf Chromosom 9q34.1 über 40 Jahre (McIntosh et al., 1997; Eyaid et al., 1998; Iannotti et al., 1997). Frappierende Ähnlichkeiten zwischen den Skelett- und Nierenveränderungen von NPS-Patienten und *Lmx1b*$^{-/-}$-Mäusen und die Bestimmung der genauen Lokalisation von *LMX1B* auf Chromosom 9q34 führten dann zur Entdeckung von ersten Mutationen des *LMX1B*-Gens in NPS-Patienten (Dreyer et al., 1998; McIntosh et al., 1998). Aktuell sind über 130 verschiedene Mutationen bekannt (Dunston et al., 2004).

## 1.3 Der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor LMX1B

LMX1B ist ein Mitglied der Familie der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren, die in Vertebraten eine fundamentale Rolle für die Formation dorsoventraler Muster und die Morphogenese der Niere während der Entwicklung spielen (Bongers et al., 2002). Das Protein besteht aus 395 bzw. 402 Aminosäuren (je nach Isoform) und besitzt $NH_2$-terminal zwei proteinbindende LIM-Domänen (LIM1 mit 51 Aminosäuren und LIM2 mit 54 Aminosäuren) und darauf folgend eine DNA-bindende Homöodomäne (mit 60 Aminosäuren) (Dunston et

al., 2004). COOH-terminal der Homöodomäne befindet sich eine glutamin- und serinreiche mutmaßliche Transaktivierungsdomäne.

Das Akronym LIM leitet sich von den Anfangsbuchstaben der ersten drei Proteine, in denen LIM-Domänen identifiziert wurden ab: Lin-11 aus *C. elegans* (Freyd et al., 1990), Isl-1 aus der Ratte (Karlsson et al., 1990) und Mec-3 wiederum aus *C. elegans* (Way & Chalfie, 1988). Eine LIM-Domäne besteht aus zwei Zinkfinger-ähnlichen Modulen und hat folgende cysteinreiche Konsensus-Sequenz Cys-$X_2$-Cys-$X_{16-23}$-His-$X_2$-Cys-$X_2$-Cys-$X_2$-Cys-$X_{16-21}$-Cys-$X_2$-Cys/His/Asp (Freyd et al., 1990), welche für die Bindung von Zink-Ionen von großer Wichtigkeit ist (Michelsen et al., 1993). LIM-Domänen treten allein oder auch in Kombination mit anderen Protein-Domänen wie Homöodomänen auf (z.B. bei LMX1B), wobei die LIM-Homöodomäne-Proteine zwei LIM-Domänen (LIM A und LIM B) besitzen, von denen angenommen wird, dass sie durch Verdoppelung einer LIM-Domäne entstanden sind (Dawid et al., 1995; Curtiss & Heilig, 1998).
Obwohl LIM-Domänen klassischen Zinkfingern sehr ähneln, scheinen sie DNA nicht binden zu können und vielmehr an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt zu sein (Dawid et al., 1995). Dies ermöglicht eine Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren mit Co-Faktoren, die einen aktivierenden (Co-Aktivator) oder inhibierenden (Co-Repressor) Effekt auf die Transkriptionsregulation ausüben können (Rétaux & Bachy, 2002). Für LMX1B sind zwei derartige Interaktionspartner beschrieben LDB1 (Marini et al., 2003) und E47, ein Produkt des *E2A*-Gens (Johnson et al., 1997).

Das LIM-Domäne-Binde-Protein 1 (LDB1, auch CLIM2 oder NLI genannt), ein nukleäres Adaptorprotein wurde entdeckt auf Grund seiner Fähigkeit LIM-Homöodomäne-Proteine (LIM-HD) bzw- LIM-only-Proteine (LMO) zu binden (Agulnick et al., 1996; Bach et al., 1997; Jurata et al., 1996; Visvader et al., 1997). LDB1 besitzt keinerlei enzymatische Aktivität oder Fähigkeit an Nukleinsäure zu binden (Matthews & Visvader, 2003). Obwohl LDB1 als transkriptionaler Aktivator von LIM-HD-Proteinen beschrieben worden ist (Bach et al., 1997) und mit LMX1A, einem mit LMX1B eng verwandten Protein, einen Komplex bildet, scheint es dessen transkriptionale Aktivität nicht zu steigern bzw. die Synergie zwischen LMX1A und E47 sogar zu blockieren (Jurata & Gill, 1997). Betrachtet man LMX1B, so wird die Rolle von LDB1 kontrovers diskutiert. Es wurden Hinweise gefunden, dass LDB1 zumindest an spezifischen Promotoren sogar in Abwesenheit von E47 einen inhibierenden Effekt auf LMX1B ausüben könnte (Dreyer et al., 2000). Im Kontrast dazu ist

die Entdeckung zu sehen, dass Ldb1 LIM-HD-Proteine mit Otx-Transkriptionsfaktoren verbindet und damit Gene aktiviert, die für die Embryogenese wichtig sind (Bach et al., 1997). Zusammenfassend kann also ausgehend von diesen in-vitro-Studien keine genaue Aussage über die Bedeutung der Interaktion von LMX1B und LDB1 in vivo gemacht werden. Des Weiteren wird es wohl nicht möglich sein, diese Frage allgemein zu beantworten; sie wird vielmehr für jedes einzelne Zielgen von LMX1B erneut beantwortet werden müssen.

Das Gen *E2A* kodiert für zwei helix-loop-helix-Transkriptionsfaktoren, die jeweils durch alternatives Splicing der HLH-Domäne entstehen. Beide Proteine gehören zu den sog. E-Proteinen, die an E-Boxen binden, unter deren Regulation die Genexpression in verschiedensten Zellen wie z.B. Lymphozyten, Muskelzellen und Neuronen steht (Übersicht in Slattery et al., 2008). Das Protein E47 übt überdies eine aktivierende Wirkung auf LMX1B (Dreyer et al., 2000; Johnson et al., 1997) und LMX1A (German et al., 1992; Jurata & Gill, 1997) aus. Wie oben beschrieben wird dieser Synergismus zwischen LMX1A und E47 durch LDB1 inhibiert, was wahrscheinlich daran liegt, dass E47 und LDB1 an denselben Bindungsstellen innerhalb von LMX1A konkurrieren.

Einen weiteren wichtigen Co-Faktor stellt RLIM („RING finger LIM-domain binding protein“) dar. RLIM inhibiert die funktionelle Aktivität von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren, indem es den Sin3A/Histondeacetylase-Komplex zu LIM-Domänen, die einen Transkriptionskomplex beinhalten, rekrutiert (Bach et al., 1999). Überdies besitzt RLIM Ubiquitin-Ligase-Aktivität und kann so LDB1 und andere LIM-HD-Proteine für den Abbau über den 26S-Proteasom-Weg markieren (Ostendorff et al., 2002). Ob RLIM auch auf LMX1B als Co-Repressor wirkt, konnte im Detail noch nicht gezeigt werden.

COOH-terminal der beiden LIM-Domänen befindet sich eine Homöodomäne (Dunston et al., 2004). Hierbei handelt es sich um eine hochkonservierte Proteindomäne mit einem die Bindung von DNA ermöglichenden helix-turn-helix-Motiv, die nach ihrer Entdeckung in den homöotischen Selektor-Genen von *Drosophila melanogaster* Homöodomäne genannt wurde (McGinnis et al., 1984; Scott & Weiner, 1984). Durch Röntgen-Kristallographie und NMR-Spektroskopie-Studien konnte gezeigt werden, dass eine Homöodomäne aus insgesamt drei α-Helices, die sich zu einer kompakten Struktur mit einem $NH_2$-terminalen Erweiterungsarm zusammenlagern, besteht (Banerjee-Basu & Baxevanis, 2001). Helix I und II liegen parallel zueinander, während Helix III, die auch Erkennungshelix genannt wird, senkrecht zu den

beiden ersteren liegt und an die große Furche der DNA bindet (Gehring et al., 1994). Ein zusätzlicher Kontakt zur DNA wird durch den $NH_2$-terminalen Erweiterungsarm hergestellt, indem dieser an die kleine Furche der DNA bindet. In „electrophoretic mobility shift assays" (EMSA) konnte gezeigt werden, dass die Homöodomäne von LMX1B an ein sog. FLAT-Element (TTAATAATCTAATTA) bindet (German et al., 1992; Dreyer et al., 1998; McIntosh et al., 1998). Typisch für die Homöodomänen von LIM-HD-Proteinen und damit auch für LMX1B ist die evolutionär konservierte Aminosäurensequenz Thr-Gly-Leu auf Position 38 bis 40 der Homöodomäne (Banerjee-Basu & Baxevanis, 2001).

Zur genaueren Aufklärung der Funktion von *LMX1B* wurden *Lmx1b*-Knockout-Mäuse generiert. Murines Lmx1b ist auf der Aminosäurenebene zu 99% identisch mit humanem LMX1B (Dreyer et al., 1998). Die *Lmx1b*-Knockout-Mäuse entwickeln einen Phänotyp, der dem Nagel-Patella-Syndrom sehr ähnelt (Chen et al., 1998), weshalb angenommen wurde, dass bei der Genese von NPS *LMX1B* mit involviert sein muss bzw. sogar eine entscheidende Rolle spielt. Einschränkend ist aber zu sagen, dass *Lmx1b*$^{+/-}$-Mäuse keinerlei Symptome zeigen, während hingegen NPS autosomal dominant vererbt wird. Daher mussten sämtliche Beobachtungen an *Lmx1b*$^{-/-}$-Mäusen gemacht werden, die innerhalb von 24 h nach Geburt versterben (Chen et al., 1998).
Was das Skelettsystem angeht, zeigen die *Lmx1b*-Knockout-Mäuse einen schwereren Phänotyp als NPS-Patienten; grundsätzlich spiegeln sich aber die Hauptcharakteristika von NPS wider. So fehlen bei den Mäusen ebenfalls Nägel und Kniescheiben und es sind Duplikaturen ventraler Strukturen vorhanden (Chen et al., 1998).
Ferner ergab eine genaue Analyse des Nierenphänotyps der Tiere große Parallelen zum Nagel-Patella-Syndrom. Es zeigte sich, dass sich die Podozyten der *Lmx1b*$^{-/-}$-Mäuse nur langsam entwickelten und keine Fußfortsätze bzw. Schlitzmembranen ausbildeten (Miner et al., 2002; Rohr et al., 2002). Zudem wurde bei den Tieren ein alteriertes Genexpressionsprofil in Podozyten gefunden: so waren Podocin (Miner et al., 2002; Rohr et al., 2002) und die α3- und α4-Ketten von Kollagen IV (Morello et al., 2001) nicht mehr nachweisbar. Diese Entdeckungen wurden dadurch erklärt, dass LMX1B an eine AT-reiche Sequenz im ersten Intron des *COL4A4*-Gens (Morello et al., 2001) und auch in der Promotorregion von *NPHS2* (Miner et al., 2002; Rohr et al., 2002) bindet. Somit scheinen beide Gene Zielgene von LMX1B zu sein, was zu deren fehlender Expression in *Lmx1b*-Knockout-Mäusen führen würde.

Im Gegensatz dazu konnten Podocin und die α3- und α4-Ketten von Kollagen IV in Nierenbiopsien von NPS-Patienten immunhistochemisch detektiert werden (Heidet et al., 2003). Die Gründe für diese widersprüchlichen Entdeckungen sind nicht auf den ersten Blick erkennbar, könnten aber in den großen Unterschieden zwischen beiden Systemen hinsichtlich des Entwicklungsstadiums, der Pathologie und der Anzahl der verbliebenen Wildtypallele liegen (McIntosh et al., 2005). Aus diesen Diskrepanzen wird aber klar, dass es neben den angeführten Studien auch biochemischer Methoden (z.B. der Chromatin-Immunpräzipitation) bedarf, um die genaue Funktion von LMX1B in Podozyten aufzuklären und mutmaßliche Zielgene zu bestätigen bzw. Neue zu finden.

Das *LMX1B*-Gen besteht aus insgesamt acht Exons, wobei Exon 2 und 3 für jeweils eine der beiden LIM-Domänen und die Exons 4 bis 6 für die Homöodomäne kodieren. Aus den acht Exons ergibt sich nach Transkription eine ca. 7 kbp große mRNA, wobei alternatives Splicing für die letzten 21 Nukleotide von Exon 7 beschrieben wurde (Seri et al., 1999), was zu zwei unterschiedlichen Isoformen mit 395 bzw. 402 Aminosäuren führt (Dunston et al., 2004). Ob zwischen diesen beiden Isoformen ein funktioneller Unterschied besteht, ist aktuell noch unklar.

In NPS-Patienten wurden bis dato über 130 Mutationen in der für LMX1B kodierenden Sequenz beschrieben, die sich größtenteils auf die LIM-Domänen und die Homöodomäne beschränken (Clough et al., 1999; Hamlington et al., 2001). Die funktionellen Konsequenzen dieser Mutationen sind teilweise dramatisch. So stören z.B. Missense-Mutationen in den LIM-Domänen die Zinkfinger-Struktur, wodurch sich wiederum kein stabiles Protein bilden kann (Bongers et al., 2002). Missense-Mutationen in der Homöodomäne können in unterschiedlichem Ausmaß die DNA-Bindung und damit die Aktivierung von Reporter-Genen durch LMX1B beeinflussen (Dreyer et al., 2000). Mutationen einzelner oder mehrerer Basenpaare in den Exons 1, 7 und 8 treten nur in verschwindend geringem Maß auf, während Deletionen eines Teils von *LMX1B* bzw. des kompletten Gens bis zu 5% aller NPS-Mutationen ausmachen.
Der pathogenetische Wirkmechanismus der Mutationen konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Ein dominant-negativer Effekt konnte durch die Co-Transfektion von Zellen mit Wild-Typ- bzw. mutierten Konstrukten von *LMX1B* nahezu ausgeschlossen werden (Dreyer et al., 2000). Am wahrscheinlichsten erscheint Haploinsuffizienz als Wirkmechanismus, da zwischen Missense-, Frameshift- und Nonsense-Mutationen oder Deletionen von Teilen bzw.

des gesamten Genes keine Unterschiede in der Schwere der NPS-Symptome festgestellt werden konnten (Clough et al., 1999; Dunston et al., 2004; McIntosh et al., 1998).

## 1.4 Das humorale Immunsystem: Antikörper

Beim Immunsystem handelt es sich um ein komplexes System aus Zellen und Faktoren, die den Organismus in die Lage versetzen, sich mit Infektionskrankheiten und anderen Fremdstrukturen auseinander setzen zu können. Hierbei unterscheidet man grundsätzlich nicht-adaptives (angeborenes) und adatives (erworbenes) Immunsystem.
Die angeborene Immunität ist eine allgemeine, nicht-spezifische Antwort auf körperfremde Moleküle, die Mechanismen wie Phagozytose (Makrophagen), Zelllyse (natürliche Killerzellen) und eine Menge an chemischen und physikalischen Faktoren einschließt. Der entscheidende Unterschied zwischen nicht-adaptivem und adaptivem Immunsystem liegt darin, dass sich das adaptive Immunsystem mit Hilfe spezifischer Moleküle an die wiederholte Exposition mit einem körperfremden Agens anpassen und dessen Eliminierung somit deutlich verbessern kann.
Grundsätzlich lässt sich das adaptive Immunsystem in zwei parallele, aber miteinander verflochtene Systeme gliedern: in die zelluläre und die humorale Immunantwort. Bei Ersterer attackieren und töten bestimmte Zellen, die man als zytotoxische T-Lymphozyten bezeichnet, Zellen mit fremden Strukturmotiven auf ihrer Oberfläche.
Bei der humoralen Immunantwort werden fremde Moleküle durch lösliche Proteine, die man Antikörper oder Immunglobuline nennt, erkannt und für das eigene Immunsystem als körperfremd markiert. Der Terminus „humorale Immunantwort“ leitet sich dabei von der alten Bezeichnung für Körperflüssigkeiten als humores und dem Vorkommen von Immunglobulinen in Selbigen ab. Produziert werden diese Antikörper durch Plasmazellen, einer spezialisierten Zellpopulation, die aus B-Lymphozyten hervorgeht, wobei ein B-Lymphozyt/eine Plasmazelle nur einen für die Zelle spezifischen Antikörper sezerniert. Körperfremde Makromoleküle, die spezifisch an einen Antikörper binden, werden als Antigene bezeichnet. Bei Immunogenen handelt es sich um körperfremde Moleküle die durch ihre Bindung eine Immunantwort auslösen. Ein Antikörper richtet sich stets nicht gegen das Makromolekül in toto, sondern nur gegen eine bestimmte Stelle, die als Epitop oder antigene Determinante bezeichnet wird. Handelt es sich bei dem Makromolekül z.B. um ein Protein, so besteht nur eine spezifische Affinität zwischen dem Antikörper und einem Teilbereich des

Proteins, der meist nur aus wenigen Aminosäuren besteht (Übersicht in Berg et al., 2003 und Janeway et al., 2009).

### 1.4.1 Struktur, Vielfalt und Funktion von Antikörpern

Bei Antikörpern handelt es sich um sehr große Moleküle, für deren genauere Analyse es zunächst nötig war, sie in Fragmente zu zerlegen. So lässt sich das Immunglobulin G (IgG) durch die proteolytische Wirkung von Papain in drei Fragmente mit einer ungefähren Größe von 50 kD spalten (Porter, 1959). Zwei dieser Fragmente binden das Antigen und werden daher als $F_{ab}$ (Antigenbindung) bezeichnet; das dritte Fragment, $F_c$ (crystalizable, der englische Ausdruck für kristallisierbar), bindet das Antigen nicht, führt jedoch zur Aktivierung von Effektorfunktionen wie z.B. dem Start der Komplementkaskade (Berg et al., 2003).

Ausgehend von diesen ersten Studien konnte die gesamte Raumstruktur von Antikörpern aufgeklärt werden, wobei im folgenden Abschnitt vereinfachend die Struktur von IgG (siehe auch Abbildung 1), dem häufigsten Immunglobulin im Blutserum, beschrieben wird. Das Antikörpermolekül besteht aus vier Polypeptidketten, zwei schweren (heavy) oder H-Ketten mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kD und zwei leichten (light) oder L-Ketten mit einem Molekulargewicht von 25 kD, wobei die H-Ketten untereinander über mindestens eine Disulfidbrücke verknüpft sind und jeweils eine L-Kette ebenfalls über Disulfidbrücken binden. Die H-Kette besitzt eine variable Region, $V_H$, die für die Antigenbindung verantwortlich ist, sowie drei konstante Regionen $C_{H1}$, $C_{H2}$ und $C_{H3}$. Ebenso verfügt die L-Kette über eine für die Antigenbindung wichtige variable Region $V_L$ und eine konstante Region $C_{L.}$ Nach Zusammenlagerung der beschriebenen Proteindomänen, nimmt das Antikörpermolekül eine Y-förmige Konformation ein, wobei der Stamm (entspricht $F_{c)}$ durch die COOH-terminalen Hälften der schweren Ketten und die beiden Arme, die den $F_{ab}$-Fragmenten entsprechen, durch $V_H$ und $V_L$ sowie durch Teile von $C_{H1}$ und $C_L$ gebildet werden. Stamm und Arme sind über ein bewegliches Stück der Polypeptidkette, die Gelenkregion/Scharnierregion (hinge), miteinander verknüpft, was eine gewisse Segmentflexibilität vermittelt und dadurch die Bindung von Antigenen erleichtert (Übersicht in Edelman, 1991; Porter, 1991; Janeway et al., 2009).

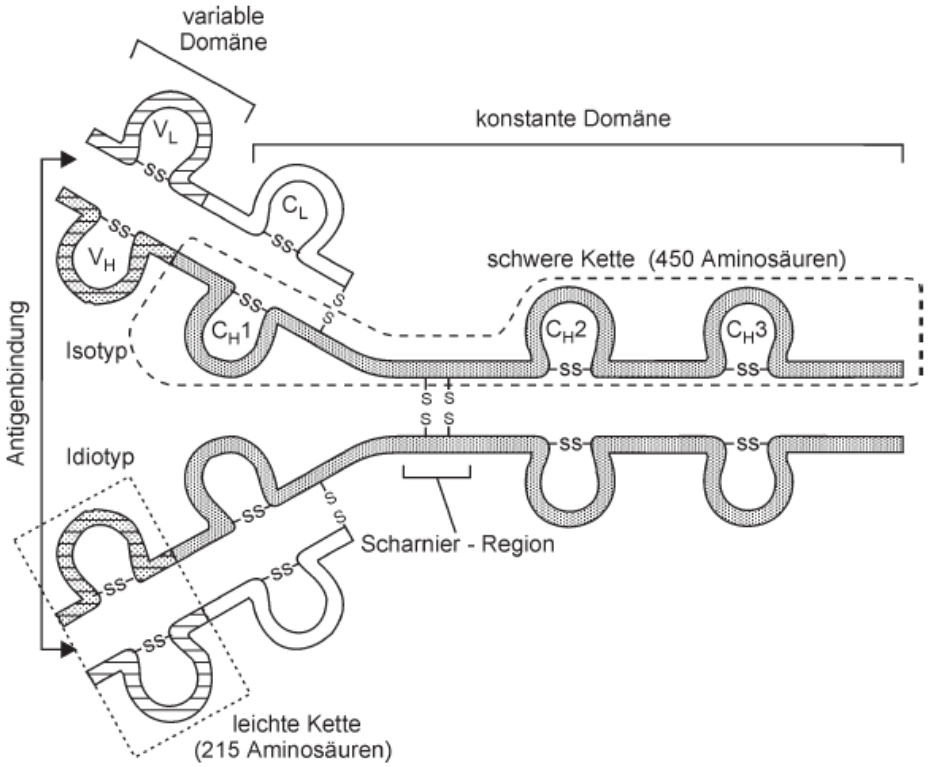



**Abbildung 1: Schematische Struktur des menschlichen IgG-Moleküls (Ferencík et al., 2006).**

Neben IgG gibt es noch vier weitere Immunglobulinklassen (A, D, E und M), wobei die Klasse und damit die Effektorfunktion eines Antikörpers durch seine schweren Ketten festgelegt werden. Die schweren Ketten von IgG bezeichnet man als γ-Ketten, diejenigen von IgA, IgD, IgE und IgM als α-, δ-, ε- bzw. μ-Ketten. Bei den L-Ketten unterscheidet man hingegen nur zwei Typen: κ- und λ-Ketten (Janeway et al., 2009).

Grundsätzlich unterscheiden sich die variablen Regionen eines Antikörpers von denen jedes anderen, wobei sich diese Sequenzvariabilität auf drei Regionen, die sog. hypervariablen Regionen konzentriert. Während die wenig variablen Gerüstregionen eines Antikörpers β-Faltblattstrukturen ausbilden, bilden die hypervariablen Regionen drei Schleifen am Rande der β-Faltblätter, wodurch ein hypervariabler Bereich an der Spitze eines jeden $F_{ab}$-Fragmentes entsteht, der als Antigenbindungsstelle dient. Da die drei hypervariablen Schleifen jeweils komplementär zur Oberflächenstruktur des Antigens sind, nennt man sie auch komplementäritätsbestimmende Regionen (CDR) (Berg et al., 2003; Janeway et al., 2009).

Die Anzahl an unterschiedlichen Antikörpern, die ein Mensch produzieren kann, wird auf mehr als $10^9$ geschätzt und übersteigt damit die Kodierungskapazität des menschlichen Genoms beträchtlich (Di Noia & Neuberger, 2007). Bei den Mechanismen, die zu einer derartigen Antikörpervielfalt führen, handelt es sich vielmehr um die kombinatorische Verknüpfung verschiedener Gene sowie somatische Hypermutationen (Tonegawa, 1983). Dieser Mechanismus sei kurz am Beispiel der Herstellung einer κ-Kette erläutert. In nicht-differenzierten B-Lymphozyten finden sich – wie in jeder anderen somatischen Zelle des Organismus – 40 sog. V-Gene (variabel), die für die ersten 97 Aminosäuren der V-Region verantwortlich sind; davon abgesetzt liegen fünf J-Gene (Joining = Verbindung), die für die restlichen 13 Aminosäuren der variablen Region kodieren, sowie ein C-Gen (constant), das die Information für den konstanten Teil beinhaltet (Berg et al., 2003). Während der Entwicklung eines funktionsfähigen B-Lymphozyten wird nun ein beliebiges V-Gen mit einem beliebigen J-Gen mit Hilfe der für Immunzellen spezifischen Enzyme RAG-1 und RAG-2 verknüpft (Bassing et al., 2002; Gellert, 2002), wobei die dazwischen liegenden Segmente entfernt werden. Durch RNA-Splicing werden die zwischen J- und C-Gen gelegenen DNA-Anschnitte eliminiert, wodurch ein mRNA-Molekül entsteht, das für eine vollständige L-Kette kodiert. Bei der genetischen Rekombination von schweren Ketten sind neben den V- und J-Genen auch sog. D-Gene (diversity = Vielfalt) beteiligt, was noch mehr Rekombinationsmöglichkeiten gestattet (Maizels, 2005). Die durch diese V(D)J-Rekombinationen erhaltene Vielfalt wird durch somatische Hypermutationen noch deutlich erhöht. So werden während eines sehr engen Zeitfensters in der B-Zell-Entwicklung einzelne Basen im V-Gen ausgetauscht (Di Noia & Neuberger, 2007), wobei die Mutationsrate im Vergleich zur spontanen Mutationsrate des somatischen Genoms ca. 1.000.000 Mal höher ist (Li et al., 2004).

Die fundamentale Wichtigkeit dieses Repertoires an hoch-spezifischen Antikörpern für die Immunantwort wird klar, wenn man einige Funktionen von Antikörpern betrachtet: So können hochaffine Antikörper bakterielle Toxine neutralisieren (Robbins & Robbins, 1986), die Infektiosität von Viren hemmen (Mandel, 1976; Possee et al., 1982) oder durch Bindung an C1q den klassischen Weg der Komplementaktivierung auslösen (Cooper, 1985). An die Oberfläche von Erregern gebundene Antikörper regen zudem Phagozyten (Karakawa et al., 1988) bzw. natürliche Killerzellen (Lanier et al., 1988) dazu an, diese Erreger zu zerstören.

### 1.4.2 Monoklonale Antikörper

Die Fähigkeit von Antikörpern hochspezifisch an Moleküle zu binden, machte man sich auch bereits sehr früh in der Wissenschaft zu Nutze. Tiere wurden mit Hilfe eines Antigens immunisiert und deren Serum anschließend für Experimente verwendet (Harlow & Lane, 1988). Auf diese Art und Weise gewonnene Antiseren weisen allerdings gewisse Nachteile auf: Sie sind polyklonal d.h. sie enthalten Immunglobuline tausender, unterschiedlicher B-Zell-Klone (Goding, 1980), von denen zumeist nur maximal 10% Antikörper gegen das gewünschte Antigen produzieren (Harlow & Lane, 1988). Die restlichen Antikörper sind gegen unspezifische Antigene gerichtet und sorgen bei Experimenten somit für nicht-gewünschte Interaktionen. Ein zweiter gravierender Nachteil von Antiseren besteht darin, dass sie sich nur in begrenzter Menge herstellen lassen (Harlow & Lane, 1988), was die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen deutlich einschränkt. Um diese Probleme zu lösen, musste eine Methode gefunden werden, mit der sich Antikörpermoleküle mit homogener Struktur und bekannter Spezifität in unbegrenzter Menge produzieren lassen.

Dies wurde 1975 durch Georges Köhler und César Milstein realisiert, indem sie eine Technik entwickelten, die es erlaubte, kurzlebige, Antikörper-sezernierende Plasmazellen, die aus der Milz einer zuvor immunisierten Maus gewonnen worden waren, mit murinen Myelomzellen (Zellen eines B-Zell-Tumors) zu fusionieren (Köhler & Milstein, 1975). Die auf diese Weise entstandenen Hybridomzellen vereinen die Eigenschaften beider Zelllinien: die Milzzellen liefern die Fähigkeit zur Antikörperproduktion und die Myelomzellen steuern die unbegrenzte Teilungsfähigkeit bei. Expandiert man eine einzelne Hybridomzelle in der Zellkultur, so erhält man eine klonale Zellpopulation, die große Mengen an homogenen Antikörpern, einen sog. monoklonalen Antikörper, sezerniert.

Da sich mit Hilfe dieser Methode monoklonale Antikörper nahezu jeder gewünschten Spezifität in theoretisch unbegrenzter Menge produzieren lassen, revolutionierte sie die Anwendung von Antikörpern und die Leistungsfähigkeit immunologischer Ansätze erhöhte sich drastisch (Melchers et al., 1978; Kennett, 1979; Secher & Burke, 1980; Staines & Lew, 1980). In den folgenden Jahren wurde die von Köhler und Milstein entwickelte Technik zunehmend verfeinert und mehrere, leicht unterschiedliche Strategien etabliert, die sich allerdings in ihren Grundzügen gleichen (Goding, 1980).

Primär mussten die am besten geeigneten Fusionspartner gefunden werden. Die ersten Myelomzelllinien wurden generiert, indem Balb/c-Mäusen Mineralöl intraperitoneal injiziert wurde (Potter, 1972), weshalb die erhaltenen Zelllinien auch als MOPC (mineral oil

plasmocytoma) bezeichnet wurden. Während die von Köhler und Milstein verwendete, von MOPC 21 abgeleitete Zelllinie P3-X63Ag8 noch fähig war eigene Immunglobuline zu sezernieren, was dazu führte, dass nach erfolgter Fusion die Hybridomzellen Antikörper von mehr als einer Spezifität produzierten, wurden später Zelllinien entwickelt, die die Fähigkeit der Antikörperproduktion gänzlich verloren hatten (Goding, 1980). Beispiele für diese Myelomzelllinien sind X63-Ag8.653 (Kearney et al., 1979) und Sp2/O-Ag14 (Shulman et al., 1978). Obwohl grundsätzlich Milzzellen verschiedener Spezies mit den Balb/c-Myelomzelllinien fusioniert werden konnten, zeigte sich ein dramatischer Anstieg der Anzahl an Hybridomzellen, wenn Zellen eng-verwandter Spezies verwendet wurden, so dass idealer Weise auch Balb/c-Mäuse für die Immunisierung und die konsekutive Isolierung von Milzzellen benutzt wurden (Harlow & Lane, 1988).

Um nun Milzzellen und Myelomzellen zu fusionieren, stehen zumindest theoretisch eine Reihe von Substanzen zur Verfügung, von denen sich Polyethylenglykol (PEG), das erstmals 1975 zur Fusion von Säugerzellen eingesetzt wurde (Pontecorvo, 1975), als Mittel der Wahl durchsetzte. Polyethylenglykol verschmilzt die Membranen benachbarter Myelom- und/oder Milzzellen, wobei eine Zelle mit mehreren Kernen entsteht. Dieses Heterokaryon löst sich erst bei der nächsten Mitose auf (Goding, 1980). Was die genauen Details anbelangt, gibt es allerdings sehr große Unterschiede zwischen den einzelnen Laboratorien (Galfre et al., 1977; Gefter et al., 1977; Oi et al., 1978).

Da selbst mit Hilfe des effizientesten Fusions-Protokolls nur ca. 1% der eingesetzten Zellen verschmolzen werden können, wovon wiederum nur 1 Zelle aus $10^5$ Zellen einen vitalen Hybridomzellklon bildet, verbleiben sehr viele unfusionierte Zellen in der Zellkultur (Harlow & Lane, 1988). Was die isolierten Milzzellen angeht, stellt dies kein Problem dar, weil diese unter normalen Zellkulturbedingungen weder teilungs- noch über einen längeren Zeitraum lebensfähig sind. Für die Eliminierung der an Zellkulturbedingungen adaptierten Myelomzellen bzw. Myelom-Myelom-Hybridome wurde 1964 durch Littlefield eine bis heute gebräuchliche Methode etabliert (Littlefield, 1964): Selektionsmedien, die Folsäure-Antagonisten wie Aminopterin oder Methotrexat enthalten, hemmen die de-novo-Nukleotidsynthese, indem sie das Enzym Dihydrofolat-Reduktase inhibieren. Als einziger Weg zur Nukleotidsynthese verbleibt dann der sog. „salvage pathway“, ein Stoffwechselweg, durch den Nukleotide mit Hilfe der Enzyme Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) und Thymidinkinase (TK) „recycelt“ werden können. Verwendet man nun HGPRT-defiziente Myelomzellen für die Fusion, können diese nur dann im Selektionsmedium überleben, wenn sie mit einer Milzzelle, die eine funktionelle

Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase enthält, fusionieren. Die DNA-Biosynthese von unfusionierten Myelomzellen bzw. Myelom-Myelom-Hybridomen hingegen kommt zum Erliegen und die Zellen sterben ab (Goding, 1980; Harlow & Lane, 1988).
Unter diesen Selektionsbedingungen entstehen innerhalb von 5 bis 15 Tagen nach Fusion makroskopisch sichtbare Kolonien von Hybridomzellen (Goding, 1980). Diejenigen Kolonien, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren, werden durch ein Screening identifiziert. Diesem Screening kommt eine Schlüsselrolle in der gesamten Hybridomproduktion zu. Da erfolgreiche Fusionen zwischen 200 und 20.000 Hybridomzellklone hervorbringen (Harlow & Lane, 1988), nimmt die Screeningprozedur sehr viel Zeit in Anspruch. Daher sollte die gewählte Methode sowohl zuverlässig, was die Identifikation von positiven Klonen anbelangt, als auch schnell durchführbar sein. Beide Kriterien werden vom sog. „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) (Engvall & Perlmann, 1971) sehr gut erfüllt, weshalb der ELISA aktuell auch die Technik der Wahl darstellt.
Nach der Identifikation von positiven Klonen sollten diese möglichst schnell subkloniert werden, was die Wahrscheinlichkeit, dass spezifische Klone durch Unspezifische „überwachsen“ werden minimiert (Goding, 1980).
Nach Durchführung der Subklonierung liegt eine klonale Zellpopulation vor, die nahezu unbegrenzte Mengen an homogenen Antikörpern der gewünschten Spezifität produziert. Das Ziel einen monoklonalen Antikörper zu entwickeln ist damit erreicht.

Neben ihrem Einsatz in der Forschung schienen monoklonale Antikörper auf Grund ihrer Fähigkeit, mit sehr hoher Spezifität an ein gewünschtes Molekül binden zu können, auch ideal für die gezielte Therapie von Erkrankungen geeignet zu sein. Eine große Einschränkung hierbei stellte allerdings die Tatsache dar, dass es sich bei den ersten monoklonalen Antikörpern um murine Moleküle handelte, die im Menschen auf Grund ihrer Herkunft eine Immunantwort auslösten (Chames et al., 2009). Um dieses Problem zu lösen, musste die Antikörpertechnologie enorm weiterentwickelt werden. So machten es verschiedene Neuerungen in der Molekularbiologie möglich die Gene eines IgG-Moleküls zu klonieren (Winter & Milstein, 1991), was zur Folge hatte, dass jeder gewünschte Antikörper rekombinant in eukaryontischen Zelllinien produziert werden konnte. Daneben wurden auch in-vitro-Selektionstechniken wie die „Phagen-Display-Methode“ entwickelt, mit deren Hilfe ausgehend von einer Bibliothek an V-Genen, die zuvor in Expressionsvektoren kloniert worden sind, schnell und effektiv Antikörper gegen nahezu jedes Antigen ausgewählt werden

können (McCafferty et al., 1990). Die Möglichkeit die DNA der ausgewählten Antikörper durch zufällige oder direkte Mutagenese nochmals zu verändern und damit deren Bindungseigenschaften gegenüber dem gewünschten Antigen zu optimieren, läutete schließlich ein neues Zeitalter in der Entwicklung von Antikörpern ein (Hoogenboom & Chames, 2000).

Da diese neuen Methoden ein hohes Maß an Automatisierung voraussetzen, bleiben sie kommerziellen Anbietern wie z.B. Pharmaunternehmen, die über diese Möglichkeiten verfügen, vorbehalten. In der Forschung stellt die durch Georges Köhler und César Milstein begründete, konventionelle Hybridomtechnik somit noch immer die Methode der Wahl dar.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mutationen im *LMX1B*-Gen führen zum sog. Nagel-Patella-Syndrom (Dreyer et al., 1998; McIntosh et al., 1998). Zur Aufklärung der Funktion von *LMX1B* wurden *Lmx1b*-Knockout-Mäuse generiert (Chen et al., 1998), die einen dem NPS sehr ähnlichen Phänotyp entwickeln. Diese tierexperimentellen Studien ergaben auch Hinweise für mögliche Zielgene bzw. Interaktionspartner von LMX1B, wobei die in *Lmx1b*-Knockout-Mäusen generierten Daten teilweise in Widerspruch zu den Beobachtungen bei NPS-Patienten stehen. Um nun die genaue Wirkungsweise von LMX1B näher zu ergründen, bedarf es weiterer biochemischer Experimente. Hierbei erscheinen immunologische Ansätze wie z.B. die Co-Immunpräzipitation bzw. Chromatin-Immunpräzipitation sehr hilfreich, wofür wiederum möglichst spezifische Antikörper gegen LMX1B benötigt werden.
Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, monoklonale Antikörper gegen den LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor LMX1B zu entwickeln und anschließend zu charakterisieren.
Hierzu war es zunächst nötig, geeignete immunogene Bereiche von LMX1B auszuwählen, gegen die die Antikörper generiert werden sollten. Anschließend sollten Expressionskonstrukte erstellt werden, mit deren Hilfe die ausgewählten Peptide rekombinant in Bakterien produziert werden konnten. Mit den gewonnenen Peptiden sollten dann Mäuse immunisiert werden. Während der Immunisierungsphase galt es zudem, ein möglichst effizientes System für die Fusion von Milz- und Myelomzellen zu etablieren bzw. die Zellkulturbedingungen für Hybridomzellen zu optimieren. Überdies musste ein geeignetes

„Screening“-Verfahren entwickelt werden, mit dem es möglich sein sollte, Tausende von Hybridomzellklonen in möglichst kurzer Zeit mit möglichst hoher Sensitivität zu testen.
Nach erfolgter Fusion von Milz- und Myelomzellen und nach erfolgtem Screening sollten weiterführende, immunologische Experimente mit deutlicher höherer Spezifität wie z.B. Western-Blot und Immunpräzipitation durchgeführt werden, so dass diejenigen Hybridomzellklone, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzierten, ausgewählt werden konnten. Die selektierten, noch polyklonalen Hybridomzellklone sollten anschließend mittels eines geeigneten Verfahrens subkloniert werden, um letztendlich eine monoklonale Zellpopulation zu erhalten.
Die generierten, monoklonalen Antikörper galt es dann mittels multipler immunologischer Verfahren zu charakterisieren, wobei das gesamte Spektrum der möglichen Einsatzgebiete der Antikörper in der Arbeitsgruppe abgedeckt werden sollte.
Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auch auf der Detektion von endogenem LMX1B liegen. So könnte die Rolle von LMX1B – in Ergänzung zu den bisher in der Arbeitsgruppe gebräuchlichen Systemen, in denen LMX1B überexprimiert wurde – in einem physiologischerem Kontext untersucht werden. Nach erfolgreicher Etablierung dieses Systems galt es zudem, die physiologische Relevanz der Wechselwirkung von LMX1B mit Interaktionspartnern wie LDB1, welche bereits durch in-vitro-Studien gezeigt werden konnte (Agulnick et al., 1996; Jurata & Gill, 1997; Marini et al., 2003), in einer Podozytenzelllinie bzw. in Glomeruli zu überprüfen.
Für die Identifikation von Zielgenen von LMX1b stellt die Chromatin-Immunpräzipitation ein nahezu unverzichtbares Werkzeug dar. Ein weiterer Aspekt der Charakterisierung der generierten, monoklonalen Antikörper lag darin, Vorversuche zur Chromatin-Immunpräzipitation durchzuführen und so zu klären, ob die generierten Antikörper in diesem Verfahren eingesetzt werden könnten.

# 2. Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Chemikalien, Medien und Reagenzien

| | |
|---|---|
| 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfon-Säure (Hepes) | Fluka |
| Aceton | Acros |
| Acido Fixer (Fixierer für Röntgenfilme bei Western Blots) | Agfa |
| Acrylamid | Serva |
| Agarose | Biozym |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Biorad |
| Ampicillin | Serva |
| Aprotinin | Roth |
| Bacto-Agar | Becton Dickinson |
| Bacto-Hefeextrakt | Becton Dickinson |
| Bacto-Trypton | Becton Dickinson |
| bovine serum albumin (BSA) | Sigma |
| Brij 97 | Sigma |
| Bromphenolblau | Sigma |
| Chloramphenicol | Calbiochem |
| Chloroquin | Sigma |
| Coomassie Brilliant Blau G 250 | Serva |
| Coomassie Brilliant Blau R 250 | Serva |
| DEAE-Dextran | Sigma |
| Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) | Fermentas |
| Dikaliumhydrogenphosphat | Merck |
| Dimethylsulfoxid (> 99%) | Sigma |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Merck |
| Dithiothreitol (DTT) | Roth |
| DMEM: Dulbecco’s modified Eagle’s Medium, high Glucose (4,5 g/l) | PAA |

| | |
|---|---|
| DNA-Marker „1 kb DNA Ladder” | Invitrogen |
| DNA-Marker „100 bp DNA Ladder” | Invitrogen |
| Entwickler Eukobrom (Entwickler für Röntgenfilme bei Western Blots) | TETENAL AG &CO. KG |
| Essigsäure | Merck |
| Ethanol | J. T. Baker |
| Ethidiumbromid | Sigma |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Roth |
| Ethylendiamintetraessigsäure-Natriumsalz (EDTA-$Na_2$) | Sigma |
| FCS: fetales Kälberserum | Invitrogen |
| Ficoll 400 | Serva |
| Formalin | Sigma |
| Glukose | Merck |
| Glycin | Roth |
| Glyzerin | Merck |
| Harnstoff | Merck |
| Hoechst 33258 (Bisbenzimid) | Sigma |
| Hybridoma Fusion and Cloning Supplement (HFCS) (50×) | Roche |
| Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT) Mediumzusatz (50x) | Sigma |
| Hypoxanthin-Thymidin (HT) Mediumzusatz (50x) | Sigma |
| Imidazol | Merck |
| Immersol™ 518F: Immersionsöl zum Mikroskopieren | Carl Zeiss |
| Isoamylalkohol | Merck |
| Isopropanol (2-Propanol) | Merck |
| Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) | Fermentas |
| Kaliumazetat | Merck |
| Kaliumchlorid | Applichem |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck |
| Kaliumhydroxid-Plätzchen | Merck |
| Leupeptin | Roth |
| Lithiumchlorid | Merck |

| | |
|---|---|
| Magermilchpulver | Sucofin |
| Magnesiumsulfat | Merck |
| Methanol | Merck |
| N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Serva |
| N’,N’ Methylen Bisacrylamid | Serva |
| Natriumazetat | Merck |
| Natriumazid | Merck |
| Natriumchlorid | Merck |
| Natriumdeoxycholat | Sigma |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Sigma |
| Natriumphosphat | Merck |
| Natronlauge | Merck |
| Nickelsulfat-6-hydrat | Riedel de Haën |
| Nonidet P40 | Fluka |
| o-Phosphorsäure 85% | Merck |
| OPI Media Supplement | Sigma |
| Paraformaldehyd | Merck |
| Penicillin/Streptomycin 1% | PAA |
| Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) | Roth |
| Pikrinsäure | Sigma |
| Polyethylenglycol 1500 (PEG 1500) | Roche |
| Polyethylenglykol 3350 (PEG 3350) | Sigma |
| Prestained Protein Marker, Broad Range | NEB |
| Roti®Quant | Roth |
| Roti-Phenol/C/I (Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol) | Roth |
| Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid) | Applichem |
| Saccharose | Merck |
| Salzsäure | Merck |
| Schwefelsäure | Merck |
| Tetramethylbenzidin | Merck |
| Titermax Classic Adjuvant | Sigma |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan | USB |
| Triton-X-100 | Merck |

| | |
|---|---|
| Trypsin-EDTA | PAA |
| Tween 20 | Serva |
| Wasserstoffsuperoxid (30%) | Merck |
| Xylencyan FF | Serva |
| Zitronensäure-mono-Hydrat | Merck |
| β-Mercaptoethanol | Merck |

### 2.1.2 Enzyme

Die geeigneten 10 x Puffer und Reaktionszusätze wurden jeweils bei den entsprechenden Firmen mitbestellt.

A. Restriktionsendonukleasen

| | |
|---|---|
| *Bam*H I | NEB |
| *Eco*R I | Fermentas |
| *Eco*R V | NEB |
| *Spe* I | NEB |

B. DNA- und RNA-modifizierende Enzyme

| | |
|---|---|
| Alkalische Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) | NEB |
| iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase | Biorad |
| RNase A | Roth |

C. Proteinasen

| | |
|---|---|
| Faktor Xa | Novagen |

### 2.1.3 Kits

| | |
|---|---|
| DNA Extraction Kit | Fermentas |
| Western Lightning Chemoluminiscence Reagent | Perkin Elmer |
| Wizard Plus Midiprep DNA Purification System | Promega |

### 2.1.4 Verbrauchsmaterial

| | |
|---|---|
| Autoklavierband | VWR |
| Chromatographie Papier „3MM Chr“ | Whatman |
| Chromatographie-Säulen (Gravitationssäulen aus Plastik) | Novagen |
| Deckgläser aus Glas: 12 mm Durchmesser (rund) | VWR |
| Deckgläser aus Glas: 24 x 60 mm | Roth |
| Dreiwegehahn | Braun |
| Einfrierröhrchen | Nunc |
| Elutip-Säulen | Schleicher & Schüll |
| Film-Kassetten: Universal 100 (35,6 x 43,2 cm) mit Verstärkerfolie und blau emittierend EK 100 (für Röntgenfilme bei der Entwicklung von Western-Blots) | rego |
| Flottierhilfe für Slide-A-Lyzer (weiß) | Pierce (Perbio) |
| Gewebesieb „Cell Strainer“ | Greiner |
| Glasobjektträger (76 x 26 mm) | R. Langenbrinck |
| Glaswaren/Plastikwaren: Flaschen, Kulturkolben etc. | Roth |
| Glogos Autorad Marker | Stratagene |
| Handschuhe Latex | Kimberley-Clark |
| Handschuhe Nitril | Roth |
| Haushaltstücher | Fripa |
| His Bind Resin | Novagen |
| Kanülen | Braun |
| Mikro-Hämatokrit-Kapillare, heparinisiert | Brand |
| Klarsichtfolien (klar) | Leitz/Durable |
| Küvetten 100 (Plastik) (10 x 4 x 45 mm) für Spektralphotometer | Sarstedt |

| | |
|---|---|
| „U-2000“; 1 ml (Proteinbestimmung und OD-Messungen) | |
| MF-Millipore Membranfilter: 0,025 µm | Roth |
| Neubauer-Zählkammer mit Deckglas: 0,100 mm Tiefe/ 0,0025 $mm^2$ | BRAND |
| Petrischalen | Sarstedt |
| Pipettenspitzen | Sarstedt Gilson |
| Protein A Sepharose CL-4B | GE Healthcare |
| Protein G Sepharose CL-4B | GE Healthcare |
| PVDF-Membran: 0,45 µm Porengröße Immobilon-P Transfermembran | Millipore |
| Rasierklingen | Herkenrath, Solingen |
| Reaktionsgefäße aus Plastik: 0,1 ml, 0,2 ml / 0,5 ml / 1,5 ml und 2 ml | Sarstedt |
| Röhrchen: 50 ml und 15 ml (Plastik) | Sarstedt |
| Röntgenfilme: Fuji Medical X-Ray FILM 100 NIF 18 cm x 24 cm und 35 cm x 43 cm | gfh |
| Serologische Pipetten | Sarstedt |
| Slide-A-Lyzer Dialysekassetten: Glyzerin-frei 500 µl; regenerierte Zellulose; 3,5 MWCO | Pierce (Perbio) |
| Spritzen (steril) | Braun |
| Sterilfilter (0,22 µm) | VWR |
| Zellkulturbedarf: T75- und T25-Filterflaschen; P10-, P6- und P3-Schalen; 6-Loch-, 24-Loch- und 96-Loch-Platten | Sarstedt |
| Zell-Schaber | Sarstedt |
| Zellulosetücher „Kimwipes“ | Kimberley-Clark |
| Zentrifugenbecher aus Plastik für Kühlzentrifuge „Sigma 3K20“ (20 ml) | Beckman Coulter GmbH |
| Zentrifugenbecher aus Plastik mit Schraubverschluss (250 ml) für Kühlzentrifuge „Sorvall Superspeed RC2-B“ mit Rotor GSA | Beckman Coulter GmbH |

### 2.1.5 Geräte und Instrumente

| | |
|---|---|
| Agarose-Gelelektrophorese Dokumentatiosystem „Gel Max“ | Intas |

| | |
|---|---|
| Agarose-Gelelektrophorese Midisystem „Easy cast” | Owl Scientific |
| Agarose-Gelelektrophorese Minisystem “Horizon 58” | GIBCO BRL |
| Autoklav „Systec 5050 ELV“ | Systec |
| Autoklav „Vakuklav® 30-B“ | Mela |
| CMV-E: Dreharm für Eppendorf-Cups | Fröbel Labortechnik GmbH |
| DMC 2-Kamera (für Fluoreszenzmikroskop-Axioskop) | Polaroid |
| Drehrad für Eppendorf-Cups | Werkstatt der Univ. Rgbg., NWF III |
| Eismaschine AF-10 | Scotsman |
| Feinwaage „Mettler H10w“ | Mettler |
| Fluoreszenzmikroskop: Axioskop 20 | Carl Zeiss |
| Flurorescence Spektrophotometer CARY ECLIPSE mit Temp. Controller | Varian |
| Flüssigstickstofftank: ARPEGE TP 100 | Air Liquide |
| Gefrierschränke bis –20°C | Privileg |
| Gefrierschränke bis –80°C „Herafreeze“ | Heraeus |
| Gewebesiebe 106/180/75 µm Porengröße | Haver & Boecker |
| Gewebesiebe 63/75/38 µm Porengröße | Haver & Boecker |
| Heizblock „VLM LS 1“ | VLM |
| Heizplatten mit Magnetrührer „MR 3001“ | Heidolph |
| Inkubationsschrank „Kelvitron t“ | Heraeus |
| Inkubationsschüttler „Unitron“ | Infors |
| Kühlschränke | Privileg |
| Kühlzentrifuge „Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454 | Heraeus |
| Kühlzentrifuge „Sigma 3K20“ mit Rotor Nr. 12154 oder 12158 | Braun |
| Kühlzentrifuge „Sorvall Superspeed RC2-B“ mit Rotor GSA | Sorvall |
| Mikroskop: Nikon Eclipse TS 100 | Nikon |
| Mikrotiterplatten-Photometer „Sunrise remote control“ | TECAN |
| Mikrowelle „Privileg 8018 E“ | Privileg |
| pH-Meter „766 Calimatic“ | Knick |
| Quarzküvette QS 1.000 (schwarz; 100 µl, Schichtdicke und Zentrum jeweils 10 mm) für Spektralphotometer | Hellma |

| | |
|---|---|
| „U-2000“ (für DNA- und Proteinbestimmung) | |
| Scanner DUOSCAN f40 | Agfa |
| Schüttler für SDS-Gele und Western-Blot-Membranen | Oehmen Labortechnik |
| SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System (8 cm x 4 cm x 0,75 mm oder 1 mm): Mini Protean® II Electrophoresis Cell | Biorad |
| SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System „SE 600 Series Elektrophoresis Unit“ (14 cm x 12 cm x 1,5 mm) | Hoefer |
| Spannungsgeber “PS 608 Electrophoresis Power Supply” | GIBCO BRL |
| Spannungsgeber “Standard Power Pack P25” | Biometra |
| Spektralphotometer „U-2000“ | Hitachi |
| Thermocycler-Cycler „My Cycler“ | Biorad |
| Thermomixer 5436 für Eppendorf-Cups | Eppendorf |
| Thermostat “Polystat cc1” | Huber |
| Tischzentrifuge “Biofuge pico” mit Rotor Sorvall 3329 | Heraeus |
| Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell | Biorad |
| Ultraschallgerät „Vibra Cell“ | Sonics & Materials Inc. |
| Vortexer “Vortex-Genie 2” | Scientific Industries |
| Waage „BL 1500 S“ | Sartorius |
| Wasseraufbereitungsanlage “Seralpur PRO 90 CN” | Seral |
| Western-Transferkammer „TE 62“ (Tank-Blotting) | Hoefer |
| Zellkulturarbeitsbank: Heraeus Lamin Air HA 2448 GS | Heraeus |
| Zellkultur-Brutschrank APT.line™ CB | Binder |

### 2.1.6 Antikörper

**Tabelle 1: Primärantikörper**

| Antikörper | gerichtet gegen | Spezies | mono-/ polyklonal | Verdünnung | Quelle/ Referenz |
|---|---|---|---|---|---|
| 9E10 | c-Myc | Maus | monoklonal | Western Blot: 1:3<br>Immunzytochemie: 1:2<br>Immunpräzipitation: 100 µl für 300 µg Zelllysat | Hybridom selbst kultiviert; (Evan et al., 1985) |
| anti-LDB1 Antiserum 4508 | LDB1 AS 178-375 | Kaninchen | polyklonal | Western Blot: 1:4.000 | Gordon Gill und Samuel Pfaff, San Diego (Jurata et al., 1996) |
| anti-LMX1B Antiserum BMO8 | LMX1B AS 31-395 | Manichean | polyklonal | Western Blot: 1:2.000<br>Immunpräzipitation: 12 µl für 300 µg Zelllysat | J. Prestel (Suleiman et al., 2007) |
| anti-Poly-Histidin | Poly-Histidin | Maus | monoklonal | Western Blot: 1:1.000 | Sigma |
| BMN8 (Affinitäts-aufgereinigtes anti-LMX1B Antiserum) | LMX1B | Kaninchen | polyklonal | Western Blot: 1:1.000 | J. Prestel H. Suleiman |
| CLIM-2 (N-18) | LDB1 | Ziege | polyklonal | Western Blot: 1:200 | Santa Cruz |
| E47 (N.649) | E47 AS 1-649 | Kaninchen | Polyklonal | Western Blot: 1:1.000 | Santa Cruz |

**Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit generierte, monoklonale Antikörper (siehe hierzu auch Tabelle 13).** Die Angaben zur **Immunpräzipitation** beziehen sich auf Methode **A** (siehe 2.2.5E; 100 µl an unverdünntem Zellkulturüberstand auf 300 µg Gesamtprotein) bzw. Methode **B** (siehe 2.2.5E; Inkubation von 1 ml an unverdünntem Zellkulturüberstand mit 50 µl einer 50%igen Beads-Suspension über Nacht vor der IP).

| **Antikörper** | **gerichtet gegen** | **Spezies** | **mono-/ polyklonal** | **Verdünnung** | **Quelle/ Referenz** |
|---|---|---|---|---|---|
| 422-19 | LMX1B AS 1-53 | Maus | monoklonal | Western Blot: 1:10<br>Immunpräzipitation:<br>Methode A: 100 µl | diese Arbeit |
| 422-76 | LMX1B AS 1-53 | Maus | monoklonal | Western Blot: 1:10<br>Immunpräzipitation:<br>Methode A: 100 µl | diese Arbeit |
| 193-16 | LMX1B AS 322-395 | Maus | monoklonal | Western Blot: 1:10<br>Immunzytochemie: 1:100<br>Immunpräzipitation:<br>Methode A: 100 µl<br>Methode B: 1 ml | diese Arbeit |
| 193-67 | LMX1B AS 322-395 | Maus | monoklonal | Western Blot: 1:10<br>Immunzytochemie: 1:100<br>Immunpräzipitation:<br>Methode A: 100 µl<br>Methode B: 1 ml | diese Arbeit |
| 193-68 | LMX1B AS 322-395 | Maus | monoklonal | Western Blot: 1:10<br>Immunpräzipitation:<br>Methode A: 100 µl | diese Arbeit |

**Tabelle 3: Sekundärantikörper**

| **Antikörper** | **gerichtet gegen** | **Spezies** | **mono-/ polyklonal** | **Verdünnung** | **Quelle** |
|---|---|---|---|---|---|
| Cy3/anti-Maus-IgG | Maus-IgG | Ziege | polyklonal | Immunzytochemie 1:300 | Dianova |
| HRP/anti-Maus-IgG | Maus-IgG | Ziege | polyklonal | Western Blot 1:10.000 | Sigma |
| HRP/anti-Kaninchen-IgG | Kaninchen-IgG | Ziege | polyklonal | Western Blot 1:20.000 | Sigma |
| HRP/anti-Ziegen-IgG | Ziegen-IgG | Kaninchen | polyklonal | Western Blot 1:80.000 | Sigma |

### 2.1.7 Oligonukleotide für die Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Oligonukleotide wurden von Metabion bezogen.

**Tabelle 4: Oligonukleotide**

| Name | Nr. | Sequenz (5'→3') | Länge | $T_m$ |
|---|---|---|---|---|
| hLMX1B *Bam*H 1 1F | 1 | CGCGGATCCATGGATATAGCAACAGGTCCCGAG | 33 | 77,7 |
| hLMX1B *Eco*R 1 464R | 2 | CGCGAATTCGTCGCCCTTGCGTA | 23 | 68,2 |

### 2.1.8 Plasmide

**Tabelle 5: Plasmide**

| Vektor | Größe [kbp] | Selekions-marker | Klonierung | Referenz |
|---|---|---|---|---|
| p3M/hLMX1B complete | 6,7 | Ampicillin | PCR-Amplifizierung des Basenpaarbereichs 1-464 von humanem LMX1B aus HEK293-Zellen (Primerpaar 1&2); Einklonierung des PCR-Inserts über *Bam*H I/*Eco*R I-Schnittstellen in p3M/hLMX1B | diese Arbeit |
| p3M/hLMX1B | 6,7 | Ampicillin | Insert (43bp) entnommen über *Cla* I/ *Hin*d III aus Oligo-c-myc-tag und einkloniert in *Cla* I/*Hin*d III geschnittenen p3H/hLMX1B | Prof. Dr. Ralph Witzgall |
| p3M/mLdb1 | 6,7 | Ampicillin | Insert (murines Ldb1) entnommen über *Nco* I → Klenow I/*Xba* I aus pGEM/mldb1 und einkloniert in *Bam*H I → Klenow I/*Xba* I geschnittenen p3M/hLMX1B | PD Dr. Anne Rascle |
| pET16b/hLMX1B (1-53) | 5,8 | Ampicillin | PCR-Amplifizierung des Basenpaarbereichs 1-159 von humanem LMX1B aus HEK293-Zellen; Einklonierung des PCR-Inserts über *Nde* I/*Bam*H I-Schnittstellen in pET 16b (Novagen) | PD Dr. Anne Rascle |
| pET16b/hLMX1B (322-395) | 6,0 | Ampicillin | Insert (bp-Bereich 966-1185 von humanem LMX1B) entnommen über *Nco* I → Klenow/*Eco*R V aus pCRIItopo/hLMX1B und einkloniert in *Xho* I → Klenow/*Xho* I → Klenow geschnittenen pET16b (Novagen) | PD Dr. Anne Rascle |

### 2.1.9 Bakterienstämme

Klonierungsstamm

| | |
|---|---|
| *E. coli* DH5α | Stratagene |

Expressionsstämme

| | |
|---|---|
| *E. coli* BL21 (DE3) | Novagen |
| *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS | Novagen |

Beide Expressionsstämme enthalten eine chromosomale Kopie der T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors und sind daher besonders für die Expression von Konstrukten unter Regulation von T7-Promotoren geeignet, zu welchen die pET Vektoren zählen. Die pLyS-Stämme enthalten zusätzlich ein Plasmid mit einer Chloramphenicol-Resistenz, das für T7-Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase, kodiert. Die basale Transkription der T7 RNA-Polymerase wird blockiert, was eine frühzeitige Expression eines evtl. toxischen Zielproteins verhindert und somit Wachstum und Lebensfähigkeit der Bakterien positiv beeinflusst. Darüber hinaus erleichtert T7-Lysozym den Aufschluss der Bakterienzellen. Der Rosetta-Stamm enthält zusätzliche tRNAs für in *E. coli* selten genutzte Codons und erleichtert dadurch die Expression eukaryotischer Gene, die diese Codons besitzen.

### 2.1.10 Säugerzelllinien

**Tabelle 6: Säugerzelllinien**

| Zelllinie | Charakterisierung | Quelle/Referenz |
|---|---|---|
| 9E10-Hybridom | Hybridom-Zellen, die einen monoklonalen Antikörper gegen das humane c-Myc-Protein sezernieren | American Type Culture Collection (Evan et al., 1985) |
| COS-7 | Nierenzellen aus der grünen Meerkatze; Abkömmlinge der CV-1-Affen-Zellen, die mit einer im Replikationsursprung defekten SV40-Mutante transformiert wurden | B. Royer-Pokora, Humangenetik, Heidelberg |
| HEK293T | HEK293-Zellen mit dem Gen für das SV40 T-Antigen | W. Nickel (BZH, Heidelberg) |
| mHyb 193-# und 422-# | Hybridom-Zellinien, die monoklonale Antikörper gegen das humame LMX1B-Protein sezernieren | diese Arbeit |
| mPCL Klon E11 | Klon E11 einer murinen Podozytenzelllinie | K. Endlich, Universität Greifswald, (Schiwek et al., 2004) |
| X63-Ag8.653 | Murine Myelomzellen | M. Mack, Universitätsklinik Regensburg (Kearney et al., 1979) |

### 2.1.11 Medien, Lösungen und Puffer

Vorbemerkung: Die im Folgenden aufgeführten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Reinstwasser einer Wasseraufbereitungsanlage (Seralpur PRO 90 CN) hergestellt.

## A. Arbeiten mit Bakterien

| | |
|---|---|
| LB-Medium: | 10 g Bacto-Trypton<br>5 g Bacto-Hefeextrakt<br>10 g NaCl<br><br>$H_2O$ ad 1 l; autoklavieren; Zugabe des jeweils gewünschten, sterilfiltrierten Antibiotikums in der unter 2.2.1A angegebenen Konzentration. |
| LB-Agar: | 10 g Bacto-Trypton<br>5 g Bacto-Hefeextrakt<br>10 g NaCl<br>15 g Bacto-Agar<br><br>$H_2O$ ad 1 l; autoklavieren; Zugabe des jeweils gewünschten, sterilfiltrierten Antibiotikums in der unter 2.2.1A angegebenen Konzentration und gießen der Platten. |
| TSS-Puffer: | 10% PEG 3350<br>5% DMSO<br>25 mM $MgSO_4$<br><br>Hergestellt in LB-Medium, dann sterilfiltrieren. |
| Bindepuffer für Ni-Säulen: | 5 mM Imidazol<br>500 mM NaCl<br>20 mM Tris HCl pH 8,0<br>0,1% Triton X-100 |

B. Arbeiten mit Tieren

10x PBS:

1,4 M NaCl

100 mM $K_2HPO_4$

Mit 100 mM $KH_2PO_4$ auf pH 7,5 einstellen.

TMB-Entwicklerlösung (Hidaka et al., 2002):

| | |
|---|---|
| 6 µl | 30% $H_2O_2$ |
| 360 µl | Tetramethylbenzidin (3 mg/ml in Aceton) |
| 5,64 ml | 0,1 M Zitronensäure-mono-Hydrat |
| 4,36 ml | 0,2 M $Na_2HPO_4$ |

C. Arbeiten mit Säuger-Zelllinien

HAT-Medium (für 500 ml):

| | |
|---|---|
| 20% FCS | 100 ml |
| 1x HFCS | 10 ml |
| 1x HAT Mediumzusatz | 10 ml |
| 1x OPI | 5 ml |
| Penicillin/Streptomycin 1% | 5 ml |
| 0,25% Glucose | 1,25 g |
| β-Mercaptoethanol | 3 µl |
| RPMI | 375 ml |

HAT-Medium: Alternativprotokoll B(für 500 ml):

| | |
|---|---|
| 20% FCS | 100 ml |
| 1x HAT Mediumzusatz | 10 ml |
| Penicillin/Streptomycin 1% | 5 ml |
| 0,25% Glucose | 1,25 g |
| β-Mercaptoethanol | 3 µl |
| RPMI | 390 ml |

HT-Medium (für 500 ml):

| | |
|---|---|
| 20% FCS | 100 ml |
| 1x HFCS | 10 ml |
| 1x HT Mediumzusatz | 10 ml |
| 1x OPI | 5 ml |
| Penicillin/Streptomycin 1% | 5 ml |
| β -Mercaptoethanol | 3 µl |
| RPMI | 375 ml |

Hoch-FCS-Medium (für 500 ml):

| | |
|---|---|
| 20% FCS | 100 ml |
| β -Mercaptoethanol | 3 µl |
| RPMI | 400 ml |

Transiente Transfektion

DEAE-Dextran/Chloroquin-Lösung:

10 mg/ml DEAE-dextran
2,5 mM Chloroquin

In 1x PBS herstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

Herstellung von Zelllysat:

RIPA-Puffer:
1% Nonidet P40
1% Natriumdeoxycholat
0,1% SDS
150 mM NaCl
10 mM Natriumphosphat pH 7,2

Proteinase-Inhibitoren vor Gebrauch frischzugeben:
10 µg/ml Aprotinin

10 µg/ml Leupeptin
0,5 mM PMSF

Brij®-Puffer:
10 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl
2 mM EDTA pH 8,0
0,875% Brij® 97
0,125% Nonidet P40

Proteinase-Inhibitoren vor Gebrauch frisch zugeben:
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin
0,5 mM PMSF

Immunzytochemie

Bouin-Lösung:
0,1 M Natriumphosphat pH 7,4
15% gesättigte Pikrinsäure
2% Formalin

Mit $H_2O$ zum gewünschten Endvolumen auffüllen.

4%-iges Paraformaldehyd:
4 g Paraformaldehyd

In 90 ml $H_2O$ mit 4 Tropfen 1 M NaOH unter Rühren und Erhitzen auf 50°C lösen. Mit 10 ml 10x PBS mischen, abkühlen lassen. Filtrieren und mit 1 M HCl auf pH 7,4 einstellen.

Permeabilisierungslösung:
2% BSA
0,2% Triton X-100

In 1x PBS

| | |
|---|---|
| BSA-PBS-Lösung: | 2% BSA |
| | In 1x PBS |
| Hochsalz-PBS: | 350 mM NaCl |
| | In 1x PBS |
| Hoechst-Lösung: | 50 mg Bisbenzimid |
| | In 10 ml $H_2O$ dunkel bei 4°C aufbewahren. |
| Glyzerin-PBS-Lösung: | 40% Glyzerin |
| | In 1x PBS. Vor Gebrauch sterilfiltrieren. |

D. Arbeiten mit DNA

| | |
|---|---|
| STET-Puffer: | 8% Saccharose<br>0.5% Triton X-100<br>50 mM EDTA (pH 8)<br>10 mM Tris-HCl (pH 8) |
| | Filtersterilisieren und bei 4°C lagern. |
| RNase A-Lösung: | 20 mg/ml RNase A |
| | In TE-Puffer lösen, 15 min bei 100°C kochen, 1 Volumen Glyzerin (10 mg/ml) zugeben und bei -20°C lagern. |
| TE-Puffer: | 10 mM Tris-HCl pH 7,4<br>1 mM EDTA pH 8,0 |

| | |
|---|---|
| 5x Stopp-Puffer | 0,125% Bromphenolblau<br>15% Ficoll 400<br>50 mM EDTA pH 8,0<br>0,5% SDS |
| Natriumacetat-Lösung: | 3 M Natriumacetat<br><br>Mit konz. Essigsäure auf pH 5,2 titrieren. |
| 50x TAE-Puffer: | 2 M Tris<br>0,1 mM EDTA (freie Säure)<br><br>Mit Essigsäure auf pH 8,0 titrieren. |
| Ethidiumbromid-Lösung: | 1 mg/ml Ethidiumbromid<br><br>In $H_2O$. |

Elutip-Säulen:

| | |
|---|---|
| Ladepuffer: | 0,2 M NaCl<br>1 mM EDTA<br>20 mM Tris-HCl pH 7,4 |
| Elutionspuffer: | 1 M NaCl<br>1 mM EDTA<br>20 mM Tris-HCl pH 7,4 |

## E. Arbeiten mit Proteinen

| | |
|---|---|
| Coomassie-Lösung: | 100 mg Coomassie Brilliant Blau G 250 |

| | |
|---|---|
| | In 50 ml Ethanol (95%) lösen, dann 100 ml Phosphorsäure (85%) zugeben und mit $H_2O$ auf 1 l auffüllen. |

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

| | |
|---|---|
| 10x Laufpuffer: | 250 mM Tris<br>1,9 M Glycin<br>1% SDS |
| 5x SDS-Probenpuffer: | 625 mM Tris pH 6,7<br>50% Glyzerin<br>12,5% SDS<br>12,5% β-Mercaptoethanol<br>0,05% Bromphenolblau |
| 4x Lower Tris: | 1,5 M Tris-HCl pH 8,8<br>0,4% SDS |
| 4x Upper Tris: | 500 mM Tris-HCl pH 6,8<br>0,4% SDS |
| Trenngel: | 7 ml 4x Lower Tris<br>6,5 ml - 18,7 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid<br>$H_2O$ ad 28 ml<br>16 µl TEMED<br>78 µl 10% APS |
| Sammelgel: | 2,5 ml 4x Upper Tris<br>1,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid<br>6,1 ml $H_2O$<br>50 µl 10% APS<br>10 µl TEMED |

Coomassie Brilliant Blue-Färbung von SDS-Polacrylamidgelen

| | |
|---|---|
| Färbelösung: | 0,25% Coomassie Brilliant Blau R 250<br>50% Methanol<br>10% Essigsäure |
| Entfärbelösung: | 50% Methanol<br>10% Essigsäure |

Immundetektion von Proteinen (Western-Blot)

| | |
|---|---|
| Transferpuffer: | 50 mM Tris<br>384 mM Glycin<br>20% Methanol<br>0,01% SDS |
| Blocklösung: | 1x PBS<br>5% Magermilchpulver<br>0,5% Tween 20 |
| Waschlösung: | 1x PBS<br>0,5% Tween 20 |

Chromatin-Immunpräzipitation

| | |
|---|---|
| SDS+ Puffer: | 100 mM NaCl<br>50 mM Tris pH 8.0<br>5 mM EDTA<br>0,5% SDS |
| | In $H_2O$ herstellen, 0,02% Natrium-Azid (Endkonzentration) hinzufügen. |

SDS- Puffer:
100 mM NaCl
50 mM Tris pH 8.0
5 mM EDTA

In $H_2O$ herstellen, 0,02% Natrium-Azid (Endkonzentration) hinzufügen.

Triton-Verdünnungs-Puffer:
100 mM NaCl
100 mM Tris pH 8.0
5 mM EDTA
5% Triton X-100

In $H_2O$ herstellen, sterilfiltrieren und 0,02% Natrium-Azid (Endkonzentration) hinzufügen.

Aufreinigung von Protein über Nickel-Säulen

Bindepuffer:
5 mM Imidazol
500 mM NaCl
20 mM Tris HCl pH 8,0
0,1% Triton X-100

Charge-Puffer:
50 mM $NiSO_4$

Waschpuffer:
60 mM Imidazol
500 mM NaCl
20 mM Tris HCl pH 8,0
0,1% Triton X-100

Elutionspuffer:
1 M Imidazol
500 mM NaCl
20 mM Tris HCl pH 8,0
0,1% Triton X-100

| | |
|---|---|
| Strip-Puffer: | 100 mM EDTA |
| | 500 mM NaCl |
| | 20 mM Tris HCl pH 8,0 |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit Bakterien

A. Anzucht von Bakterien

Alle Arbeiten mit Bakterien erfolgten stets unter sterilen Bedingungen mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Materialien und Lösungen. Zur Anzucht wurde immer LB-Medium verwendet, dem unmittelbar vor Gebrauch abhängig von der Resistenz des jeweiligen Bakterienstammes folgende Antibiotika in der angegebenen Endkonzentration zugesetzt wurden.

Ampicillin: 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml
Chloramphenicol: 34 µg/ml

Zur Produktion von Proteinen wurde dem LB-Medium zusätzlich Glucose in einer Endkonzentration von 1% (m:v) beigefügt.

Die Anzucht von Bakterien erfolgte ausgehend von einer Kolonie oder einer bei -80°C in Glyzerin gelagerten Stammkultur, wobei die Kulturen bei 37°C und 250 rpm über Nacht auf dem Schüttler (Inkubationsschüttler Unitron) inkubiert wurden.

B. Messung der optischen Dichte

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Bakterienkulturen wurde 1 ml der entsprechenden Kultur in einer transparenten Plastikküvette im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 550 nm vermessen. Wurden Absorptionswerte größer 1,0 erreicht, wurde die Kultur nach Bedarf mit LB-Medium verdünnt. Als Nullwert für alle Messungen diente LB-Medium.

C. Herstellung von kompetenten Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte bei allen in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämmen (2.1.9) nach dem TSS-Protokoll (Chung et al., 1989). Ausgehend von einer 1:100 Verdünnung einer Übernachtkultur (2.2.1A) wurden die Bakterien in LB-Medium, dem evtl. das entsprechende Antibiotikum vorher zugesetzt worden war, bis zu einer OD von 0,4 bis 05 angezüchtet. Dann wurden die Bakterien für 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 2.500 rpm abzentrifugiert (Multifuge 3L-R mit Rotor Ch. 2454). Das gewonnene Bakterienpellet wurde in eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert, wobei das Volumen 1/10 des ursprünglichen Kulturvolumens betrug. Die kompetenten Zellen wurden in 200 µl-Aliquots entweder bei -80°C weggefroren oder sofort für eine Transformation (2.2.1D) verwendet.

D. Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterien erfolgte nach dem TSS-Protokoll (Chung et al., 1989; Hanahan, 1983). Hierzu wurden 5 µl eines bereits sequenzierten Plasmides bzw. eines Ligationsansatzes (2.2.4L) zu 200 µl kompetenten Zellen (2.2.1C) gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Transformationsansätze für 90 Sekunden bei 42°C in einen Heizblock gestellt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 2 Minuten wurden 800 µl LB-Medium zugegeben. Diese Bakteriensuspension wurde daraufhin eine Stunde bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Im Anschluss daran wurden unterschiedliche Volumina (30 µl, 100 µl, 200 µl und zwei Mal 300 µl) der Ansätze auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion der transformierten Klone erfolgte durch die in den Agar-Platten zugesetzten Antibiotika.

E. Produktion von Proteinen in *E. coli*

Für die Herstellung von Proteinen in *E. coli* wurden die Stämme BL21 (DE3) und Rosetta (DE3) pLysS (2.1.9) verwendet.

Wachstumskurve und Induktionskinetik

Um eine größtmögliche Ausbeute an rekombinant produziertem Protein zu erreichen, mussten optimale Induktionsbedingungen gefunden werden. Hierzu wurde zunächst das Expressionskonstrukt in einen geeigneten Expressionsstamm transformiert. Anschließend wurden mit einer Kolonie von der LB-Agar-Platte ca. 5-10 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum beimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Ausgehend von dieser Bakteriensuspension wurde eine Stammkultur angelegt, indem 600 µl der Kultur in ein Einfrierröhrchen, das bereits 300 µl Glyzerin (im Einfrierröhrchen autoklaviert) enthielt, gegeben wurden. Diese Stammkultur wurde bei -80°C weggefroren und konnte ab dann benutzt werden, um weitere Kulturen anzulegen.

Für die Induktionskinetik wurden 50 ml LB-Medium, das das entsprechende Antibiotikum enthielt, 1:100 mit der Übernachtkultur inokuliert und wie unter 2.2.1A beschrieben inkubiert. Vor der Inokulation erfolgten 2 Waschschritte, um freigesetzte β-Lactamase zu entfernen, wobei die gesamte Suspension bei RT und 4.000 rpm für 5 Minuten (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch.2454) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in dem entsprechenden Medium resuspendiert wurde. Bei einer optischen Dichte von 0,5 bzw. 1,0 wurde die Proteinexpression mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Um die optimale Temperatur zu bestimmen, erfolgte die weitere Inkubation bei 30°C und 37°C bei 250 rpm auf dem Schüttler. Unmittelbar vor der Induktion mit IPTG wurde 1 ml der Bakterienkultur als „0 h-Kontrolle“ entnommen und bei 13.000 rpm 1 Minute zentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Der Überstand wurde abgesaugt und das Bakterienpellet mit 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert, wobei das benötigte Volumen an 1x SDS-Probenpuffer berechnet wurde, indem die optische Dichte der Bakterienkultur mit 200 µl multipliziert wurde. Danach wurde die Probe bei 100°C für 5 Minuten auf dem Heizblock inkubiert. Nach 1 h, 2 h, 3 h und 4 h Induktion wurde ebenfalls die optische Dichte der Bakterienkultur im Spektralphotometer gemessen und eine Probe von 1 ml entnommen, mit der analog zur „0 h-Kontrolle“ verfahren wurde. Unter Umständen wurden auch Proben nach 8 h und 24 h gewonnen. Anschließend wurden gleiche Volumina (30-60 µl) der verschiedenen Proben auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (2.2.5B) entsprechender Prozentigkeit geladen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie angefärbt (2.2.5C). Um die optimalen Induktionsbedingungen zu ermitteln, erfolgten ein Vergleich der Banden sowie eine Analyse der bakteriellen Wachstumskurve, die aus den gemessenen optischen Dichten generiert wurde.

Produktion von Proteinen unter optimalen Bedingungen

Nachdem die optimalen Expressionsbedingungen mittels Wachstumskurve und Induktionskinetik ermittelt worden waren, konnten die verschiedenen Proteine in größerem Maßstab in *E. coli* produziert werden. Hierbei wurden die Kulturen stets aus einer 3 h-Vorkultur anstatt einer Übernachtkultur beimpft, bei einer $OD_{550}$ von 0,4 mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und bei 30°C bzw. 37°C über die etablierte Zeitspanne im Schüttler bei 250 rpm inkubiert. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit wurde die optische Dichte der Bakterienkultur erneut gemessen. Die genauen Induktionsbedingungen für jedes Expressionskonstrukt im entsprechenden Expressionsstamm finden sich in 3.1.2.

Präparation von bakteriellem Zelllysat

Zur Präparation von bakteriellem Zelllysat wurden die induzierten Bakterienkulturen sofort nach Ablauf der etablierten Induktionszeit bei 4°C und 15.000 rpm für 30 Minuten abzentrifugiert (Sorvall Superspeed RC2-B mit GSA-Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in Bindepuffer für Nickelsäulen resuspendiert, wobei sich das benötigte Volumen an Bindepuffer gemäß nachfolgender Formel berechnete: (2 ml Bindepuffer pro 100 $OD_{550}$) x Volumen der Bakterienkultur. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf Eis mittels Ultraschallgerät (Vibra Cell) aufgeschlossen. Hierzu wurde ein Suspensionsvolumen von 10 bis 20 ml für 30 Sekunden mit 50%iger Intensität des Gerätes beschallt. Dies wurde nach einer Pause von 1 min nochmals wiederholt. Die lysierten Proben wurden im Anschluss daran bei 4°C und 15.000 rpm für 30 Minuten abzentrifugiert (Sorvall Superspeed RC2-B mit GSA-Rotor). Die Lysatüberstände wurden entweder sofort zur Proteinaufreinigung mit Hilfe von Nickelsäulen (2.2.5G) verwendet oder bei -80°C weggefroren.

### 2.2.2 Arbeiten mit Tieren

A. Immunisierung von Mäusen mittels subkutaner oder intraperitonealer Injektionen

Es wurden jeweils 6 Balb/c-Mäuse pro Peptid immunisiert. Hierzu wurden zuerst zwei 1 ml-Spritzen mit einem Dreiwegehahn verbunden, wobei die Spritzen in einem Winkel von 90° zueinander platziert wurden. Die Stempel der Spritzen wurden jeweils entfernt und der Dreiwegehahn so eingestellt, dass die mit den Spritzen verbundenen Schenkel verschlossen waren. In die eine Spritze wurden 100 µl Titermax Classic Adjuvant, in die andere 500 µg des entsprechenden, aufgereinigten und gegen 1x PBS dialysierten Peptids pipettiert, wobei das Gesamtvolumen an Peptid zuvor bereits mit 1x PBS auf 400 µl aufgefüllt worden war. Die Stempel der Spritzen wurden nun wieder angebracht und die Spritzen separat über den Dreiwegehahn entlüftet. Dieser wurde nun so eingestellt, dass die beiden mit den Spritzen konnektierten Schenkel verbunden und der dritte Schenkel verschlossen war. Jetzt wurde das Peptid-PBS-Gemisch in die Spritze mit Titermax Classic Adjuvant gepresst. Indem das Gesamtgemisch aus Peptid, PBS und Titermax Classic Adjuvant für ca. 15 bis 30 Minuten von einer Spritze in die jeweils andere gedrückt wurde, entstand eine stabile, milchig-weiße Emulsion. Den Balb/c-Mäusen wurden jeweils 100 µl dieser Emulsion (entspricht 100 µg Peptid) subkutan an 4 Stellen gemäß dem untenstehenden Immunisierungsschema (Tabelle 7) gespritzt. Der 3. „Boost“ erfolgte als intraperitoneale Injektion von 100 µg Peptid in 1x PBS (Gesamtvolumen 100-150 µl), wobei auf adjuvante Substanzen verzichtet wurde.

**Tabelle 7: Immunisierungsschema.**

| Tag | Immunisierung |
|---|---|
| 1 | Grundimmunisierung subkutan |
| 22 | 1. „Boost“ subkutan |
| 36 | 2. „Boost“ subkutan |
| 50 | 3. „Boost“ intraperitoneal |
| 55 | Entnahme der Milz |

B. Blutentnahme

Den immunisierten Tieren wurde am 10. Tag nach dem zweiten „Boost“ Blut abgenommen, indem die Spitze des unter einer Wärmelampe hyperämisierten Schwanzes abgeschnitten und das austretende Blut mit einer heparinisierten Kapillare aufgefangen wurde. Das Blut wurde dann in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, für 1 h bei 37°C inkubiert, um die Blutgerinnung zu beschleunigen, und über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 1.000 rpm und Raumtemperatur für 10 min (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Anschließend wurde mit einer Pipette vorsichtig das Serum abgenommen ohne die geronnenen Blutbestandteile zu berühren. Das Serum wurde entweder sofort zur Bestimmung der Antikörpertiter mittels ELISA (2.2.2C) verwendet oder bei -20°C gelagert.

C. Bestimmung der Antikörpertiter im Serum mittels ELISA

Zur Bestimmung der Antikörpertiter im Serum der immunisierten Tiere wurde ein “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) durchgeführt. Da im Serum eine Vielzahl unterschiedlicher Immunglobuline vorhanden ist und somit die Gefahr unspezifischer Antikörper-Antigen-Reaktionen gegeben ist, wurden neben dem spezifischen Peptid, gegen das auch die Immunisierung stattfand, mehrere unspezifische Peptide verwendet. Zunächst wurden die entsprechenden Peptide mit 1x PBS auf eine Endkonzentration von 2 µg/ml verdünnt, jeweils 50 µl des entsprechenden, verdünnten Peptids in die jeweilige Vertiefung einer 96-Loch-Platte aus Polystyren pipettiert und diese Platte dann entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei Raumtemperatur in einer luftdicht verschlossenen Box gemeinsam mit feuchten Zellulosetüchern („feuchte Kammer“) inkubiert. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden ebenfalls in einer „feuchten Kammer“ durchgeführt. Dann wurden die Peptidlösungen wieder entfernt, die Platte drei Mal mit 1x PBS (ca. 200 µl/Vertiefung) gewaschen und mit 100 µl pro Vertiefung 3% BSA in 1x PBS für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit 1x PBS wurden die Serumverdünnungen (verdünnt in 3% BSA/PBS) als primärer Antikörper in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur und vier Waschschritte mit 1x PBS, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Nun wurde die Platte für 1 h bei RT mit 50 µl/Vertiefung HRP-konjugiertem anti-Maus-Antikörper (1:10.000 verdünnt in 3% BSA/PBS) inkubiert. Nachdem

die Platte abermals vier Mal mit 1x PBS gewaschen worden war, wurden die gebundenen Antikörper durch die Zugabe von 100 µl/Vertiefung TMB-Entwicklerlösung (Hidaka et al., 2002) visualisiert. Die Entwicklerlösung bildete das Substrat für eine durch die Meerretichperoxidase (HRP) katalysierte Reaktion, die zu einer Blaufärbung der entsprechenden Vertiefungen führte. Je nach Signalintensität wurde die Reaktion nach 10 bis 30 min mit 100 µl/Vertiefung 5,3% Schwefelsäure (18-fache Verdünnung von 97-99% Schwefelsäure) abgestoppt und die Platten mittels Biorad Mikrotiterplatten-Photometer „Sunrise“ (TECAN) bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen (dies musste innerhalb von 30 min nach Zugabe der Schwefelsäure erfolgen).

D. Präparation von Nierenglomeruli

Zur Präparation von Nierenglomeruli wurden ausschließlich sterile bzw. autoklavierte und auf 4°C gekühlte Lösungen und Materialien verwendet. Im Folgenden wird die Präparation von murinen Glomeruli beschrieben.

Erwachsenen C57BL/6-Mäusen wurden beide Nieren entnommen. Diese wurden sofort in eine Glas-Petrischale mit 1x PBS auf Eis überführt, um Proteindegradation zu verhindern. Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Um die Präparation zu erleichtern, wurden die Nieren auf sterile Kompressen gelegt. Nachdem pararenales Fett- und Bindegewebe entfernt worden waren, wurden die Nieren durch einen Längsschnitt in zwei Hälften geteilt und das Nierenmark, Nierenkelchsystem und Nierenbecken herausgetrennt. Die verbleibenden Nierencortices wurden in einer Glaspetrischale mit einer Rasierklinge für ca. 10 bis 15 min zerschnitten, so dass eine homogene Masse entstand. Nun wurden die Gewebesiebe mit den entsprechenden Porengrößen und die Auffangschale mit 1x PBS benetzt und in folgender Reihenfolge gestapelt (von oben nach unten): 63 µm-Sieb/75 µm-Sieb/38 µm-Sieb/Auffangschale. Die homogenisierten Nierenrinden wurden anschließend mit Hilfe eines 50 ml Glaskolbens, dessen Boden als Stempel benutzt wurde, durch das erste Sieb gepresst. Danach wurden zuerst die Oberseite und dann auch vorsichtig die Unterseite dieses Siebes mit 1x PBS aus einer Spritzflasche gewaschen, so dass das im Sieb verbliebene Nierenparenchym ebenfalls den darunter liegenden Sieben zugeführt wurde und nur weißes Nierenstroma zurückblieb. Durch das 75 µm-Sieb wurden die Nierentubuli zurückgehalten. Im 38 µm-Sieb sammelten sich die Nierenglomeruli. Diese wurden durch vorsichtiges

Abwaschen mit 1x PBS vom Sieb in ein 50 ml Röhrchen überführt und danach bei 500 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit größter Vorsicht abgenommen und das Glomerulipellet in einem Volumen von 5 bis 10 ml 1x PBS resuspendiert. 2 bis 3 Tropfen dieser Suspension wurden auf einen Objektträger gegeben und unter dem Lichtmikroskop zur Bestimmung des Reinheitsgrades betrachtet. Daraufhin wurde die Glomerulisuspension in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei 3.000 rpm und 4°C für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Präparation von Glomeruli aus Whistar-Ratten erfolgte analog dem oben stehenden Protokoll, wobei Gewebesiebe mit anderer Porengröße in folgender Reihenfolge (von oben nach unten) verwendet wurden: 106 µm-Sieb/180 µm-Sieb/75 µm-Sieb/Auffangschale.

### 2.2.3 Arbeiten mit Säuger-Zelllinien

A. Kultivierung von Säuger-Zellen

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden mit sterilen Verbrauchsmaterialien, Medien und Lösungen (durch Autoklavieren oder Sterilfiltrieren) an Zellkulturarbeitsbanken (Heraeus Lamin Air HA 2448 GS) durchgeführt, um eine Kontamination der Zellen mit Bakterien, Viren oder Pilzen zu verhindern. Alle verwendeten Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen oder Gewebekulturschalen bei 5% $CO_2$ kultiviert. Die genauen Kulturbedingungen für die jeweilige Zellline finden sich in Tabelle 8.

**Tabelle 8: Kulturbedingungen für Säuger-Zellen**

| Zelllinie | Wachstumsverh. | Medium | Zusätze | Temp. |
|---|---|---|---|---|
| 9E10-Hybridom | in Suspension | RPMI 1640 | 10% FCS | 37°C |
| COS-7 | adhärent | DMEM | 10% FCS | 37°C |
| HEK 293T | adhärent | DMEM | 10% FCS | 37°C |
| mHyb LMX1B 193-# und 422-# (endgültige Bedingungen) | in Suspension | RPMI 1640 | 10% FCS | 37°C |
| mPCL (non-permissive Bedingungen) | adhärent | RPMI 1640 | 10% FCS | 38°C |
| mPCL (permissive Bedingungen) | adhärent | RPMI 1640 | 10% FCS<br>10 U/ml IFNγ | 33°C |
| X63-Ag8.653 | in Suspension | RPMI 1640 | 20% FCS | 37°C |

B. Primäre Zellkultur: Isolierung peritonealer Makrophagen

Alle Medien und Lösungen zur Isolierung peritonealer Makrophagen wurden auf 37°C vorgewärmt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1.100 rpm und Raumtemperatur für 5 min („Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454).

Zur Isolierung peritonealer Makrophagen wurden weibliche Balb/c-Mäuse (6 bis 8 Wochen alt) verwendet, wobei die Ausbeute an Zellen aus einer Maus für 2 96-Loch-Platten ausreichend ist. Das Tier wurde durch zervikale Dislokation getötet und für ca. 2 min in ein Bad aus 70% Ethanol gelegt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden an einer Zellkulturarbeitsbank durchgeführt. Mit Hilfe steriler Instrumente wurde sodann das Fell über dem Abdomen des Tieres inzidiert und durch Abziehen des Selbigen das Peritoneum freigelegt. Durch eine Kanüle des Kalibers 20 G wurden anschließend 4 ml (aus einem Gesamtvolumen von 5 ml) an 11,2% Saccharose (in $H_2O$) in die Bauchhöhle injiziert. Eine suffiziente Verteilung der Saccharose-Lösung wurde durch eine peritoneale Massage sichergestellt. Nach 30 Sekunden wurde mit Hilfe der noch liegenden Kanüle die intraperitonale Flüssigkeit, in der sich auch die Makrophagen befinden, aspiriert und anschließend zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in insgesamt 15 ml HAT-Medium (Alternativprotokoll B; ohne HFCS und OPI) resuspendiert und die Zellsuspension auf 2 96-

Loch-Platten (75 µl/Vertiefung) verteilt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C und einer $CO_2$-Konzentration von 5% für 2 Tage, bevor die gewonnenen peritonealen Makrophagen als Fütterzellen für Hybridome verwendet wurden.

C. Primäre Zellkultur: Isolierung von Milz-Lymphozyten und Fusion mit Myelomzellen (Protokoll A)

Alle Medien und Lösungen zur Herstellung von Hybridom-Zellen wurden auf 37°C vorgewärmt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1100 rpm und Raumtemperatur für 5 min („Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454).
Zwei Tage vor der Fusion wurden die murinen Myelomzellen X63-Ag8.653 (Kearney et al., 1979) 1:10 in 3 T75-Zellkulturflaschen (Endvolumen jeweils 100 ml) gesplittet, so dass am Tag der Fusion ca. $75x10^6$ Myelomzellen zur Verfügung standen. Fünf Tage nach dem intraperitonealen „Boost“ wurde die entsprechende Maus durch zervikale Dislokation getötet und für ca. 2 min in ein Bad aus 70% Ethanol gelegt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden an einer Zellkulturarbeitsbank durchgeführt. Dann wurde der Maus die Milz entnommen und in eine Petrischale mit ca. 10 ml RPMI 1640 gelegt, wobei auf Sterilität geachtet wurde; d.h. für Hautschnitt, Eröffnen des Peritoneums und Präparation der Milz wurde jeweils ein neues, steriles Set bestehend aus Präparierschere und –pinzette verwendet. Nachdem die Milz sorgfältig von Fett und Bindegewebe befreit worden war, wurde sie in ein Gewebesieb „Cell strainer“ über einer neuen Petrischale (mit ca. 6 ml RPMI 1640 gefüllt) gelegt und mit einer Präparierschere in möglichst kleine Stücke geschnitten. Diese wurden mit Hilfe des Stempels einer 1 ml-Spritze durch das Sieb gedrückt, wobei das Sieb immer wieder mit RPMI 1640 gewaschen wurde. Dann wurden die in der Petrischale aufgefangenen Milzzellen (überwiegend Lymphozyten) in ein 50 ml-Röhrchen überführt, wobei die Petrischale zwei Mal mit jeweils 5 ml RPMI 1640 gewaschen wurde. Den größeren Bestandteilen der Zellsuspension wurden 1 bis 2 min Zeit gegeben, um im Röhrchen abzusinken. Anschließend wurde der Überstand in ein neues 50 ml-Röhrchen pipettiert, mit RPMI 1640 auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde weitere zwei Mal in 50 ml RPMI 1640 resuspendiert und zentrifugiert.

Parallel dazu wurden auch die Myelomzellen in 50 ml-Röhrchen überführt, zentrifugiert und analog zu den Milzzellen ebenfalls drei Mal mit RPMI 1640 gewaschen, um FCS aus dem

Medium fast vollständig zu eliminieren, da es ansonsten zu einer Beeinträchtigung der folgenden Fusion kommen könnte. Nach den Waschschritten wurden sowohl Milz- als auch Myelomzellen in 10 ml RPMI 1640 resuspendiert und ca. 100 µl der jeweiligen Zellsuspension zum Zählen der Zellen (2.2.3G) verwendet. Anschließend wurden Milzzellen und Myelomzellen im Verhältnis 3:1 zusammengegeben und zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett entfernt, um ein Verdünnen der Polyethylenglycol 1500-Lösung im nächsten Schritt zu vermeiden, und durch leichtes Klopfen gegen den Boden des Röhrchens wurde das Zellpellet vom Plastik gelöst. Nun wurde 1 ml einer 50%igen PEG 1500-Lösung (in RPMI 1640) langsam über einen Zeitraum von 1 min zugegeben, wobei kontinuierlich mit der Pipettenspitze in der Zellsuspension gerührt wurde (nach Lane, 1985; Galfre et al., 1977). Danach erfolgte weiterhin unter Rühren nacheinander die Zugabe von 1 ml RPMI 1640 über den Zeitraum von 1 min und 8 ml RPMI 1640 über 2 min. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in 300 ml HAT-Medium resuspendiert, auf insgesamt 20 96-Loch-Platten verteilt (150 µl/Vertiefung) und bei 37°C und einer $CO_2$-Konzentration von 5% inkubiert.

HAT-Medium beinhaltet Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin. Aminopterin blockiert die de-novo-Nukleotidsynthese, indem es das Enzym Dihydrofolat-Reduktase inhibiert. Zellen, die die Enzyme Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) und Thymidinkinase (TK) exprimieren, können zur Nukleotidsynthese einen alternativen „Recycling-Weg“ (salvage pathway) benutzen, wenn sie mit Hypoxanthin und Thymidin versorgt werden, und sterben in der Gegenwart von Aminopterin nicht ab (Harlow & Lane, 1988). Da Myelomzellen HGPRT-defizient sind, werden durch HAT-Medium die Myelomzellen eliminiert. Milzzellen hingegen sind nicht sensitiv gegenüber Aminopterin, haben aber unter Zellkulturbedingungen eine sehr kurze Lebenszeit. Auf diese Art und Weise überleben nur die gewünschten Milzzelle-Myelomzelle-Hybridome.

D. Primäre Zellkultur: Isolierung von Milz-Lymphozyten und Fusion mit Myelomzellen (Alternativprotokoll B)

Da in der Literatur sehr viele, unterschiedliche Protokolle zur Fusion von Milz- und Myelomzellen vorhanden sind (Galfre et al., 1977; Gefter et al., 1977; Westerwoudt, 1985; Lane et al., 1984; Lane, 1985), wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche durchgeführt, um die Bedingungen zu optimieren. Hierzu wurde ein zweites Fusionsprotokoll herangezogen,

das dem oben Geschilderten in vielen, technischen Aspekten glich. Es bestehen allerdings einige grundsätzliche Unterschiede: Sowohl Milz- als auch Myelomzellen wurden bei dem Alternativprotokoll B während der Isolierungs- und Waschschritte anstatt in RPMI1640 in 1x-PBS-Lösung suspendiert, welche im letzten Schritt vor der Zugabe von Polyethylenglykol 1500 durch 1x-PBS- Lösung mit 0,68 mM $CaCl_2$ und 0,49 mM $MgCl_2$ ersetzt wurde. Einen weiteren fundamentalen Unterschied stellen die unterschiedlichen Verhältnisse der eingesetzten Milz- zu Myelomzellen dar: Milzzellen:Myelomzellen in einem Verhältnis von 3:1 bei Protokoll A versus 1:3 bei Alternativprotokoll B.
Als Fusions-Agens wurde bei beiden Protokollen 1 ml einer 50%igen PEG 1500-Lösung (in RPMI 1640) eingesetzt, wobei bei Protokoll B auf ein Rühren während der einminütigen Inkubationszeit verzichtet wurde. Nach der Fusion wurden die Zellen jeweils in HAT-Medium unterschiedlicher Zusammensetzung resuspendiert. Da bei Alternativprotokoll B peritoneale Makrophagen als „Fütterzellen“ eingesetzt wurden, welche die für das Wachstum von Hybridomzellen notwendigen Stoffe wie z.B. Zytokine sezernieren, wurde HAT-Medium ohne Supplementierung mit HFCS und OPI verwendet. Ein weiterer gravierender Unterschied bestand des Weiteren in der Zelldichte beim Aussäen der Zellen. Während bei Protokoll A die Zellen aus einer Maus auf insgesamt 20 96-Loch-Platten verteilt wurden, wurden bei Protokoll B nur 4 96-Loch-Platten benutzt.

## E. Passagieren von Zellen

### Adhärent wachsende Zellen

Beim Passagieren (= Splitten) von adhärent wachsenden Zellen wurden diese zunächst vom Boden des jeweiligen Kulturgefäßes abgelöst und dann in der gewünschten Zelldichte erneut ausgesät. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen (5 ml pro T25-Flache bzw. P6-Schale und 10 ml pro T75-Flasche bzw. P10-Schale), um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurde ein entsprechendes Volumen Trypsin/EDTA zugegeben (2-3 ml pro T25-Flache bzw. P6-Schale und 5 ml pro T75-Flasche bzw. P10-Schale), so dass die Zellen gerade bedeckt wurden, und so lange bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes ablösten (dies geschah in der Regel nach ca. 5 min), was lichtmikroskopisch kontrolliert wurde. Um die Trypsin-Aktivität zu inhibieren, wurde mindestens das doppelte Volumen an FCS-haltigem

Medium zugegeben. Etwaige noch adhärente Zellen wurden durch mehrmaliges sanftes Auf- und Abpipettieren gelöst und die Zellsuspension dann bei 1.000 rpm und Raumtemperatur für 5 min abzentrifugiert („Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen an frischem Kulturmedium resuspendiert. Nach dem Zählen der Zellen (2.2.3G) wurden diese dann in der gewünschten Dichte erneut ausgesät. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten adhärent wachsenden Zellen wurden zumeist 1:10 gesplittet.

In Suspension wachsende Zellen

In Suspension wachsende Zellen mussten im Unterschied zu adhärenten Zellen nicht durch Trypsin/EDTA abgelöst werden. Zum Splitten von Suspensionszellen wurde das gesamte Kulturmedium in ein 50 ml-Röhrchen überführt, wobei durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren etwaige „semi-adhärente“ Zellen mitabgelöst wurden, und dann bei 1.000 rpm und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert („Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen an frischem Kulturmedium resuspendiert, die Zellen gezählt und die gewünschte Zellzahl erneut ausgesät. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten in Suspension wachsenden Zellen wurden nach dem Auftauen zumeist 1:10 gesplittet, später bei gutem Wachstum 1:50.

F. Kultur von Hybridomzellen: Von der Fusion bis zu den endgültigen Kulturbedingungen

Screening mittels ELISA

Nach der Fusion (2.2.3C) wurden die Zellen bei 37°C und einer $CO_2$-Konzentration von 5% in HAT-Medium inkubiert. Nach 4 bis 5 Tagen entwickelten sich lichtmikroskopisch sichtbare Hybridomzellkolonien; die restlichen Zellen wurden wie bereits beschrieben durch das Selektionsmedium eliminiert. Neun bis 10 Tage nach der Fusion erreichten diese Kolonien eine für das erste Screening ausreichende Größe. Dieses wurde mittels eines ELISA analog zu 2.2.2C durchgeführt mit dem Unterschied, dass nur gegen das entsprechende, spezifische Peptid getestet wurde und anstatt der Serumverdünnungen 50 µl an unverdünntem Zellkulturüberstand aus der jeweiligen Vertiefung als Primärantikörper eingesetzt wurden. Danach wurde jede Vertiefung mit 100 µl HAT-Medium aufgefüllt.

Es wurden dann die 93 Vertiefungen mit dem höchsten Antikörpertiter für das zweite Screening, das am nächsten Tag durchgeführt wurde, ausgewählt. Hierbei wurde sowohl gegen das spezifische als auch gegen ein unspezifisches Peptid getestet, so dass falsch positive Hybridome, die eine unspezifische Antikörper-Antigen-Reaktion gezeigt hatten, eliminiert werden konnten. Die genauen Screening-Bedingungen finden sich in 3.1.4C. Die richtig-positiven Hybridome wurden erneut mit 100 µl HAT-Medium aufgefüllt.
Ein bis zwei Tage nach dem zweiten Screening wurden die Zellen aus den positiven Vertiefungen von den 96-Loch-Platten auf 24-Loch-Platten übertragen, indem mehrfach auf- und abpipettiert wurde, um semi-adhärente Zellen zu lösen, und die Zellsuspension dann in die neue Vertiefung überführt wurde. Anschließend wurde frisches HAT-Medium bis zu einem Gesamtvolumen von 600 µl/Vertiefung hinzugefügt. Nach wenigen Tagen konnten die Zellen mit derselben Technik auf 6-Loch-Platten übertragen werden (Gesamtvolumen an HAT-Medium 1-2 ml/Vertiefung). Im Weiteren wurden die Zellen alle 2 bis 4 Tage 1:2 bis 1:3 gesplittet, wobei von HAT-Medium auf eine 1:1 Mischung von HAT-Medium:HT-Medium gewechselt wurde. Bei jedem Mediumwechsel wurden stets auch Zellen in dem alten Medium belassen, so dass auf diese Zellen zurückgegriffen werden konnte, für den Fall, dass die neue Mediumzusammensetzung von den Zellen nicht vertragen wurde. Nach zwei Passagen in der 1:1 Mischung wurden die Zellen 1:3 bis 1:5 in reines HT-Medium in T25-Flaschen (Gesamtvolumen 5-10 ml) gesplittet.

Subklonierung

Nachdem die Kulturen auf T25-Flaschen expandiert worden waren, wurde eine Subklonierung der jeweiligen Zellklone durchgeführt. Hierzu wurde jeder Klon in Zelldichten von 10 Zellen/Vertiefung für die eine Hälfte der Platte und 1 Zelle/Vertiefung für die andere Hälfte in HT-Medium auf eine 96-Loch-Platte ausgesät (Gesamtvolumen 100 µl/Vertiefung). Das Screening der auf der Platte entstandenen Sub-Klone erfolgte ca. 10 Tage später analog dem ersten Screening nach der Fusion; hierbei wurden zwei Sub-Klone ausgewählt, erneut über die Sequenz 96-Loch-Platte / 24-Loch-Platte / T25-Flasche expandiert und der am besten wachsende Sub-Klon anschließend ein zweites Mal subkloniert. Die genauen Bedingungen und Auswahlkriterien für die jeweiligen Subklonierungen finden sich in 3.3.1.

Entwöhnung der Hybridomzellen

Nach der zweiten Subklonierung wurden die ausgewählten Klone expandiert, bis sie in T75-Flaschen kultiviert werden konnten. Anschließend wurden die Zellen von dem supplementierten HT-Medium entwöhnt, indem sie für jeweils 2 Passagen nacheinander in folgenden Medien gezüchtet wurden: einer 1:1 Mischung aus HT-Medium und Hoch-FCS-Medium, gefolgt von reinem Hoch-FCS-Medium, gefolgt von einer 1:1 Mischung aus Hoch-FCS-Medium und RPMI 1640/10% FCS, bis schließlich reines RPMI 1640/10% FCS als endgültiges Kulturmedium erreicht wurde.

## G. Zählen von Zellen

Zum Zählen von Zellen wurden 100 µl der entsprechenden Zellsuspension mit 100 µl Trypan Blau gemischt und ein Aliquot dieser Mischung in die vorbereitete Neubauer-Zählkammer überführt. Die lebenden, nicht mit Trypan Blau gefärbten Zellen wurden unter dem Mikroskop (Nikon Eclipse TS 100) gezählt. Anschließend wurde die Zellzahl pro ml anhand der Anzahl ausgezählter Quadrate der Neubauer-Zählkammer, des Volumens über einem mittelgroßen Quadrat von $1 \times 10^{-4}$ ml und der Verdünnungsstufe berechnet.

## H. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren von Zellen wurden die Zellen einer 100% konfluenten T25- bzw. T75-Flasche zunächst wie unter 2.2.3E beschrieben behandelt. Nach der Zentrifugation wurde das Medium abgesaugt und das Zellpellet in FCS/10% DMSO resuspendiert (3 ml für eine T25-Flasche, 6 ml für eine T75-Flasche). Danach wurde die Zellsuspension in Aliquots à 1,5 ml in Einfrierröhrchen pipettiert und diese zunächst bei -80°C eingefrorenen. Zur weiteren Lagerung wurden die Einfrierröhrchen dann am nächsten Tag in den Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen von Zellen wurde das entsprechende Einfrierröhrchen dem Flüssigstickstofftank entnommen und der Deckel kurz um eine halbe Umdrehung aufgeschraubt, um ein Platzen des Gefäßes zu verhindern. Die Zellen wurden dann aufgetaut, indem das Einfrierröhrchen in handwarmem Wasser geschwenkt wurde, und danach in einem

15 ml-Röhrchen mit 10 bis 15 ml FCS-haltigen Kulturmedium gemischt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1000 rpm und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert („Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml des entsprechenden Kulturmediums aufgenommen und die Zellsuspension in eine T25-Flasche überführt, wo die Zellen bei 37°C und 5% $CO_2$ anwachsen konnten.

## I. Transiente Transfektion von Zellen

Bei der Transfektion von eukaryontischen Zellen werden 2 Formen unterschieden: die transiente und die stabile Transfektion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die transiente Transfektion von COS-7-Zellen durchgeführt. Hierbei kommt es nicht zur Integration der transfizierten DNA ins zelluläre Genom der Zellen, was nur zu einer vorübergehenden Expression des gewünschten Proteins führt.

Einen Tag vor der Transfektion wurden COS-7-Zellen so in eine P6- oder P10-Schale gesplittet, dass am folgenden Tag eine Konfluenz von ca. 70% bestand. Sollten die Zellen zur Durchführung einer Immunzytochemie verwendet werden, wurden die runden Deckgläser bereits vor dem Splitten in die Zellkulturschale gelegt. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich stets auf die Transfektion einer P6-Schale.

Kurz vor der Transfektion wurden 5 ml DMEM/10% FCS mit 200 µl der DEAE-Dextran/Chloroquin-Lösung gemischt. Dieser Mischung wurden ca. 15 µg Plasmid-DNA zugegeben und alles erneut gut gemischt. Nach Absaugen des Kulturmediums wurde die Transfektonsmischung auf die COS-7-Zellen gegeben und diese für 4 bis 6 h bei 37°C und 5% $CO_2$ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Medium/DEAE-Dextran/Chloroquin-Lösung entfernt und die Zellen für 90 Sekunden bei Raumtemperatur mit 10% DMSO (in 1x PBS) inkubiert. Danach wurde die DMSO-Lösung gründlich abgesaugt, die Zellen zwei Mal mit 1x PBS gewaschen, und für 48 h in DMEM/10% FCS inkubiert. Da in der Regel nach zwei Tagen das Maximum der Proteinexpression erreicht wird, wurde zu diesem Zeitpunkt Zelllysat (2.2.3J) hergestellt bzw. eine Immunzytochemie (2.2.3K) durchgeführt.

J. Ernte von Säuger-Zellen und Herstellung von Zelllysat

Für die Ernte wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit 1x PBS gewaschen. Danach wurde ein kleines Volumen an 1x PBS zugegeben, das ausreichend war, um die Zellen zu bedecken. Diese wurden nun mit Hilfe eines Zellkulturschabers vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst. Die im PBS schwimmenden Zellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 3.000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet entweder sofort für die Herstellung von Zelllysat verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Lyse von Säuger-Zellen wurden alle Lösungen auf Eis vorgekühlt und alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt. Zunächst wurde das Zellpellet entsprechend seiner Größe in 50 bis 200 µl Lyse-Puffer resuspendiert und für 15 bis 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C für 15 min (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154). Der Überstand wurde vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und entweder sofort für Versuche verwendet oder bei -80°C gelagert.

K. Immunzytochemie

Vorbemerkung: Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Zur Durchführung einer Immunzytochemie wurden COS-7-Zellen auf runden Deckgläschen in Zellkulturschalen ausgesät (2.2.3E) und mit dem entsprechenden Plasmid transient transfiziert (2.2.3I). 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 20 bzw. 30 min mit 4% PFA- bzw. Bouin-Lösung fixiert. Danach wurden sie 3 Mal für 5 min mit 1x PBS gewaschen und für 45 min mit der Permeabilisierungs-Lösung (2% BSA/0,2% Triton X-100 in 1x PBS) inkubiert. Nachdem die Zellen weitere 3 Mal für 5 min mit 1x PBS gewaschen worden waren, wurde BSA-PBS-Lösung (2% BSA in 1x PBS) zugegeben und für 1 h inkubiert, um unspezifische Antikörperreaktionen zu reduzieren. Anschließend wurde die BSA-PBS-Lösung abgesaugt und es erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper (verdünnt in BSA-PBS-Lösung). Danach wurden die Zellen 3 Mal mit Hochsalz-PBS und ein

Mal mit 1x PBS gewaschen und für 1h mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (verdünnt in BSA-PBS-Lösung) inkubiert. Da mit Fluoreszenzfarbstoffen-gekoppelte Sekundärantikörper benutzt wurden und selbige lichtempfindlich sind, erfolgte diese Inkubation wie auch alle folgenden Arbeitsschritte im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Zellen erneut 3 Mal mit Hochsalz-PBS und 1 Mal mit 1x PBS gewaschen und eine Kernfärbung durchgeführt, indem Hoechst-Lösung (1:500 verdünnt in $H_2O$) für 1 min zugegeben wurde. Nach 3 weiteren Waschschritten mit 1x PBS waren die Zellen bereit zum Eindeckeln. Hierzu wurden zunächst einige Tropfen der Glyzerin-PBS-Lösung auf einen Objektträger gegeben und die Deckgläschen mit den Zellen darauf gelegt. Anschließend konnten luftblasenfrei Deckgläser auf den Objektträger platziert werden, wobei zuvor evtl. am Rand der Deckgläschen noch etwas Glyzerin-PBS-Lösung hinzugefügt worden war. Die Objektträger wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Auswertung und Bilddokumentation der Immunzytochemie erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20 mit einer DMC 2-Kamera.

### 2.2.4 Arbeiten mit DNA

Vorbemerkung: DNA wurde stets bei -20°C gelagert.

A. Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde zunächst eine 3 ml-Kultur der entsprechenden Kolonie angesetzt und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert (2.2.1A). Am nächsten Tag wurden 1,5 ml dieser Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 rpm und RT für 2 min zentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Der Überstand wurde verworfen und 200 µl STET-Puffer plus 10 µl Lysozym (10 mg/ml in $H_2O$) zugegeben. Das Pellet wurde mittels Vortexer (Vortex-Genie 2, Stufe 10) resuspendiert und die Zellsuspension für 1 min bei 108°C auf dem Heizblock inkubiert. Danach erfolgte sofort eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT für 10 min (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Das entstandene Pellet wurde mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt und 200 µl Isopropanol zugegeben. Nach einer Inkubation bei -20°C für 10 min wurde die Lösung bei 14.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154) und danach der Überstand durch Umdrehen des Reaktionsgefäßes abgegossen. Das entstandene Pellet wurde

mit 600 µl 70% Ethanol gewaschen, wobei Ethanol ohne erneuten Zentrifugationsschritt durch vorsichtiges Abpipettieren wieder entfernt wurde. Das DNA-Pellet wurde nun bei RT oder 37°C getrocknet, in 50 µl TE-Puffer plus 5 µl RNase A-Lösung gelöst und für ca. 20 min bei 37°C inkubiert, wobei nach der Hälfte der Inkubationszeit ein wenige Sekunden dauernder Vortexschritt durchgeführt wurde. Im Anschluss wurden 5 µl der Plasmid-DNA-Mini-Präparation für einen Restriktionsverdau (2.2.4J) verwendet.

B. Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Midi-Präparation von Plasmid-DNA wurden Bakterien in 200 bis 250 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wie unter 2.2.1A beschrieben über Nacht angezüchtet. Die Präparation wurde mit Hilfe des „Wizard Plus Midiprep-Kit“ durchgeführt. Hierzu wurde die Übernachtkultur zunächst 15 min bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Sorvall superspeed RC2-B mit GSA Rotor). Das Bakterienpellet wurde in 3 ml Resuspensions-Puffer des Kits aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde dann nach Zugabe von 3 ml Lyse-Puffer vorsichtig durch Schwenken gemischt und für maximal 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 3 ml Neutralisations-Puffer zugegeben, erneut gemischt und 15 min bei 14.000 rpm und 4°C (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12158) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe eines Filterpapiers filtriert, vorsichtig mit 10 ml Säulen-Beads vermischt und alles in die mitgelieferte Plastik-Säule überführt. Diese war zuvor auf die mit einer Wasserstrahlpumpe gekoppelte Vakuum-Absaug-Apparatur montiert worden. Nun wurde die DNA-haltige Lösung so langsam wie möglich abgesaugt, um ein effizientes Binden der DNA an das Säulenmaterial zu ermöglichen. Nachdem die Lösung komplett abgesaugt worden war, erfolgten 2 Waschschritte mit jeweils 15 ml Waschlösung bei maximaler Leistung der Wasserstrahlpumpe. Im Anschluss wurde die Säule 30 Sekunden trocken gesaugt. Die kleine Säule wurde abgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesteckt. Nun wurde für 2 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Anschließend wurde die kleine Säule in ein neues 1,5 ml-Gefäß gesteckt, mit 300 µl von auf 65°C erwärmtem $H_2O$ beladen und für 1 min inkubiert. Die Elution der DNA erfolgte durch einen 20 Sekunden dauernden Zentrifugationsschritt (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329) bei 13000 rpm und RT. Mit der gewonnenen DNA wurde danach ein Restriktionsverdau (2.2.4J) durchgeführt.

C. Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der in $H_2O$ gelösten DNA wurde eine 1:20 Verdünnung (in $H_2O$) der DNA erstellt. Diese Verdünnung wurde luftblasenfrei in eine schwarze Quarzküvette überführt und die Absorption bei 260 nm mit dem Spektralphotometer bestimmt. Als Nullwert diente $H_2O$. Die DNA-Konzentration wurde dann wie folgt ermittelt: eine Absorption bei 260 nm von 1,0 entspricht 50 ng/µl an doppelsträngiger DNA.

D. Phenolisierung von DNA

Nachdem mit Hilfe einer Pipette das Volumen der zu phenolisierenden DNA bestimmt worden war, wurde ein Volumen der fertigen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (Roth) zugegeben und alles für 1 min mit Hilfe des Vortexgerätes (Vortex-Genie 2, Stufe 10) gemischt. Unmittelbar danach erfolgte eine Zentrifugation (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329) bei 13.000 rpm und RT für 10 min. Hierdurch fand eine Trennung des Gemisches in 3 Phasen statt und die oberste, DNA-enthaltende Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde wie unter 2.2.4E beschrieben vorgegangen.

E. Ethanol-Präzipitation von DNA

Der DNA-Lösung wurde ein 1/10 Volumenanteil Natriumacetat-Lösung und das 2,5fache Volumen an 100% Ethanol zugegeben, wobei durch Invertieren gemischt wurde. Nach einer 30minütigen Inkubation bei -20°C erfolgte eine Zentrifugation (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154) bei 14.000 rpm und 4°C für 30 min. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene DNA-Pellet mit ca. 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde erneut bei 14.000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154). Das DNA-Pellet wurde schließlich bei RT oder 37°C getrocknet und in dem gewünschten Volumen an autoklaviertem $H_2O$ resuspendiert.

## F. Agarose-Gele

Zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten dienten Agarose-Gele. Je nach Fragmentgröße wurden Gele mit einem Agarose-Gehalt von 1,0% bis 2,0% (w:v) verwendet.

Hierzu wurde die entsprechende Menge an Agarose unter Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst, nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C Ethidiumbromid-Lösung in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt, alles durch Schwenken gemischt und in die vorbereitete Gelkammer mit eingesetztem Gelkamm gegossen. Nachdem die Agarose bei RT geliert war, wurde die Gelkammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt und der Gelkamm gezogen. Die vorbereiteten mit Stopp-Puffer versetzten Proben wurden in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von bis zu 150 V. Die angefärbten Nukleinsäuren wurden nach Abschluss des Laufs auf dem UV-Leuchtschirm sichtbar gemacht und mit Hilfe des Agarose-Gelektrophorese-Dokumentationssystems Gel Max photographiert. Bei so genannten präparativen Agarose-Gelen wurden die Banden der gewünschten Größe nach der Photodokumentation mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und die DNA wie unter 2.2.4G und 2.2.4H beschrieben extrahiert.

## G. Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen mittels „DNA Extraction Kit“ (Fermentas)

Die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen wurde mit Hilfe des „DNA Extraction Kit“ von Fermentas durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329) wurden bei 13.000 rpm und RT durchgeführt, alle Inkubationsschritte bei 55°C für 5 min. Nachdem die Bande der gewünschten Größe aus dem Gel ausgeschnitten worden war, wurde mit Hilfe des Gewichts des Gelstücks sein Volumen abgeschätzt, wobei angenommen wurde, das 1 g ungefähr 1 ml entspricht. Das Gelstück wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 3 Volumen Bindelösung erfolgte eine Inkubation, wodurch das Agarose-Gel aufgelöst wurde. Anschließend wurde die Silica-Suspension hinzupipettiert, wobei für bis 2,5 µg an DNA 5 µl und für jedes weitere µg an DNA weitere 2 µl an Silica-Suspension eingesetzt wurden, und alles erneut inkubiert. Um ein Absinken des Silica-Pulvers zu vermeiden, wurde während der Inkubation mehrmals kurz durch Vortexen gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 Sekunden im Anschluss an die Inkubation wurde das

entstandene Pellet in 500 µl eiskaltem Wasch-Puffer resuspendiert, kurz durch Vortexen gemischt, erneut für 5 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde 3 Mal wiederholt. Danach konnte die Elution erfolgen, indem das Pellet in dem entsprechenden Volumen an $H_2O$ oder TE-Puffer aufgenommen und inkubiert wurde. Nach einer Zentrifugation von 30 Sekunden wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Reagiergefäß überführt. Um die Ausbeute an DNA zu erhöhen, wurde der Elutionsschritt einmal wiederholt. Die Qualität der gewonnenen DNA wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert.

H. Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen mittels Elutip-Säulen

Bei sehr großen DNA-Fragmenten wurde die DNA mittels Elutip-Säulen aus den ausgeschnittenen Gelstücken extrahiert. Hierzu wurde nach Säulenäquilibrierung mit 3 ml Elutionspuffer und 3 ml Ladepuffer das Gelstück auf die Säule geladen und anschließend bei 3.000 rpm und RT für 10 min zentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Die Elution erfolgte mit 450 µl Elutionspuffer. Danach wurde die DNA wie unter 2.2.4E beschrieben mit Ethanol präzipitiert.

I. Verwendung von alkalischer Phosphatase (CIP) zur Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation von präparativ verdauter Vektor-DNA (2.2.4J) zu verhindern, wurde diese mit Hilfe des Enzyms CIP dephosphoryliert. Hierzu wurde dem Ansatz nach dem Restriktonsverdau 0,75 U Enzym pro µg DNA zugegeben, wobei auf die Kompatibilität von CIP mit dem für den Verdau verwendeten Puffer geachtet wurde (verwendbar sind die NEB-Puffer 2, 3 und 4 sowie die Spezial-Puffer für *Bam*H I, *Eco*R I und *Sal* I). Nach einer Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die Reaktion bei 75°C für 10 min gestoppt. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe eines präparativen Agarose-Geles aufgereinigt.

## J. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Für einen analytischen Verdau wurden in der Regel 500 ng der betreffenden DNA in einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl und für einen präparativen Verdau 10 bis 30 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt des Weiteren 1/10 Volumenanteil des vom Hersteller empfohlenen 10x Puffers, 2 U des betreffenden Restriktionsenzyms pro µg DNA und - falls erforderlich – weitere Zusätze wie BSA. Das Volumen eingesetzten Enzyms überschritt nie 10% des Gesamtvolumens, um auf Grund einer zu hohen Glycerinkonzentration Staraktivität zu verhindern. Der Ansatz wurde mit $H_2O$ auf das entsprechende Gesamtvolumen aufgefüllt und für 4 h bis über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei einem Doppelverdau wurden beide Enzyme zugesetzt, wobei auf Kompatibilität der Pufferbedingungen beider Enzyme geachtet wurde. Waren diese nicht kompatibel, wurden die Reaktionen nacheinander im passenden Puffer durchgeführt und die DNA zwischen den Reaktionen phenolisiert und ethanolpräzipitiert (2.2.4D und 2.2.4E). Im Anschluss an den Verdau wurde die Spaltreaktion mittels Agarosegel-Elektrophorese (2.2.4F) überprüft.

## K. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion Insert-DNA für Klonierungen amplifiziert. Hierzu wurden der Thermo-Cycler „My Cycler“ (BioRad) und die iproof DNA-Polymerase (BioRad) benutzt. Bei der iproof DNA-Polymerase handelt es sich um eine *Pfu*-ähnliche DNA-Polymerase, die allerdings eine höhere Extensionsgeschwindigkeit und Genauigkeit bietet. Nachfolgend findet sich ein typischer Reaktionsansatz, wobei iproof DNA-Polymerase stets zuletzt zugegeben wurde:

| | |
|---|---|
| Proben-DNA (50 ng/µl) | 0,4 µl (20 ng) |
| 6,25 µM Fwd. Primer | 2 µl (250 nM) |
| 6,25 µM Rev. Primer | 2 µl (250 nM) |
| 12,5 mM dNTPs | 1 µl (0,25 mM) |
| 5x iproof HF Puffer | 10 µl |
| steriles $H_2O$ | 32,6 µl |
| iproof DNA-Polymerase | 2 µl (0,6 U pro Reaktion) |
| **Gesamtvolumen** | **50 µl** |

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

| | | |
|---|---|---|
| I. | 1 Minute bei 98°C | |
| II. | 1. 10 Sekunden bei 98°C<br>2. 30 Sekunden bei einem Temperaturgradienten<br>3. 15-30 Sekunden pro zu amplifizierendem kb bei 72°C | **35x** |
| III. | 10 Minuten bei 72°C | |
| IV. | ∞ bei 4°C | |

Um eine geeignete Annealing-Temperatur für die Primer zu finden, wurde in Schritt II.2 ein Temperaturgradient im Bereich 5-15°C unter den vom Hersteller angegebenen Schmelztemperaturen angelegt. Schritt II.1 bis II.3 wurden 35 Mal wiederholt. Nach der Reaktion wurden 5 µl jedes Ansatzes auf ein Agarose-Gel geladen, um die Reaktionsprodukte zu beurteilen. Geeignete Ansätze wurden zusammengefasst und einer Phenolisierungs- und Fällungsreaktion (2.2.4D und 2.2.4E) unterzogen. Danach wurde ein Restriktionsverdau (2.2.4J) durchgeführt.

## L. Ligation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden stets nur überhängende DNA-Enden ligiert. Hierfür wurden maximal 100 ng an Vektor-DNA eingesetzt. Es wurden mehrere Ansätze mit molaren Verhältnissen von Vektor-DNA zu Insert-DNA zwischen 1:1 und 1:5 erstellt. Die genaue Menge an Insert-DNA berechnete sich nach folgender Formel:

$$m_{Insert\ \ DNA} = m_{Vektor\ \ DNA} \times \frac{Größe\ \ der\ \ Insert-DNA\ \ (in\ \ bp)}{Größe\ \ der\ \ Vektor-DNA\ \ (in\ \ bp)} \div molares\ \ Verhältnis$$

Die entsprechenden Mengen an Vektor- und Insert-DNA wurden dann zusammenpipettiert. Anschließend wurden 1,5 µl an 10x Reaktionspuffer und 1 µl T4 DNA Ligase (400 U/µl) zugegeben. Nachdem mit sterilem $H_2O$ auf 15 µl aufgefüllt worden war, erfolgte eine Inkubation für 4 h bei 16°C. Anschließend wurden 5 µl des Ligationsansatzes für eine Transformation (2.2.1D) verwendet.

M. Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte bei MWG Biotech (Martinsried). Hierfür wurden 1,5 µg an bei 37°C getrockneter Plasmid-DNA einer Midi-Präparation (2.2.4B) und, falls nötig, der entsprechende Primer in einem Volumen von 50 µl (in $H_2O$) und einer Konzentration von 10 pmol/µl eingeschickt.

### 2.2.5 Arbeiten mit Proteinen

Vorbemerkung: Die Lagerung von Proteinen erfolgte bei –80°C.

A. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur kolorimetrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford wurde das Roti®Quant-Konzentrat nach Vorschrift verdünnt und die Extinktion bei 590 nm und 450 nm im Vergleich zu BSA Standard-Werten gemessen. Der Bradford-Assay beruht auf der Wechselwirkung des Coomassie Brilliant-Blue-Farbstoffs G 250 mit kationischen und nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine.
Hierzu wurde zunächst 1 bis 20 µl der zu messenden Proteinlösungen in einer Küvette mit 1 ml der Roti® Quant-Lösung gemischt. Ebenso wurde mit jeweils 10 µl der BSA-Eichlösungen in den Konzentrationen 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1,5 und 5 µg/µl verfahren. Nach einer

Inkubation von 5 min bei RT wurden alle Proben bei einer Wellenlänge von 590 und 450 nm im Spektralphotometer „U-2000“ gegen reines $H_2O$ vermessen. Als Negativ-Kontrollen dienten hierbei entsprechende Volumina an Probenpuffer in 1 ml Roti®Quant-Lösung.

Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen wurde dann für jede Probe der Quotient aus $A_{590}$ und $A_{450}$ gebildet und im Anschluss jeweils der Quotient $A_{590}/A_{450}$ der 0 µg-BSA-Eichlösung (Negativkontrolle) abgezogen, was den korrigierten Quotienten (= korr. $A_{590}/A_{450}$) ergab. Zur Erstellung der Eichkurve wurden die eingesetzten Proteinmengen (1-50 µg) der BSA-Eichlösungen durch die jeweiligen korrigierten Quotienten $A_{590}/A_{450}$ geteilt und aus den Ergebnissen der Mittelwert gebildet. Mit diesem Mittelwert wurden nun die korrigierten Quotienten $A_{590}/A_{450}$ der Proben mit Zelllysat multipliziert. Durch Division des Ergebnisses durch das jeweils eingesetzte Lysatvolumen ließ sich dann die jeweilige Proteinkonzentration in µg/µl errechnen.

B. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Anschließend besteht die Möglichkeit der Färbung der Proteine im Gel oder des Transfers der Proteine auf eine Membran mit nachfolgender Immundetektion. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 10-20%ige, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet.

Zunächst wurden Glasplatten und Abstandshalter zusammengebaut und fixiert. Danach wurden 28 ml Trenngel gemischt und zwischen die Glasplatten gegossen. Ein Überschichten des Trenngels mit einem geringen Volumen an Wasser führte zur Glättung der Oberfläche. Nach ca. 60 min Polymerisationszeit wurde das Wasser abgeschüttet, 10 ml des 4%igen Sammelgels gemischt und auf das Trenngel gegossen. Anschließend wurde ein Gelkamm in der Stärke der verwendeten Abstandshalter eingesetzt. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde der Kamm vorsichtig entfernt, die obere Kammer montiert und vorsichtig mit Laufpuffer befüllt. Die entsprechenden Proben wurden mit 2x oder 5x SDS-Probenpuffer gemischt, so dass sich eine Endkonzentration von 1x SDS ergab, anschließend bei 100°C für 5 min gekocht und auf das Gel geladen. Nachdem die vertikale SDS-Polyacryamid-Gel-Apparatur komplett zusammengebaut und mit Laufpuffer befüllt worden

war, konnte die Elektrophorese für die Gelgröße 14 cm x 12 cm x 1,5 mm bei 500 V am Tag oder 10 V über Nacht unter Kühlung (10°C) durchgeführt werden. Für den Geltyp 8 cm x 4 cm x 0,75 mm oder 1 mm hingegen erfolgte die Elektrophorese ohne Kühlung bei RT und 120 V. Sobald das Bromphenolblau des Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Trenngel für das weitere Vorgehen entnommen. Im Anschluss daran wurde das Trenngel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (2.2.5C) oder für einen Western Blot (2.2.5D) verwendet.

C. Coomassie Brilliant Blue-Färbung von SDS-Polacrylamidgelen

Gele der Größe 14 cm x 12 cm x 1,5 mm wurden 40 min in einer Schale mit Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert; Gele der Größe 8 cm x 4 cm x 0,75 mm oder 1 mm hingegen nur 10 Minuten. Danach wurde die Färbelösung entfernt und die Gele wurden in Entfärbelösung gegeben, wobei zur Entfernung der Hintergrundfärbung die Entfärbelösung 6-8 Mal gewechselt wurde. Zur Dokumentation wurde das Gel gescannt.

D. Immundetektion von Proteinen (Western-Blot)

Beim Western-Blot wurden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (PVDF-Membran: 0,45 µm Porengröße Immobilon-P Transfer Membran) transferiert und immobilisiert, was sie der folgenden Immundetektion zugänglich macht.

Vor Vorwendung wurde die PVDF-Membran zunächst auf Gelgröße zugeschnitten, kurz in Methanol geschwenkt und dann in Transferpuffer überführt. Die zugeschnittenen Whatman-Papiere und die Schaumstoffpolster wurden kurz in Transferpuffer getränkt, das SDS-Polyacrylamid-Gel für mindestens 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Je nach Gelgröße wurden zwei unterschiedliche Transferverfahren angewendet.

Semidry-Verfahren (für Gele der Größe 8 cm x 4 cm x 0,75 mm oder 1 mm)

Beim Semidry-Verfahren wurden auf die Kathodenplatte des Transfer-Apparats (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell) 3 Lagen Whatman-Papier, das SDS-Polyacrylamid-Gel und die PVDF-Membran gelegt. Störende Luftblasen zwischen Gel und Membran wurden dann entfernt, indem mit einem Glasstab unter leichtem Druck über den Stapel gerollt wurde. Nachdem 3 weitere Lagen Whatman-Papier aufgebracht worden waren, wurden erneut auf dieselbe Art und Weise Luftblasen entfernt und der Apparat durch das Auflegen der Anodenplatte geschlossen. Der Transfer erfolgte bei RT und einer Spannung von 24 V für 1 bis 1,5 h.

Tankblot-Verfahren (für Gele der Größe 14 cm x 12 cm x 1,5 mm)

Zum Aufbau des Transfersystems wurde zunächst das Blotgitter geöffnet und auf die später der Anode zugewandte Seite des Gitters (graue Seite) wurden ein Schaumstoffpolster, 3 Lagen an Whatman-Papier, die PVDF-Membran, das SDS-Polyacrylamid-Gel und weitere 3 Lagen an Whatman-Papier gelegt. Nachdem Luftblasen zwischen Gel und Membran vorsichtig durch Vor- und Zurückrollen auf dem Stapel mit einem Glasstab herausgedrückt worden waren, wurde ein weiteres Schaumstoffpolster auf den Stapel gelegt. Das Blotgitter wurde geschlossen und in die mit Transferpuffer gefüllte Tankvorrichtung (Western-Transferkammer „TE 62“) gesteckt. Der Transfer erfolgte bei 1 A über 3 h unter ständiger Kühlung auf 10°C.

Immundetektion

Unabhängig vom Transferverfahren wurden nach dem Transfer die Banden des vorgefärbten Proteinmarkers mit einem Filzstift nachgezeichnet und die Membran für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler in Blocklösung inkubiert. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden ebenfalls auf einem Schüttler durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für 2 h bei RT mit dem in Blocklösung verdünnten Primärantikörper inkubiert. Danach wurde zuerst zwei Mal 10 min mit Waschlösung und dann zwei Mal 10 min mit Blocklösung gewaschen. Im Anschluss folgte eine einstündige Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper in Blocklösung, nach der die Membran vier Mal 10 min in Waschlösung, zwei Mal 10 min in 1x PBS und ein Mal 10 min in $H_2O$ gewaschen wurde.

Nach Abgießen des Wassers wurde auf die Membran ein Volumen einer 1:1 Mischung aus Luminol- und Oxidations-Reagenz des Western Lightning Chemiluminescence Reagent gegeben, das gerade ausreichte, um die Membran zu bedecken. Es folgte eine Inkubation von 1 min bei RT. Dann wurde die Membran luftblasenfrei in eine Klarsichtfolie gelegt und in eine Film-Kassette überführt. Die Detektion der Banden erfolgte durch das Auflegen eines Röntgenfilms in der Dunkelkammer. Je nach Primärantikörper und geladener Proteinmenge schwankten die Expositionszeiten zwischen 1 min und über Nacht. Nach erfolgter Exposition wurde der Film für 7 bis 10 Minuten in Eukobrom-Enwickler gegeben und nach kurzem Schwenken in Wasser mit Acido Fixer fixiert (15 Minuten). Anschließend wurde er 30 min in fließendem Wasser gewaschen und bei RT getrocknet.

E. Immunpräzipitation von Proteinen

Für die Immunpräzipitation (IP) von Proteinen wurde zunächst immer eine Suspension aus Protein A Sepharose- bzw. Protein G Sepharose-Beads in dem entsprechenden IP-Puffer hergestellt. Hierzu wurde ein entsprechendes Volumen an Beads in einem 3-4 fachen Volumen an IP-Puffer resuspendiert und bei 6.000 rpm und RT für 30 Sekunden zentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Nachdem dieser Waschschritt 3 Mal wiederholt worden war, wurden die Beads in 1 Volumen IP-Puffer aufgenommen, so dass eine 50%ige Beads-Suspension entstand. Das benötigte Säuger-Zelllysat wurde stets wie in 2.2.3J beschrieben hergestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei leicht unterschiedliche Methoden für die Immunpräzipitation verwendet.

Methode A:

Diese Methode wurde zum Testen von Antikörpern verwendet.

Zunächst wurde das benötigte Volumen an Zelllysat (pro IP wurden 250 bis 400 µg Gesamtprotein eingesetzt) mit IP-Puffer auf das gewünschte Endvolumen (400 bis 500 µl/IP) gebracht, und mit 100 µl einer 50%igen Beads-Suspension in einem 15 ml-Röhrchen für 30 bis 60 min bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert, um unspezifisch an Protein A bzw.

G bindende Proteine aus dem Lysat zu klären. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden ebenfalls auf einem Rotationsschüttler bei 4°C durchgeführt. Danach wurde die Suspension für 2 min bei 2.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329), der Überstand abgenommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. 20 bis 100 µl des Überstandes wurden als Input vor Immunpräzipitation für spätere Western-Blot-Analysen entnommen, sofort mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt, für 2 min bei 100°C gekocht und bei -20°C gelagert. Dem „vorgeklärten" Zelllysat wurden nun jeweils 100 µl an Zellkulturüberstand von Hybridomzellen (enthält den entsprechenden monoklonalen Antikörper) bzw. 3 bis 12 µl Kaninchen-Serum hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde das entsprechende Zellkulturmedium verwendet. Es erfolgte eine 2stündige Inkubation, während der die monoklonalen Antikörper an das betreffende Antigen banden. Danach wurden 40 bis 50 µl der 50%igen Beads-Suspension zugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154) bei 6.000 rpm und 4°C für 30 Sekunden. Der Überstand wurde für spätere Western-Blot-Analysen in toto in ein neues Reagiergefäß überführt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde in 600 bis 800 µl IP-Puffer resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Insgesamt wurden drei dieser Waschschritte durchgeführt. Anschließend wurde der Überstand restlos abgenommen und das Pellet in 30 bis 40 µl 2x SDS-Proben-Puffer resuspendiert, für 2 min bei 100°C gekocht und bei -20°C gelagert. Zum Laden der Proben auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (2.2.5B) wurden sie nochmals für 2 min bei 100°C gekocht, wobei jeweils die Hälfte der Probe aufgetragen wurde.

Methode B:

Diese Methode wurde für die Immunpräzipitation endogener Proteine optimiert. Im Unterschied zu Methode A wurden hierbei bereits vor der Immunpräzipitation die monoklonalen Antikörper an Protein A bzw. G gekoppelt. Pro IP wurden 0,5 bis 5 ml Zellkulturüberstand von Hybridomzellen mit demselben Volumen an IP-Puffer und 50 µl 50%iger Beads-Suspension gemischt und über Nacht bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Antikörper-gekoppelten Beads bei 2.000 rpm und 4°C für 2 min abzentrifugiert und analog zu Methode A drei Mal mit 800 µl IP-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde den Antikörper-gekoppelten Beads das vorgeklärte Zelllysat hinzugefügt und es erfolgte eine Inkubation für 4,5 h bei 4°C auf dem Rotationsschüttler. Im Unterschied zu Methode A wurde bei der Immunpräzipitation

endogener Proteine eine Gesamtmenge von 1 bis 2,5 mg Protein in einem Endvolumen von 1 ml verwendet. Die Vorklärung des Zelllysats erfolgte wegen des höheren Proteingehalts mit 200 µl 50%iger Beads-Suspension für 1 h bei 4°C. Das restliche Vorgehen gestaltete sich identisch zu Methode A.

F. Immunpräzipitation von Proteinen unter Chromatin-Immunpräzipitationsbedingungen zum Test von Antikörpern

Um herauszufinden, ob bestimmte monoklonale Antikörper auch zur Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) verwendet werden können, wurde eine Immunpräzipitation gemäß Methode A (2.2.5E) unter ChIP-Bedingungen durchgeführt. Da für LMX1B keine definitiven Zielgene bekannt sind, wurde anschließend zur Analyse ein Western-Blot (2.2.5D) anstatt einer quantitativen PCR-Reaktion durchgeführt. Daher wurde auf eine Quervernetzung von DNA und Proteinen mittels Formalin verzichtet.

Zunächst wurde ein Zellpellet in einem entsprechenden Volumen (100 bis 200 µl) SDS-Puffer resuspendiert. Danach wurde SDS in einer Endkonzentration von 0,5% zugegeben. Um die Zellen aufzuschließen, wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer Nadel in eine 1 ml-Spritze aufgezogen und mehrfach zwischen Spritze und Reagiergefäß hin- und herbewegt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154) bei 14.000 rpm und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde abgenommen und mit einem ½ Volumenanteil Triton-Verdünnungs-Puffer aufgefüllt. Auf Grund des hohen SDS-Gehalts konnte die Proteinkonzentration des Lysats nicht mittels Bradford-Bestimmung (2.2.5A) ermittelt werden, sondern wurde anhand der Pelletgröße und der Ergebnisse der Lyse eines gleichgroßen Pellets mit Brij®-Puffer abgeschätzt. Alle weiteren Schritte wurden analog zu 2.2.5E durchgeführt, wobei als IP-Puffer eine Mischung aus einem Volumen SDS+ Puffer und ½ Volumen Triton-Verdünnungs-Puffer benutzt wurde.

G. Aufreinigung von Proteinen über Nickel-Säulen

Zur Aufreinigung von His-Epitop-fusionierten Proteinen wurden Chromatographie-Säulen (Fassungsvolumen: 10 ml) aus Plastik in Kombination mit dem sog. „His Bind Resin“-Kit der

Firma Novagen verwendet. Die Bindekapazität betrug 10 mg Protein pro ml Säulenbett. Die Aufreinigung wurde bei RT durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina $H_2O$ gewaschen und das Säulenmaterial unter Verwendung von 10 Säulenvolumina Charge-Puffer mit Nickelionen beladen. Nachdem die Säule mit 5 Säulenvolumina Bindepuffer äquilibriert worden war, wurde das wie in 2.2.1E beschrieben hergestellte bakterielle Zelllysat geladen, wobei zur Sicherheit der Durchfluss stets gesammelt wurde. Danach wurde mit 15 Säulenvolumina gewaschen. Die Elution erfolgte fraktionsweise mit je einem halben Säulenvolumen Elutionspuffer, welcher Imidazol in einer Endkonzentration von 1 M enthielt. Es wurden in der Regel 12 Fraktionen gesammelt, wobei das Elutionsprofil des jeweiligen Proteins mittels Proteinbestimmung nach Bradford (2.2.5A) dokumentiert wurde. Die weitere Analyse der Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina $H_2O$ und 3 Säulenvolumina Strip-Puffer regeneriert und in Strip-Puffer bei 4°C gelagert.

## H. Aufreinigung von Antikörpern mit Protein A Sepharose-Säulen

Zur Aufreinigung monoklonaler Antikörper wurden Protein A Sepharose und Chromatographie-Säulen (Fassungsvolumen: 10 ml) benutzt. Zuerst wurde der pH-Wert des Zellkulturüberstandes (Gesamtvolumen 100 ml) durch Zugabe eines 1/10 Volumenanteils 1 M Tris pH 8,0 auf 8,0 eingestellt, was mittels eines pH-Indikatorpapiers kontrolliert wurde. Danach wurde ein Volumen von 1 ml an Protein A Sepharose Beads mit 100 mM Tris pH 8,0 gewaschen und jeweils 0,5 ml der Beads in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Im Anschluss wurden jeweils 50 ml des Zellkulturüberstandes hinzugegeben, wobei für spätere Analysen ein Aliquot als Input vor Aufreinigung bei 4°C aufbewahrt wurde. Nach einer Inkubation für 2 h bei 4°C auf einem Rotationsschüttler wurde die Suspension aus Zellkulturüberstand und Protein A Beads auf eine Säule geladen (Gesamtvolumen 100 ml), wobei der Durchfluss aufgefangen wurde. Die Säule wurde mit jeweils 10 ml (10% des Volumens) 100 mM Tris pH 8,0 und 10 mM Tris pH 8,0 gewaschen. Anschließend erfolgte die fraktionsweise Elution mit jeweils 500 µl 100 mM Glycin pH 3,0, wobei zum pH-Ausgleich jeder Fraktion 50 µl 1 M Tris pH 8,0 zugegeben wurden. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Western-Blot-Analyse. Die Fraktionen mit dem höchsten Antikörpergehalt wurden zusammengefasst, mit 0,02% Natrium-Azid versetzt und bei 4°C bzw. -20°C gelagert. Die Säule wurde mit jeweils 10 ml 2 M Harnstoff, 1 M

Lithiumchlorid und 100 mM Glycin pH 2,5 regeneriert, mit 50 ml 1x PBS gewaschen und bei 4°C in 1x PBS mit 0,02% Natrium-Azid gelagert.

## I. Dialyse von Proteinlösungen

Zur Dialyse von Proteinlösungen wurden sog. Slide-A-Lyzer Dialysekassetten der Firma Pierce mit einer Ausschlussgröße von 3,5 kDa verwendet. Nachdem die Kassette für ca. 1 min in Dialysepuffer hydratisiert worden war, wurde die Proteinlösung mit Hilfe einer 1 ml-Spritze über eine von vier im Kassettenrahmen befindlichen Öffnungen eingespritzt und überschüssige Luft evakuiert. Die Dialyse erfolgte bei 4°C gegen ein Volumen von 500 ml Dialysepuffer, wobei jeweils nach 1½, 3 und 12 Stunden der Puffer durch frischen Dialysepuffer ersetzt wurde. Danach wurde die Proteinlösung der Dialysekassette entnommen und einer Proteinbestimmung unterzogen (2.2.5A).

## J. Abspaltung von Epitopen mittels Endoproteasen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Abspaltung der His-Epitope der Proteinprodukte von pET16b/hLMX1B (1-53) und pET16b/hLMX1B (322-395) Faktor Xa der Firma Novagen verwendet. Hierzu wurden jeweils 100 µg des jeweiligen Peptids in 1x PBS, mit 7,5 µl 10x Reaktionspuffer und 2,5 U Faktor Xa versetzt und das Gesamtvolumen mit $H_2O$ auf 75 µl aufgefüllt. Gleichzeitig wurde als Positiv-Kontrolle eine Reaktion mit dem mitgelieferten Kontrollprotein gemäß den Empfehlungen des Herstellers angesetzt. Danach erfolgte eine Inkubation bei 21°C für 16 h. Zur Kontrolle der Spaltreaktion wurden jeweils 5 µl unverdautes bzw. verdautes Peptid auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (2.2.5B) geladen und das Gel nach erfolgter Elektrophorese einer Coomassie-Färbung (2.2.5C) unterzogen.

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen LMX1B

### 3.1.1 Konstrukte

Um monoklonale Antikörper herstellen zu können, müssen Tiere mit dem jeweiligen Antigen immunisiert werden. Als Antigene dienen zumeist Peptide, für deren rekombinante Produktion in Bakterien wiederum die Generierung von Expressionsplasmiden erforderlich ist.

Für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen LMX1B mussten also zuerst geeignete Antigene/Epitope festgelegt werden. Um Kreuzreaktivität der späteren Antikörper mit anderen Proteinen zu vermeiden, sollten die für die Immunisierung gewählten immunogenen Bereiche von LMX1B spezifisch für LMX1B sein, d.h. deren Aminosäuresequenzen sollten so in keinem anderen Protein zu finden sein. LMX1B besitzt als Mitglied der Familie der LIM-Homöodomäne-Proteine (Dunston et al., 2004) $NH_2$-terminal zwei proteinbindende LIM-Domänen (LIM1 mit 51 Aminosäuren und LIM2 mit 54 Aminosäuren) und darauf folgend eine DNA-bindende Homöodomäne (mit 60 Aminosäuren) (siehe Abbildung 2). Da sich LIM-Domänen in verschiedenen Proteinen wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Protoonkogen-Produkten und Zytoskelett-assoziierten Proteinen finden und die DNA-bindende Homöodomäne ebenfalls hochkonserviert ist, können diese Bereiche von LMX1B keinesfalls als Immunogene für die Generierung von Antikörpern dienen. Die Aminosäurenbereiche 1 bis 53 bzw. 322 bis 395 hingegen sind LMX1B-spezifisch und können somit für die Immunisierung von Tieren verwendet werden (siehe Abbildung 2).

Zur Herstellung des Konstruktes pET16b/hLMX1B (1-53) wurde zuerst der Basenpaarbereich 1-159 von humanem LMX1B ausgehend von cDNA aus HEK 293-Zellen mittels PCR amplifiziert, wobei Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Nde* I und *Bam*H I eingeführt wurden. Sowohl das PCR-Amplifikat (Insert) als auch der Vektor pET16b wurden dann mit den beiden Enzymen *Nde* I und *Bam*H I verdaut. Nach erfolgter Aufreinigung der

gewünschten DNA-Stücke mittels Agarosegel-Elektrophorese und anschließender DNA-Extraktion konnten Insert und Vektor miteinander ligiert werden.

Für die Klonierung von pET16b/hLMX1B (322-395) wurde der Bereich 966-1185 bp von humanem LMX1B aus pCRII/topohLMX1B mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Nco* I und *Eco*R V entnommen (Insert). Der Vektor pET16b wurde mit Hilfe des Enzyms *Xho* I geschnitten. Nachdem die 5'-überhangenden DNA-Enden mit Hilfe des Enzyms Klenow-DNA-Polymerase aufgefüllt worden waren, konnten Vektor und Insert ligiert werden.

Der pET16b-Vektor besitzt $NH_2$-terminal der einklonierten Peptide ein His-Epitop mit 10 Histidin-Resten, das die Aufreinigung des jeweiligen Proteinprodukts mit Hilfe von Nickelsäulen ermöglicht, sowie abwärts des His-Epitops eine Faktor-X-Spaltstelle, so dass das His-Epitop für bestimmte Anwendungen abgespalten werden kann (schematische Darstellung siehe Abbildung 3). Die Kontrolle der Transkription des Zielgens erfolgt bei pET-Vektoren durch einen T7-Promotor, weshalb sich Expressionstämme wie *E. coli* BL21 (DE3) und *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, die eine chromosomale Kopie der T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors enthalten, zur Proteinproduktion besonders eignen.

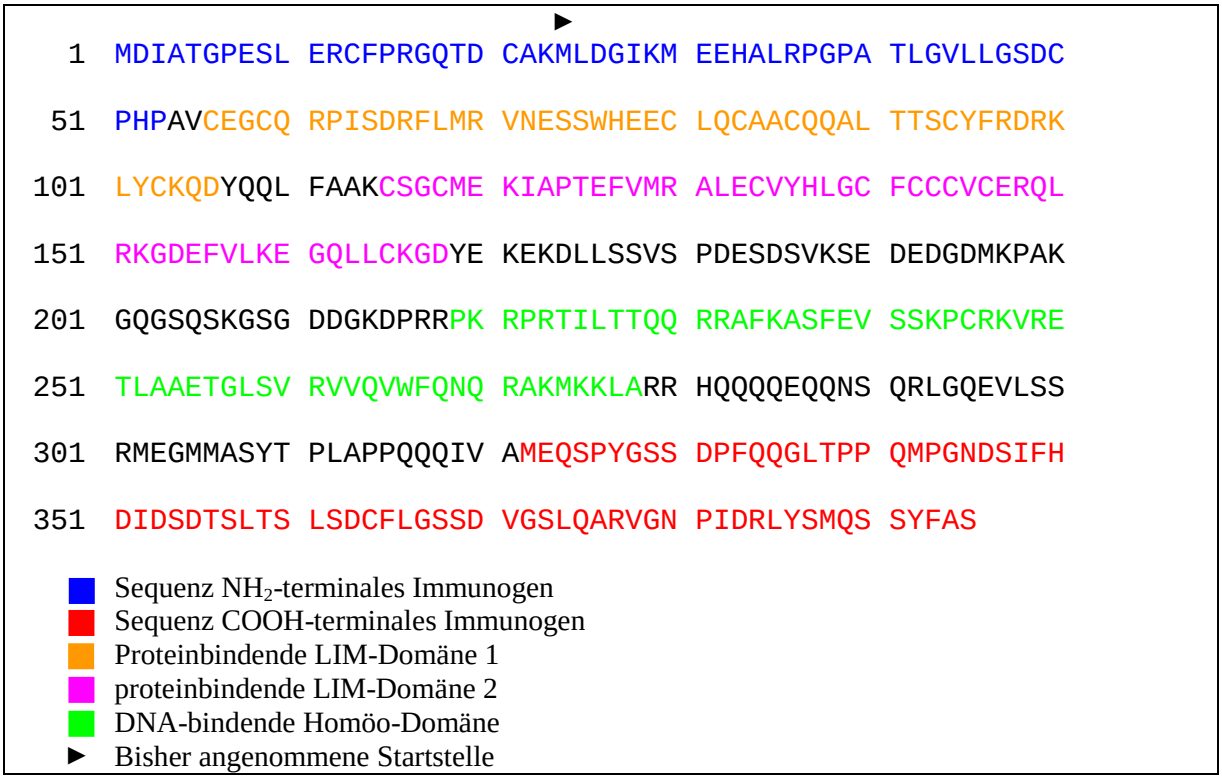



**Abbildung 2: Aminosäure-Sequenz von LMX1B nach (Dunston et al., 2004) (dargestellt ist die kurze Isoform mit 395 AS).**

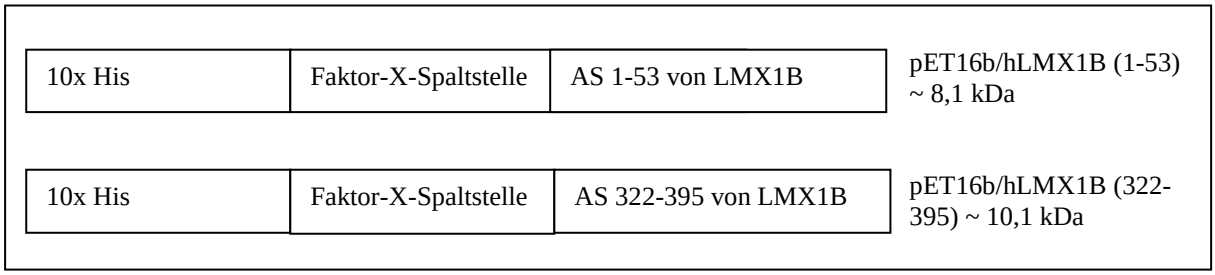



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Expressionskonstrukte für die Immunisierung von Tieren.**

### 3.1.2 Produktion und Aufreinigung der Proteinprodukte von pET16b/hLMX1B (1-53) und pET16b/hLMX1B (322-395)

A. hLMX1B (1-53)

Zur Produktion des Proteinprodukts von pET16b/hLMX1B (1-53) wurden die Expressionsstämme BL21 (DE3) und Rosetta (DE3) pLysS mit dem Konstrukt transformiert. Zunächst wurden Induktionskinetiken für beide Stämme durchgeführt, wobei die Induktion mit Hilfe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM bei einer $OD_{550}$ von 0,5 bzw. 1,0 gestartet wurde und bei 30°C bzw. 37°C erfolgte. Von allen Proben wurden gleiche Volumina auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen. Dadurch enthält jede Spur Protein von derselben Menge lysierter Bakterien. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie angefärbt. Hierbei konnten keine dem Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (1-53) entsprechenden Banden in einer errechneten Molekulargewichtshöhe von ~ 8,1 kDa nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die Induktionskinetiken wiederholt und die Proben einer Western-Blot-Analyse mittels anti-Poly-Histidin-Antikörper zugeführt. Abbildung 4 zeigt, dass sowohl in BL21 (DE3) als auch in Rosetta (DE3) pLysS ein Peptid mit His-Epitop produziert wurde, wobei die Größe des produzierten Peptids geringer war als das errechnete Molekulargewicht von ~ 8,1 kDa.

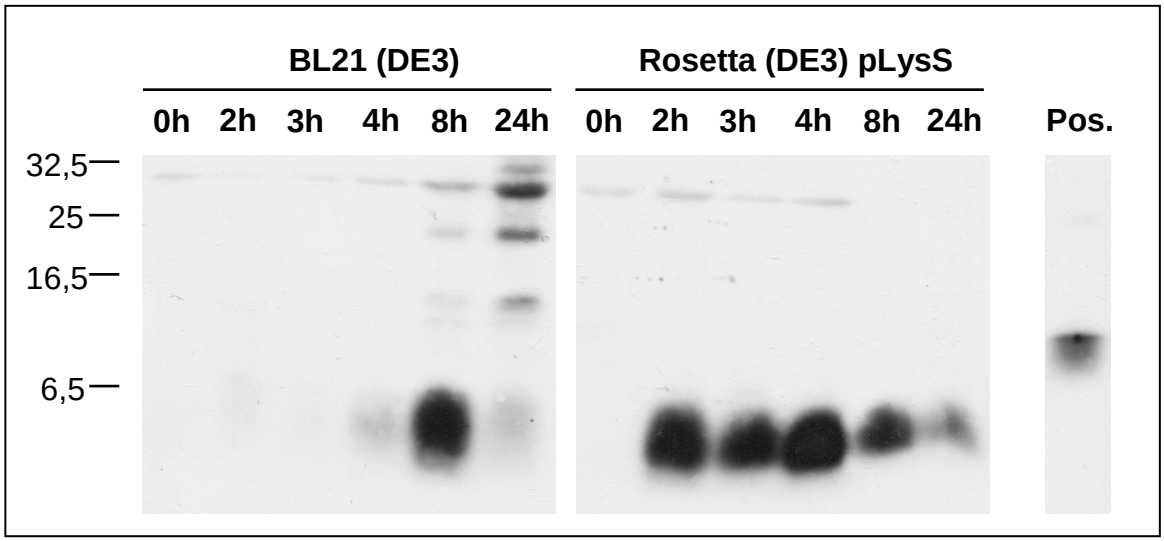



**Abbildung 4: Induktionskinetiken von pET16b/hLMX1B (1-53) in BL21 (DE3) und Rosetta (DE3) pLysS**. Die Expressionsstämme BL21 (DE3) und Rosetta (DE3) pLysS wurden mit dem Konstrukt pET16b/hLMX1B (1-53) transformiert. Die Bakterien wurden bei 37°C inkubiert und bei Erreichen einer $OD_{550}$ von 1,0 mit 1 mM IPTG induziert. Vor Induktion (0 h) und nach 2 h, 3 h, 4 h, 8 h und 24 h wurden Proben entnommen, mit dem jeweiligen Volumen 1x SDS-Probenpuffer versetzt und jeweils 30 µl jeder Probe auf ein 20% SDS-Polyacrylamidgel geladen. Als Positivkontrolle (**Pos.**) wurden 3 µg eines 9,3 kDa Peptids mit His-Epitop aufgetragen. In der anschließenden Western-Blot-Analyse wurde das synthetisierte Peptid mittels anti-Poly-Histidin-Antikörper und HRP-gekoppeltem anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert.

Als Grund dafür können unvollständige Translation oder Degradation aufgrund von Toxizität in Betracht kommen. Da die Intensität der Banden während der Induktionszeit zunächst zu- und dann wieder abnimmt, wurde von Degradation des Peptids in den Bakterien ausgegangen. Während bei dem Stamm BL21 (DE3) nur eine intensive Bande nach 8 h zu sehen ist, zeigen sich bei Rosetta (DE3) pLysS starke Banden im Zeitraum von 2 h bis 8 h. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die pLyS-Stämme zusätzlich ein Plasmid mit einer Chloramphenicol-Resistenz enthalten, das für T7-Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase, kodiert. Die basale Transkription der T7 RNA-Polymerase wird so blockiert, was eine frühzeitige Expression eines evtl. toxischen Zielproteins verhindert und somit Wachstum und Lebensfähigkeit der Bakterien positiv beeinflusst.

Daher wurde zur Optimierung der Proteinproduktion nurmehr der Expressionsstamm Rosetta (DE3) pLysS verwendet. Zusätzlich wurde die Konzentration von Ampicillin von 50 µg/ml auf 100 µg/ml angehoben, um die Plasmidstabilität zu erhöhen. Da angenommen wurde, dass das Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (1-53) für die Bakterien toxisch ist und deshalb degradiert wird, wurde zudem eine Strategie angewandt, welche die basale Expressionsrate senken sollte. Wenn Bakterienkulturen die stationäre Phase erreichen, fungieren zunächst Glucose und dann andere Kohlenstoffquellen wie z.B. Glyzerol als Nahrung. Der

Metabolismus alternativer Kohlenstoffquellen führt zu einer intrazellulären Erhöhung des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegels, was die Transkription vom *lacUV5*-Promotor und konsekutiv die Expression der T7 RNA-Polymerase stimuliert. Im Gegensatz zum Wildtyp-*lac*-Promotor ist der *lacUV5*-Promotor nicht so sensitiv gegenüber cAMP-Erhöhungen (Fried & Crothers, 1984), dennoch kommt es aber zu einer signifikanten Expression des Zielproteins (Grossman et al., 1998; Kelley et al., 1995; Pan & Malcolm, 2000). Dem kann entgegen gewirkt werden, indem LB-Medium zusätzlich mit Glucose versetzt wird. Für alle weiteren Experimente wurde LB-Medium mit 1% Glucose (m:v) verwendet. Zusätzlich wurde die Dauer der Vorkultur von „über Nacht“ auf nur drei Stunden begrenzt, so dass die Bakterienkultur die stationäre Phase nicht erreichen kann.

Mit den derart optimierten Bedingungen wurden erneut Induktionskinetiken für den Stamm Rosetta (DE3) pLysS durchgeführt, wobei die Induktion bei einer $OD_{550}$ von 0,4 gestartet und bei 30°C bzw. 37°C für insgesamt 4 h durchgeführt wurde. Jeweils 30 µl der Proben wurden für eine Western-Blot-Analyse mittels anti-Poly-Histidin-Antikörper verwendet (Abbildung 5). Hierbei konnten sowohl für die Induktion bei 30°C als auch bei 37°C Peptide mit His-Epitop zu den Zeitpunkten 2 h, 3 h und 4 h nachgewiesen werden. Alle Banden laufen erneut in einer Höhe unterhalb von 6,5 kDa; zudem sind Doppelbanden und verschmierte Banden sichtbar, weshalb von unvollständiger Translation und/oder Degradation auszugehen war. Die Bande mit der größten Intensität findet sich nach 2 h bei einer Induktionstemperatur von 30°C.

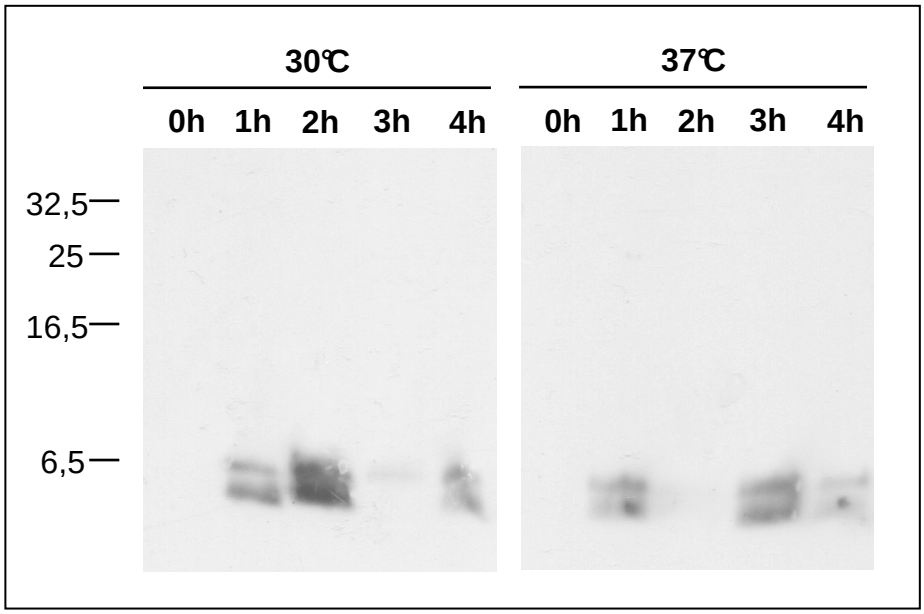



**Abbildung 5: Induktionskinetiken von pET16b/hLMX1B (1-53) in Rosetta (DE3) pLysS unter optimierten Bedingungen (3 h-Vorkultur, LB-Medium mit 1%Glucose, 100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol).** Das Konstrukt pET16b/hLMX1B (1-53) wurde in Rosetta (DE3) pLysS transformiert. Die Bakterien wurden bei einer $OD_{550}$ von 0,4 mit 1 mM IPTG induziert. Vor Induktion (0 h) und nach 1 h, 2 h, 3 h und 4 h wurden Proben entnommen, mit dem jeweiligen Volumen 1x SDS-Probenpuffer versetzt und jeweils 30 µl jeder Probe auf ein 20% SDS-Polyacrylamidgel geladen. In der anschließenden Western-Blot-Analyse wurde das synthetisierte Peptid mittels anti-Poly-Histidin-Antikörper und HRP-gekoppeltem anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert. **Die intensivste Bande ist nach 2 h bei 30°C zu erkennen.**

Trotz der zu niedrigen Molekulargewichtshöhe der Banden und des Bandenschmiers wurde beschlossen, eine Proteinproduktion in größerem Maßstab mit nachfolgender Aufreinigung über eine Nickel-Säule durchzuführen, um mehr Peptid für weitere Analysen zu gewinnen. Dies erfolgte unter den zuvor optimierten Bedingungen: transformierte Rosetta (DE3) pLysS-Bakterien wurden 2 h bei 30°C mit 1 mM IPTG induziert, die Bakterienzellen anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen und das Lysat auf eine Nickelsäule geladen. Nach Elution der Säule wurden mittels Proteinbestimmung nach Bradford die proteinhaltigen Eluatsfraktionen (Fraktion 2 und 3) ermittelt und vereinigt. In Abbildung 6 A ist ein Western-Blot dargestellt, bei dem 2 µg der vereinigten Fraktionen 2 und 3 mit Hilfe eines anti-Poly-Histidin-Antikörpers nachgewiesen werden konnten. Nach einer Dialyse gegen 1x PBS wurden 10 µg an Protein auf SDS-Polyacrylamidgele geladen und im Anschluss an die Elektrophorese mit Coomassie gefärbt (siehe Abbildung 6 B). Abbildung 6 A zeigt, dass ein Peptid mit His-Epitop synthetisiert wurde, das sauber und ohne Kontaminationen von der Säule eluiert (siehe Abbildung 6 B).

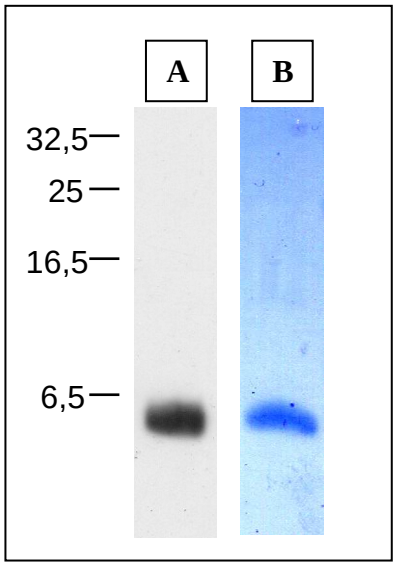



**Abbildung 6: Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (1-53) nach Elution von der Nickelsäule (A) und Dialyse gegen 1x PBS (B). Abbildung A:** Das Konstrukt pET16b/hLMX1B (1-53) wurde in Rosetta (DE3) pLysS transformiert. Die Bakterien wurden bei einer $OD_{550}$ von 0,4 mit 1 mM IPTG für 2 h bei 30°C induziert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall. Das bakterielle Zelllysat wurde mittels Nickelsäule aufgereinigt und die proteinhaltigen Eluatsfraktionen 2 und 3 vereinigt. 2 µg Protein der vereinigten Fraktionen 2 und 3 wurden auf ein 20% SDS-Polyacrylamidgel geladen. In der anschließenden Western-Blot-Analyse wurde das synthetisierte Peptid mittels anti-Poly-Histidin-Antikörper und HRP-gekoppeltem anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert. **Abbildung B:** Das in Elutionspuffer gelöste Protein der vereinigten Fraktionen 2 und 3 wurde gegen 1x PBS-Puffer dialysiert. Im Anschluss wurden 10 µg Protein auf ein 20% SDS-Polyacrylamidgel geladen und dieses nach erfolgter Elektrophorese mit Coomassie gefärbt. **Es zeigte sich, dass das Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (1-53) als einzelne Bande ohne Kontaminationen von der Säule eluiert.**

Da die Bande aber unter der errechneten Molekulargewichtshöhe von ~ 8,1 kDa läuft, wurde das Molekulargewicht des Peptids mittels Massenspektrometrie bestimmt (Prof. Dr. Rainer Deutzmann, Lehrstuhl Biochemie 1 der Universität Regensburg). Die Messung ergab, dass das Molekulargewicht des produzierten Peptids 5 Da unterhalb des errechneten Wertes lag. Diese Abweichung ist so gering, dass sie nicht durch eine alterierte Proteinsequenz begründet sein kann. Die großen Molekulargewichtsunterschiede zwischen SDS-PAGE und Massenspektrometrie lassen sich dadurch erklären, dass die SDS-PAGE nach Laemmli das Molekulargewicht von Proteinen unter 10 kDa nur sehr ungenau wiedergibt (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Rainer Deutzmann, Lehrstuhl Biochemie 1 der Universität Regensburg). Um aber letztendgültige Sicherheit bezüglich der Aminosäuren-Sequenz zu erlangen, wurde das Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (1-53) mittels Edman-Abbau (Edman, 1949) (Prof. Dr. Rainer Deutzmann, Lehrstuhl Biochemie 1 der Universität Regensburg) sequenziert. Zuvor war mittels Faktor Xa das His-Epitop abgespalten worden, da dieses eine Sequenzierung erschwert. Hierzu wurden 100 µg des Peptids in 1x PBS mit 7,5 µl 10x Reaktionspuffer und 2,5 U Faktor Xa versetzt, das Gesamtvolumen wurde mit $H_2O$ auf 75 µl

aufgefüllt und der gesamte Ansatz für 16 h bei 21°C inkubiert. Im Edman-Abbau ergaben sich eine Haupt- und eine Nebensequenz, die beide vollkommen identisch mit der translatierten Sequenz von pET16b/hLMX1B (1-53) waren (Abbildung 7).

| | |
|---|---|
| **Hauptsequenz Edman-Abbau** | **HMDIATGPESLERC** |
| **Nebensequenz Edman-Abbau** | **CFPRGQTDCA** |
| **Sequenz pET16b/hLMX1B (1-53)** | HHHHHHHHHHSSGHIEGR**HMDIATGPESLERCFPRGQTDCA**KML |
| | DGIKMEEHALRPGPATLGVLLGSDCPHP |

**Abbildung 7: Edman-Abbau des Proteinprodukts von pET16b/hLMX1B (1-53).** Der grau markierte $NH_2$-Terminus wurde vor Durchführung des Edman-Abbaus mit Faktor Xa (Novagen) abgespalten. Blau gekennzeichnet sind die im Edman-Abbau ermittelte Haupt- und Nebensequenz sowie der übereinstimmende Bereich des Proteinprodukts von pET16b/hLMX1B (1-53).

Mit Hilfe der optimierten Bedingungen (Induktion bei 30°C für 2 h) ergab sich bei den folgenden Aufreinigungen eine Proteinausbeute von bis zu 3,5 mg pro Liter Bakterienkultur. Während dieser Arbeit wurde eine Gesamtmenge an hLMX1B (1-53) von ca. 13 mg produziert.

B. hLMX1B (322-395)

Zur Produktion des Proteinproduktes von pET16b/hLMX1B (322-395) wurden ebenfalls Rosetta (DE3) pLysS als Expressionsstamm und die für pET16b/hLMX1B (1-53) optimierten Mediumbedingungen verwendet: LB-Medium mit 1% Glucose, 100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol. Ausgehend von einer 3 h-Vorkultur wurden Induktionskinetiken bei 30°C und 37°C durchgeführt, wobei die Induktion bei einer $OD_{550}$ von 0,4 gestartet wurde. Da die SDS-PAGE der Proben mit nachfolgender Coomassie-Färbung der Gele keine dem Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (322-395) entsprechende Banden erbrachte, erfolgte eine Western-Blot-Analyse der Proben. Hierzu wurden 30 µl der Proben auf ein 20% SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach erfolgter Elektrophorese und Transfer auf eine PVDF-Membran wurde das synthetisierte Peptid mittels anti-Poly-Histidin-Antikörper und HRP-gekoppeltem anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert. Abbildung 8 zeigt, dass sowohl bei einer Induktionstemperatur von 30°C als auch 37°C ein Protein mit His-Epitop produziert wird. Die Intensität der Banden nimmt über die Zeit ab, was ein Hinweis auf Degradation eines toxischen Proteins sein könnte. Die Banden laufen auf einer Höhe von ca. 6,5 kDa und somit unterhalb des errechneten Molekulargewichts von 10,1 kDa. Dies kann aber auch darin

begründet sein, dass die SDS-PAGE nach Laemmli das tatsächliche Molekulargewicht von Proteinen ≤ 10 kDa nur unzureichend wiedergibt (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Rainer Deutzmann, Lehrstuhl Biochemie 1 der Universität Regensburg). Die intensivste Bande - und damit auch das meiste synthetisierte Peptid - zeigt sich bei einer Induktionstemperatur von 37°C nach 1 h.

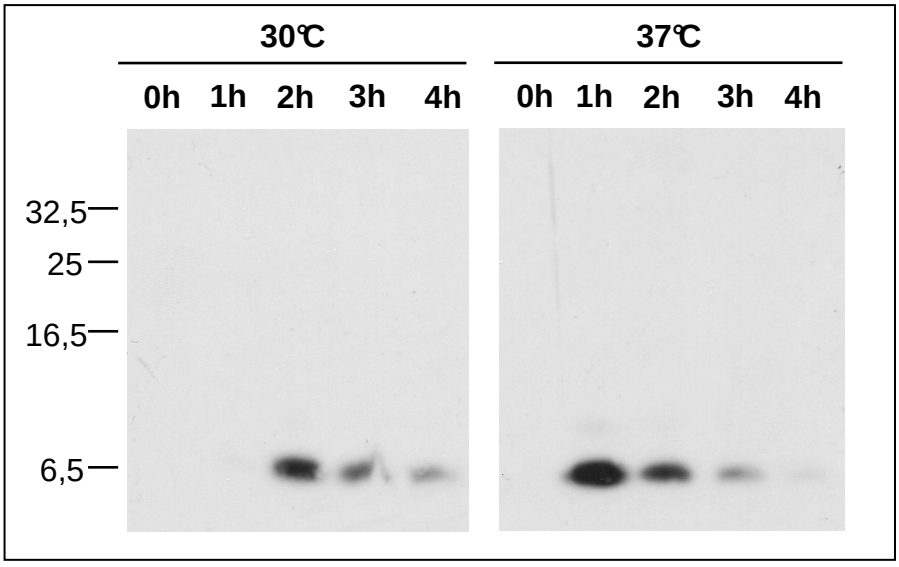



**Abbildung 8: Induktionskinetiken von pET16b/hLMX1B (322-395) in Rosetta (DE3) pLysS unter optimierten Bedingungen (3 h-Vorkultur, LB-Medium mit 1%Glucose, 100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol).** Das Konstrukt pET16b/hLMX1B (322-395) wurde in Rosetta (DE3) pLysS transformiert. Die Bakterien wurden bei einer $OD_{550}$ von 0,4 mit 1 mM IPTG induziert. Vor Induktion (0 h) und nach 1 h, 2 h, 3 h und 4 h wurden Proben entnommen, mit dem jeweiligen Volumen 1x SDS-Probenpuffer versetzt und jeweils 30 µl jeder Probe auf ein 20% SDS-Polyacrylamidgel geladen. In der anschließenden Western-Blot-Analyse wurde das synthetisierte Peptid mittels anti-Poly-Histidin-Antikörper und HRP-gekoppeltem anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert. **Die intensivste Bande ist nach 1 h Induktion bei 37°C zu erkennen.**

Bei allen folgenden Proteinproduktionen in größerem Maßstab wurden die Bakterien daher bei einer $OD_{550}$ von 0,4 mit 1 mM IPTG für 1 h bei 37°C induziert. Mittels Ultraschall wurde bakterielles Zelllysat hergestellt und dieses durch eine Nickelsäule aufgereinigt. In der kolorimetrischen Proteinbestimmung nach Bradford ergab sich, dass der Großteil an Protein in den Eluatsfraktionen 2 und 3 vorhanden war. Insgesamt konnten pro Liter Bakterienkultur ca. 2,5 mg Protein produziert werden. Die proteinhaltigen Eluatsfraktionen wurden vereinigt und gegen 1x PBS dialysiert. Während der Dialyse kam es zu einer leichten Präzipitation des Peptids, was allerdings dessen Immunogenität nicht beeinträchtig (Harlow & Lane, 1988). Beim Absaugen der Proteinlösung aus der Dialysekassette mit Hilfe einer 1 ml-Spritze und dem nachfolgenden Überführen in ein neues Reagiergefäß ging das Peptid größtenteils wieder in Lösung über, so dass makroskopisch kein ausgefallenes Protein mehr sichtbar war. In

Abbildung 9 sind 10 µg des Proteinproduktes von pET16b/hLMX1B (322-395) nach Dialyse zu sehen. Das Peptid ist frei von Kontaminationen, läuft aber – wie bereits oben besprochen – unterhalb der errechneten Molekulargewichtshöhe von 10,1 kDa.

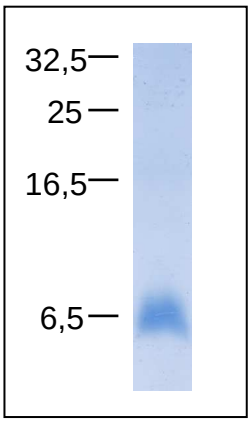



**Abbildung 9: Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (322-395) nach Elution von der Nickelsäule und Dialyse gegen 1x PBS.** Das Konstrukt pET16b/hLMX1B (322-395) wurde in Rosetta (DE3) pLysS transformiert. Die Bakterien wurden bei einer $OD_{550}$ von 0,4 mit 1 mM IPTG für 1 h bei 37°C induziert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall. Das bakterielle Zelllysat wurde mittels Nickelsäule aufgereinigt, die proteinhaltigen Eluatsfraktionen 2 und 3 vereinigt und gegen 1x PBS dialysiert. 10 µg Protein wurden auf ein 20% SDS-Polyacrylamidgel geladen und dieses nach erfolgter Elektrophorese mit Coomassie gefärbt. **Es zeigt sich das Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (322-395) als eine Bande mit leichtem Bandenschmier ohne Kontaminationen in einer Molekulargewichtshöhe von 6,5 kDa.**

Um letzte Sicherheit zu erhalten, dass es sich bei dem synthetisierten Protein um das Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (322-395) handelt, wurde beschlossen, wie schon bei dem Peptid hLMX1B (1-53) eine Massenspektrometrie sowie eine Sequenzierung mittels Edman-Abbau nach Abspaltung des His-Epitops durchzuführen. Aufgrund von technischen Problemen konnte das Molekulargewicht massenspektrometrisch nicht bestimmt werden. Der Edman-Abbau ergab allerdings eine Aminosäuren-Sequenz, die vollkommen identisch mit der translatierten Sequenz von pET16b/hLMX1B (322-395) war (Abbildung 10). Während dieser Arbeit wurde eine Gesamtmenge an hLMX1B (322-395) von ca. 10 mg produziert.

| | |
|---|---|
| **Sequenz Edman-Abbau** | **HMLDMEGSPYGSSDPFQQGLTPPQMP** |
| **Sequenz pET16b/hLMX1B (322-395)** | HHHHHHHHHHSSGHIEGR**HMLDMEQSPYGSSDPFQQGLTPPQMP**GNDSIFHDIDSDTSLTSLSDCFLGSSDVGSLQARVGNPIDRLYSMQSSYFAS |

**Abbildung 10: Edman-Abbau des Proteinprodukts von pET16b/hLMX1B (322-395).** Der grau markierte $NH_2$-Terminus wurde vor Durchführung des Edman-Abbaus mit Faktor Xa (Novagen) abgespalten. Blau gekennzeichnet sind die im Edman-Abbau ermittelte Sequenz sowie der übereinstimmende Bereich des Proteinprodukts von pET16b/hLMX1B (322-395).

### 3.1.3 Immunisierung von Mäusen und Serum-Antikörpertiterbestimmung (ELISA)

A. Immunisierung

Nachdem ausreichende Mengen der Proteinprodukte von pET16b/hLMX1B (1-53) und pET16b/hLMX1B (322-395) produziert worden waren, konnte mit der Immunisierung von jeweils 6 Balb/c-Mäusen pro Peptid begonnen werden. Hierzu wurde aus dem jeweiligen Peptid in 1x PBS und Titermax Classic Adjuvant eine Emulsion erzeugt, was die Immunogenität im Vergleich zu reinem Peptid in 1x PBS deutlich steigerte (Hunter et al., 1981). Jeder Maus wurden insgesamt drei Mal 100 µg Peptid in Form dieser Emulsion im Abstand von drei Wochen bzw. zwei Wochen subkutan an vier verschiedenen Stellen gespritzt. Nach weiteren zwei Wochen erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 100µg Peptid in 1x PBS ohne adjuvante Substanzen, da ansonsten die Gefahr einer schweren, aseptischen Peritonitis bestünde. 5 Tage nach der intraperitonealen Injektion wurde der Maus die Milz entnommen und die Milzzellen mit Myelomzellen fusioniert. Die insgesamt 6 Mäuse pro Peptid wurden zum Zwecke der Immunisierung in drei Gruppen à 2 Tiere eingeteilt; die Immunisierung wurde mit zwei Wochen Zeitabstand zwischen den jeweiligen Gruppen durchgeführt.

Im Verlauf der Immunisierung kam es bei keinem Tier zu ernsthaften Komplikationen. Bei einigen Tieren bildeten sich nach wiederholten, subkutanen Injektionen Verhärtungen an den Einstichorten aus, bei denen es sich am wahrscheinlichsten um Fremdkörpergranulome handelte.

B. Auswahl des Tieres mit der besten Immunantwort

Am 10. Tag nach der dritten subkutanen Injektion (2. „Boost“) wurde den Balb/c-Mäusen Blut entnommen, um das Tier bzw. die Tiere mit der besten Immunantwort auszuwählen. Hierzu wurde die Spitze des unter einer Wärmelampe hyperämisierten Schwanzes abgeschnitten und das austretende Blut mit einer heparinisierten Kapillare aufgefangen. Nachdem das Blut geronnen war, wurde mittels Zentrifugation Serum gewonnen.

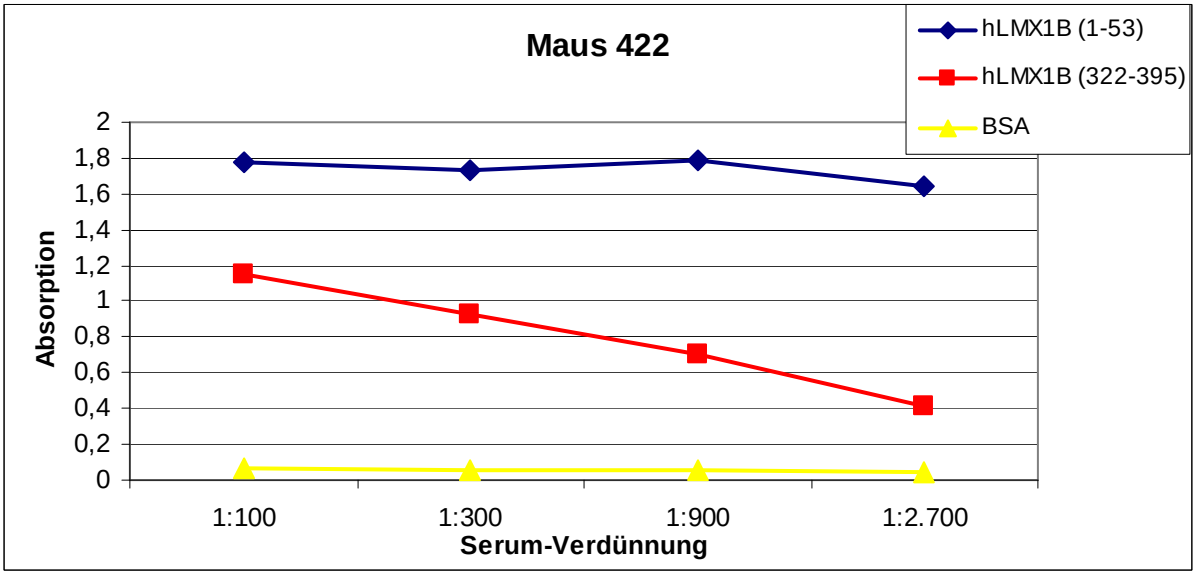
Da im Serum eine Vielzahl unterschiedlicher Immunglobuline vorhanden ist und somit die Gefahr unspezifischer Antikörper-Antigen-Reaktionen im ELISA gegeben ist, wurden neben dem spezifischen Peptid, gegen das auch die Immunisierung stattfand, mehrere unspezifische Peptide verwendet: So wurde z.B. bei Tieren, die gegen hLMX1B (1-53) immunisiert wurden, hLMX1B (322-395) (und umgekehrt) sowie BSA und ein Kontrollpeptid ohne His-Epitop benutzt. Alle Peptide wurden durch eine Inkubation an das Polystyren der 96-Loch-Platten immobilisiert. Die Verdünnungen der jeweiligen Seren dienten als Primärantikörper; gebundene Primärantikörper wurden mittels HRP-konjugierter anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert.

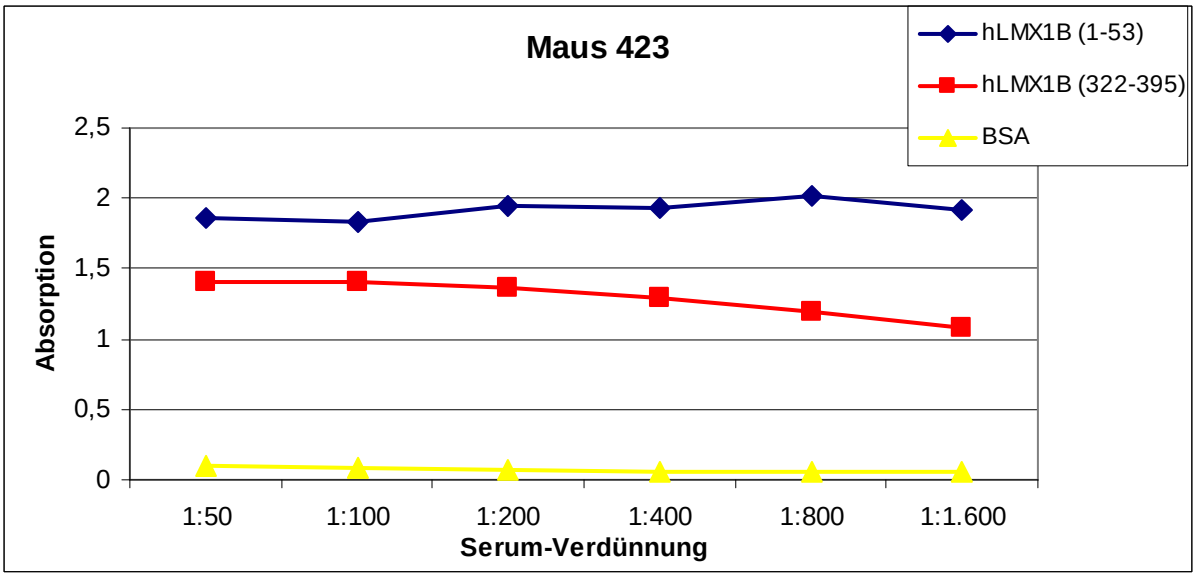
Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Titerbestimmungen für die Tiere 422, 423, 395, 396, 195 und 196, denen das Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (1-53) injiziert worden war. Da die Mäuse 422 und 423 diejenige Gruppe bildeten, mit der die Immunisierung begonnen worden war, mussten erst die optimalen Serum-Verdünnungen ermittelt werden. Im initialen ELISA wurden diese Verdünnungen zu niedrig gewählt, wodurch es beim Auslesen der Platte zu vollkommen gesättigten Signalen kam (Daten nicht gezeigt). Für den nachfolgenden ELISA stand somit nurmehr der Rest an Serum zur Verfügung, weshalb sich die bei den Mäusen 422 und 423 gewählten Verdünnungen von den später durchgeführten Experimenten unterscheiden. Auf wiederholte Blutabnahmen oder die Abnahme aus dem retrobulbären Plexus, einem Venengeflecht, das die Abnahme eines höheren Blutvolumens ermöglicht, wurde verzichtet, um die bereits immunisierten Tiere nicht zu gefährden. Bei den folgenden Tieren wurden je nach Menge des gewonnenen Serums Verdünnungsreihen bis 1:25.000 bzw. 1:51.200 verwendet.

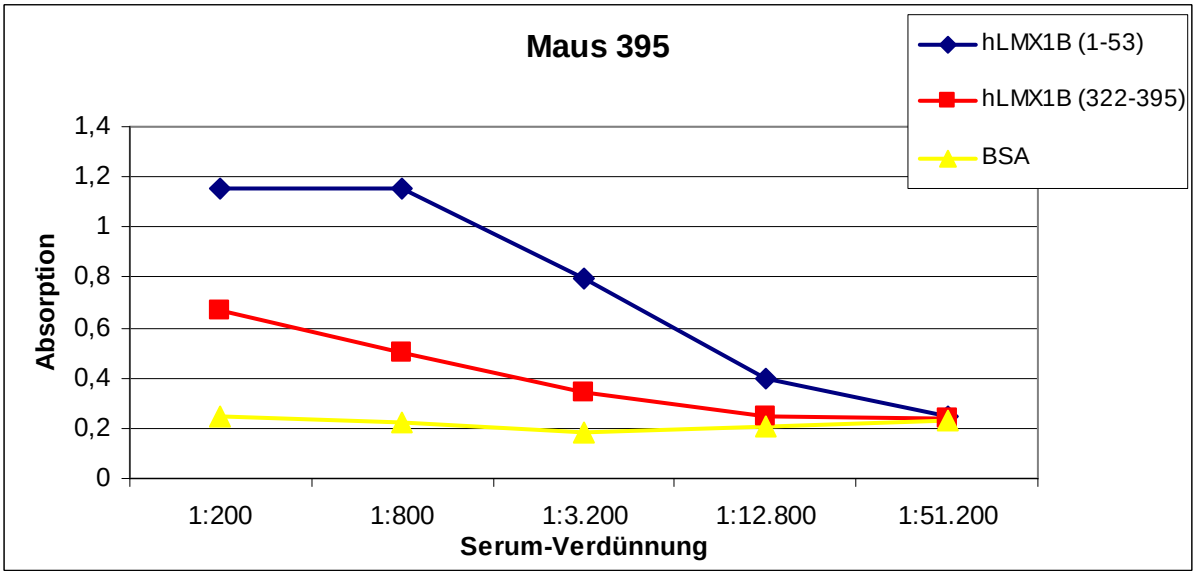
Bezüglich der Auswertung ist anzuführen, dass zwar bei den unterschiedlichen Experimenten die Entwicklungszeit mit TMB-Entwickler-Lösung konstant gehalten wurde, die absoluten Werte aber trotzdem nur eingeschränkt verglichen werden können. Betrachtet man Abbildung 11, so ist augenfällig, dass bei allen Tieren ein hoher Antikörpertiter gegenüber hLMX1B (1-53), dem Peptid, mit dem die Immunisierung durchgeführt wurde, besteht. Darüber hinaus weisen auch alle Tiere Immunglobuline auf, die mit hLMX1B (322-395) reagieren. Da beide Peptide $NH_2$-terminal über die identische Sequenz (His-Epitop und Faktor X-Spaltstelle) verfügen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die mit hLMX1B (322-395) reagierenden Antikörper gegen eben dieses Epitop gerichtet sein könnten. Um dies zu bestätigen, wurde bei Maus 195 und 196 zusätzlich gegen ein Kontroll-Peptid ohne His-Epitop oder Faktor X-

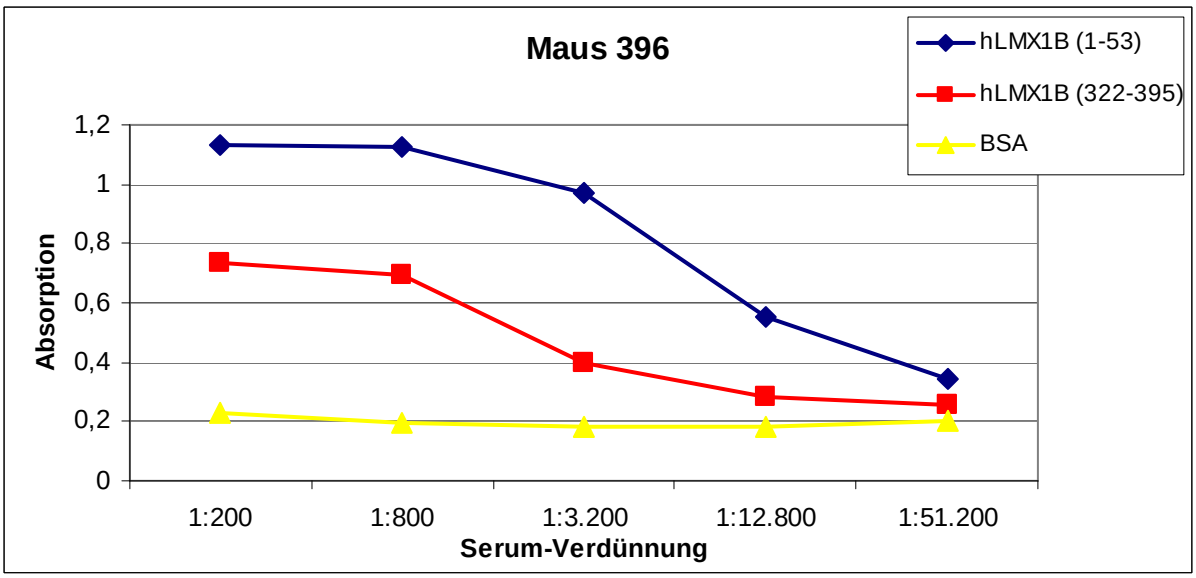
Spaltstelle getestet. Die Titer bezüglich dieses Kontroll-Peptids waren sehr niedrig und mit denen gegen BSA vergleichbar, was die oben aufgestellte Hypothese unterstützte. Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit geprüft, ob sich durch die Immunisierung mit den beiden gewählten Peptiden auch Antikörper gegen ein His-Epitop herstellen lassen.

Als Hauptauswahlkriterium für die Tiere mit der besten Immunantwort wurde das Verhältnis aus spezifischem zu unspezifischem Signal herangezogen. Maus 195 weist ähnliche Titer gegen hLMX1B (1-53) und hLMX1B (322-395) auf und ist daher für eine mögliche Fusion von Milzzellen und Myelomzellen weniger geeignet. Bei den restlichen Tieren ist jeweils das spezifische Signal höher als das Unspezifische. Wenn man den Verdünnungsbereich zwischen ca. 1:1.000 und 1:3.000 betrachtet, fällt auf, dass das unspezifische Signal früher abfällt als das Spezifische; besonders ausgeprägt ist dies bei Maus 422 der Fall: Die Werte für hLMX1B (322-395) fallen rapide, während die Werte für hLMX1B (1-53) annähernd gleich bleiben; bei den anderen Tieren fallen die spezifischen Signale ebenfalls ab. Daher wurde die Maus 422 als das Tier mit der besten Immunantwort auf die Peptid-Vakzinierung für die Entnahme der Milz und die Fusion von Milz- und Myelomzellen ausgewählt. Für die Mäuse 423, 395, 396 und 196 wurde die Immunisierung nur bis zur dritten, subkutanen Gabe durchgeführt, so dass für den Fall, dass mit Maus 422 keine geeigneten monoklonalen Antikörper generiert werden könnten, diese Tiere als Reserve zur Verfügung stünden und jederzeit eine intraperitoneale Injektion mit nachfolgender Milzentnahme durchgeführt werden könnte.




Maus 423
hLMX1B (1-53)
hLMX1B (322-395)
BSA
Absorption
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1:50
1:100
1:200
1:400
1:800
1:1.600
Serum-Verdünnung


Maus 395
hLMX1B (1-53)
hLMX1B (322-395)
BSA
Absorption
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
1:200
1:800
1:3.200
1:12.800
1:51.200
Serum-Verdünnung


Maus 396
hLMX1B (1-53)
hLMX1B (322-395)
BSA
Absorption
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
1:200
1:800
1:3.200
1:12.800
1:51.200
Serum-Verdünnung

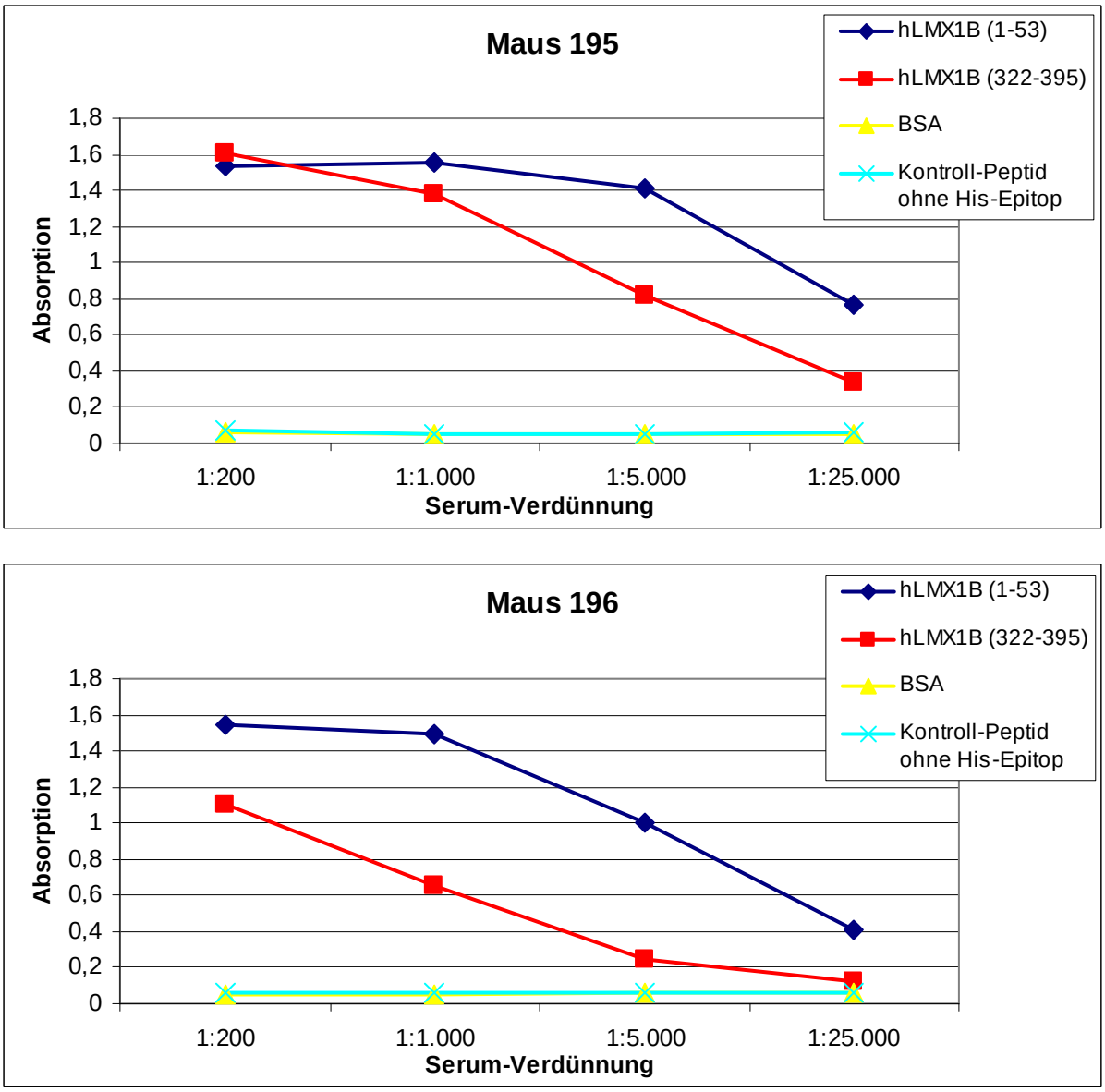
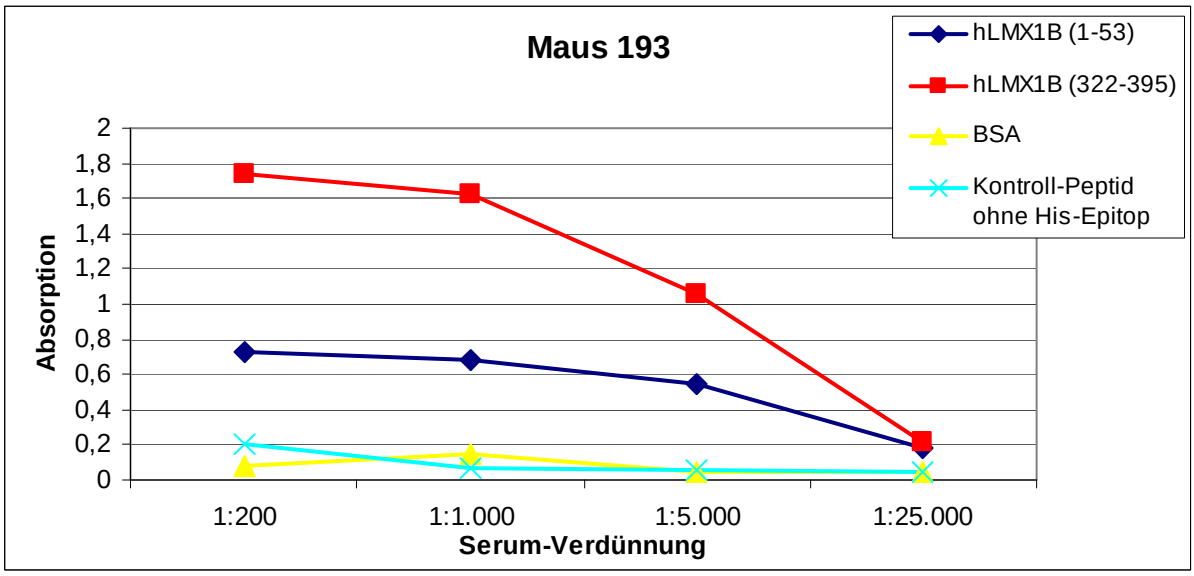
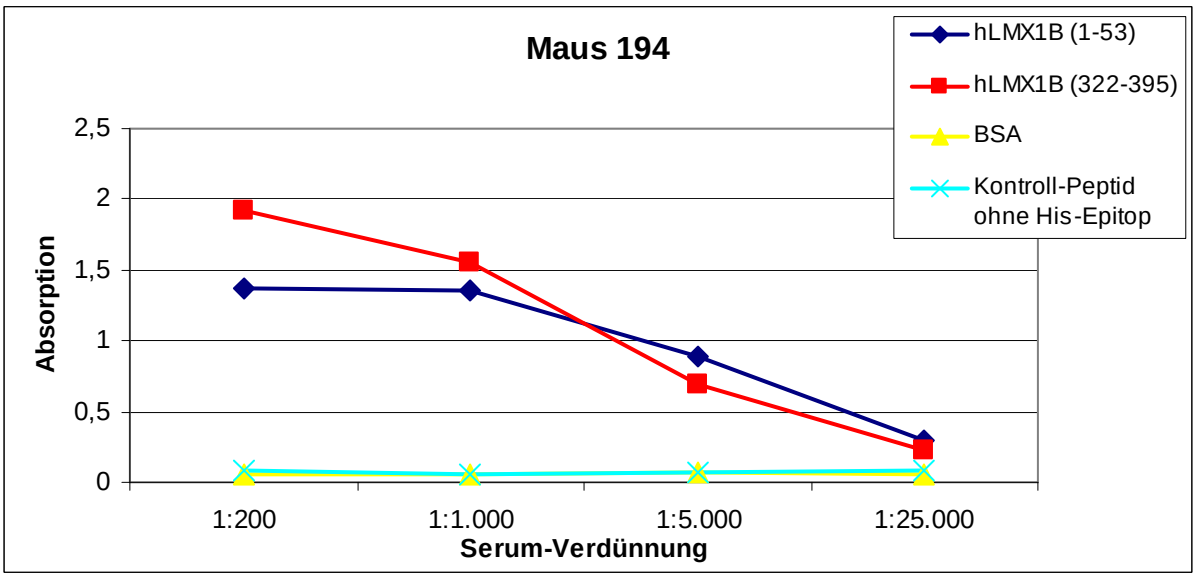


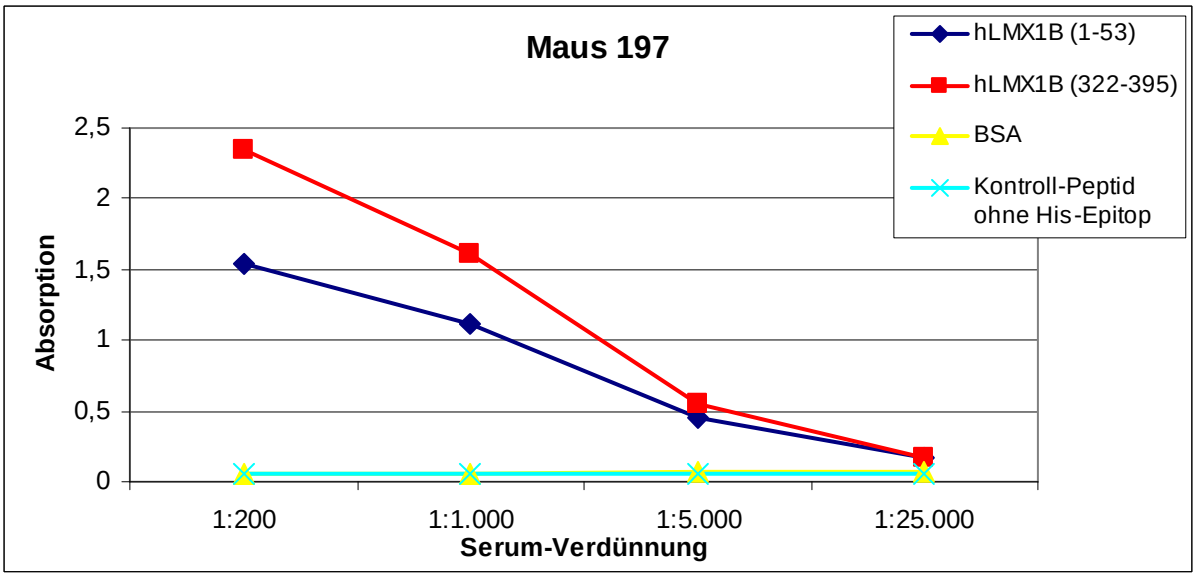

**Abbildung 11: Bestimmung der Antikörper-Titer der Tiere, die gegen das Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (1-53) immunisiert worden waren, mittels ELISA.** Den Mäusen 422, 423, 395, 396, 195 und 196 wurde am 10. Tag nach dem 2. „Boost“ Blut entnommen und daraus durch Zentrifugation Serum gewonnen. 96-Loch-Platten wurden bei 4°C in einer „feuchten Kammer“ über Nacht mit den jeweiligen Peptiden inkubiert. Die angegebenen Verdünnungen der Seren wurden für 2 h mit den an Polystyren immobilisierten Peptiden inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden gebundene Primärantikörper mit HRP-konjugierten anti-Maus-IgG-Antikörpern detektiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TMB-Entwicklerlösung visualisiert und die Platten nach Abstoppen der Reaktion mit 5,3% Schwefelsäure bei 450 nm ausgelesen. **Auf Grund des besten Verhältnisses von spezifischem zu unspezifischem Signal wurde Maus 422 für die Fusion ausgewählt.**

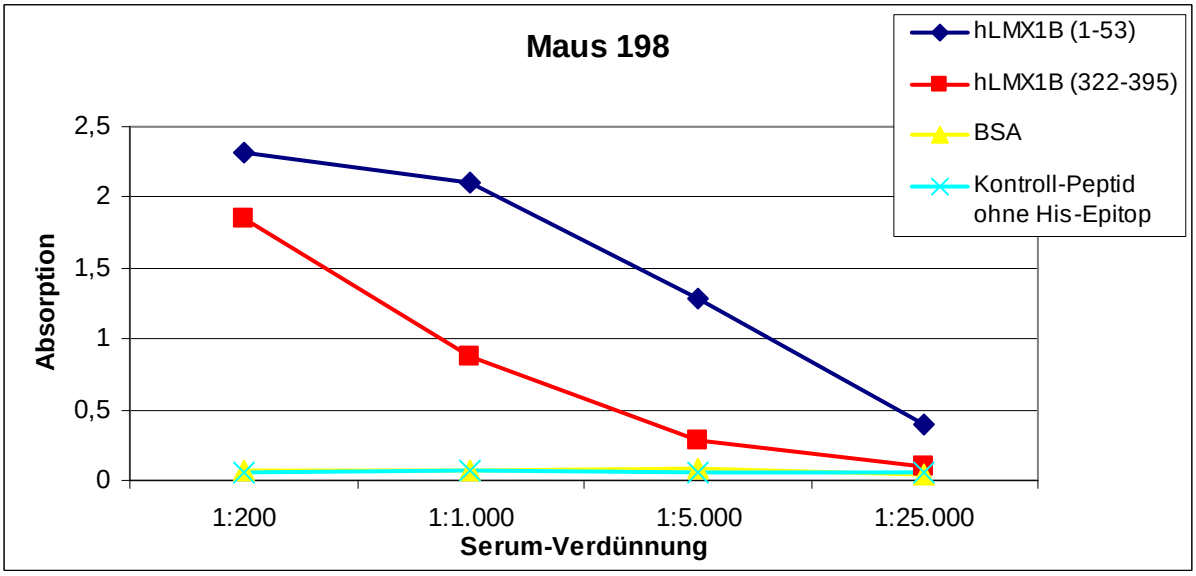
Den Mäusen 193, 194, 197, 198, 397 und 398 wurde das Polypeptid hLMX1B (322-395) injiziert. Abbildung 12 zeigt die Antikörpertiter-Bestimmungen für diese Tiere. Die Auswertung erfolgte ebenfalls nach den oben erörterten Gesichtspunkten. Wie schon bei den Mäusen, die gegen hLMX1B (1-53) immunisiert worden waren, zeigten sich auch hier sehr niedrige Titer gegen BSA und das Kontrollpeptid ohne His-Epitop. Die Titer gegen hLMX1B

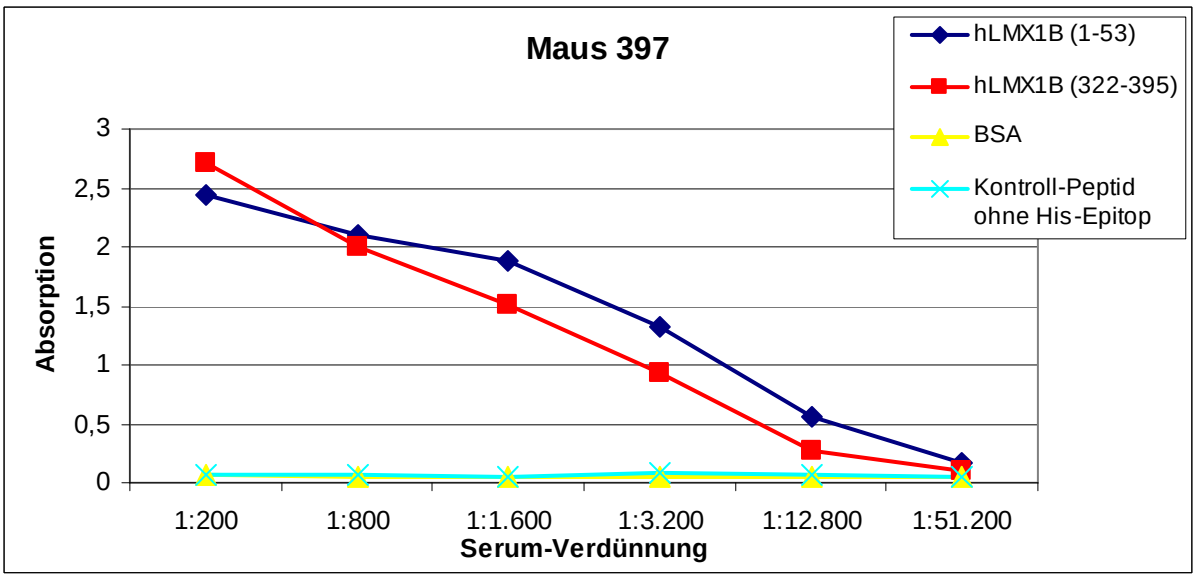
(322-395) und hLMX1B (1-53) gestalten sich aber speziell für die Tiere 194, 197, 397 und 398 annähernd gleich hoch, was zu der Vermutung führt, dass der beiden Peptiden gemeinsame $NH_2$-Terminus über eine starke Immunogenität verfügt. Bei Maus 198 lagen sogar höhere Signale für hLMX1B (1-53) als hLMX1B (322-395) vor. Die gebildeten Antikörper könnten somit überwiegend gegen das His-Epitop oder die Faktor X-Spaltstelle gerichtet sein. Somit sind diese Tiere für das weitere Vorgehen weniger brauchbar. Lediglich bei Maus 193 besteht ein größerer Unterschied zwischen den spezifischen und unspezifischen Signalen. Somit wurde Maus 193 für die Milzentnahme und Fusion von Milz- und Myelomzellen ausgewählt.




Maus 197
hLMX1B (1-53)
hLMX1B (322-395)
BSA
Kontroll-Peptid ohne His-Epitop
Absorption
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1:200
1:1.000
1:5.000
1:25.000
Serum-Verdünnung


Maus 198
hLMX1B (1-53)
hLMX1B (322-395)
BSA
Kontroll-Peptid ohne His-Epitop
Absorption
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1:200
1:1.000
1:5.000
1:25.000
Serum-Verdünnung


Maus 397
hLMX1B (1-53)
hLMX1B (322-395)
BSA
Kontroll-Peptid ohne His-Epitop
Absorption
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1:200
1:800
1:1.600
1:3.200
1:12.800
1:51.200
Serum-Verdünnung

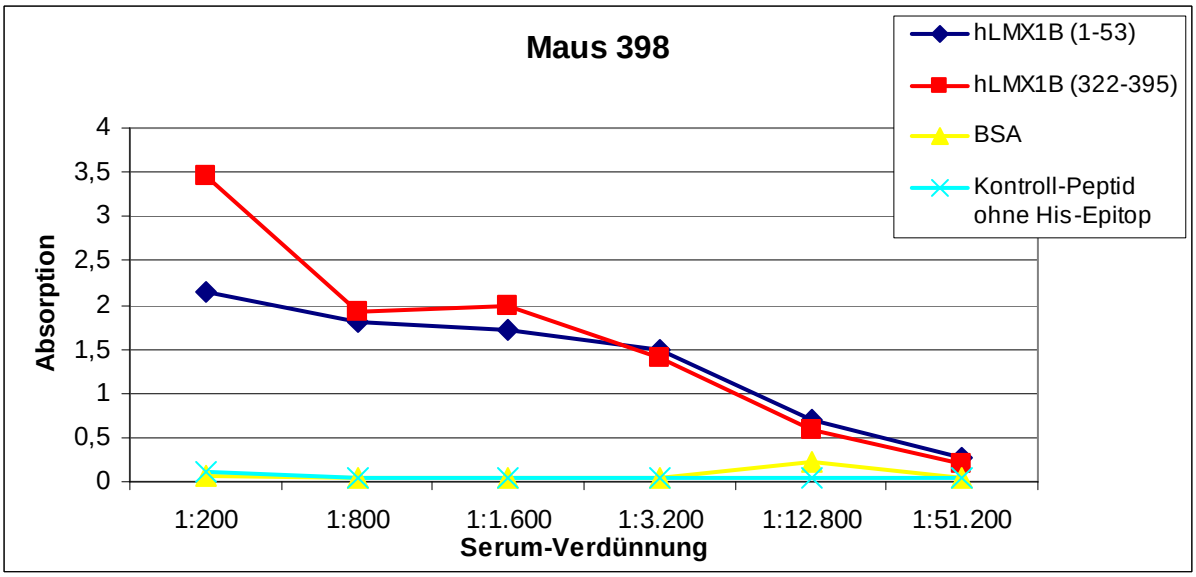



**Abbildung 12: Bestimmung der Antikörper-Titer der Tiere, die gegen das Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (322-395) immunisiert worden waren, mittels ELISA.** Den Mäusen 193, 194, 197, 198, 397 und 398 wurde am 10. Tag nach dem 2. „Boost“ Blut entnommen und daraus durch Zentrifugation Serum gewonnen. 96-Loch-Platten wurden bei 4°C in einer „feuchten Kammer“ über Nacht mit den jeweiligen Peptiden inkubiert. Die angegebenen Verdünnungen der Seren wurden für 2 h mit den an Polystyren immobilisierten Peptiden inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden gebundene Primärantikörper mit HRP-konjugierten anti-Maus-IgG-Antikörpern detektiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TMB-Entwickler-Lösung visualisiert und die Platten nach Abstoppen der Reaktion mit 5,3% Schwefelsäure bei 450 nm ausgelesen. **Auf Grund des besten Verhältnisses von spezifischem zu unspezifischem Signal wurde Maus 193 für die Fusion ausgewählt.**

### 3.1.4 Herstellung von Hybridomzellen

A. Vergleich unterschiedlicher Fusionsprotokolle

Da in der Literatur sehr viele, unterschiedliche Protokolle zur Fusion von Milzzellen und Myelomzellen vorhanden sind (Galfre et al., 1977; Gefter et al., 1977; Westerwoudt, 1985; Lane et al., 1984; Lane, 1985), wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche durchgeführt, um die Fusions-Bedingungen zu optimieren. Hierzu wurden zwei Protokolle miteinander verglichen. Die methodischen Unterschiede sind in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9: Unterschiede zwischen den verglichenen Fusionsprotokollen.**

| | **Protokoll A** | **Protokoll B** |
|---|---|---|
| **Suspensionslösung vor Fusion** | RPMI 1640 | 1x PBS bzw. 1x PBS (0,68 mM $CaCl_2$, 0,49 mM $MgCl_2$) |
| **Verhältnis Milzzellen:Myelomzellen** | 3:1 | 1:3 |
| **Kulturmedium** | HAT-Medium mit HFCS und OPI | HAT-Medium mit peritonealen Makrophagen als „Fütterzellen“ |
| **Zelldichte** | Zellen einer Maus auf 20 96-Loch-Platten | Zellen einer Maus auf 4 96-Loch-Platten |

Für jedes Protokoll wurde einer weiblichen, nicht-immunisierten Balb/c-Maus die Milz entnommen, die Milzzellen gemäß dem jeweiligen Protokoll isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Bei Protokoll B waren bereits 2 Tage zuvor peritoneale Makrophagen als „Fütterzellen“ aus insgesamt 2 Balb/c-Mäusen präpariert worden.

8 Tage nach der Fusion wurde lichtmikroskopisch die Anzahl an Hybridomzellklonen pro 96-Loch-Platte bestimmt. Aus Abbildung 13 ist ersichtlich, dass die Zahl der Hybridomkolonien zwar variiert, jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen Protokoll A und B besteht. Während sich unter Verwendung von Protokoll A im Schnitt ca. 200 Kolonien pro Platte entwickelten, sind es für Protokoll B gerade einmal durchschnittlich 56 Klone. Trotz des erheblich höheren technischen Aufwandes durch die geringe Zelldichte beim Aussäen, wurden auf dem Boden dieser Ergebnisse alle weiteren Fusionsexperimente gemäß Protokoll A durchgeführt.

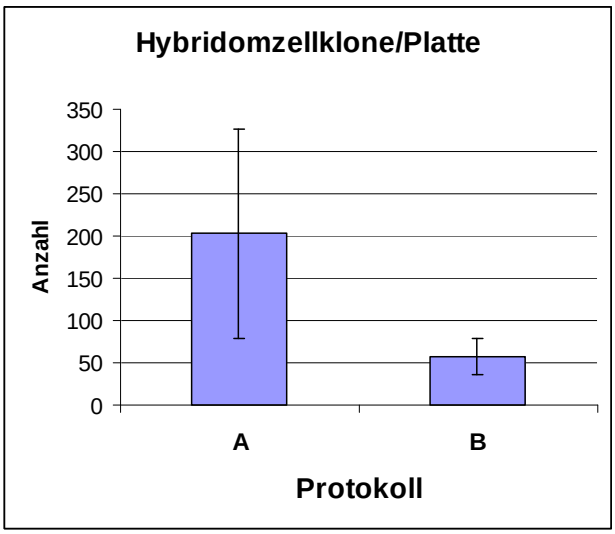



**Abbildung 13: Vergleich unterschiedlicher Fusionsprotokolle.** Anhand von Protokoll A bzw. B wurde einer weiblichen, nicht-immunisierten Balb/c-Maus die Milz entnommen, Splenozyten isoliert und anschließend mit Myelomzellen fusioniert. Acht Tage post fusionem wurde lichtmikroskopisch die Anzahl der Hybridomzellklone pro Platte bestimmt. Die Durchschnittswerte wurden für Protokoll A aus 20 96-Loch-Platten und für Protokoll B aus 4 96-Loch-Platten berechnet.

B. Fusion

Den ausgewählten Mäusen 422 und 193 wurde 5 Tage nach der intraperitonealen Injektion die Milz entnommen. Unter einer Zellkulturarbeitsbank wurden mit Hilfe eines Gewebesiebes Milzzellen isoliert und anschließend in Gegenwart von Polyethylenglykol 1500 (Lane, 1985; Lane et al., 1984) gemäß Protokoll A mit den Myelomzellen X63-Ag8.653 (Kearney et al., 1979) verschmolzen, wobei die Zellen in einem Verhältnis von Milzlymphozyten:Myelomzellen von 3:1 zusammen gegeben wurden. In Tabelle 10 ist für jede Maus die konkrete Anzahl der verwendeten Zellen angegeben. Die Anzahl isolierter Milzlymphozyten von $100x10^6$ bzw. $185x10^6$ Zellen liegt im erwarteten Bereich von $50x10^6$ bis $200x10^6$ (Harlow & Lane, 1988), was Beleg für eine effiziente Immunisierung mit konsekutiver, klonaler Expansion und Isolierung der Zellen mittels Gewebesieb ist.
Nach der Fusion wurden die Zellen in HAT-Medium (150 µl/Vertiefung) resuspendiert und auf insgesamt 20 96-Loch-Platten pro Maus verteilt, so dass eine Endkonzentration von ca. 70.000 bzw. 130.000 Zellen/Vertiefung vorlag.

**Tabelle 10: Anzahl an isolierten Milzellen und verwendeten Myelomzellen X63-Ag8.653 bei dem jeweiligen Versuchstier.**

| Maus | Anzahl isolierter Milzzellen | Anzahl Myelomzellen X63-Ag8.653 |
|---|---|---|
| 422 | $100x10^6$ | $3{,}4x10^6$ |
| 193 | $185x10^6$ | $62x10^6$ |

C. Screening des Zellkulturüberstandes der Hybridomzellen (ELISA)

Nach der Fusion wurden die Zellen bei 37°C und einer $CO_2$-Konzentration von 5% in HAT-Medium inkubiert; bis zum ersten Screening wurde das Medium nicht gewechselt. 4 bis 5 Tage nach der Fusion entwickelten sich lichtmikroskopisch sichtbare Hybridomzellkolonien; die restlichen Zellen wurden durch das Selektionsmedium eliminiert (siehe 2.2.3F).

Erstes Screening

Am 10. Tag (Maus 422) bzw. am 9. Tag (Maus 193) nach der Fusion nahmen die meisten Hybridomzellklone ca. 50% oder mehr der Fläche einer Vertiefung ein, so dass im

Zellkulturüberstand genügend sezernierte Antikörper für das erste Screening in Form eines ELISA vorhanden waren. Hierzu wurden pro Maus jeweils 20 96-Loch-Platten mit dem spezifischen Peptid in einer Konzentration von 2 µg/ml [hLMX1B (1-53) für Hybridomzellen aus Maus 422 und hLMX1B (322-395) für Hybridomzellen aus Maus 193] über Nacht inkubiert. Jeweils 50 µl an unverdünntem Zellkulturüberstand pro Vertiefung dienten als Primärantikörper. An das immobilisierte Peptid gebundene Antikörper wurden mittels HRP-konjugierter anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert und die Reaktion mit TMB-Entwicklerlösung visualisiert (Bild einer 96-Loch-Platte beim Screening siehe Abbildung 14). Nach dem Screening wurde jede Vertiefung mit 100 µl HAT-Medium aufgefüllt.

Für jede der beiden durchgeführten Fusionen wurden die 93 Vertiefungen (aus 1920) mit dem stärksten Signal gegenüber dem jeweils spezifischen Antigen im ELISA ausgewählt, gemäß ihrer Lokalisation auf den 20 96-Loch-Platten (unabhängig von der Signalintensität) nummeriert und am nächsten Tag einem weiterführenden, zweiten Screening unterzogen. Lichtmikroskopisch wurden Anzahl und Größe der in den ausgewählten Vertiefungen vorhandenen Klone bestimmt, um so die Morphologie der Hybridomzellkolonien und die jeweilige Signalintensität im ELISA korrelieren zu können, wodurch eine erste, orientierende Aussage über die Klonalität der Zellen und die Qualität und Quantität des sezernierten Antikörpers getroffen werden konnte.

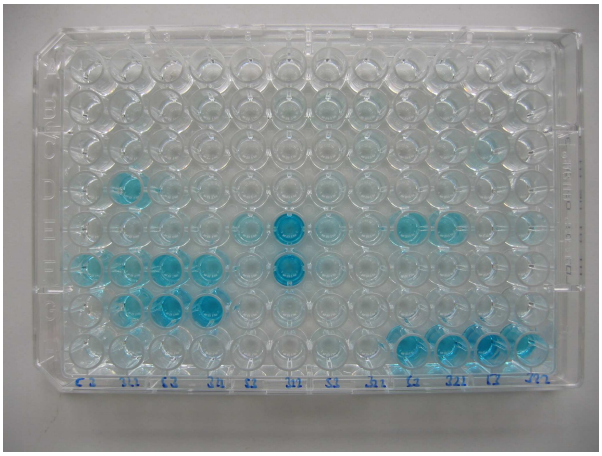


**Abbildung 14: Screening mittels ELISA.** An das immobilisierte Peptid gebundene Antikörper wurden mittels HRP-konjugierter anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert und die Reaktion mit TMB-Entwicklerlösung visualisiert.

Zur Nomenklatur: Im weiteren Verlauf werden Vertiefungen bzw. Hybridomzellklone mit zwei Nummern getrennt durch einen Bindestrich bezeichnet. Die erste Nummer gibt die Maus

an, aus der die Milzzellen isoliert wurden. Bei der zweiten Nummer handelt es sich um die Nummer der Vertiefung im ersten Screening. Beispiele: 422-1 bis 422-93 und 193-1 bis 193-93. Da angenommen wird, dass für die hohe Signalintensität einer Vertiefung im ersten Screening jeweils nur ein Hybridomzellklon verantwortlich ist, selbst wenn mehrere Klone lichtmikroskopisch nachweisbar waren, werden die Begriffe Vertiefung und Hybridomzellklon, obwohl für die Klone noch keine Monoklonalität besteht, vereinfachend teilweise äquivalent gebraucht.

Zweites Screening

Da sich bei der Bestimmung der Antikörpertiter im Serum (siehe 3.1.3B) gezeigt hatte, dass unspezifische Antigen-Antikörperreaktionen in nicht unerheblichem Umfang auftreten [v.a. in Form einer Kreuzreaktivität zwischen hLMX1B (1-53) und hLMX1B (322-395)], fand am Tag nach dem ersten Screening ein Zweites statt. Dieses zweite Screening erfolgte methodisch analog dem Erstem; mit dem Unterschied, dass jeweils 50 µl Zellkulturüberstand aus den im ersten Screening ausgewählten 93 Vertiefungen (pro Fusion) gegen immobilisiertes hLMX1B (1-53) und hLMX1B (322-395) getestet wurden. Zusätzlich wurden zwei Negativkontrollen (zwei Vertiefungen, die im ersten Screening ein negatives Resultat gezeigt hatten) und eine Positivkontrolle (anti-Poly-Histidin-Antikörper 1:1.000) eingeschlossen.
Zur Auswertung wurde jeweils der Quotient aus spezifischem Signal zu unspezifischem Signal bestimmt. Vertiefungen/Hybridomzellklone mit hohen Werten wurden als spezifisch angesehen und zusätzlich nach der absoluten Signalintensität gegenüber dem spezifischen Peptid in die zwei Gruppen „spezifisch-stark“ und „spezifisch-schwach“ eingeteilt (siehe Tabelle 11). Der Grenzwert zwischen den beiden Gruppen wurde dabei frei gewählt: für Zellen aus Maus 422 lag er bei einem absoluten Absorbanz-Wert von 0,579 einschließlich, für Zellen aus Maus 193 bei 1,602 einschließlich. Die Vertiefungen mit „spezifisch-starken“ bzw. „spezifisch-schwachen“ Klonen wurden erneut mit 100 µl HAT-Medium aufgefüllt.

**Tabelle 11: Ergebnisse des zweiten Screenings.**

| | **Zellen aus Maus 422** | **Zellen aus Maus 193** |
|---|---|---|
| **Spezifisch-starke Klone** | 422-16, 422-19, 422-55, 422-67, 422-76 | 193-11, 193-16, 193-50, 193-53, 193-67, 193-68 |
| **Spezifisch-schwache Klone** | 422-1, 422-4, 422-5, 422-6, 422-8, 422-9, 422-14, 422-15, 422-17, 422-21, 422-23, 422-28, 422-33, 422-39, 422-40, 422-43, 422-44, 422-51, 422-59, 422-70, 422-71, 422-82, 422-84, 422-87, 422-88, 422-92 | 193-1, 193-4, 193-5, 193-6, 193-63, 193-64, 193-69, 193-73, 193-80, 193-91 |
| **Insgesamt auf 24-Loch-Platte übertragene Klone** | **31** | **16** |

1 bis 2 Tage nach dem zweiten Screening wurden die ausgewählten Klone von den 96-Loch-Platten auf 24-Loch-Platten übertragen und in HAT-Medium (600 µl/Vertiefung) bei 37°C und einer $CO_2$-Konzentration von 5% weiter kultiviert. Wie aus Tabelle 11 zu ersehen ist, wurden bei Maus 422 deutlich mehr spezifisch-schwache Klone ausgewählt als bei Maus 193. Dies hatte folgende Gründe: Zum Zeitpunkt des ersten und zweiten Screenings war die Zellzahl der einzelnen Klone sehr unterschiedlich. Unter der Vermutung, dass eine geringere Zellzahl auch zu geringeren Antikörperkonzentrationen und damit einem schwächeren Signal im ELISA führt, wurden auch schwache, kleine Klone auf die 24-Loch-Platte übertragen. Nachdem die Klone dieselbe Konfluenz erreicht hatten, wurde erneut getestet. Es stellte sich heraus, dass die Zelldichte nur untergeordneten Einfluss auf die Signalintensität im ELISA hat (siehe 3.2.1). Da die beiden Fusionen mit einem zeitlichen Abstand von 3 Wochen durchgeführt wurden, lagen diese Ergebnisse zum Zeitpunkt des zweiten Screenings der Klone aus Maus 193 vor und konnten berücksichtigt werden.

Des Weiteren traten im zweiten Screening multiple Hybridomzellklone auf, die hohe Signale gegenüber hLMX1B (1-53) und hLMX1B (322-395) zeigten. Unter der Vermutung, dass die gebildeten Antikörper gegen das beiden Peptiden gemeinsame His-Epitop oder die Faktor X-Spaltstelle gerichtet sein könnten, wurden die Klone 422-10, 422-37, 422-68 und 422-77 ebenfalls auf eine 24-Loch-Platte übertragen, was eine weitere Charakterisierung ermöglichte. Die durchgeführten ELISA-Experimente zeigten allerdings, dass die durch die Klone 422-10, 422-37, 422-68 und 422-77 sezernierten Antikörper komplett unspezifisch gegenüber allen getesteten Peptiden reagierten (Daten nicht gezeigt), weshalb keine weiteren Analysen erfolgten.

## 3.2 Auswahl der besten Hybridomzelklone für die Subklonierung

### 3.2.1 ELISA

Nach ca. 5 bis 10 Tagen (je nach Wachstumsgeschwindigkeit) erreichten die Hybridomzellklone auf den 24-Loch-Platten eine Konfluenz von 100% und wurden daher auf 6-Loch-Platten übertragen (Gesamtvolumen an HAT-Medium 1-2 ml/Vertiefung). Beim Passagieren der Zellen konnte ein Volumen von 200 bis 300 µl Zellkulturüberstand gewonnen werden, um einen erneuten ELISA durchzuführen. Dadurch sollte zum einen der Einfluss der Zelldichte auf die Signalintensität, zum anderen die Spezifität der Klone näher beleuchtet werden. Da für die einzelnen Klone noch keine Monoklonalität bestand, war es zudem möglich, dass positive Klone verloren gingen, indem sie durch andere, „unspezifische“ Klone überwachsen wurden, was ein ELISA ebenfalls zeigen würde.

Das Experiment erfolgte analog den ersten beiden Screenings, wobei zusätzlich auch gegen ein Kontrollpeptid ohne His-Epitop und BSA getestet wurde. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der ersten beiden ELISA-Experimente für die Hybridomzellklone aus Maus 422. Da Zellkulturüberstand bei maximaler Konfluenz verwendet werden sollte und die Klone leicht unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten aufwiesen, wurden die Daten zweizeitig erhoben (A: schneller wachsende Klone, B: langsamer wachsende Klone). Später glich sich die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Klone an. Neben den im zweiten Screening schon als „spezifisch-stark“ eingestuften Klonen 422-16, 422-19 und 422-76 zeigten auch 422-5 und 422-70 hohe spezifische Signale. Der als „spezifisch-stark“ eingestufte Klon 422-67 hingegen wies für alle 4 Peptide nur geringe Signalintensitäten auf. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass es sich noch um polyklonale Zellen handelte und der spezifische Klon von einem anderen Klon „überwachsen“ wurde. Der „spezifisch-stark“ eingestufte Klon 422-55 konnte leider nicht getestet werden, da er trotz wiederholtem Passagieren von der 96-Loch- zur 24-Loch-Platte kein Wachstum zeigte.

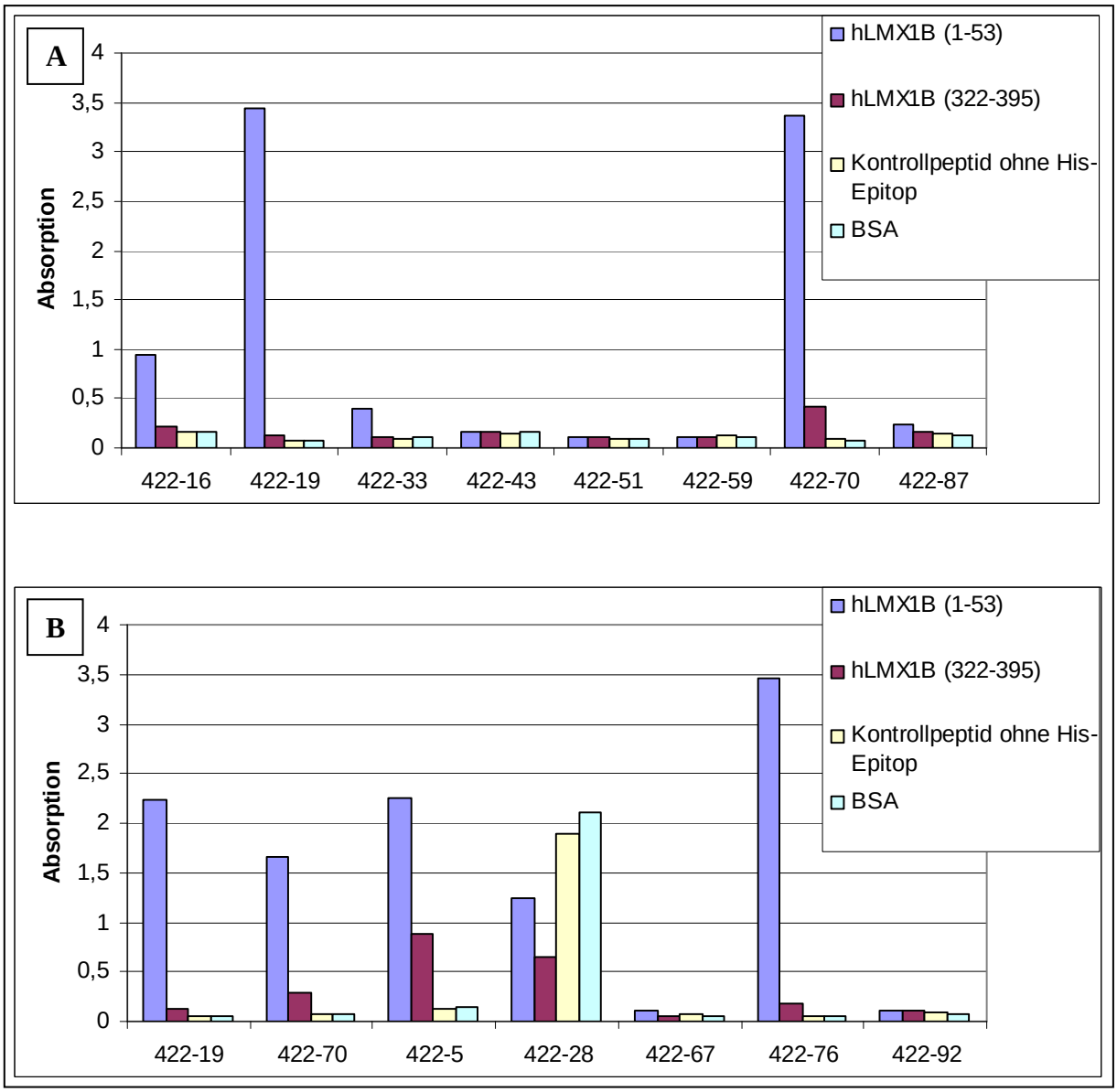



**Abbildung 15: ELISA mit dem Zellkulturüberstand der Hybridomzellklone aus Maus 422 [immunisiert gegen hLMX1B (1-53)] bei maximaler Zelldichte.** Die angegebenen Hybridomzellklone wurden auf 24-Loch-Platten kultiviert. Bei maximaler Zelldichte (A: schneller wachsende Klone, B: langsamer wachsende Klone) wurde Zellkulturüberstand entnommen. Zur Durchführung des ELISA wurden die jeweiligen Peptide (spezifisch: hLMX1B (1-53), Negativkontrollen: hLMX1B (322-395), Kontrollpeptid ohne His-Epitop und BSA) zunächst an 96-Loch-Platten immobilisiert und dann mit dem jeweiligen unverdünnten Zellkulturüberstand für 2 h inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden gebundene Primärantikörper mit HRP-konjugierten anti-Maus-IgG-Antikörpern detektiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TMB-Entwicklerlösung visualisiert und die Platten nach Abstoppen der Reaktion mit 5,3% Schwefelsäure bei 450 nm ausgelesen.

In Zusammenschau der Ergebnisse des zweiten Screenings und dieses Experimentes wurden die Klone 422-5, 422-16, 422-19, 422-33, 422-67, 422-70 und 422-76 für einen weiterführenden Western-Blot ausgewählt (422-33 und 422-67 auf Grund der Ergebnisse im zweiten Screening).

Die Tatsache, dass die bereits im zweiten Screening als „spezifisch-stark“ eingestuften Klone 422-16, 422-19 und 422-76 erneut im ELISA die höchsten Signalintensitäten aufwiesen, führte zu der Hypothese, dass die Zelldichte und damit konsekutiv auch die Antikörperkonzentration im hier gewählten Testsystem nur eine untergeordnete Rolle spielten. Um dies zu verifizieren, wurde der Klon 422-19 auf einer 6-Loch-Platte in HAT-Medium kultiviert und bei unterschiedlichen, lichtmikroskopisch bestimmten Zelldichten Zellkulturüberstand für die Durchführung eines ELISA entnommen. Abbildung 16 zeigt, dass die Signalhöhe nur in geringem Umfang mit der Zelldichte und damit der Antikörperkonzentration zunimmt. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass bei der Durchführung des ELISA nur eine Peptidlösung mit einer Konzentration von 2 µg/ml verwendet und daher nur sehr wenig Peptid an die Platten immobilisiert wurde. Daher könnten bereits geringe Konzentrationen an spezifischem Antikörper ausreichen, um nahezu alle Bindungsstellen abzusättigen. Somit scheint die Signalhöhe im ELISA eher mit dem Bindungsverhalten als der Quantität des Antikörpers zu korrelieren.

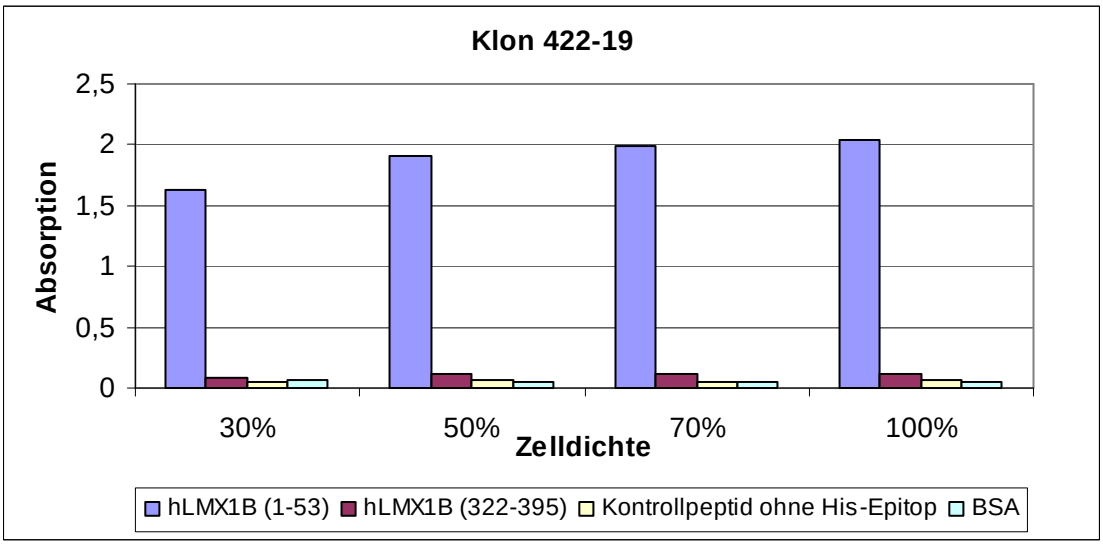



**Abbildung 16: ELISA mit dem Zellkulturüberstand des Hybridomzellklones 422-19 [gerichtet gegen hLMX1B (1-53)] bei unterschiedlichen Zelldichten.** Der Hybridomzellklon 422-19 wurde auf 6-Loch-Platten kultiviert. Bei den angegebenen Zelldichten wurde jeweils Zellkulturüberstand entnommen. Zur Durchführung des ELISA wurden die jeweiligen Peptide (spezifisch: hLMX1B (1-53), Negativkontrollen: hLMX1B (322-395), Kontrollpeptid ohne His-Epitop und BSA) zunächst an 96-Loch-Platten immobilisiert und dann mit dem jeweiligen unverdünnten Zellkulturüberstand für 2 h inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden gebundene Primärantikörper mit HRP-konjugierten anti-Maus-IgG-Antikörpern detektiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TMB-Entwicklerlösung visualisiert und die Platten nach Abstoppen der Reaktion mit 5,3% Schwefelsäure bei 450 nm ausgelesen.

Da diese Erkenntnis bei den Experimenten für die Klone aus Maus 193 bereits vorlag, wurden weniger „spezifisch-schwache“ Klone ausgehend von der 96-Loch-Platte weiter kultiviert.

Beim Passagieren von der 24-Loch- zur 6-Loch-Platte konnte Zellkulturüberstand für die Durchführung eines im Vergleich zum zweiten Screening um ein Kontrollpeptid ohne His-Epitop und BSA erweiterten ELISA entnommen werden. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der „spezifisch-starken“ Klone 193-11, 193-16, 193-50, 193-67 und 193-68 sowie der „spezifisch-schwachen“ Klone 193-5, 193-6 und 193-64. Erwartungsgemäß weisen die „spezifisch- starken“ Klone hohe Signalintensitäten gegenüber hLMX1B (322-395) auf. Bemerkenswert hingegen sind die im zweiten Screening nicht in diesem Umfang aufgetretenen, unspezifischen Signale gegenüber hLMX1B (1-53) bei Klon 193-11 und 193-67, was ein Hinweis auf die Polyklonalität dieser Klone sein könnte.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wurde beschlossen, alle hier gezeigten Klone einer weiterführenden Analyse mittels Western-Blot zuzuführen. Die „spezifisch-schwachen“ Klone 193-5, 193-6 und 193-64 wurden ebenfalls ausgewählt, da sich ELISA und Western-Blot dadurch unterscheiden, dass bei Ersterem natives und bei Letzterem denaturiertes Protein eingesetzt wird und somit die Ergebnisse von ELISA und Western-Blot abweichen können.

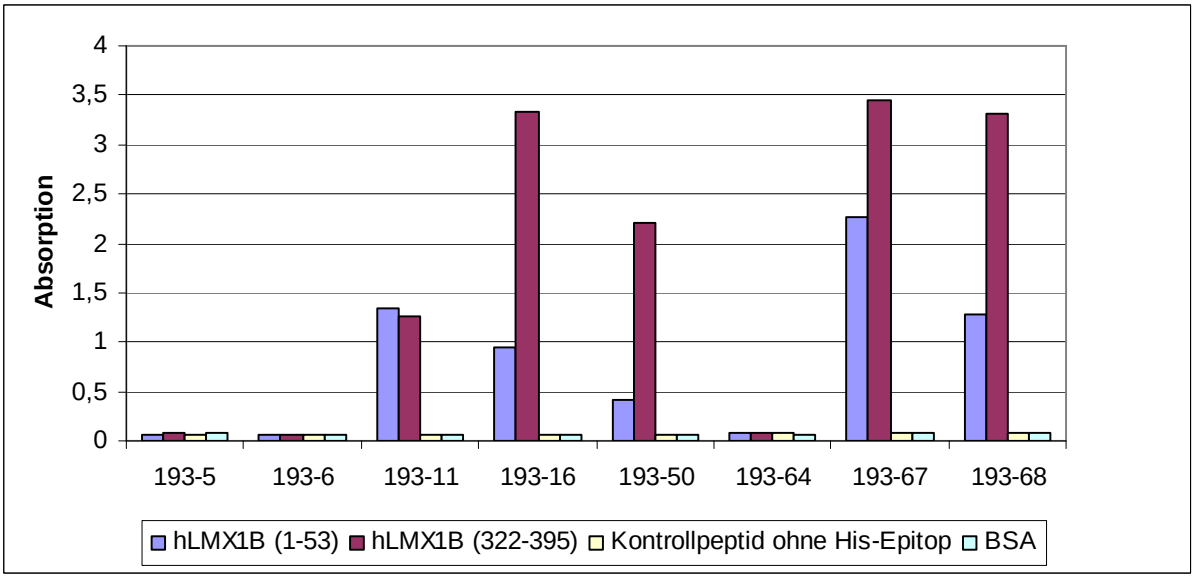



**Abbildung 17: ELISA mit dem Zellkulturüberstand der Hybridomzellklone aus Maus 193 [immunisiert gegen hLMX1B (322-395)] bei maximaler Zelldichte.** Die angegebenen Hybridomzellklone wurden auf 24-Loch-Platten kultiviert. Bei maximaler Zelldichte wurde Zellkulturüberstand entnommen. Zur Durchführung des ELISA wurden die jeweiligen Peptide (spezifisch: hLMX1B (322-395), Negativkontrollen: hLMX1B (1-53), Kontrollpeptid ohne His-Epitop und BSA) zunächst an 96-Loch-Platten immobilisiert und dann mit dem jeweiligen unverdünnten Zellkulturüberstand für 2 h inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden gebundene Primärantikörper mit HRP-konjugierten anti-Maus-IgG-Antikörpern detektiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TMB-Entwicklerlösung visualisiert und die Platten nach Abstoppen der Reaktion mit 5,3% Schwefelsäure bei 450 nm ausgelesen.

Nachdem die Hybridomzellklone von 24-Loch-Platten auf 6-Loch-Platten übertragen worden waren, wurden sie dort weiter kultiviert und bereits auch expandiert, um mehr Zellkulturüberstand für die nötigen, weiteren Experimente zu erhalten. Zellkulturüberstand wurde stets nur bei 100% Zelldichte gewonnen, mit 0,02% Na-Azid versetzt und bei 4°C gelagert. Im Weiteren wurden die Zellen alle 2 bis 4 Tage 1:2 bis 1:3 gesplittet, wobei von HAT-Medium auf eine 1:1 Mischung von HAT-Medium:HT-Medium gewechselt wurde, wodurch die toxischen Effekte von Aminopterin bei bereits abgeschlossener Selektion (siehe 2.2.3F)minimiert werden konnten.

### 3.2.2 Klonierung von p3M/hLMX1B complete

Aus 3.2.1 ist ersichtlich, dass ein ELISA-Testsystem zwar hervorragend als Screening-Werkzeug und für eine erste Charakterisierung von Antikörpern eingesetzt werden kann. Einschränkend ist aber zu sagen, dass bei hoher Sensitivität Probleme bezüglich der Spezifität bestehen. Zudem wurden stets nur kurze, in Bakterien produzierte Peptide für die Experimente verwendet.

Um die folgenden Experimente wie z.B. Western-Blot-Analysen mit in eukaryontischen Zellen produziertem LMX1B in voller Länge durchführen zu können, musste zunächst ein entsprechendes Konstrukt generiert werden. Als Basis hierfür diente das Konstrukt p3M/hLMX1B. Dieses musste allerdings $NH_2$-terminal gemäß der nach (Dunston et al., 2004) publizierten Sequenz um 23 Aminosäuren ergänzt werden. Hierfür wurde der Gen-Abschnitt, welcher für die $NH_2$-terminalen 156 Aminosäuren von LMX1B codiert, mittels PCR amplifiziert, wobei cDNA aus HEK293T-Zellen und die Oligonukleotide hLMX1B *Bam*H I 1F und hLMX1B *Eco*R I 464R (Annealing-Temperatur: 66°C) benutzt wurden. Mittels der PCR wurden Restriktionsstellen für *Bam*H I und *Eco*R I eingeführt und das PCR-Produkt nach Phenolisierung und Ethanol-Präzipitation mit diesen beiden Enzymen gespalten, wodurch ein 468 bp Stück (Insert) entstand, welches durch Agarosegel-Elektrophorese und anschließende DNA-Extraktion aufgereinigt wurde. Analog zum PCR-Produkt wurde das Konstrukt p3M/hLMX1B mit *Bam*H I und *Eco*R I verdaut, wobei zwei DNA-Stücke mit 456 bzw. 6.321 Basenpaaren entstanden. Eine Religation des Vektors wurde durch die Dephosphorylierung der DNA-Enden mittels CIP verhindert und das 6.321 bp Stück (Vektorgerüst) durch Agarosegel-Elektrophorese und anschließende DNA-Extraktion aufgereinigt. Anschließend wurden Insert und Vektorgerüst miteinander ligiert und das neu

entstandene Konstrukt p3M/hLMX1B complete (Struktur siehe Abbildung 18) in DH5α-Zellen transformiert.

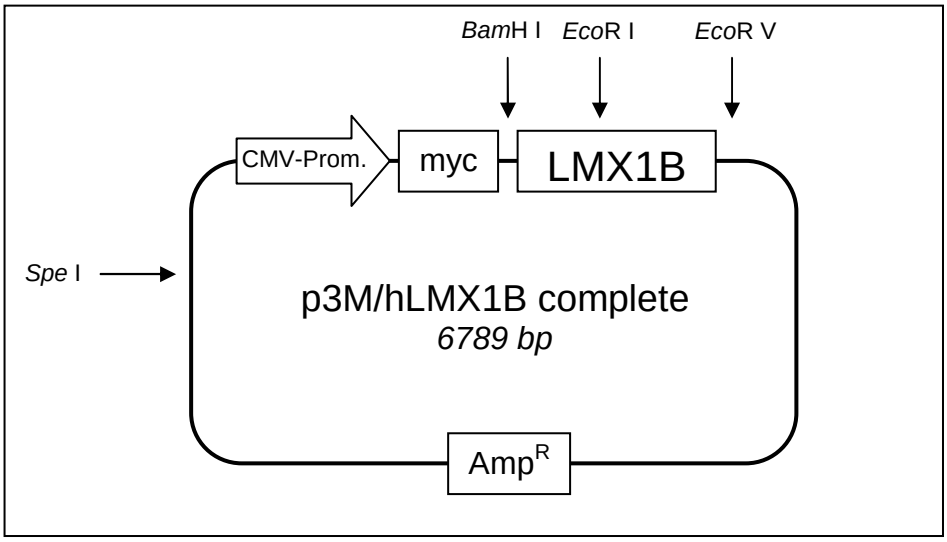



**Abbildung 18: Struktur von p3M/hLMX1B complete mit den für die Klonierung und Analyse benutzten Restriktionsstellen.**

Die Selektion erfolgte mit Hilfe der im Konstrukt enthaltenen Ampicillinresistenz. Positive Klone wurden durch Testverdau mit *Bam*H I und *Eco*R I identifiziert. Anschließend wurde ein weiterer Testverdau durchgeführt: Da beim Klonieren das Konstrukt p3M/hLMX1B mit *Bam*H I verdaut wurde, ging eine Restriktionsstelle für *Spe* I an der Multiklonierungsstelle verloren. Daher entstehen beim Verdau von p3M/hLMX1B complete im Vergleich zu p3M/hLMX1B nurmehr 2 (4.745 bp und 2.044 bp) anstatt von 3 DNA-Stücken (4.745 bp, 1.318 bp und 714 bp) (siehe Abbildung 19).

Demnach scheinen sowohl Klon 1 als auch Klon 2 das korrekte Konstrukt zu beinhalten. Die erfolgreiche Klonierung wurde anschließend durch Sequenzierung bestätigt.

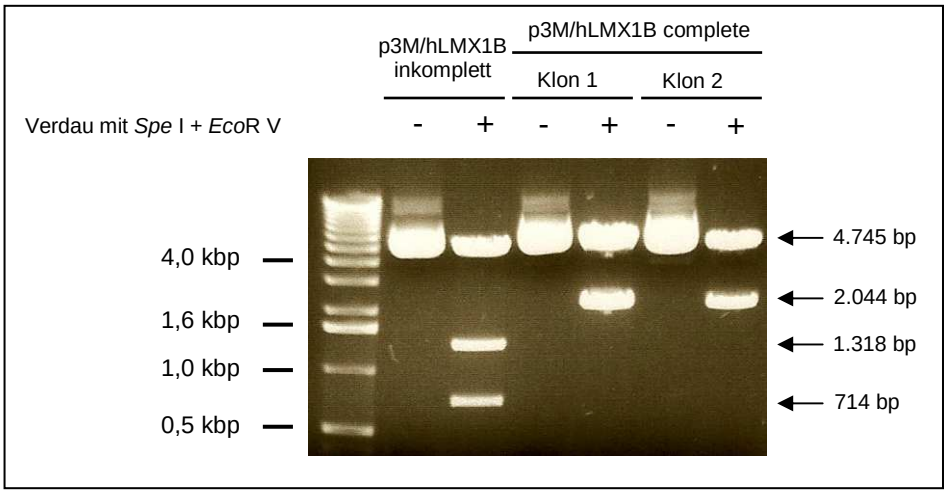



**Abbildung 19: Agarosegel-Elektrophorese nach Verdau mit *Spe* I + *Eco*R V.** Nach Transformation des neu klonierten Konstrukts p3M/hLMX1B complete in DH5α-Zellen wurden über die Ampicillinresistenz mehrere Klone ausgewählt und deren DNA mittels Mini-Präparation entnommen. Die Plasmid-DNA von Klon 1 und 2 sowie von dem Ausgangskonstrukt p3M/hLMX1B (inkomplett) wurde mit *Spe* I und *Eco*R V bei 37°C für 4 h verdaut. Jeweils 5 µl des jeweiligen Verdaus bzw. 500 ng an unverdauter Plasmid-DNA wurden mit der entsprechenden Menge an Ladepuffer vermengt und auf ein 1% Agarosegel geladen. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Banden unter einem UV-Leuchtschirm sichtbar gemacht.

Das Konstrukt p3M/hLMX1B complete wurde fortan als Expressionsvektor in eukaryontischen Zellen eingesetzt. p3M-Vektoren gehören zur Gruppe der pcDNA3-Vektoren (Invitrogen), bei denen die Transkription des Zielgens unter Kontrolle eines CMV-Promotors steht. Für eine Transfektion mit dem Konstrukt p3M/hLMX1B complete eignen sich COS-7-Zellen, die mit einer im Replikationsursprung defekten SV40-Mutante transformiert wurden. COS-7-Zellen erlauben daher durch die kontinuierliche Synthese des großen T-Antigens von SV40 die Amplifizierung von Plasmiden mit einem SV40 spezifischen Replikationsursprung (wie z.B. pcDNA3-Plasmiden). Da LMX1B $NH_2$-terminal mit einem myc-Epitop fusioniert wurde, können zum Nachweis des Proteinprodukts von p3M/hLMX1B complete in Immuno-Assays auch anti-myc-Antikörper wie z.B. 9E10 verwendet werden.

### 3.2.3 Western-Blot

A. Hybridomzellklone aus Maus 422 [gerichtet gegen hLMX1B (1-53)]

Die Hybridomzellklone 422-5, 422-16, 422-19, 422-33, 422-67, 422-70 und 422-76 wurden anhand der Ergebnisse aus den ELISA-Experimenten für eine Western-Blot-Analyse ausgewählt. Hierzu wurden COS-7-Zellen transient mit p3M/hLMX1B complete (Abbildung

20 Spur 2) transfiziert und nach 48 h lysiert. Als Negativkontrolle diente Lysat von nicht-transfizierten COS-7-Zellen (Abbildung 20 Spur 1). Zusätzlich wurde auch Lysat aus HEK293T-Zellen verwendet (Abbildung 20 Spur 3), die LMX1B endogen exprimieren. So sollte eruiert werden, ob mit den generierten Antikörpern auch die im Vergleich zum Über-Expressions-System in COS-7-Zellen sehr geringen, endogenen Proteinmengen detektiert werden könnten.

Gemäß der Empfehlung aus (Harlow & Lane, 1988) wurden die Zellkulturüberstände für den Western-Blot 1:10 mit Blockier-Lösung verdünnt. Als Positivkontrolle dienten anti-LMX1B Antiserum BMO8 sowie der monoklonale Antikörper 9E10, der gegen das c-Myc-Epitop gerichtet ist und in der Arbeitsgruppe als Hybridomzellklon selbst kultiviert wird. Abbildung 20 zeigt, dass einzig Zellkulturüberstand von 422-76 imstande ist, LMX1B zu detektieren. Die Tatsache, dass endogenes LMX1B nicht nachgewiesen werden konnte bzw. dass die Bande für 422-76 deutlich schwächer ist als die Banden der Positivkontrollen, könnte in der Polyklonalität von 422-76 eine Erklärung finden, so dass nach erfolgter Subklonierung u.U. mit besseren Resultaten zu rechnen ist. Erfreulicherweise sind für 422-76 trotz der relativ langen Expositonsdauer und der angenommenen Polyklonalität keine unspezifischen Banden zu sehen. Die restlichen getesteten Klone zeigen leider gar kein bzw. nur unspezifische Signale, was anhand der vorherigen Resultate so nicht zu erwarten war. Die Ergebnisse bezüglich 422-76 wurden in einem Bestätigungsversuch reproduziert.

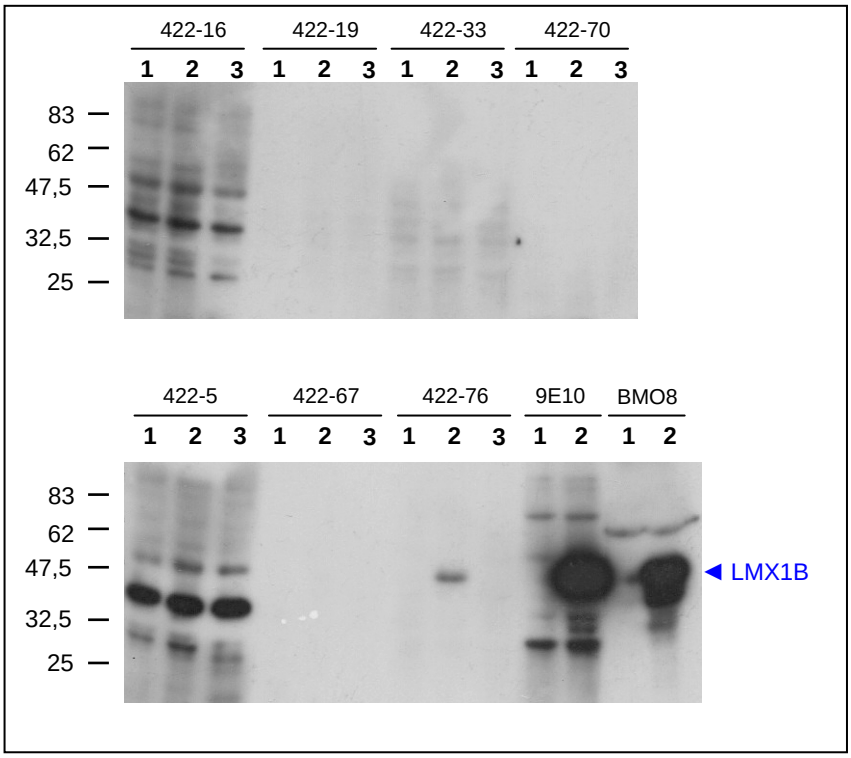



**Abbildung 20: Western-Blot mit Zellkulturüberstand der Klone aus Maus 422.** Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion lysiert. Ebenso wurde mit nicht-transfizierten COS-7-Zellen und HEK293T-Zellen verfahren. Je 40 µg Lysat wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen (**Spur 1:** Lysat von nicht-transfizierten COS-7-Zellen, **Spur 2:** Lysat von mit p3M/hLMX1B complete transfizierten COS-7-Zellen, **Spur 3:** Lysat von HEK293T-Zellen), das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde. Danach wurde die PVDF-Membran in Stücke à 3 bzw. 2 Spuren zerteilt und mit den jeweiligen Antikörpern (Verdünnung von 1:10 für 422-#; 1:3 für 9E10 und 1:2.000 für BMO8; siehe auch **Tabelle 1** und **Tabelle 2**) für 2 h inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers. Der blaue Pfeilkopf zeigt die Bande für LMX1B.

## B. Hybridomzellklone aus Maus 193 [gerichtet gegen hLMX1B (322-395)]

Analog dem für die Hybridomzellklone aus Maus 422 angewandten System wurden die Klone 193-4, 193-5, 193-6, 193-11, 193-16, 193-50, 193-64, 193-67 und 193-68 ebenfalls mittels Western-Blot getestet. Auf Lysat aus HEK293T-Zellen wurde allerdings verzichtet, da die endogenen Proteinmengen doch wohl zu gering sind, um ohne Optimierung detektiert zu werden.

Aus Abbildung 21 (jeweils Spur 2) ist ersichtlich, dass sowohl mit 193-16 als auch mit 193-67 LMX1B detektiert werden kann, wobei die Bande für 193-67 stärker bzw. mindestens ebenso stark ist wie die Banden für 9E10 bzw. BMO8. Die „spezifisch-starken“ Klone 193-16 und 193-67 hatten auch bereits sehr hohe spezifische Signalintensitäten im ELISA gezeigt, weshalb die guten Ergebnisse im Western-Blot nicht verwunderlich sind. Ausgehend von den

Daten des zweiten Screenings bzw. der ELISA-Experimente hätte man für 193-50 und 193-68 im Western-Blot ähnliche Resultate erwarten können. Eine Erklärung für die negativen Ergebnisse könnte daran liegen, dass beim Western-Blot denaturiertes Protein verwendet wird.

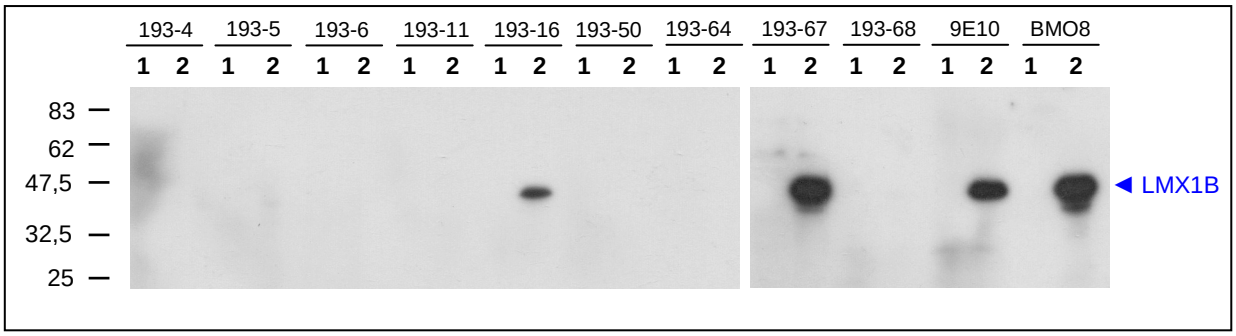



**Abbildung 21: Western-Blot mit Zellkulturüberstand der Klone aus Maus 193.** Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion lysiert. Ebenso wurde mit nicht-transfizierten COS-7-Zellen verfahren. Je 40 µg Lysat wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen (**Spur 1:** Lysat von nicht-transfizierten COS-7-Zellen, **Spur 2:** Lysat von mit p3M/hLMX1B complete transfizierten COS-7-Zellen), das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde. Danach wurde die PVDF-Membran in Stücke à 2 Spuren zerteilt und mit den jeweiligen Antikörpern (Verdünnung von 1:10 für 193-#; 1:3 für 9E10 und 1:2.000 für BMO8; siehe auch **Tabelle 1** und **Tabelle 2**) für 2 h inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers. Der blaue Pfeilkopf zeigt die Bande für LMX1B.

### 3.2.4 Immunpräzipitation

Da die Immunpräzipitation und ihre Abkömmlinge Co-Immunpräzipitation und Chromatin-Immunpräzipitation mögliche Applikationen für die generierten Antikörper darstellen (siehe 1.5), wurden die Hybridomzellklone noch vor der Subklonierung mittels Immunpräzipitation getestet. Auf Grund des im Vergleich zu ELISA und Western-Blot aufwendigeren Verfahrens beschränkte sich die Immunpräzipitation auf Klone, von denen gute Resultate erwartet werden konnten. Als Auswahlkriterium wurden die ELISA-Ergebnisse (siehe 3.2.1) herangezogen, weil sowohl beim ELISA als auch bei der Immunpräzipitation natives Protein eingesetzt wird.

A. Hybridomzellklone aus Maus 422 [gerichtet gegen hLMX1B (1-53)]

Bei den gegen hLMX1B (1-53) gerichteten Klonen wurden für die Immunpräzipitation die Hybridomzellklone 422-16, 422-19, 422-70 und 422-76 ausgewählt, da diese bereits im

ELISA hohe spezifische Signale gezeigt hatten. Die Immunpräzipitation erfolgte nach Methode A (siehe 2.2.5E). Hierbei wurden dem vorgeklärten Lysat (400 µg Gesamtprotein) jeweils 100 µl an unverdünntem Zellkulturüberstand zugegeben. Da die IgG-Subklassen der generierten Antikörper nicht bekannt waren, wurden auf Grund des breiteren Bindungsverhaltens Protein G Sepharose-Beads verwendet. Im Gegensatz zu Protein G bindet Protein A zwar ebenfalls stark an $IgG_{2a}$ und $IgG_{2b}$, die Bindung für $IgG_3$ ist aber deutlich schwächer und $IgG_1$ wird fast gar nicht gebunden (Ey et al., 1978; Goding, 1978; Mackenzie et al., 1978). Als Positivkontrolle wurden der monoklonale Antikörper 9E10 (Zellkulturüberstand eines selbst kultivierten Hybridomzellklones) und als Negativkontrolle frisches Zellkulturmedium mit allen Zusätzen (in diesem Fall HAT-Medium) benutzt. Pro Ansatz wurden 400 µg Gesamtprotein aus mit p3M/hLMX1B complete transient transfizierten COS-7-Zellen eingesetzt. Nach der Immunpräzipitation wurde jeweils die Hälfte der Proben auf ein Gel geladen, das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde. Die Bandendetektion erfolgte mittels anti-LMX1B Antiserum BMO8.

Abbildung 22 A zeigt, dass bei 422-19, 422-76 und 9E10 LMX1B im präzipitierten Komplex (B) detektiert werden konnte; im Überstand (Ü) nach Immunpräzipitation war aber bei allen drei Antikörpern noch LMX1B vorhanden, was am Bindungsverhalten der jeweiligen Antikörper oder dem eingesetzten Protein:Antikörper-Verhältnis liegen könnte. Bei den mit einem Pfeil markierten Banden bei 25 kDa wurde angenommen, dass es sich um ein unspezifisches Signal handelt, das durch die leichten Ketten der Antikörper, das Zellkulturmedium oder einer Kombination der genannten Stoffe verursacht wurde. Da dieses unspezifische Signal bei 422-19 deutlich stärker ausgeprägt ist als bei den übrigen Antikörpern wurde die Immunpräzipitation für 422-19, 422-76 und 9E10 komplett wiederholt (Abbildung 22 B). Hierdurch konnte bestätigt werden, dass die durch die Klone 422-19 und 422-76 produzierten Antikörper für die Durchführung einer Immunpräzipitation geeignet sind.

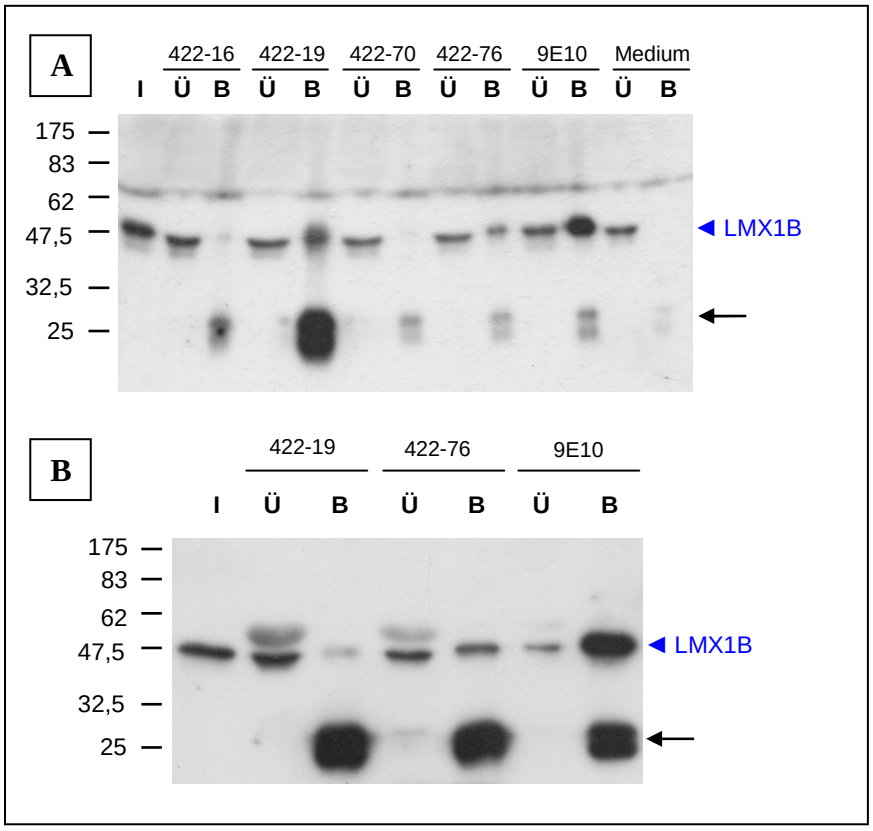



**Abbildung 22: Immunpräzipitation mit Zellkulturüberstand der Klone aus Maus 422.** Mit p3M/hLMX1B complete transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert und das Lysat mit 100 µl 50%iger Protein G-Sepharose-Beads in Brij-Puffer 0,5 h bei 4°C vorgeklärt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und 20 µl des Überstandes (entspricht 40 µg Protein) als Input **(I)** mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 2 min bei 100°C gekocht und bei -20°C gelagert. Dann wurden je 400 µl vorgeklärtem Lysat (entspricht 400 µg Gesamtprotein) 100 µl Zellkulturüberstand des jeweiligen Klons bzw. HAT-Medium zugegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 40 µl 50%iger Protein G-Sepharose-Beads in Brij-Puffer hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4°C wurden die Protein G-Sepharose-Antikörper-Protein-Komplexe abzentrifugiert. Jeweils 25 µl des Überstandes **(Ü)** wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 2 min bei 100°C gekocht und bei -20°C gelagert. Nach Entfernen des restlichen Überstandes wurden die Beads **(B)** mehrfach gewaschen, anschließend in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 2 min bei 100°C gekocht. Jeweils die Hälfte der Proben (Input I, Überstand Ü und Beads B) wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde. Danach wurde die PVDF-Membran für 2 h mit anti-LMX1B Antiserum BMO8 (1:2.000) inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers. Bei **Abbildung A** handelt es sich um ein erstes orientierendes Experiment. **Abbildung B** zeigt die Ergebnisse eines Bestätigungsexperimentes. Der blaue Pfeilkopf zeigt die Bande für LMX1B. Der Pfeil weist auf die leichten Ketten der Antikörper, das Zellkulturmedium oder einer Kombination der genannten Stoffe hin.

## B. Hybridomzellklone aus Maus 193 [gerichtet gegen hLMX1B (322-395)]

Analog dem Versuch für die Klone aus Maus 422, wurden die Hybridomzellklone aus Maus 193 getestet. Die Menge an Gesamtprotein aus mit p3M/hLMX1B complete transfizierten COS-7-Zellen pro IP wurde lediglich von 400 µg auf 300 µg reduziert. Aus Abbildung 23 ist ersichtlich, dass die durch 193-16, 193-67 und 193-68 produzierten Antikörper zur

Durchführung einer Immunpräzipitation geeignet sind (siehe jeweils Spur B). Bemerkenswert ist insbesondere, dass für 193-16 und 193-67 im Überstand (Ü) nach Immunpräzipitation kein LMX1B mehr nachweisbar ist, was für die hohe Effizienz dieses Antikörpers spricht. Überdies sind die Banden (jeweils Spur B) für 193-16, 193-67 und 193-68 wesentlich stärker ausgeprägt als für 422-19 oder 9E10, was dadurch erklärt werden kann, dass diese Antikörper während der Immunpräzipitation deutlich mehr LMX1B binden.

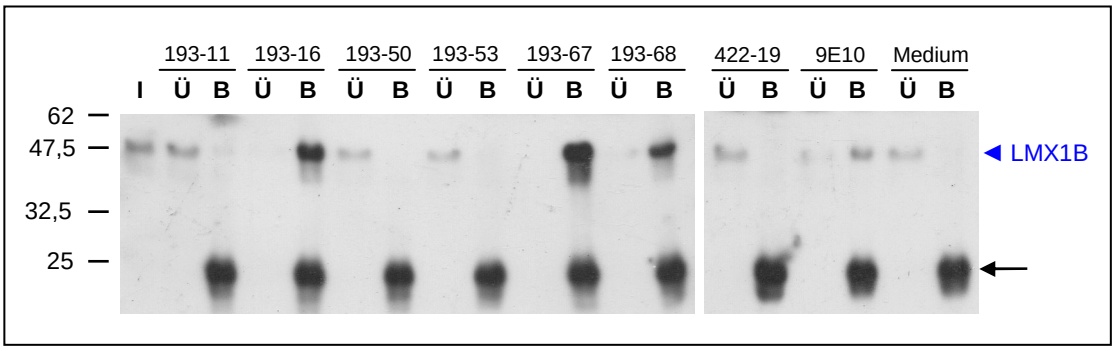



**Abbildung 23: Immunpräzipitation mit Zellkulturüberstand der Klone aus Maus 193.** Mit p3M/hLMX1B complete transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert und das Lysat mit 100 µl 50%iger Protein G-Sepharose-Beads in Brij-Puffer 0,5 h bei 4°C vorgeklärt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und 20 µl des Überstandes (entspricht 30 µg Protein) als Input **(I)** mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 2 min bei 100°C gekocht und bei -20°C gelagert. Dann wurden je 400 µl vorgeklärtem Lysat (entspricht 300 µg Gesamtprotein) 100 µl Zellkulturüberstand des jeweiligen Klons bzw. HAT-Medium zugegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl 50%iger Protein G-Sepharose-Beads in Brij-Puffer hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4°C wurden die Protein G-Sepharose-Antikörper-Protein-Komplexe abzentrifugiert. Jeweils 25 µl des Überstandes **(Ü)** wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 2 min bei 100°C gekocht und bei -20°C gelagert. Nach Entfernen des restlichen Überstandes wurden die Beads **(B)** mehrfach gewaschen, anschließend in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 2 min bei 100°C gekocht. Jeweils die Hälfte der Proben (Input I, Überstand Ü und Beads B) wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde. Danach wurde die PVDF-Membran für 2 h mit anti-LMX1B Antiserum BMO8 (1:2.000) inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers. Der blaue Pfeilkopf zeigt die Bande für LMX1B. Der Pfeil weist auf die leichten Ketten der Antikörper, das Zellkulturmedium oder einer Kombination der genannten Stoffe hin.

Fasst man die Ergebnisse aus ELISA, Western-Blot und Immunpräzipitation zusammen, so ergeben sich fünf Hybridomzellklone, die hervorragende Resultate erbracht haben: die gegen das $NH_2$-terminale Peptid hLMX1B (1-53) gerichteten Klone 422-19 und 422-76 und die gegen das COOH-terminale Peptid hLMX1B (322-395) gerichteten Klone 193-16, 193-67 und 193-68 (Zusammenfassung der Testergebnisse siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse aus ELISA, Western-Blot und Immunpräzipitation.** Die Bewertung erfolgte anhand von Qualität und Spezifität der Ergebnisse in einer Abstufung von +++ (sehr gut) bis – (negativ).

| | 422-19 | 422-76 | 193-16 | 193-67 | 193-68 |
|---|---|---|---|---|---|
| **ELISA** | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| **Western-Blot** | - | + | ++ | +++ | - |
| **Immunpräzipitation** | + | + | ++ | +++ | ++ |

## 3.3 Subklonierung der Hybridomzellen und endgültige Charakterisierung der monoklonalen Antiköper gegen LMX1B

### 3.3.1 Subklonierung der ausgewählten Zellklone

Während der Testphase wurden die Hybridomzellklone auf 6-Loch-Platten kultiviert und alle 2 bis 4 Tage 1:2 bis 1:3 gesplittet, wobei von HAT-Medium auf eine 1:1 Mischung von HAT-Medium:HT-Medium gewechselt wurde. Bei jedem Mediumwechsel wurden stets auch Zellen in dem alten Medium belassen, so dass auf diese Zellen zurückgegriffen werden konnte für den Fall, dass die neue Mediumzusammensetzung von den Zellen nicht vertragen wurde, was aber nicht eintrat. Nach zwei Passagen in der 1:1 Mischung wurden die Zellen 1:3 bis 1:5 in reines HT-Medium in T25-Flaschen (Gesamtvolumen 5-10 ml) gesplittet. Zu diesem Zeitpunkt war die Testphase abgeschlossen. Die fünf ausgewählten Hybridomzellklone mussten nun subkloniert werden, um eine jeweils monoklonale Zellpopulation herzustellen. Da die Klone von der Fusion bis zu diesem Zeitpunkt in etwa 8 bis 10 Mal passagiert worden waren, wurde vor der Subklonierung ein ELISA (siehe 3.3.2A) durchgeführt, um auszuschließen, dass bei einer angenommenen Polyklonalität der Zellpopulation nicht der jeweils spezifische durch unspezifische Klone „überwachsen“ worden war. Da dies für keinen der fünf Hybridomzellklone der Fall war (siehe Abbildung 24), konnte mit der Subklonierung begonnen werden.

Die Wahrscheinlichkeit eine monoklonale Zellpopulation zu erhalten lässt sich in Abhängigkeit von der Zahl der ausgesäten Zellen pro Vertiefung (=α) mit Hilfe der Poisson-Gleichung annäherungsweise berechnen (Lefkovits & Waldmann, 1979). Während die Anzahl komplett leerer Vertiefungen mit der Zahl der ausgesäten Zellen pro Vertiefung

abnimmt, findet sich für die Bedingung, dass sich genau ein Klon pro Vertiefung bildet (Monoklonalität) ein Maximum bei α=1 (Lietzke & Unsicker, 1985). Daher scheint es rein statistisch am besten die Hybridomzellen in einer Zelldichte von 1 Zelle pro Vertiefung auszusäen. In der Praxis führte aber eine so geringe Zelldichte zu sehr vielen komplett leeren Vertiefungen. Deshalb wurde jeder Klon in den Zelldichten von 10 Zellen/Vertiefung für eine Hälfte der Platte und 1 Zelle/Vertiefung für die andere Hälfte (Goding, 1980) in HT-Medium auf eine 96-Loch-Platte ausgesät. Das Screening der auf der Platte entstandenen Sub-Klone erfolgte ca. 10 Tage später analog dem ersten Screening (siehe 3.1.4C) nach der Fusion. Da für α = 1 die Anzahl der biklonalen Kulturen aber noch immer 50% der monoklonalen beträgt (Lietzke & Unsicker, 1985), bedarf es neben dem Screening mittels ELISA der genauen lichtmikroskopischen Analyse der Klonmorphologie und –größe.

Daher war neben einem hohen spezifischen Signal im Screening das Vorliegen von nur einer, kreisrunden Zellkolonie (ohne zusätzliche Kolonien oder Zellen) entscheidend für die Auswahl dieser Vertiefung. Pro zu subklonierendem Hybridomzellklon wurden zwei Sub-Klone ausgewählt, erneut über die Sequenz 96-Loch-Platte / 24-Loch-Platte / T25-Flasche expandiert und der am besten wachsende Sub-Klon anschließend ein zweites Mal auf dieselbe Art und Weise subkloniert.

Zusammenfassend war es für jeden der Klone 422-19, 422-76, 193-16, 193-67 und 193-68 möglich bei beiden Subklonierungen Vertiefungen auf der Hälfte der 96-Loch-Platte mit einer Zelldichte von 1 Zelle/Vertiefung auszuwählen, die sowohl ein hohes spezifisches Signal im ELISA als auch die geforderte Klonmorphologie boten. Die anschließende Entwöhnung der Hybridomzellen von dem multipel supplementierten Zellkulturmedium gestaltete sich problemlos (genaues Vorgehen siehe 2.2.3F). Danach wurden die Hybridomzellen in RPMI 1640/10% FCS als endgültigem Medium kultiviert und erneut expandiert, so dass von jedem Klon ca. 15 Röhrchen eingefroren werden konnten. Der beim Einfriervorgang abgenommene Zellkulturüberstand wurde mit 0,02% Na-Azid versetzt und teils bei 4°C für die sofortige Durchführung von Experimenten, teils bei -20°C zur Langzeitaufbewahrung gelagert.

### 3.3.2 Endgültige Charakterisierung der monoklonalen Antiköper gegen LMX1B

Im Anschluss an die Subklonierung musste erneut überprüft werden, ob sich durch das Passagieren der Zellen die Eigenschaften der produzierten Antikörper verändert haben, bzw. diese Eigenschaften endgültig charakterisiert werden.

A. ELISA

Als Erstes wurde das bereits bekannte ELISA-Testsystem (siehe 3.2.1) benutzt, um Zellkulturüberstand vor (prä) und nach (post) den zwei Subklonierungen zu vergleichen. Wie aus Abbildung 24 ersichtlich ist, ergab sich für keinen der fünf Hybridomzellklone eine Änderung des Signalverhaltens. Im Vergleich zu den initial durchgeführten ELISA-Experimenten (siehe 3.2.1) scheint das unspezifische Signal gegenüber hLMX1B (1-53) für die Klone 193-16, 193-67 und 193-68 gemindert. Da dies auch bereits vor der Subklonierung der Fall war, lässt sich dieses Phänomen allerdings nicht durch die Polyklonalität der Antikörper vor bzw. die Monoklonalität nach den Subklonierungen erklären. Zusammenfassend erzielen alle fünf Klone sehr gute, spezifische Ergebnisse im ELISA.

**Abbildung 24: ELISA mit Zellkulturüberstand der Klone 422-19 und 422-76 (A) sowie 193-16, 193-67 und 193-68 (B) vor und nach den Subklonierungen.** Zunächst wurden die jeweiligen Peptide durch Inkubation über Nacht an 96-Loch-Platten immobilisiert und dann mit dem jeweiligen unverdünnten Zellkulturüberstand für 2 h inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden gebundene Primärantikörper mit HRP-konjugierten anti-Maus-IgG-Antikörpern detektiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TMB-Entwicklerlösung visualisiert und die Platten nach Abstoppen der Reaktion mit 5,3% Schwefelsäure bei 450 nm ausgelesen.

## B. Western-Blot

Analog 3.2.3 wurden die Hybridomzellklone einer erneuten Analyse mittels Western-Blot unterzogen. Abbildung 25 zeigt, dass – wie bereits bekannt – LMX1B mit Zellkulturüberstand der Klone 422-76, 193-16 und 193-67 detektiert werden kann. Nach Überexposition findet sich sogar eine schwache Bande für 193-68 (Daten nicht gezeigt). Besonders bemerkenswert ist auch, dass die Bande für 193-67 bei gleicher Expositionsdauer die Banden der Positivkontrollen 9E10 und BMO8 deutlich übertrifft; somit scheint von allen in der Arbeitsgruppe vorhandenen Antikörpern 193-67 am besten geeignet für die Detektion von

LMX1B mittels Western-Blot; bei 193-67 handelt es sich also um einen guten Kandidaten, um den Nachweis von endogenem LMX1B mittels Western-Blot zu etablieren.

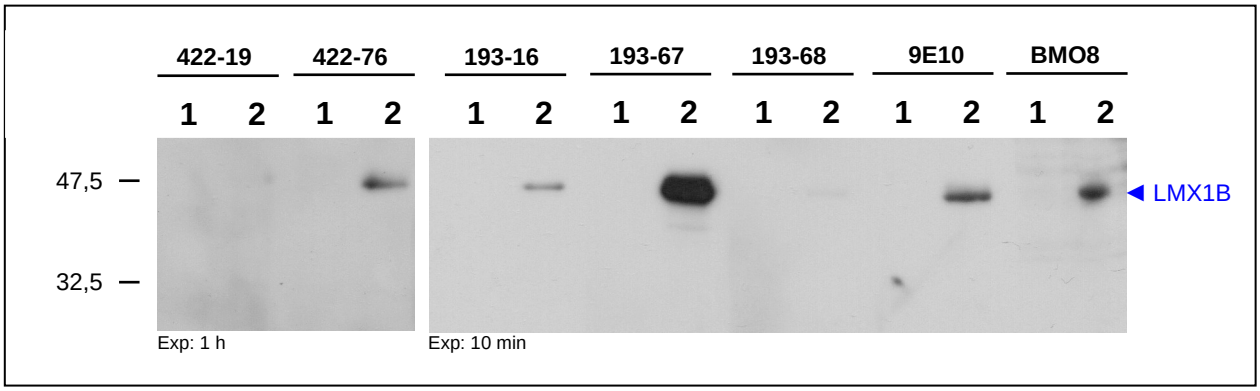



**Abbildung 25: Western-Blot mit Zellkulturüberstand der subklonierten Hybridomzellklone.** Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert. Ebenso wurde mit nicht-transfizierten COS-7-Zellen verfahren. Je 40 µg Lysat wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen (**Spur 1:** Lysat von nicht-transfizierten COS-7-Zellen, **Spur 2:** Lysat von mit p3M/hLMX1B complete transfizierten COS-7-Zellen), das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde. Danach wurde die PVDF-Membran in Stücke à 2 Spuren zerteilt und mit den jeweiligen Antikörpern (Verdünnung von 1:10 für 422-19, 422-76, 193-16, 193-67, 193-68; 1:3 für 9E10 und 1:2.000 für BMO8; siehe auch **Tabelle 1** und **Tabelle 2**) 2 h inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers. Dargestellt sind zwei verschiedene Expositionszeiten: 1 h und 10 min. Der blaue Pfeilkopf weist auf die Bande für LMX1B hin.

## C. Immunpräzipitation

Neben ELISA und Western-Blot wurden auch die Ergebnisse der Immunpräzipitation (siehe 3.2.4) nach den Subklonierungen reproduziert. Da auch die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) eine mögliche Applikation für die generierten Antikörper darstellt, wurde über eine „normale“ Immunpräzipitation hinaus auch eine Immunpräzipitation von Proteinen unter Chromatin-Immunpräzipitationsbedingungen durchgeführt. Hierzu wurde ein modifiziertes Immunpräzipitationsprotokoll angewendet. Der größte Unterschied zwischen beiden Protokollen besteht in den verwendeten Puffern: Brij/NP40 als eher milde Detergentien bei der „normalen“ IP im Vergleich zu SDS und Triton X-100 als bedeutend stärkere Detergentien bei der ChIP. Zur Analyse der ChIP wurde ein Western-Blot mit anti-LMX1B Antiserum durchgeführt. Daher wurde auf eine Quervernetzung von DNA und Proteinen mit Hilfe von Formalin verzichtet.

Was die „normale“ Immunpräzipitation anbelangt, konnten die aus den Vorversuchen bereits bekannten Ergebnisse reproduziert werden (siehe Abbildung 26 A); somit eignen sich alle

generierten Antikörper für die Immunpräzipitation, wobei sich die stärksten Banden bei den Antikörpern 193-16 und 193-67 finden.

Unter Chromatin-Immunpräzipitationsbedingungen stellt sich ein ganz ähnliches Ergebnis dar. Abbildung 26 B zeigt, dass auch unter geänderten Pufferbedingungen alle generierten Antikörper LMX1B binden. Erneut finden sich die stärksten Banden und somit das beste Bindungsverhalten bei den Antikörpern der Klone 193-16 und 193-67. Auffallend ist aber, dass im Vergleich von IP und ChIP 422-76 unter ChIP-Bedingungen besser funktioniert, wohingegen das Signal für 193-68 unter ChIP-Bedingungen deutlich schwächer ist.

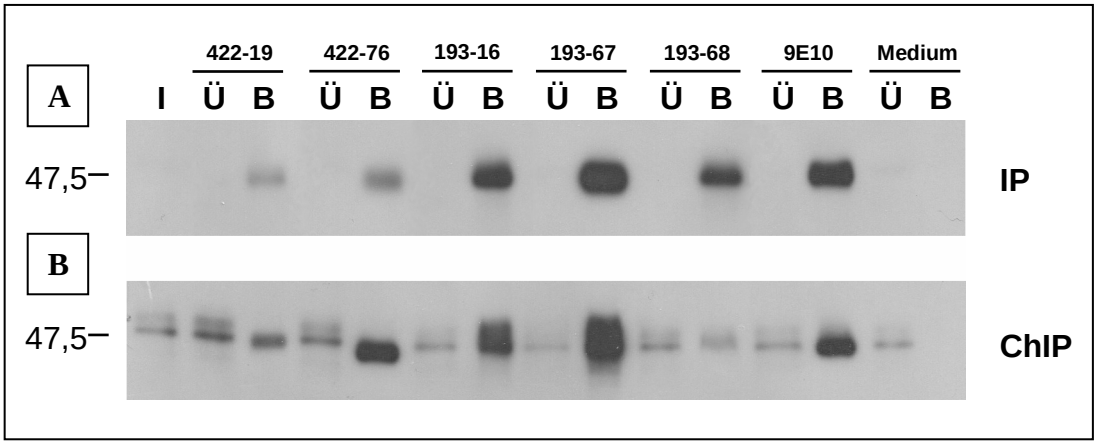



**Abbildung 26: Immunpräzipitation unter normalen und unter Chromatin-Immunpräzipitations-Bedingungen. Abbildung A:** Mit p3M/hLMX1B complete transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Brij-Puffer lysiert und das Lysat mit 100 µl 50%iger Protein G-Sepharose-Beads in Brij-Puffer 0,5 h bei 4°C vorgeklärt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und 20 µl des Überstandes als Input (I) mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 2 min bei 100°C gekocht und bei -20°C gelagert. Dann wurden je 400 µl vorgeklärtem Lysat (entspricht 300 µg Gesamtprotein) 100 µl Zellkulturüberstand des jeweiligen Klons bzw. Zellkulturmedium zugegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 40 µl 50%iger Protein G-Sepharose-Beads in Brij-Puffer hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1h wurden die Protein G-Sepharose-Antikörper-Protein-Komplexe abzentrifugiert. Jeweils 25 µl des Überstandes (Ü) wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 2 min bei 100°C gekocht und bei -20°C gelagert. Nach Entfernen des restlichen Überstandes wurden die Beads (B) mehrfach gewaschen, anschließend in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 2 min bei 100°C gekocht. Jeweils die Hälfte der Proben **(Input I, Überstand Ü und Beads B)** wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde. Danach wurde die PVDF-Membran für 2 h mit anti-LMX1B Antiserum BMO8 inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers. **Abbildung B:** Mit p3M/hLMX1B complete transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit SDS-Puffer lysiert. Nach erfolgter Lyse wurde SDS bis zu einer Endkonzentration von 0,5% zugegeben. Um die Zellen aufzuschließen, wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer Nadel in eine 1 ml-Spritze aufgezogen und mehrfach zwischen Spritze und Reagiergefäß hin- und herbewegt. Danach wurde dem durch Zentrifugation abgetrennten Überstand ½ Volumenanteil Triton-Verdünnungspuffer zugegeben. Alle weiteren Schritte wurden analog zu Abbildung A durchgeführt, wobei als IP-Puffer eine Mischung aus einem Volumen SDS+ Puffer und ½ Volumen Triton-Verdünnungspuffer benutzt wurde. **Die Bande für LMX1B befindet sich in einer Molekulargewichtshöhe von 47,5 kDa.**

Zusammenfassend erbringen also die durch die Hybridomzellklone 193-16 und 193-67 sezernierten Antikörper die besten Ergebnisse bei der Durchführung von

Immunpräzipitationsexperimenten. Somit sind diese Antikörper auch am besten geeignet, um Co-Immunpräzipitationen und Chromatin-Immunpräzipitationen von endogenem LMX1B zu etablieren, was ein Ziel dieser Arbeit darstellt (siehe 1.5).

Bei den bisherigen Experimenten wurden auf Grund des breiteren Bindungsverhaltens an alle IgG-Subtypen Protein G Sepharose-Beads verwendet. Da in Zukunft aber auch Protein A zur Anwendung kommen sollte, wurde für 193-16 und 193-67 ein Experiment durchgeführt, das das Bindungsverhalten von Protein A bzw. Protein G gegenüber diesen beiden Antikörpern vergleicht. Aus Abbildung 27 (jeweils Spur B) ist ersichtlich, dass sowohl für 193-16 als auch für 193-67 kein Unterschied in der Signalstärke und damit auch im Bindungsverhalten zwischen Protein A und Protein G besteht.

Auffallend ist zudem, dass die mit einem Pfeil markierten Banden bei 25 kDa, von denen initial (siehe 3.2.4) angenommen worden war, dass es sich um ein unspezifisches Signal handle, das durch die leichten Ketten der Antikörper, das Zellkulturmedium oder eine Kombination der genannten Stoffe verursacht wird, nur bei der Anwendung von Protein G-Sepharose Beads auftreten.

Unglücklicherweise treten bei Verwendung von Protein A Sepharose-Beads ebenfalls unspezifische Banden auf (markiert durch den Pfeil unterhalb von 47,5 kDa), die sich direkt unterhalb der Bande für LMX1B befinden. Da diese unspezifischen Banden bei der Detektion von LMX1B extrem hinderlich sind, wurde auch in zukünftigen Experimenten nur Protein G eingesetzt.

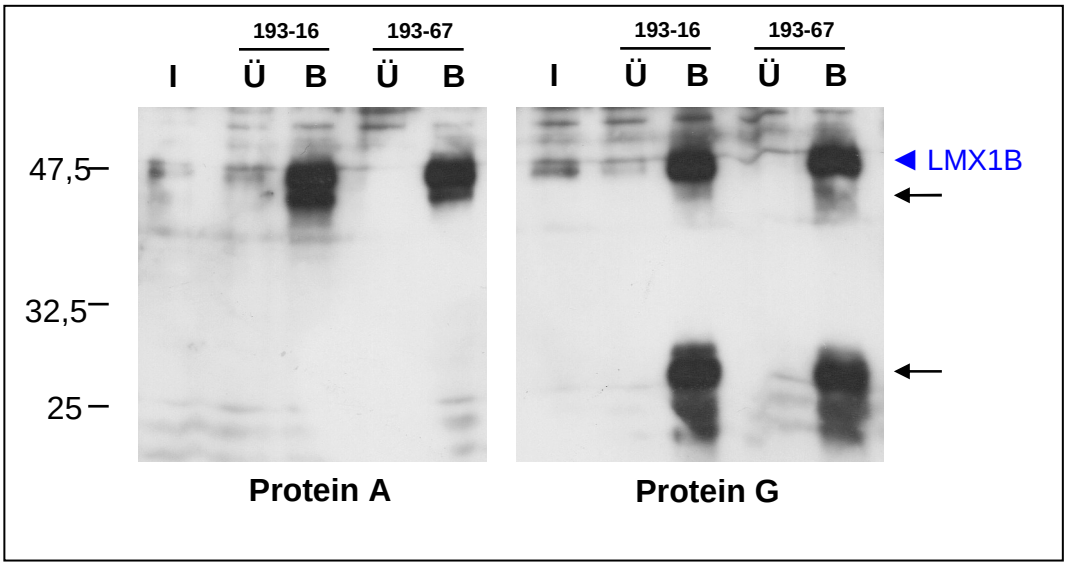



**Abbildung 27: Immunpräzipitation mit 193-16 und 193-67; Vergleich des Bindungsverhaltens von Protein A- und Protein G-Sepharose-Beads.** Mit p3M/hLMX1B complete transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Brij-Puffer lysiert und das Lysat mit 100 µl 50%iger Protein A- bzw. Protein G-Sepharose-Beads in Brij-Puffer 0,5 h bei 4°C vorgeklärt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und 20 µl des Überstandes als Input (I) mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 2 min bei 100°C gekocht und bei -20°C gelagert. Dann wurden je 400 µl vorgeklärtem Lysat (entspricht 250 µg Gesamtprotein) 100 µl Zellkulturüberstand des jeweiligen Klons zugegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 40 µl 50%iger Protein A- bzw. Protein G-Sepharose-Beads in Brij-Puffer hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h wurden die Beads-Antikörper-Protein-Komplexe abzentrifugiert. Jeweils 25 µl des Überstandes (Ü) wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 2 min bei 100°C gekocht und bei -20°C gelagert. Nach Entfernen des restlichen Überstandes wurden die Beads (B) mehrfach gewaschen, anschließend in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 2min bei 100°C gekocht. Jeweils die Hälfte der Proben **(Input I, Überstand Ü und Beads B)** wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde. Danach wurde die PVDF-Membran für 2 h mit anti-LMX1B Antiserum BMO8 (1:2.000) inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers. Der blaue Pfeilkopf zeigt die Bande für LMX1B. Die Pfeile markieren jeweils unspezifische Banden.

## D. Immunzytochemie

In Ergänzung zu den bisher durchgeführten Versuchen sollten die generierten Antikörper auch mittels Immunzytochemie getestet werden. Die durch die Klone 193-16 und 193-67 sezernierten Antikörper, die ja bereits die besten Ergebnisse in der Immunpräzipitation erbracht hatten, wurden auch für die Durchführung einer Immunzytochemie ausgewählt.

Hierzu wurden COS-7-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und transient mit p3M/hLMX1B complete transfiziert. Als Negativkontrolle wurden nicht-transfizierte COS-7-Zellen verwendet. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst gewaschen und dann fixiert. Da je nach Fixierungsprotokoll die Zugänglichkeit der von den Antikörpern erkannten Epitope unterschiedlich sein kann, wurden zwei unterschiedliche Protokolle mit Bouin bzw. 4% Paraformaldehyd als Fixans verwendet. Letztendlich ergaben sich aber für

beide Fixierungsprotokolle identische Resultate, weshalb in Abbildung 28 (Antikörper 193-16) und Abbildung 29 (Antikörper 193-67) nur die Versuche mit Bouin-Fixation dargestellt sind.

Als Positivkontrolle diente Zellkulturüberstand des Hybridomzellklons 9E10, der in einer in der Arbeitsgruppe üblichenVerdünnung von 1:2 verwendet wurde. Ausgehend von dieser Verdünnung wurde für die generierten Antikörper ein Bereich von 1:2 bis 1:100 getestet. Für jedes Deckgläschen wurde des Weiteren eine Kernfärbung mit Hoechst-Lösung durchgeführt (Daten nicht gezeigt), wodurch die Zellkerne (LMX1B ist als Transkriptionsfaktor nukleär lokalisiert) eindeutig lokalisiert und die Färbung durch 193-16 bzw. 193-67 verifiziert werden konnte.

Aus Abbildung 28 und Abbildung 29 ist ersichtlich, dass beide getesteten Antikörper über den gesamten Verdünnungsbereich zu einer deutlichen Kernfärbung führen. Während das spezifische Signal bei steigenden Verdünnungen nur minimal abnimmt, ist ein deutlicher Rückgang des Hintergrundsignals (siehe nicht-transfizierte Zellen) zu verzeichnen. Daher erscheint sowohl für 193-16 als auch für 193-67 eine Verdünnung von 1:100 als am besten geeignet.

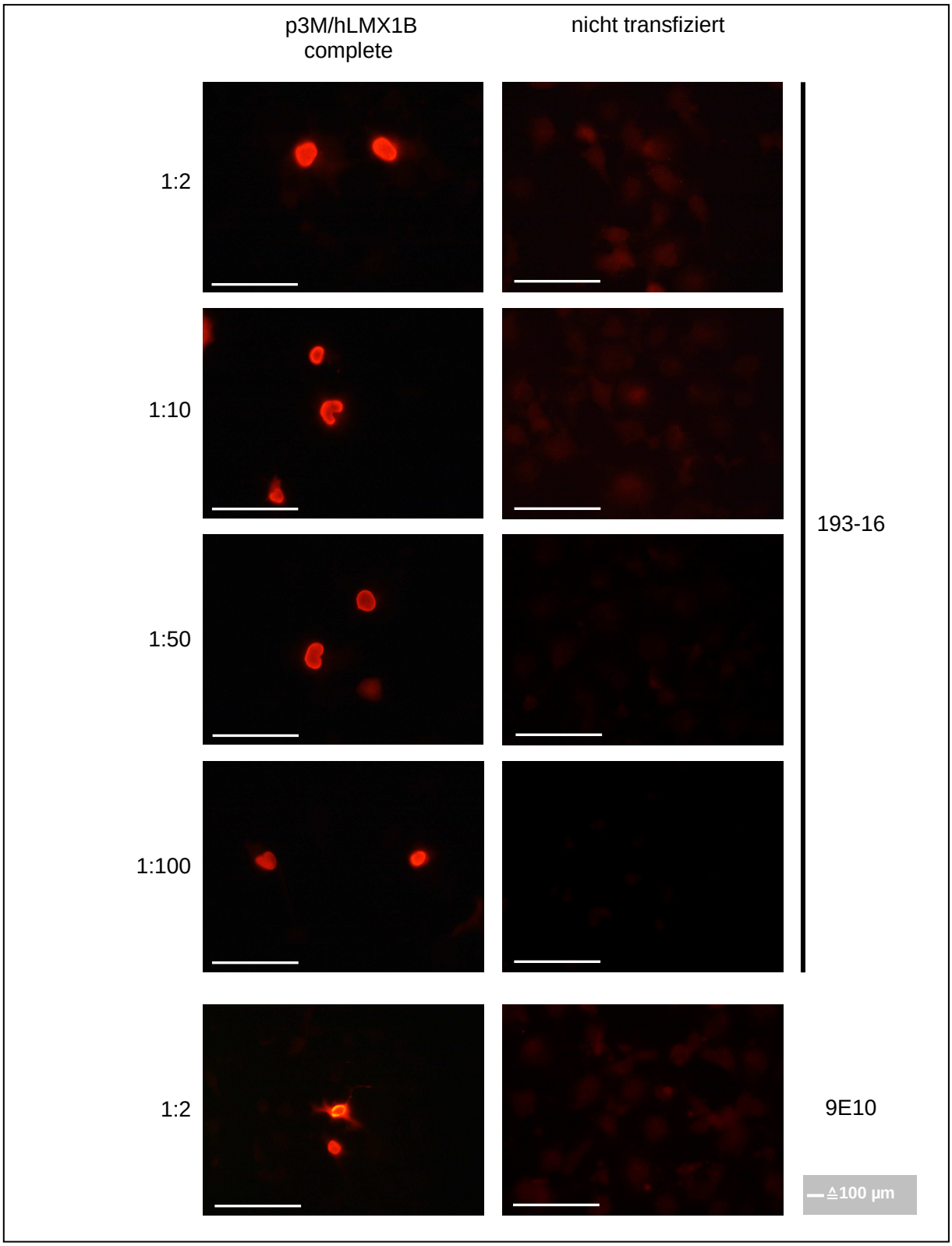



**Abbildung 28: Immunzytochemie mit Zellkulturüberstand von Klon 193-16.** Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in Bouin fixiert und mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Zellkulturüberständen (193-16 in verschiedenen Verdünnungen bzw. 9E10). Die Detektion der Primärantikörper erfolgte über Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper. Die Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20 mit einer Polaroid DMC 2-Kamera photographiert (x40).

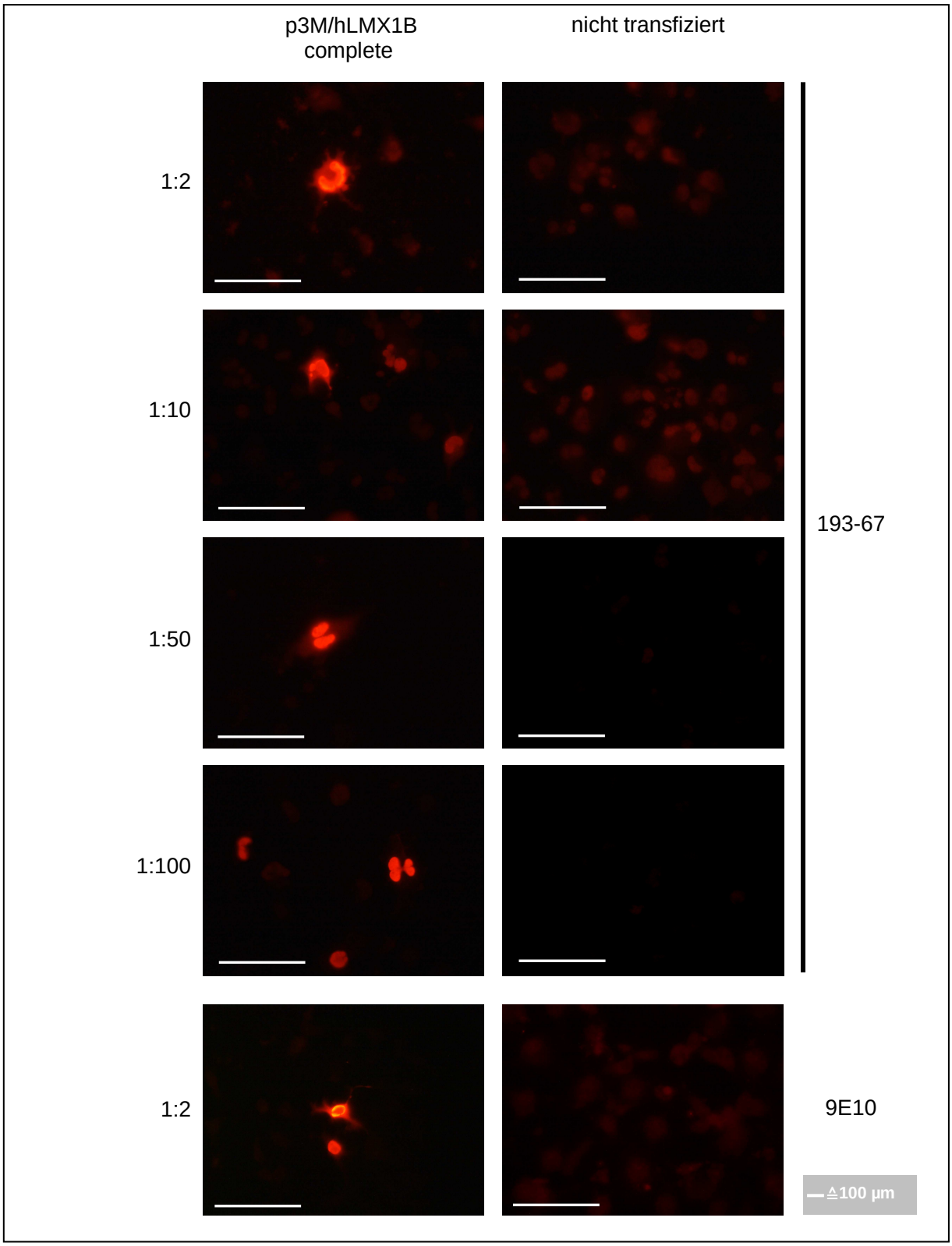



**Abbildung 29: Immunzytochemie mit Zellkulturüberstand von Klon 193-67.** Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in Bouin fixiert und mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Zellkulturüberständen (193-67 in verschiedenen Verdünnungen bzw. 9E10). Die Detektion der Primärantikörper erfolgte über Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper. Die Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20 mit einer Polaroid DMC 2-Kamera photographiert (x40).

## 3.4 Detektion von endogenem LMX1B-Protein und Charakterisierung von LMX1B-Interaktionspartnern in Podozyten mit Hilfe der hergestellten monoklonalen Antikörper

Mit den vorliegenden monoklonalen Antikörpern wurden leistungsfähige Werkzeuge geschaffen, um LMX1B mit Hilfe verschiedenster Verfahren zu detektieren. Da ihre Sensitivität in einigen Verfahren deutlich über der der bisher in der Arbeitsgruppe verwendeten Antikörper liegt (siehe 3.3.2B und 3.3.2C), erscheint es lohnenswert, mit Hilfe der neuen Antikörper Verfahren zu etablieren, um endogen produziertes LMX1B zu detektieren. So könnte die Rolle von LMX1B – in Ergänzung zu den bisher verwendeten Systemen, in denen LMX1B überexprimiert wurde – in einem physiologischeren Kontext untersucht werden.

### 3.4.1 Detektion von endogenem Lmx1b in Zelllysat aus murinen Podozytenzellen (mPCL) mittels Western-Blot

LMX1B wird renal spezifisch in den Podozyten exprimiert. Daher wurde zunächst versucht, Lmx1b in Zelllysat muriner Podozytenzellen (Schiwek et al., 2004) zu detektieren. Hierzu wurden die murinen Podozytenzellen unter permissiven Bedingungen kultiviert. Bei Erreichen vollständiger Konfluenz wurden die Zellen geerntet und sowohl Vollzelllysat als auch nukleäres Extrakt und als Negativkontrolle zytosolisches Extrakt gewonnen. In Western-Blot-Analysen mit Hilfe der Zellkulturüberstande von Klon 193-16 bzw. 193-67 bzw. mit anti-LMX1B-Antiserum BMO8 wurden bis zu 100 µg Vollzelllysat bzw. nukleäres Extrakt eingesetzt. Selbst nach Optimierung konnte Lmx1b allerdings nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Parallel dazu wurden Western-Blot Experimente mit kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen die LMX1B-Interaktionspartner LDB1 (Marini et al., 2003) und E47 (Johnson et al., 1997) durchgeführt, die ebenfalls zu keinem positiven Ergebnis führten (Daten nicht gezeigt).

A. Aufreinigung von Zellkulturüberstand von Klon 193-67 mittels Protein A-Sepharose-Säulen

Da die generierten monoklonalen Antikörper nur in Form von Zellkulturüberstand vorlagen, welcher im Vergleich zu Serum oder kommerziell verfügbaren Antikörpern nur sehr geringe Konzentrationen an Antikörper beinhaltet (Harlow & Lane, 1988), wurde beschlossen, den im Western-Blot stärksten, (siehe 3.3.2B) von Hybridomzellklon 193-67 sezernierten Antikörper mittels Protein A-Sepharose-Säulen aufzureinigen. Der Proteingehalt des Zellkulturüberstandes von Klon 193-67 betrug vor Aufreinigung 5,5 µg/ml. Eine vergleichende Messung von Zellkulturüberstand des Hybridomzellklons 9E10 (Evan et al., 1985) erbrachte einen Wert von 5,6 µg/ml, was zeigt, dass der im Rahmen dieser Arbeit generierte Klon 193-67 im Vergleich zu in anderen Arbeitsgruppen hergestellten Hybridomzellklonen eine ähnliche Menge an Antikörpern produziert.

Bei der Durchführung der Aufreinigung wurden 100 ml Zellkulturüberstand und 1 ml Protein A-Sepharose-Beads (verteilt auf 2 50 ml-Röhrchen) miteinander für 2 h bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert und anschließend auf eine Säule geladen. Der Durchfluss wurde für spätere Analysen aufgefangen. Nach einigen Waschschritten erfolgte die fraktionsweise Elution mit jeweils 500 µl Glycin pH 3,0, wobei zum pH-Ausgleich jeder Fraktion 50 µl 1 M Tris pH 8,0 zugegeben wurden. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Western-Blot-Analyse mit Quantifizierung der Bandengröße und –intensität mittels ImageQuant (Molecular Dynamics) (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurde festgestellt, dass ca. 60% der Antikörper an das Säulenmaterial gebunden haben, während sich ca. 40% ungenutzt im Durchfluss fanden. Die Eluatsfraktionen 1 bis 3 wiesen die höchsten Proteinkonzentrationen auf und wurden daher zusammengefasst; es ergab sich eine Antikörperkonzentration von 0,18 µg/µl, was im Vergleich zu Zellkulturüberstand eine 32-fache Anreicherung der Antikörper bedeutet. Mit Hilfe dieser aufgereinigten Antikörperlösung wurden Western-Blot-Analysen angestellt, wobei Verdünnungen im Bereich von 1:50 bis 1:1.000 getestet wurden. Hierbei gelang es selbst bei der höchsten Verdünnung mühelos LMX1B in 10 µg Vollzelllysat aus mit p3M/hLMX1B complete transfizierten COS-7-Zellen nachzuweisen; endogenes Lmx1b aus 100 µg Vollzelllysat muriner Podozytenzellen entzog sich allerdings der Detektion (Daten nicht gezeigt).

Parallel dazu wurden Western-Blots mit Hilfe des Antikörpers BMN8 im selben Verdünnungsbereich durchgeführt. Bei BMN8 handelt es sich um mit Hilfe des Proteinprodukts aus pET21b/hLMX1B 22-116 affinitätsaufgereinigtes anti-LMX1B Antiserum. Endogenes Lmx1b aus 100 µg Vollzelllysat muriner Podozytenzellen konnte allerdings ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.4.2 Detektion von endogenem Lmx1b in Zelllysat aus murinen Podozytenzellen (mPCL) mittels Immunpräzipitation

Da der Nachweis von endogenem Lmx1b im Western-Blot wohl auf Grund der zu geringen Proteinmengen misslungen war, musste die Strategie gewechselt werden. Bei einer Immunpräzipitation können sehr große Mengen an Zelllysat eingesetzt werden, was es ermöglicht selbst Proteine mit geringer Expressionsrate zu präzipitieren. Daher wurde diese Methode als nächste eingesetzt.

Die ersten Versuche erbrachten jedoch negative Resultate, weshalb das bisher verwendete Protokoll (siehe 2.2.5E Methode A) modifiziert werden musste. Im Unterschied zu Methode A wurden hierbei bereits vor der Immunpräzipitation die monoklonalen Antikörper an Protein G gekoppelt. Pro Immunpräzipitation wurden bis zu 5 ml Zellkulturüberstand von Hybridomzellen mit demselben Volumen an IP-Puffer und 50 µl 50%iger Beads-Suspension gemischt und über Nacht bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Durch ein derartiges Absättigen der Beads mit Antikörpern stehen deutlich mehr Antikörper für die Immunpräzipitation zur Verfügung. Der Erfolg dieses Verfahrens wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft. Zellkulturüberstand-IP-Puffer-Gemisch wurde vor und nach Inkubation mit den Beads abgenommen, auf ein 10%-SDS-Gel geladen und nach Elektrophorese auf eine PVDF-Membran transferiert. Die schweren und leichten Ketten der enthaltenen Antikörper wurden mit Hilfe eines HRP-gekoppelten anti-Maus-IgG-Antikörpers sichtbar gemacht. Hierbei zeigte sich, dass selbst bei Einsatz von 5 ml Zellkulturüberstand pro IP nahezu alle Antikörper an die Beads binden (Daten nicht gezeigt). Nach erfolgter Bindung wurden die Beads-Antikörper-Komplexe gründlich mit IP-Puffer gewaschen, wodurch alles Zellkulturmedium, das eventuell während der eigentlichen IP einen interferierenden Einfluss haben könnte, entfernt wurde, was einen weiteren Vorteil gegenüber Methode A darstellt. Als

Negativkontrolle wurde statt Zellkulturüberstand RPMI 1640/10%FCS verwendet, mit dem vollkommen identisch verfahren wurde.

Es wurden die Antikörper 193-16, 193-67 und auch BMO8 bzw. Kombinationen der monoklonalen Antikörper getestet, wobei sich 193-67 als am besten geeignet erwies.
Abbildung 30 zeigt, dass mit Hilfe dieser Optimierungsmaßnahmen Lmx1b tatsächlich mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 193-67 in Vollzelllysat aus murinen Podozytenzellen präzipitiert werden konnte. Der Nachweis von Lmx1b im Western-Blot erfolgte mit anti-LMX1B Antiserum BMO8, das aus Kaninchen gewonnen wurde. Hierdurch wurde verhindert, dass der Sekundärantikörper im Western-Blot ebenfalls die für die Immunpräzipitation verwendeten monoklonalen Antikörper (gewonnen aus der Maus) erkennt, was zu einer maskierenden Bande im Bereich von ca. 50 kDa führen würde.

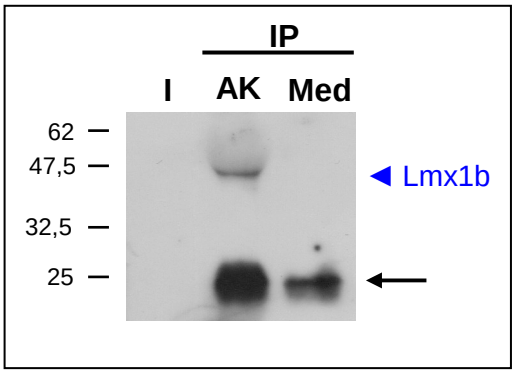



**Abbildung 30: Immunpräzipitation von endogenem Lmx1b aus murinen Podozytenzellen (mPCL).** 4 ml Zellkulturüberstand des Hybridomzellklons 193-67 wurden mit 4ml Brij-Puffer und 50 µl 50%iger Protein G-Sepharose-Suspension über Nacht inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 4 ml RPMI 1640/10% FCS verwendet, mit denen genauso verfahren wurde. Nach Zentrifugation der Beads und mehreren Waschschritten wurden pro IP 2 mg Vollzelllysat aus murinen Podozytenzellen zugegeben. Das Vollzelllysat war zuvor mit 100 µl 50%iger Protein G-Sepharose-Suspension für 1 h „vorgeklärt“ worden (ein Teil des vorgeklärten Lysats wurde als Input mit SDS-Probenpuffer versetzt, gekocht und bei -20°C gelagert). Es erfolgte eine Inkubation von 4 h bei 4°C auf dem Rotationsschüttler. Danach wurden die Protein-Antikörper-Beads-Komplexe abzentrifugiert, mehrfach gründlich mit IP-Puffer gewaschen, in 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und gekocht. Für die Western-Blot-Analyse wurde jeweils die Hälfte der Proben (**AK**= Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörper 193-67; **Med**= Immunpräzipitation mit RPMI 1640/10% FCS) und zusätzlich 100 µg Input (**I**) auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde. Danach wurde die PVDF-Membran für 2 h mit anti-LMX1B Antiserum BMO8 (1:2.000) inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers. Der blaue Pfeilkopf markiert die für Lmx1b spezifische Bande, der Pfeil eine unspezifische durch Protein G-Sepharose verursachte Bande.

### 3.4.3 Interaktion von LMX1B und LDB1

Nachdem eine Methode zur Detektion von endogenem Lmx1b etabliert worden war, konnte diese Methode ebenfalls dafür benutzt werden, Interaktionspartner von LMX1B in einem physiologischen Kontext zu charakterisieren. LDB1 stellte hierfür einen geeigneten Kandidaten dar, da die Interaktion zwischen LMX1B und LDB1 bereits in der eigenen Arbeitsgruppe durch ein Yeast-two-hybrid-screening (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Ralph Witzgall) sowie durch andere Arbeitsgruppen (Agulnick et al., 1996; Jurata & Gill, 1997; Marini et al., 2003) gezeigt worden war. Ob LMX1B und LDB1 allerdings auch in Podozyten interagieren, war bis dato unklar.

A. Murine Podozytenzelllinie (mPCL)

Da die Immunpräzipitation von Lmx1b aus murinen Podozytenzellen (siehe 3.4.2) bereits etabliert war, musste nur eine zusätzliche Western-Blot-Analyse mit Hilfe des anti-LDB1-Antikörpes CLIM-2 (N-18) durchgeführt werden, um zu klären, ob Ldb1 gemeinsam mit Lmx1b co-immunpräzipitiert wird. Hierbei konnte allerdings Ldb1 nicht sicher nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Immunpräzipitation mit Hilfe des Antikörpers CLIM-2 (N-18) und ein anschließender Western-Blot mit den gegen LMX1B gerichteten Antikörpern BMO8 bzw. 193-67 erbrachte ebenfalls keinen sicheren Nachweis einer Interaktion zwischen Lmx1b und Ldb1 in murinen Podozyten (Daten nicht gezeigt).

Diese negativen Resultate waren wohl am wahrscheinlichsten auf die nur äußerst geringen Expressionsraten beider Proteine in murinen Podozyten (mPCL) zurückzuführen. Als alternatives System bot sich die Präparation von Glomeruli aus murinen Nieren an. Da es sich bei Podozyten um eine der drei das Glomerulus aufbauenden Zellarten handelt, würde es die Präparation von murinen Glomeruli ermöglichen, mit einer stark angereicherten Podozytenpopulation zu arbeiten, die im Vergleich zur immortalisierten Zelllinie (mPCL) nicht degeneriert ist. Quantitative PCR-Analysen hatten zudem gezeigt, dass hier sowohl Lmx1b als auch Ldb1 in erheblich höherem Maße (ca. 10fach höher) exprimiert werden (persönliche Mitteilung von PD Dr. Anne Rascle und Suleiman et al., 2007).

B. Transient transfizierte COS-7-Zellen

Bevor allerdings eine Co-Immunpräzipitation mit Lysat muriner Glomeruli durchgeführt wurde, sollte die Methodik mit Hilfe eines Systems, in dem beide Proteine überexprimiert werden, optimiert werden. Insbesondere sollte neu erhaltenes anti-LDB1 Antiserum 4508 (Jurata et al., 1996) getestet werden.
Hierzu wurden COS-7-Zellen mit dem Konstrukt p3M/hLMX1B complete oder p3M/mLdb1 bzw. mit beiden Konstrukten transient transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und mit Brij-Puffer lysiert. Die Immunpräzipitation wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 193-67 analog zu dem bereits etablierten Protokoll durchgeführt, wobei die Menge an verwendetem Zellkulturüberstand auf 1 ml pro Immunpräzipitation reduziert wurde. Für die anschließende Western-Blot-Analyse wurden die Antikörper BMO8 und CLIM-2 (N-18) bzw. anti-LDB1 Antiserum 4508 eingesetzt.

Abbildung 31 zeigt, dass bei den mit p3M/hLMX1B complete transfizierten COS-7-Zellen und bei den mit p3M/hLMX1B complete und p3M/mLdb1 co-transfizierten Zellen LMX1B sowohl im Input (10 µg „vorgeklärtes“ Zelllysat) als auch im präzipitierten Komplex (Spur AK) nachweisbar ist. Betrachtet man nun den anti-Ldb1-Blot, so ist ersichtlich, dass Ldb1 ebenfalls bei den mit p3M/hLMX1B complete und p3M/mldb1 co-transfizierten Zellen in der Spur AK detektiert wird. Somit wurde durch die Immunpräzipitation mit anti-LMX1B-Antikörpern Ldb1 co-immunpräzipitiert, was die Interaktion beider Proteine belegt. Dieses Experiment wurde mehrfach durchgeführt, wobei vergleichend die beiden oben genanten anti-LDB1-Antikörper eingesetzt wurden. Es zeigte sich, dass das anti-LDB1 Antiserum 4508 Ldb1 deutlich sensitiver und spezifischer nachwies als der Antikörper CLIM-2 (N-18) (Daten nur für anti-LDB1 Antiserum 4508 gezeigt, siehe Abbildung 31).

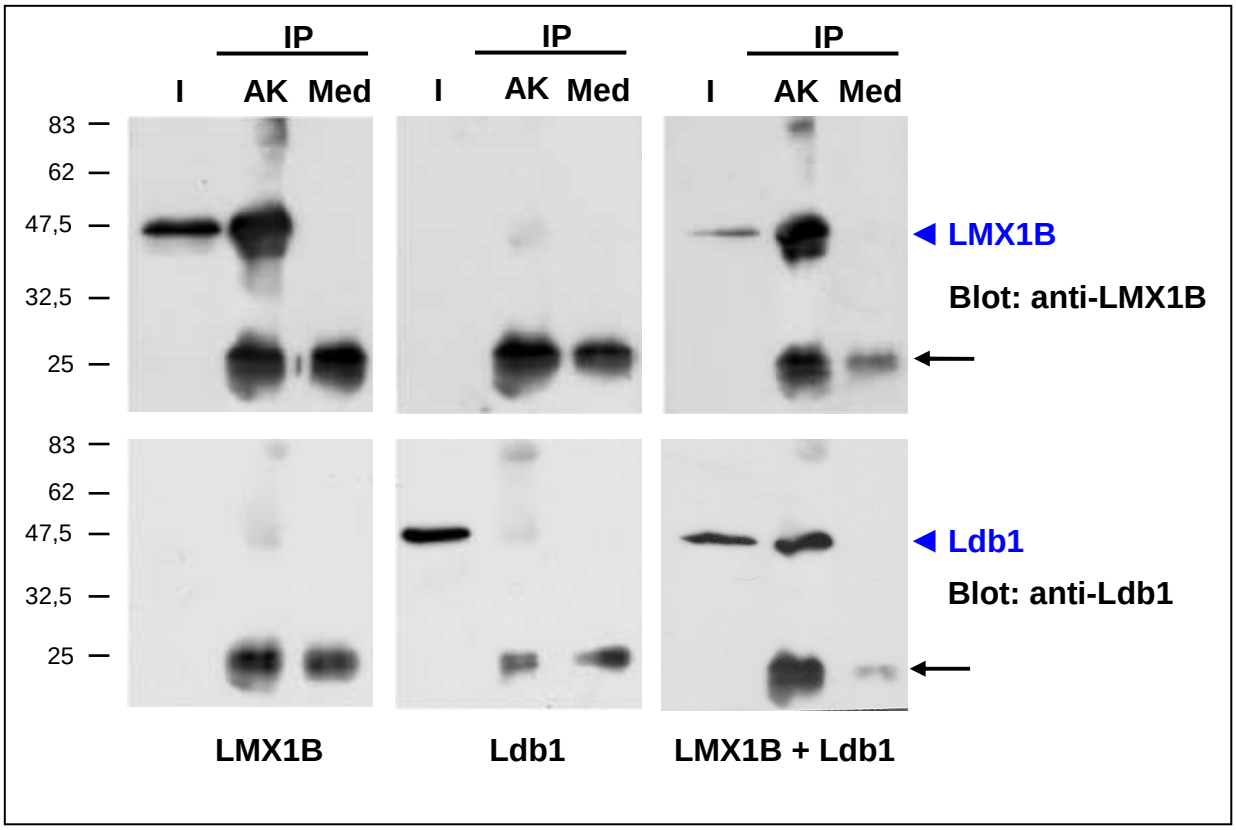



**Abbildung 31: Co-Immunpräzipitation von LMX1B und Ldb1.** COS-7-Zellen wurden mit dem Konstrukt p3M/hLMX1B complete (links) oder p3M/mLdb1 (Mitte) bzw. mit beiden Konstrukten (rechts) transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Brij-Puffer lysiert. Pro IP-Ansatz wurde jeweils 1 ml Zellkulturüberstand des Hybridomzellklons 193-67 mit 1 ml Brij-Puffer und 50 µl 50%iger Protein G-Sepharose-Suspension über Nacht inkubiert. Als Negativkontrolle wurde 1 ml RPMI 1640/10% FCS verwendet, mit dem genauso verfahren wurde. Nach Zentrifugation der Beads und mehreren Waschschritten wurden pro IP 300 µg des jeweiligen Vollzelllysats zugegeben, das zuvor mit 30 µl 50%iger Protein G-Sepharose-Suspension für 1 h „vorgeklärt" worden war (ein Teil des vorgeklärten Lysats wurde als Input mit SDS-Probenpuffer versetzt, gekocht und bei -20°C gelagert). Es erfolgte eine Inkubation von 4 h bei 4°C auf dem Rotationsschüttler. Danach wurden die Protein-Antikörper-Beads-Komplexe abzentrifugiert, mehrfach gründlich mit Brij-Puffer gewaschen, mit 40 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und gekocht. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 20 µl der Proben (**AK**= Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörper 193-67; **Med**= Immunpräzipitation mit RPMI 1640/10% FCS) und zusätzlich 10 µg Input (**I**) auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde. Danach wurden die PVDF-Membranen für 2 h mit anti-LMX1B Antiserum BMO8 (1:2.000) bzw. anti-LDB1 Antiserum 4508 (1:4.000) inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung HRP-gekoppelter Sekundärantikörper. Der Pfeilkopf markiert die für LMX1b bzw. Ldb1 spezifische Bande, der Pfeil eine unspezifische durch Protein G-Sepharose verursachte Bande.

## C. Gomeruli aus der Maus

Die Co-Immunpräzipitation in transient transfizierten COS-7-Zellen hatte gezeigt, dass LMX1B und Ldb1 tatsächlich interagieren; zudem war die Methode nochmals optimiert worden. Nun konnte also zu einem physiologischen System zurückgekehrt werden.

Hierzu wurden zwei Präparationen von murinen Glomeruli aus insgesamt 12 erwachsenen C57BL/6-Mäusen durchgeführt, wobei Glomeruli, Tubuli und restliches Nierenrindengewebe durch Gewebesiebe verschiedener Porengröße (63 µm/75 µm/38 µm) voneinander getrennt wurden. Die Qualität bzw. der Reinheitsgrad wurden lichtmikroskopisch bestimmt. Hierbei zeigte sich leider, dass bei beiden Präparationen neben den erwünschten Glomeruli ein erheblicher Teil an Tubuli bzw. nicht näher bestimmbaren Zellen und Zellverbänden enthalten waren. Ein zweites Problem stellte die mangelnde Proteinausbeute dar. Die Lyse der Glomeruli-Pellets mit Brij-Puffer erbrachte nur ca. 90 µg Gesamtprotein pro Maus, was bedeutete, dass in der anschließend durchgeführten Co-Immunpräzipitation nur 0,5 mg Protein pro IP-Ansatz eingesetzt werden konnten. In der Western-Blot-Analyse konnten weder Lmx1b noch Ldb1 sicher im präzipitierten Komplex nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

D. Glomeruli aus der Ratte

Die Co-Immunpräzipitation von Lmx1b und Ldb1 aus murinen Glomeruli war am wahrscheinlichsten auf Grund der mangelnde Reinheit und Proteinausbeute der Präparationen gescheitert. Da aber quantitative PCR-Analysen gezeigt hatten, dass in murinen Glomeruli Lmx1b und Ldb1 ca. 10-fach höher exprimiert werden als in immortalisierten, murinen Podozytenzellen (mPCL) (persönliche Mitteilung von PD Dr. Anne Rascle), erschien es lohnenswert, weiter an der Präparation von Glomeruli zu arbeiten. Auf Grund der beschränkten Optimierungsmöglichkeiten bei der Präparation muriner Glomeruli wurde beschlossen, die Spezies zu wechseln, d.h. eine Präparation von Glomeruli aus Wistar-Ratten vorzunehmen. Dies war möglich, da sich die für die Bindung der jeweiligen Antikörper notwendigen Aminosäurebereiche von LMX1B/Lmx1b und LDB1/Ldb1 zwischen Mensch, Maus und Ratte nicht unterschieden.

Im Gegensatz zur Präparation muriner Glomeruli wurden hierbei Gewebesiebe mit anderen Porengrößen (106 µm/180 µm/75 µm) verwendet. Es wurden zwei Präparationen aus insgesamt 10 männlichen Wistar-Ratten vorgenommen. Bei der lichtmikroskopischen Kontrolle der Qualität der Präparationen zeigte sich, dass erfreulicherweise nahezu ausschließlich Glomeruli enthalten waren (Daten nicht gezeigt). Die gewonnenen Glomeruli wurden in Brij-Puffer lysiert, wobei die Menge an Gesamtprotein bei ca. 2 mg pro Ratte lag.

Gründe für die im Vergleich zur Präparation muriner Glomeruli stark gesteigerte Proteinausbeute könnten zum einen in der Größe der Nieren der einzelnen Spezies und der Effizienz des Präparationsverfahrens liegen; zum anderen wurde aber auch das Lyseverfahren verbessert, indem das Lysat zusätzlich mit Hilfe einer Nadel in eine 1 ml-Spritze aufgezogen und mehrfach zwischen Spritze und Reagiergefäß hin- und herbewegt wurde.

Die hohe Qualität und Proteinmenge der Glomeruli-Präparationen lieferten ideale Ausgangsbedingungen für die Durchführung einer Co-Immunpräzipitation. Diese erfolgte nach dem bereits etablierten Protokoll mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 193-67, wobei 2,5 mg Gesamtprotein pro IP-Ansatz eingesetzt wurden. Da bei der Verwendung höherer Proteinmengen das Auftreten unspezifischer Interaktionen wahrscheinlicher wird, wurde neben der bereits bekannten Negativkontrolle (IP-Ansatz mit RPMI 1640/10% FCS und Lysat) eine weitere durchgeführt: monoklonaler Antikörper 193-67 plus Brij-Puffer (kein Lysat).
Die anschließend durchgeführte Western-Blot-Analyse (siehe Abbildung 32) zeigte, dass im durch 193-67 präzipitierten Komplex endogenes Lmx1b nachgewiesen werden konnte. Überdies wurde Ldb1 durch den anti-LMX1B-Antikörper 193-67 co-immunpräzipiert, was die Interaktion von endogenem Lmx1b und Ldb1 in Podozyten belegt.

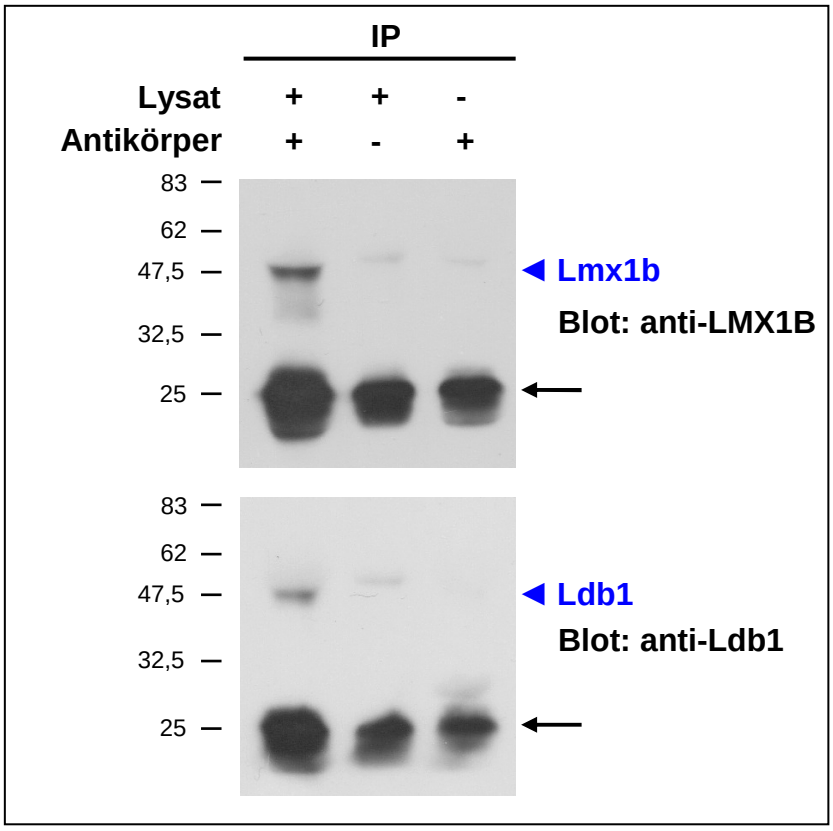



**Abbildung 32: Co-Immunpräzipitation von Lmx1b und Ldb1.** Mit Hilfe von Gewebesieben (Porengröße 106 µm/180 µm/75 µm) wurden Glomeruli aus Nieren von männlichen Wistar-Ratten präpariert. Anschließend erfolgte eine Lyse in Brij-Puffer, wobei mittels einer 1 ml-Spritze mit aufgesetzter 22G-Nadel zusätzlich Scherkräfte auf die Zellen ausgeübt wurden. Pro IP-Ansatz wurden jeweils 1 ml Zellkulturüberstand des Hybridomzellklons 193-67 bzw. 1 ml RPMI 1640/10% FCS mit 1 ml Brij-Puffer und 50 µl 50%iger Protein G-Sepharose-Suspension über Nacht inkubiert. Nach Zentrifugation der Beads und mehreren Waschschritten wurden pro IP ca. 2,5 mg des Glomeruli-Lysats zugegeben, das zuvor mit 200 µl 50%iger Protein G-Sepharose-Suspension für 1 h „vorgeklärt“ worden war. Es erfolgte eine Inkubation von 5 h bei 4°C auf dem Rotationsschüttler. Danach wurden die Protein-Antikörper-Beads-Komplexe abzentrifugiert, mehrfach gründlich mit Brij-Puffer gewaschen, mit 40 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und gekocht. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 20 µl der Proben auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde. Danach wurden die PVDF-Membranen für 2 h mit anti-LMX1B Antiserum BMO8 (1:2.000) bzw. anti-LDB1 Antiserum 4508 (1:4.000) inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung HRP-gekoppelter Sekundärantikörper. Der Pfeilkopf markiert die für Lmx1b bzw. Ldb1 spezifische Bande, der Pfeil eine unspezifische durch Protein G-Sepharose verursachte Bande.

# 4. Diskussion

Beim Nagel-Patella-Syndrom (NPS) handelt es sich um eine seltene autosomal dominant vererbte Erkrankung, die weltweit mit einer Inzidenz von 1 auf 50000 Lebendgeburten auftritt und nach ihren hervorstechendsten Merkmalen, einer Hypo- bzw. Dysplasie der Finger- und seltener auch Zehennägeln gemeinsam mit hypoplastischen bzw. fehlenden Kniescheiben, benannt ist (Bongers et al., 2002). Es treten zudem mannigfaltige, weitere Anormalitäten anderer Organsysteme auf. Prognosebestimmend für NPS-Patienten ist die mögliche Beteiligung der Nieren, wie sie bei 12 bis 55% der Patienten auftritt, wobei es in bis zu 15% der Fälle sogar zur terminalen Niereninsuffizienz kommt (Sweeney et al., 2003). Als morphologisches Korrelat der Erkrankung konnten ultrastrukturelle Veränderungen des Glomerulus gefunden werden. Sie beinhalten eine irregulär verdickte glomeruläre Basalmembran mit fribrillären Einschlüssen und aufgehellten Arealen, die „mottenfraßartig" erscheinen (Ben Bassat et al., 1971; Del Pozo & Lapp, 1970). Zusätzlich konnte ein Verlust podozytärer Fußfortsätze beobachtet werden (Chen et al., 1998).

Obwohl NPS eine der ersten Erbkrankheiten war, bei der eine genetische Kopplung etabliert werden konnte, wurden erst Jahrzehnte später erste Mutationen des *LMX1B*-Gens in NPS-Patienten gefunden (Dreyer et al., 1998; McIntosh et al., 1998). Aktuell sind über 130 verschiedene Mutationen bekannt (Dunston et al., 2004).

Bei LMX1B handelt es sich um ein Mitglied der Familie der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren, die in Vertebraten eine fundamentale Rolle für die Formation dorsoventraler Muster und die Morphogenese der Niere während der Entwicklung spielen (Bongers et al., 2002). Das Protein besitzt $NH_2$-terminal zwei proteinbindende LIM-Domänen und darauf folgend eine DNA-bindende Homöodomäne sowie COOH-terminal eine glutamin- und serinreiche mutmaßliche Transaktivierungsdomäne (Dunston et al., 2004). Da murines Lmx1b auf Aminosäureebene nahezu identisch mit humanem LMX1B ist (Dreyer et al., 1998), wurden zur genaueren Funktionsanalyse *Lmx1b*-Knockout-Mäuse generiert, deren Phänotyp dem von NPS-Patienten sehr ähnelte. Einschränkend ist aber zu sagen, dass *Lmx1b*$^{+/-}$-Mäuse keinerlei Symptome zeigen, während hingegen NPS autosomal dominant vererbt wird (Chen et al., 1998).

Der genaue Wirkmechanismus von LMX1B bleibt allerdings weiterhin unklar. Zum einen gilt es die Wechselwirkung des Transkriptionsfaktors LMX1B mit Co-Faktoren näher zu beleuchten, wobei mit LDB1 (Marini et al., 2003) und E47, einem Produkt des *E2A*-Gens

(Johnson et al., 1997) bereits zwei potentielle Interaktionspartner beschrieben sind; zum anderen stellt sich weiterhin die Frage nach den Zielgenen von LMX1B. Zu diesem Thema sind die aktuellen Daten widersprüchlich. So wurde in *Lmx1b*-Knockout-Mäusen ein alteriertes Genexpressionsprofil in Podozyten gefunden [Podocin (Miner et al., 2002; Rohr et al., 2002) und die α3- und α4-Ketten von Kollagen IV (Morello et al., 2001) waren nicht mehr nachweisbar], was dadurch erklärt wurde, dass LMX1B an eine AT-reiche Sequenz im ersten Intron des *COL4A4*-Gens (Morello et al., 2001) und auch in der Promotorregion von *NPHS2* (Miner et al., 2002; Rohr et al., 2002) bindet. Demgegenüber konnten Podocin und die α3- und α4-Ketten von Kollagen IV in Nierenbiopsien von NPS-Patienten immunhistochemisch detektiert werden (Heidet et al., 2003).

Aus diesen Diskrepanzen ist ersichtlich, dass die genaue und u.U. Promoter-spezifische Beantwortung der sich stellenden Fragen unbedingt den Einsatz biochemischer Methoden (z.B. der Co-Immunpräzipitation oder Chromatin-Immunpräzipitation) erfordert, wofür wiederum leistungsfähige Antikörper gegen LMX1B ein unverzichtbares Werkzeug darstellen.

## 4.1 Herstellung von Antikörpern gegen LMX1B

### 4.1.1 Polyklonal versus monoklonal

Bei der Herstellung von Antikörpern lassen sich wie in 1.4 dargestellt grundsätzlich zwei Techniken unterscheiden: polyklonal versus monoklonal, wobei zu Beginn der vorliegenden Arbeit eine Entscheidung für eine der beiden Techniken getroffen werden musste. In der Arbeitsgruppe war bereits ein polyklonaler Antikörper gegen LMX1B (BMO8) vorhanden, welcher durch die Immunisierung von Kaninchen mittels rekombinant hergestelltem LMX1B (Aminosäure 31 bis 395) generiert worden war. Die Produktion eines polyklonalen Antikörpers ist technisch einfach und kostengünstig; hat aber auch gewisse Nachteile: so sind zumeist nur ca. 10% der enthaltenen Antikörper gegen das gewünschte Immunogen gerichtet (Harlow & Lane, 1988), durch die restlichen 90% entstehen zumeist selbst nach Aufreinigung unerwünschte Interaktionen. Überdies ist ein polyklonaler Antikörper nur in endlicher Quantität verfügbar, was die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen einschränkt. Neben diesen allgemeingültigen Nachteilen von polyklonalen Antikörpern, lagen aber noch weitere Gründe vor, zusätzlich einen monoklonalen Antikörper zu generieren: Das Antiserum BMO8 wurde

mit Hilfe eines Peptides hergestellt, das den Aminosäuren 31 bis 395 von LMX1B entspricht und damit auch die konservierten LIM-Domänen und die Homöodomäne enthält. Hierdurch können zum einen unerwünschte Kreuzreaktionen mit anderen LIM-Homöodomäne-Proteinen entstehen, zum anderen besteht die Gefahr, dass in Interaktionsstudien mögliche Co-Faktoren von LMX1B mit den Antikörpern um Bindungsstellen konkurrieren müssen. Betrachtet man die Co-Immunpräzipitation als eine der geplanten Techniken, um Interaktionsstudien durchzuführen, so sind zudem weitere Überlegungen anzustellen: Gebraucht man bei dieser Methode für die Immunpräzipitation und den nachfolgenden Western Blot denselben Antikörper bzw. Antikörper derselben Species, werden durch den Sekundärantikörper im Western-Blot die leichten und schweren Ketten des Antikörpers, der für die Immunpräzipitation benutzt wurde, detektiert und die Banden anderer Proteine eines ähnlichen Molekulargewichts werden maskiert. Für LMX1B ist es also auf Grund seines Molekulargewichtes von ca. 44,1 kDa [Isoform mit 395 Aminosäuren; zum Vergleich Molekulargewicht der schweren Kette eines Antikörpers ca. 50 kDa (Janeway et al., 2009)] eine absolute Notwendigkeit Antikörper unterschiedlicher Species wie z.B. Maus und Kaninchen für Immunpräzipitation und Western Blot zu verwenden.
Aus diesen allgemeinen bzw. LMX1B-spezifischen Überlegungen wird deutlich, dass für die geplanten Applikationen die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen LMX1B unumgänglich ist.

### 4.1.2 Probleme bei der Produktion von hLMX1B (1-53) und hLMX1B (322-395)

Um – wie oben bereits diskutiert – Kreuzreaktionen mit anderen LIM-Homöodomäne-Proteinen zu vermeiden, wurden die für LMX1B-spezifischen Aminosäurenbereiche 1 bis 53 bzw. 322 bis 395 als Immunogene ausgewählt und entsprechende Expressionskonstrukte mit Hilfe des Vektors pET16b (Novagen) erstellt, welcher auf Grund seines $NH_2$-terminal der einklonierten Peptide gelegenen His-Epitops gewählt worden war, das wiederum eine technisch einfache Aufreinigung des generierten Peptids mittels Metallionen-Chromatographie ermöglicht. Bei der Herstellung dieser rekombinanten Peptide ergaben sich einige Probleme.
Zunächst wurden lediglich Induktionskinetiken für pET16b/hLMX1B (1-53) erstellt. Da bei pET-Vektoren die Transkription des Zielgens unter Kontrolle eines T7-Promotor erfolgt, wurden die Expressionstämme *E. coli* BL21 (DE3) und *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, die eine

chromosomale Kopie der T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors enthalten, mit dem Konstrukt transformiert. In den Proben einer initialen Kinetik konnten nach SDS-Gel-Elektrophorese und Färbung des Gels mit Coomassie keine hLMX1B (1-53) entsprechenden Banden nachgewiesen werden. Im Western-Blot ließ sich mit Hilfe eines anti-poly-Histidin-Antikörpers ein Peptid mit His-Epitop detektieren, wobei sich die Banden deutlich unterhalb der errechneten Molekulargewichtshöhe von ~ 8,1 kDa befanden. Ursächlich hierfür könnte zum einen unvollständige Translation zum anderen Degradation des Peptids auf Grund von Toxizität sein, wobei insbesondere die Tatsache, dass die Banden zunächst an Intensität zu- und dann wieder abnahmen, als Hinweis auf Degradation gewertet werden muss. Überdies ließ sich eine deutlich höhere Expression des Peptids in Rosetta (DE3) pLysS im Vergleich zu BL21 (DE3) feststellen. Da pLyS-Stämme zusätzlich ein Plasmid mit einer Chloramphenicol-Resistenz enthalten, das für T7-Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase, kodiert, und somit die frühzeitige Expression eines evtl. toxischen Proteins unterdrückt wird, unterstützt dieser Fakt ebenfalls die Theorie, dass hLMX1B (1-53) für die gewählten *E. coli* – Stämme toxisch ist.

Obwohl zum Zeitpunkt 0 h keinerlei Expression detektiert werden konnte, wurde unter der Annahme, dass bereits geringe Konzentrationen von hLMX1B (1-53) für Bakterien sehr toxisch sind, (und in Ermangelung anderer Alternativen) eine Optimierungsstrategie gewählt, mit Hilfe der die basale Expressionsrate weiterhin gesenkt werden sollte. Erreichen Bakterienkulturen die stationäre Phase so dienen zunächst Glucose und anschließend auch alternative Kohlenstoffquellen wie z.B. Glyzerol als Nahrung, wobei der Metabolismus alternativer Kohlenstoffquellen zu einer intrazellurären Erhöhung des zyklischen Adenosinmonophosphat(cAMP)-Spiegels führt, was die Transkription vom *lacUV5*-Promotor und konsekutiv die Expression der T7 RNA-Polymerase stimuliert und somit zu einer signifikanten Expression des Zielproteins führt (Grossman et al., 1998; Kelley et al., 1995; Pan & Malcolm, 2000). Daher wurde LB-Medium mit 1% Glucose (m:v) versetzt und zusätzlich die Vorkultur von „über Nacht“ auf nur drei Stunden begrenzt.

Mit Hilfe der derart optimierten Bedingungen wurden erneut Induktionskinetiken für pET16b/hLMX1B (1-53) und zusätzlich auch pET16b/hLMX1B (322-395) erstellt. Entsprechend der Degradationshypothese zeigten sich die intensivsten Banden und damit die höchste Proteinmenge für beide Peptide nach nur kurzer Inkubation: 2 h bei 30°C bzw. 1 h bei 37°C (siehe Abbildung 5 und Abbildung 8).

Es erfolgte für beide Peptide eine Proteinproduktion in größerem Umfang. Nach Aufreinigung mit Hilfe von Nickelsäulen und Dialyse der Peptide gegen 1x PBS zeigte sich im Gel jeweils

eine einzelne, kontaminationsfreie Bande. Beide Peptide wiesen allerdings - wie schon initial beobachtet - in der SDS-PAGE ein deutlich zu niedriges Molekulargewicht von ca. 6,5 kDa anstatt der errechneten 8,1 kDa bzw. 10,1 kDa auf, so dass nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden konnte, dass es sich bei den produzierten Peptiden mit His-Epitop um hLMX1B (1-53) bzw. hLMX1B (322-395) handelte. Ohne weitere Analysen verbot es sich also ein derart aufwendiges Experiment wie die Immunisierung von Mäusen zu beginnen.
Daher wurde beschlossen beide Peptide massenspektrometrisch zu vermessen. Die Messung (Prof. Dr. Rainer Deutzmann, Lehrstuhl Biochemie 1 der Universität Regensburg) ergab für das Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (1-53) eine Abweichung von 5 Da vom errechneten Molekulargewicht, welche nur technisch und nicht durch eine alterierte Aminosäuresequenz begründet sein konnte (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. Rainer Deutzmann, Lehrstuhl Biochemie 1 der Universität Regensburg). Für das Proteinprodukt von pET16b/hLMX1B (322-395) konnte auf Grund technischer Probleme leider kein Molekulargewicht ermittelt werden. Daher wurden beide Proteinprodukte, um letztendgültige Sicherheit bezüglich der Aminosäuren-Sequenz zu erlangen, mittels Edman-Abbau (Edman, 1949) sequenziert, wodurch die Identität von hLMX1B (1-53) und hLMX1B (322-395) erfreulicherweise zweifelsfrei belegt werden konnte (siehe Abbildung 7 und Abbildung 10).
Alternativ zur durchgeführten Massenspektrometrie hätte ebenfalls eine Tricin-Natrium-duodecylsufat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach Schägger angewendet werden können, welche das Molekulargewicht von Peptiden unterhalb von 10 kDa genauer als die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) wiedergibt (Schägger & von Jagow, 1987).

### 4.1.3 Prä-Fusions-Phase: Immunisierung, Etablierung einer Screening-Methode und Immunantwort der immunisierten Mäuse

Nachdem es gelungen war die beiden Peptide hLMX1B (1-53) und hLMX1B (322-395) in entsprechender Quantität kontaminationsfrei zu produzieren, konnte mit der Immunisierung von Tieren begonnen werden. Grundsätzlich hat die Immunisierung zwei Funktionen; einerseits soll es zu einer Expansion des gewünschten B-Zell-Klons kommen, was die Wahrscheinlichkeit erhöht relevante Hybridomzellklone zu erhalten (Goding, 1980), andererseits soll eine Differenzierung von B-Zellen in eine „fusionierbare“ Form eingeleitet werden. Hierzu gibt es Daten, dass kürzlich aktivierte und konsekutiv größere B-Zellen leichter Hybridome mit Myelomzellen bilden (Andersson & Melchers, 1978).

Bezüglich der Ausarbeitung eines Immunisierungsprotokolles sind eine Reihe von Überlegungen anzustellen: Harlow und Lane empfehlen für den Fall, dass keine andere Präferenz vorliegt, sechs Wochen alte, weibliche Balb/c-Mäuse zu impfen, da es bei Mäusen zum einen bei niedrigeren Antigen-Konzentrationen als bei anderen Labortieren zu einer Immunantwort kommt und zum anderen der Umgang mit ihnen leicht und kostengünstig ist (Harlow & Lane, 1988). Zudem war geplant, zur Fusion die in Balb/c-Mäusen entwickelte Zelllinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., 1979) zu benutzen, und für die Fusion von Zellen aus demselben Mausstamm ist eine höhere Effizienz beschrieben (Goding, 1980).

Da selbst Tiere desselben, genetischen Hintergrunds stark unterschiedliche Immunreaktionen zeigen können und überdies die Gefahr besteht, dass Tiere im Laufe der Immunisierung sterben, wurde pro Peptid eine ausreichende Kohorte à sechs Mäusen inokuliert. Hierzu wurden 3 subkutane Injektionen (Hyperimmunisation) im Abstand von drei bzw. zwei Wochen durchgeführt. 5 Tage vor der Splenektomie erfolgte zusätzlich ein intraperitonealer „Boost. Eine derartige Hyperimmunisierung ist zwar im Vergleich zur Einmalgabe deutlich aufwendiger, es kommt aber zur Ausbildung von Antikörpern mit deutlich höherer Affinität gegenüber dem Antigen, während die Zahl der erkannten Epitope davon unberührt bleibt (Harlow & Lane, 1988). Bezüglich der subkutanen Injektionen bestand grundsätzlich die Möglichkeit, sie mit oder ohne adjuvante Substanzen durchzuführen, wobei für den Gebrauch von Adjuvantien eine stark gesteigerte Immunogenität (insbesondere für Wasser-in-Öl-Emulsionen) beschrieben ist (Hunter et al., 1981). Die Tatsache, dass mit Hilfe des neueren Adjuvans „Titermax® Classic Adjuvant“ (Sigma) im Vergleich zu dem in der Literatur etablierten Freund’s Adjuvant weniger visköse Emulsionen mit bis zu 90% Wassergehalt hergestellt werden können, was eine leichtere Handhabung für den Anwender und bessere Verträglichkeit für das Tier mit sich bringt (Produktbeschreibung „Titermax® Classic Adjuvant“ von Sigma), führte zur Wahl dieser Substanz. Wegen der Gefahr einer aseptischen Peritonitis wurde bei der letzten, intraperitonealen Injektion auf ein Adjuvans verzichtet.

Da die Immunogenität der inokulierten Peptide nicht bekannt war und zudem mit einer stark unterschiedlichen Immunantwort der Mäuse gerechnet werden musste (Harlow & Lane, 1988), verbot sich die Durchführung einer Fusion, ohne vorher die Antikörpertiter im Serum kontrolliert zu haben. Hierzu musste ein geeignetes Verfahren etabliert werden, welches ebenfalls als Screening-Verfahren nach erfolgter Fusion eingesetzt werden sollte.

Eine erfolgreiche Fusion ergibt zwischen 200 und 20000 Hybridomzellklone, die alle zu einem Zeitpunkt (ca. 7 bis 14 Tage nach der Fusion) getestet werden müssen (Harlow & Lane, 1988). Insofern handelt es sich hierbei um einen äußerst arbeits-intensiven Prozess, den

Goding sogar als „Schlüssel zur erfolgreichen Hybridomproduktion“ bezeichnet (Goding, 1980). Das Verfahren sollte daher bereits während der Immunisierungsphase etabliert werden und folgende Vorraussetzungen erfüllen: Erstens sollte es die Zahl der Klone in Kultur auf ein handhabbares Maß reduzieren (Maximum: ca. 50 pro Fusion), zweitens sollten positive Klone in einem Zeitraum kleiner 24 Stunden detektierbar sein und drittens sollte es als „High-through-put“-Verfahren auf mehrere Tausend Klone simultan anwendbar sein. Betrachtet man dieses Anforderungsprofil, so erfüllt unter allen immunologischen Testverfahren der “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) die Kriterien am besten.

Nach Etablierung eines ELISA-Testes sollte dieser zur Kontrolle der Immunantwort der inokulierten Tiere benutzt werden. Hierzu musste zunächst ein geeigneter Zeitpunkt zur Blutentnahme bei den Mäusen festgelegt werden. Grundsätzlich ist es sinnvoll Serum vor Beginn der Immunisierung (Prä-Immunserum als Negativkontrolle) sowie ca. 7 bis 14 Tage nach jeder Injektion zu gewinnen. Auf diese Weise könnte die Kinetik der Immunantwort mit Immunglobulinklassenwechsel von IgM-Antikörpern niedriger Affinität über IgG-Antikörper mittlerer Affinität bis hin zu hochaffinen IgG-Antikörpern beobachtet werden (Harlow & Lane, 1988). Diese Technik birgt allerdings auch Risiken: so stellt jede Blutentnahme eine Gefahr für das Versuchstier mit im schlimmsten Fall letalen Komplikationen dar, was zum Verlust bereits immunisierter Tiere führen könnte. Insofern erschien es uns besser, primär nur eine Blutentnahme 10 Tage nach der dritten Injektion vorzunehmen. Die entscheidenden Fragen; nämlich, ob es zu einer Bildung spezifischer Antikörper kam, welcher Antikörpertiter vorliegt und inwiefern unspezifische Antikörper gebildet wurden, lassen sich dadurch ebenso gut beantworten.

In der Praxis zeigte sich, dass die von Harlow und Lane empfohlenen Serumverdünnungen von 1:5 und 1:10 zu komplett gesättigten Signalen führten und somit viel zu niedrig waren, was für eine gute Immunantwort gegenüber dem Immunogen sprach und zudem auch an dem gewählten Zeitpunkt liegen kann. Um unspezifische Antikörper-Antigen-Reaktionen zu detektieren, wurden mehrere unspezifische Proteine in den Test mit einbezogen. So wurde z.B. bei Tieren, die gegen hLMX1B (1-53) immunisiert wurden, hLMX1B (322-395) (und umgekehrt) sowie BSA und ein Kontrollpeptid ohne His-Epitop benutzt. Erstaunlicherweise zeigten sich bei allen Tieren erhöhte Titer für hLMX1B (1-53) und hLMX1b (322-395). In Verbindung mit der Tatsache, dass für BSA und ein Kontroll-Peptid ohne His-Epitop keine nennenswerten Titer vorlagen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es zu einer unerwünschten Immunantwort gegen den bei hLMX1B (1-53) und hLMX1B (322-395) identischen $NH_2$-Terminus (His-Epitop und Faktor X-Spaltstelle) gekommen war. Auf Grund

dieser Ergebnisse mussten auch die Auswahlkriterien für das Tier mit der besten Immunantwort gegenüber dem spezifischen Peptid geändert werden. Anstatt der absoluten Titer gegenüber dem spezifischen Peptid wurde das Verhältnis aus spezifischem zu unspezifischem Signal als Kriterium benutzt. Einschränkend ist hierbei allerdings zu bemerken, dass das durchgeführte ELISA-Experiment lediglich die Avidität eines polyklonalen Antikörpers (Serum der immunisierten Maus) wiedergibt und keine direkte Aussage über die Affinität der einzelnen, enthaltenen Antikörper-Species gegenüber dem spezifischen Peptid zulässt. So könnte es also passieren, dass das Signal einzelner hochaffiner Antikörper durch eine Majorität unspezifischer Antikörper maskiert wird. Da aber auf Grund des hohen technischen Aufwandes nicht alle Tiere aus einer Kohorte für die Fusion von Milz- und Myelomzellen herangezogen werden können und aus den gewonnenen Daten zumindest eine indirekte Aussage über die entstandenen Antikörper möglich ist, stellen die aufgestellten Kriterien in der Praxis eine gute Lösung dar.

Beim Design der Immunogene war davon ausgegangen worden, dass es sich bei dem $NH_2$-Terminus (His-Epitop und Faktor X-Spaltstelle) der Peptide um einen wenig immunogenen Bereich handelt, weshalb auf eine Abspaltung dieses Bereiches durch Faktor Xa vor der Immunisierung verzichtet wurde. Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse, wäre dies sicherlich sinnvoll gewesen, wenngleich es auf Grund der zu erwartenden Verluste bei der Aufreinigung nach Spaltung ausgehend von ohnehin schon niedrigen Proteinmengen bedingt durch die Toxizität der Peptide ein technisch sehr aufwendiges Unternehmen gewesen wäre.

### 4.1.4 Optimierung der Fusions- und Zellkulturbedingungen

Neben einer effizienten Immunisierung stellt die Fusion von isolierten Milz- und Myelomzellen einen weiteren wichtigen Schritt dar, der den Erfolg der Entwicklung monoklonaler Antikörper maßgeblich beeinflusst. In der Literatur sind zahlreiche unterschiedliche Protokolle zur Durchführung einer Fusion beschrieben (Galfre et al., 1977; Gefter et al., 1977; Kennett et al., 1978; Westerwoudt, 1985), so dass zunächst versucht wurde, die effizienteste Technik zu finden.

Grundsätzlich handelt es sich bei der spontanen Fusion zweier Zellen um ein extrem seltenes Ereignis, so dass die Zugabe eines Fusionsagens von Nöten ist (Goding, 1980). Frühe Versuche hierzu wurden mit dem Sendai-Virus, Lysolecithin oder auch Polyethylenglykol (PEG) durchgeführt, wobei sich letzteres durchsetzte (Pontecorvo, 1975). Der genaue

Mechanismus ist allerdings noch weitgehend unverstanden (White & Helenius, 1980; Wyke et al., 1980). Während initial bezüglich des Molekulargewichts, der Charge sowie der Inkubationszeit des PEG sehr große Uneinigkeit herrschte (Lane et al., 1984; Lane, 1985; Westerwoudt, 1985), etablierte sich die Verwendung von 30%igen (wenig Toxizität; geringe Effizienz) bis 50%igen (höhere Toxizität, aber auch höhere Effizienz) PEG bei einer Inkubationsdauer von einer bis eineinhalb Minuten als Standard (Goding, 1980; Goding, 1996). Die beiden im Rahmen dieser Arbeit angewandten Protokolle beinhalten ebenfalls beide eine einminütige Inkubation mit 50%igen PEG, wobei die Applikation des Polyethylenglykols basierend auf den ursprünglichen Protokollen einmal mit (Galfre et al., 1977) und einmal ohne Rühren (Gefter et al., 1977; Kennett, 1979) erfolgte. Dieses technische Detail sollte allerdings zu keinem signifikanten Unterschied in der Effizienz des Protokolls führen (Goding, 1980).

Die lichtmikroskopische Auswertung der entstandenen Hybridomzellkolonien an Tag 8 post fusionem ergab jedoch ein Ergebnis von 200 Klonen pro 96-Loch-Platte für Protokoll A versus 56 Klonen bei Protokoll B. Da sich beide Protokolle bezüglich der Fusionsbedingungen nahezu gleichen, stellt sich hier natürlich die Frage, warum es zu einer derartigen Überlegenheit von Protokoll A kommt: Grundsätzlich verwenden beide Techniken auch ein anderes Verhältnis von Milzzellen:Myleomzellen. Einschränkend muss aber gesagt werden, dass das genaue Verhältnis von Milzzellen:Myleomzellen nur eine untergeordnete Bedeutung für die Fusionseffizienz hat (Goding, 1980) und im konkreten Fall eher in unterschiedlichen Strategien bezüglich der Zelldichte begründet ist (siehe unten). Viel augenfälliger sind die Unterschiede, was die verwendeten Medien anbelangt: 20% FCS und „Hybridoma Fusion and Cloning Supplement“ (HFCS; Firma Roche) versus 20% FCS verbunden mit der Co-Kultur der Hybridomzellen mit peritonealen Makrophagen. Die multiple Supplementierung der Medien stellt bei beiden Protokollen einen Lösungsansatz für eines der Grundprobleme in der Hybridomproduktion dar: die ungenügende Toleranz von Hybridomzellen gegenüber Kulturen mit geringer Zelldichte (Goding, 1980). Bei Protokoll B, dem „klassischen“ Ansatz, werden daher die Zellen aus einer Maus nur auf 4 96-Loch-Platten verteilt und zusätzlich peritoneale Makrophagen als „Fütterzellen“ eingesetzt (Hengartner et al., 1978), welche Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, was die Kultur von Hybridomzellen erleichtert. So benötigen viele Hybridomzelllinien Interleukin 6 (IL-6)(Bazin & Lemieux, 1987; Bazin & Lemieux, 1989), was durch peritoneale Makrophagen in ausreichender Konzentration produziert wird (Nordan & Potter, 1986). Über weitere Einflussfaktoren neben Interleukin 6 ist wenig bekannt (Goding, 1996).

Hohe Zelldichten - wie in Protokoll B - bringen allerdings auch große Nachteile mit sich: So besteht die Gefahr das spezifische Hybridomzellklone einfach durch andere Zellen „überwachsen“ werden und somit verloren gehen (siehe auch 4.1.5). Zudem ist auf Grund der hohen Zellzahl mit einem schnellen Verbrauch der Medien und bei sofortigem Beginn der HAT-Selektion (Littlefield, 1964; Stähli et al., 1980) mit massivem Zelltod nach wenigen Tagen zu rechnen, was u.U. ein toxisches Milieu schaffen könnte und letztendgültig die Kulturbedingungen wieder verschlechtert. Daher wäre ein Aussäen der Zellen in geringerer Dichte (20 96-Loch-Platten pro Maus bei Protokoll A) sehr wünschenswert.
Frühe Protokolle sehen bereits ein Austesten verschiedener fetaler Kälberseren vor (Harlow & Lane, 1988; Goding, 1980), um diejenige Charge zu finden, welche optimales Wachstum ermöglicht. Einen Schritt weiter geht die Firma Roche mit dem Produkt „Hybridoma Fusion and Cloning Supplement“ (Inhaltsstoffe laut der Produktbeschreibung von Roche: Albumin, Insulin, Transferrin, Zytokine, eine Cholesterolquelle, 0,5 % FCS sowie weitere nicht näher bezeichnete Substanzen), welches den zusätzlichen Gebrauch von FCS oder „Fütterzellen“ überflüssig werden lassen soll.
Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten belegen den deutlichen Vorteil von HFCS gegenüber der „klassischen“ Technik, weshalb Protokoll A favorisiert wurde. Über die Gründe dafür kann allerdings nur spekuliert werden, da weder der genaue Einfluss von peritonealen Zellen auf die Kultur noch die präzise Zusammensetzung von HFCS bekannt sind. Als wichtige Wachstumsfaktoren für Hybridomzellen werden in diesem Zusammenhang Transferrin, Hormone wie Insulin und Thyroxin und das Spurenelement Selen diskutiert (Goding, 1996).
Bei den durchgeführten Vorversuchen wurden Milzzellen aus nicht immunisierten Balb/c-Mäusen isoliert. Die Tatsache, dass nach einer suffizienten Immunisierung im Vergleich zum nicht-immunisierten Tier mit einer deutlich höheren Zellzahl isolierter Milzzellen im Bereich von ca. $50x10^6$ bis $200x10^6$ pro Tier zu rechnen ist (Harlow & Lane, 1988), lieferte darüber hinaus ein weiteres Argument für Protokoll A, da so komplett überwachsene Vertiefungen im Vergleich zu Protokoll B besser vermieden werden können.

### 4.1.5 Fusion, Screening und Subklonierung

Wie bereits in 4.1.4 diskutiert ist die initiale Wachstumsphase bei der Produktion von Hybridomzellen sehr kritisch. Durch die Fusion der Plasmamembranen von Zellen in

Gegenwart von PEG kommt es zur Formation eines Heterokaryons, welches mehrere Zellkerne beinhaltet. Erst bei der nächsten Zellteilung verschmelzen die multiplen Nuclei (Goding, 1980; Harlow & Lane, 1988). In der folgenden initialen Wachstumsphase zeigen sich die Hybridomzellen zumeist äußerst instabil. Die Wachstumsgeschwindigkeiten unterschiedlicher Klone können extrem differieren (Goding, 1980), was auch die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten widerspiegeln, so das grundsätzlich ständig die Gefahr besteht, dass spezifische Klone durch unspezifische Klone „überwachsen“ werden können. Zusätzlich kommt es bei den frühen Zellteilungen nach der Fusion häufig zum Verlust von Chromosomen, wodurch aus initial Immunglobulin-produzierenden Klonen, die bis zu 50% ihres Proteinstoffwechsels der Antikörpersynthese widmen, nicht-produzierende Varianten entstehen können, welche die „Bürde“ der Immunglobulinbildung nicht zu tragen haben und konsekutiv schneller wachsen (Goding, 1980). Auf Grund dieser Gegebenheiten müssen zwei Hauptanforderungen an die frühe Wachstums- und Screeningperiode gestellt werden: Zum einen sollten die Zellen (wie bereits in 4.1.4 dargestellt) in möglichst geringer Zelldichte ausgesät werden, was durch Fusionsprotokoll A ermöglicht wurde; zum anderen sollte die Zeit bis zur Subklonierung so kurz wie möglich gehalten werden. Daher wurde für das Screening der Hybridomzellklone ausgehend von den Daten zur Antikörperbestimmung im Serum immunisierter Tiere eine Abfolge aus ELISA-Experimenten gewählt, welche schnell durchführbar sind, nur eine sehr geringe Menge an Zellkulturüberstand benötigen und unspezifische Antigen-Antikörperreakionen ausschließen können.

Betrachtet man die gewonnenen Daten, lassen sich Beispiele für die oben beschriebenen Phänomene finden. So zeigten die Klone 422-28, 193-11 und 193-67 unspezifische Signale, welche im dritten ELISA gegenüber dem ersten und zweiten Screening zunahmen (siehe Abbildung 15 und Abbildung 17) und daher einen Hinweis auf Polyklonalität der in der Vertiefung enthaltenen Zellen darstellten. Bei dem initial als „spezifisch-stark“ eingestuften Klon 422-67 hingegen kam es zu einem kompletten Signalverlust (siehe Abbildung 15), was durch ein „Überwachsen“ und Absterben des spezifischen Klones oder aber Chromosomeninstabilität und konsekutiv Einstellung der Immunglobulinsynthese erklärt werden kann. Als klassisches Beispiel für die Instabilität der Klone in der frühen Wachstumsphase fungiert der „spezifisch-starke“ Klon 422-55, welcher trotz multipler Versuche nicht in Kultur gehalten werden konnte. Zusammenfassend gestaltete sich aber der Verlust initial positiver Zellen, welcher von Goding mit mehr als 50% beziffert wird, erfreulicherweise sehr gering: betrachtet man die „spezifisch-starken“ Klone so gingen nur ca.

27% verloren. Die Gründe hierfür sind im konkreten Fall am wahrscheinlichsten in den Kulturbedingungen (siehe 4.1.3) zu suchen.

Die hohe Effizienz der gewählten Fusions- und Kulturbedingungen zeigte sich auch in der lichtmikroskopischen Auswertung der entstandenen Hybridomzellkolonien. Erstmals angewendet wurde die Technik der Kultur in niedriger Zelldichte durch Oi und Herzenberg, welche ca. $10^6$ Zellen pro Vertiefung in einem Volumen von 100 µl Medium aussäten (Oi & Herzenberg, 1980). Hierbei entwickelt sich statistisch ein Hybridomzellklon pro $10^5$ bis $10^7$ eingesetzten Zellen (Goding, 1996). Wendet man diese Rechnung auf die beiden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fusionen mit einer Anzahl isolierter Milzlymphozyten von $100x10^6$ bzw. $185x10^6$ an, so sollten sich ca. 10 bis 1000 bzw. 18,5 bis 1850 Hybridomzellklone bilden, was auch ungefähr der von Harlow und Lane angegebenen Zahl entspricht (Harlow & Lane, 1988). Am Tag nach dem ersten Screening wurden bei allen 96-Loch-Platten lichtmikroskopisch die Anzahl und die Morphologie der Klone bestimmt. Theoretisch sollte die Mehrzahl an Vertiefungen (1920 pro Fusion) keinen oder nur einen Klon enthalten; in der Praxis zeigten sich allerdings überwiegend ein oder zumeist mehrere Klone (Daten nicht gezeigt), was als Ausdruck der effizienten Fusions- und Kulturbedingungen zu sehen ist.

Einen zusätzlichen Vorteil stellte der eigens etablierte ELISA-Assay dar. Versuche mit Zellkulturüberstand von 422-19 in verschiedenen Zelldichten (30% bis 100% Konfluenz) hatten gezeigt (siehe Abbildung 16), dass die Signalintensität mit der Zelldichte nur unwesentlich zunimmt, was an der bei der Durchführung des ELISA verwendeten Peptidlösung mit einer Konzentration von nur 2 µg/ml liegen könnte. Daher könnten bereits geringe Konzentrationen an spezifischem Antikörper ausreichen, um nahezu alle Bindungsstellen abzusättigen. Somit scheint die Signalhöhe im ELISA eher mit der Affinität als der Quantität des Antikörpers zu korrelieren, wodurch der zusätzliche Einflussfaktor „Konfluenz“ beim Screening eher in den Hintergrund tritt. Da besonders in der frühen Phase zwischen den einzelnen Klonen große Unterschiede hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit und damit der Zelldichte bestehen, stellt die Elimination dieser zusätzlichen Variable für das weitere Vorgehen einen deutlichen Geschwindigkeitsvorteil dar.

Der entwickelte ELISA bietet zwar enorme Vorteile hinsichtlich Sensitivität und Geschwindigkeit, um die besten Klone für die Subklonierung auszuwählen, sollte aber auf Grund der Einschränkungen bezüglich der Spezifität durch andere Testverfahren ergänzt werden, wobei im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich ein Western-Blot und eine Immunpräzipitation durchgeführt wurden. Nach Klonierung von p3M/hLMX1B complete

konnte für diese Verfahren in eukaryontischen Zellen produziertes LMX1B in voller Länge eingesetzt werden, so dass der Versuchsaufbau bereits den später geplanten Applikationen entsprach.

Auf dem Boden dieser Ergebnisse wurden die Klone 422-19, 422-76, 193-16, 193-67 und 193-68 für die Subklonierung ausgewählt, um letztendgültig monoklonale Populationen zu generieren. Wie in 3.3.1 dargestellt kann die Wahrscheinlichkeit eine monoklonale Zellpopulation zu erhalten in Abhängigkeit von der Zahl der ausgesäten Zellen pro Vertiefung (=α) mit Hilfe der Poisson-Gleichung annäherungsweise berechnet werden (Lefkovits & Waldmann, 1979), wobei für die Bedingung der Monoklonalität ein Maximum bei α=1 besteht (Lietzke & Unsicker, 1985). Auf Grund der schlechten Ausbeute bei verdünnten Kulturen empfehlen allerdings Lietzke und Unsicker in der Praxis 2 Zellen pro Vertiefung auszusäen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche mit Zelldichten zwischen 0,2 und 10 Zellen pro Vertiefung durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswert ist, dass sich hierbei entgegen der Empfehlung in der Literatur α=1 als ideal erwies. Zudem konnte selbst bei so geringer Zelldichte auf den Gebrauch von peritonealen Makrophagen als „Fütterzellen“ vollkommen verzichtet werden. Eine derartige Taktik galt bis dato als nur wenig Erfolg versprechend. Insofern zeigt sich abermals die große Überlegenheit der etablierten Kulturbedingungen, welche zusammenfassend als für das Gelingen dieser Arbeit entscheidend anzusehen sind.

## 4.2 Charakteristika der hergestellten Antikörper

### 4.2.1 Art der Epitope

Nach der Subklonierung erfolgte die endgültige Charakterisierung der generierten, monoklonalen Antikörper, wozu folgende Testverfahren eingesetzt wurden: ELISA, Western-Blot, Immunpräzipitation (einschließlich ChIP-Pufferbedingungen) und Immunzytochemie. Betrachtet man die Daten aus 3.3.2, so fallen deutliche Unterschiede hinsichtlich des Signalverhaltens der einzelnen Antikörper in den Testsystemen auf. So zeigt z.B. 422-19 zwar ein gutes Signal für ELISA und Immunpräzipitation; im Western-Blot kann LMX1B aber nicht detektiert werden.

Diese Unterschiede sind am wahrscheinlichsten in den vom jeweiligen Antikörper erkannten Epitopen und den Pufferbedingungen des jeweiligen Testverfahrens begründet. Ein Antikörper erkennt stets nur einen kleinen Teil der molekularen Struktur des Antigenmoleküls, das sog. Epitop bzw. die antigene Determinante. Dieses Epitop kann aus einem einzigen Segment einer Polypeptidkette bestehen und wird dann als lineares oder kontinuierliches Epitop bezeichnet. Demgegenüber stehen sog. Konformations- oder diskontinuierliche Epitope, wobei die erkannte Stelle aus Abschnitten des Proteins besteht, welche in der Primärsequenz nicht zusammenhängen, in der dreidimensionalen Struktur allerdings nahe beieinander liegen (Janeway et al., 2009). Je nach Versuchsaufbau liegt das Protein in seiner nativen, gefalteten Struktur (z.B. ELISA oder Immunpräzipitation) bzw. denaturiert als linearer Strang (z.B. Western Blot) vor. Hierfür sind die jeweiligen Pufferbedingungen verantwortlich: Natriumduodecylsulfat (SDS), welches bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese als Detergens verwendet wird, zerstört fast alle nicht-kovalenten Bindungen innerhalb eines nativen Proteins. Disulfidbrücken werden durch die Zugabe von Mercaptoethanol im SDS-Probenpuffer gelöst (Berg et al., 2003).

Ausgehend von diesen theoretischen Überlegungen kann spekuliert werden, dass die Antikörper 422-19 und 193-68 ein diskontinuierliches Epitop erkennen, da in ELISA und Immunpräzipitation LMX1B detektiert werden kann, während dies mittels Western-Blot nicht möglich ist. Demgegenüber erkennen 422-76, 193-16 und 193-67 wahrscheinlich ein lineares Epitop. Besonders deutlich wird dies auch aus dem Vergleich der Ergebnisse aus „normaler“ Immunpräzipitation und Chromatin-Immunpräzipitationsbedingungen. Der größte Unterschied zwischen beiden Protokollen besteht in den verwendeten Puffern: Brij/NP40 als eher milde Detergentien (→ natives Protein) bei der „normalen“ Immunpräzipitation im Vergleich zu SDS und Triton X-100 als bedeutend stärkere Detergentien (→ denaturiertes Protein) bei der ChIP. Im Vergleich von Immunpräzipitation und ChIP fällt auf, dass 422-76 unter ChIP-Bedingungen besser funktioniert, wohingegen das Signal für 193-68 unter ChIP-Bedingungen deutlich schwächer ist, was die oben getroffene Vermutung unterstreicht.

Einschränkend muss jedoch bemerkt werden, dass diese Spekulationen nur unter der Annahme gültig sind, dass die für die Immunisierung verwendeten Peptide eine Tertiärstruktur einnehmen, welche zu den betreffenden Domänen von LMX1B in voller Länge identisch oder zumindest sehr ähnlich ist.

### 4.2.2 Ausblick

Aus 4.2.1 lässt sich ableiten, dass die gegen den $NH_2$-Terminus gerichteten Antikörper unterschiedliche antigene Determinanten erkennen müssen. Für die gegen den COOH-Terminus von LMX1B gerichteten Antikörper ist dies nicht so augenfällig. Es lässt sich lediglich folgern, dass 193-68 höchstwahrscheinlich ein anderes Epitop erkennt als 193-16 und 193-67. Für die beiden letztgenannten Antikörper besteht in allen durchgeführten Testverfahren ein derart ähnliches Signalprofil, dass sie grundsätzlich gegen dasselbe Epitop gerichtet sein könnten und sich nur hinsichtlich der Affinität der Antikörper unterscheiden. Von besonderem Interesse wäre dieser Unterschied für die Technik der Immunpräzipitation: hier zeigten 193-16 und 193-67 die besten Ergebnisse. Für den Fall, dass beide Antikörper unterschiedliche, antigene Determinanten erkennen, ist mit einem additiven/synergistischen Effekt bei Verwendung einer Mischung beider Antikörper in der Immunpräzipitation zu rechnen, was sich in der Praxis bei Immunpräzipitations-Experimenten mit endogenem LMX1B so nicht feststellen ließ (Daten nicht gezeigt). Dies ist allerdings nicht dafür beweisend, dass 193-16 und 193-67 gegen dasselbe Epitop gerichtet sind. Grundsätzlich lässt sich diese Frage nur durch eine weitere Charakterisierung der Antikörper in der Zukunft klären. Es wäre denkbar die für die Immunisierung verwendeten Peptide in Fragmente mit einer Länge von 10 bis 15 Aminosäuren zu zerlegen, entsprechende Expressionskonstrukte zu erstellen und nach rekombinanter Produktion der Fragmente von hLMX1B (1-53) und (322-395) erneut ELISA-Experimente durchzuführen, wodurch sich die erkannten Epitope auf einen sehr kleinen Bereich von LMX1B eingrenzen ließen.

Neben der Bestimmung der erkannten Epitope wäre zudem eine Charakterisierung der Antikörper hinsichtlich der Immunglobulinklasse und –subklasse denkbar. Während der normalen Entwicklung einer humoralen Immunantwort kommt es grundsätzlich zu einem Klassenwechsel von IgM zu IgG durch DNA-Rekombination (Berg et al., 2003; Janeway et al., 2009). Auf Grund des gewählten Immunisierungsschemas (multiple Injektionen im Abstand von Wochen) ist bei den generierten Antikörpern mit IgG als vorherrschender Klasse zu rechnen (Harlow & Lane, 1988). Mit Blick auf die zukünftigen Applikationen der generierten Antikörper ist eine zusätzliche Subklassenbestimmung sinnvoll, da Protein A und Protein G ein Subklassen-spezifisches Bindungsverhalten zeigen. Im Gegensatz zu Protein G bindet Protein A zwar ebenfalls stark an $IgG_{2a}$ und $IgG_{2b}$, die Bindung für $IgG_3$ ist aber deutlich schwächer und $IgG_1$ wird fast gar nicht gebunden (Ey et al., 1978; Goding, 1978; Mackenzie et al., 1978). Für 193-16 und 193-67, die Antikörper mit den besten Ergebnissen

in der Immunpräzipitation, wurde zumindest eine indirekte Subklassenbestimmung durchgeführt. Im direkten Vergleich zwischen Protein A und G zeigte sich bei beiden Antikörpern kein Unterschied in der Signalstärke, so dass spekuliert werden kann, dass es sich bei 193-16 und 193-67 um $IgG_2$-Antikörper handelt. Eine genaue und umfassende Charakterisierung sollte allerdings trotzdem mit Hilfe immunologischer Verfahren erfolgen, welche durch spezifische Antikörper gegen die jeweilige Klasse/Subklasse eine genaue Einordnung der produzierten Immunglobuline ermöglichen.

## 4.3 Nachweis von endogenem LMX1B und Charakterisierung von möglichen Interaktionspartnern

### 4.3.1 Nachweis von endogenem LMX1B

Da die generierten, monoklonalen Antikörper (insbesondere 193-16 und 193-67) LMX1B mit einer deutlichen höheren Sensitivität detektieren als die bisher in der Arbeitsgruppe vorhandenen Antikörper, erschienen diese als gute Kandidaten, um Nachweisverfahren für endogenes LMX1B zu etablieren, so dass die Rolle von LMX1B in Zukunft (im Vergleich zum bisher gebrauchten Überexpressionssystem) in einem physiologischerem Kontext studiert werden könnte.

Bereits während der initialen Screening-Phase war mit Hilfe der Antikörper aus Maus 422 versucht worden, endogenes LMX1B in Zelllysat aus HEK293T-Zellen nachzuweisen, was allerdings misslang und deshalb zunächst verlassen wurde. Für einen neueren Anlauf wurde daher auf Zelllysat einer murinen Podozytenzelllinie zurückgegriffen, für welche die Expression von Lmx1b auf RNA-Ebene mittels RT-PCR bereits gezeigt worden war (Schiwek et al., 2004). Dies war möglich, da sich humanes und murines LMX1B/Lmx1b in den für die Immunisierung verwendeten Bereichen nicht unterscheiden. Western-Blot-Analysen an Vollzelllysat mit Hilfe von 193-16 und 193-67 erbrachten leider keinen Nachweis von Lmx1b, so dass durch die Präparation von nukleären Extrakten versucht wurde, die Proteinmenge an Lmx1b zu steigern, was allerdings negativ verlief. Als zweiter Ansatz wurde eine Aufreinigung von 193-67 mit Hilfe von Protein A Sepharose-Säulen gewählt, wodurch eine 32-fache Anreicherung des Antikörpers gelang und konsekutiv im Western-Blot höhere Antikörperkonzentrationen eingesetzt werden konnten. Während der Nachweis von

überexprimierten LMX1B in 10 µg Vollzelllysat aus mit p3M/hLMX1B complete transfizierten COS-7-Zellen mühelos gelang, entzog sich endogenes Lmx1b weiterhin der Detektion. Parallel waren auch Versuche mit Hilfe der Antikörper BMN8, einem Affinitäts-aufgereinigtem anti-LMX1B Kaninchen-Antiserum, und Antikörpern gegen die potentiellen LMX1B-Interaktionspartner LDB1 (Marini et al., 2003) und E47 (Johnson et al., 1997) durchgeführt worden, die ebenfalls zu keinem positiven Ergebnis führten, so dass in Zusammenschau der Ergebnisse gefolgert werden musste, dass die Proteinkonzentrationen dieser nukleären Proteine in Lysat aus murinen Podozytenzellen zu gering für den Nachweis mittels Western Blot sind.

Aus diesen Ergebnissen war ersichtlich, dass für den Nachweis von endogenem LMX1B ein Verfahren gewählt werden musste, bei dem möglichst hohe Proteinmengen eingesetzt werden konnten. Hierfür schien die Immunpräzipitation am besten geeignet. Nach einigen Optimierungsmaßnahmen gelang auch der Nachweis von endogenem Lmx1b in Vollzelllysat aus mPCL, wobei deutlich höhere Antikörpermengen („Präbindung“) als bei der Arbeit mit überexprimierten Proteinen verwendet werden mussten. Es wurden Versuche mit 1 bis 5 ml Zellkulturüberstand pro IP-Ansatz (25 µl Protein G-Sepharose Beads) durchgeführt. Legt man eine Antikörperkonzentration von ca. 5,5 µg/ml zugrunde, so ergeben sich Antikörpermengen pro Volumen an Beads von 0,22 mg/ml bis 1,1 mg/ml, welche deutlich unter der theoretischen Bindungskapazität von > 20 mg/ml liegen (Produktinfomation für Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow von GE Healthcare). Trotzdem ergab sich für die höhere Antikörpermenge kein Vorteil beim Nachweis von LMX1B (Daten nicht gezeigt). Über Gründe hierfür lässt sich nur spekulieren. Diese könnten aber im der Immunpräzipitation angeschlossenen Western-Blot liegen, da hier mehr Gesamtprotein pro Spur die Laufeigenschaften der SDS-PAGE ab einem gewissen Wert verschlechtert.

Berechnet man den Faktor der Anreicherung von Immunpräzipitation gegenüber dem zuvor durchgeführten Western-Blot, so ergibt sich ein Wert von ca. 10 (2 mg versus 100 µg Vollzelllysat, wobei bei der Immunpräzipitation nur die Hälfte für den Western-Blot verwendet wird). Betrachtet man qPCR-Daten hinsichtlich der RNA-Mengen von Lmx1b, so zeigt sich in murinen Glomeruli eine ca. 10 fach höhere Expression als in mPCL (PD Dr. Anne Rascle, persönliche Mitteilung). Hier lässt sich retrospektiv spekulieren, dass bei der initialen Verwendung muriner Glomeruli anstatt muriner Podozytenzellen bereits mittels Western-Blot der Nachweis von endogenem Lmx1b gelungen wäre.

### 4.3.2 Interaktion Lmx1b und Ldb1

Es ist augenfällig, dass LMX1B nicht alleine agieren kann, sondern Co-Faktoren benötigt, welche auch die Gewebe-spezifischen Aktivitäten von LMX1B während der Entwicklung von Niere, Gliedmaßen, Auge und Hirn beeinflussen. Darüber hinaus könnte es sich bei diesen Co-Faktoren um modifizierende Gene für die klinische Ausprägung des Nagel-Patella-Syndroms, die ja sehr variabel ist, handeln (Sweeney et al., 2003). LDB1 stellt hierfür einen viel versprechenden Kandidaten dar, da die Interaktion zwischen LMX1B und LDB1 bereits in der eigenen Arbeitsgruppe durch ein Yeast-two-hybrid-screening (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Ralph Witzgall) sowie durch andere Arbeitsgruppen (Agulnick et al., 1996; Jurata & Gill, 1997; Marini et al., 2003) gezeigt worden war. Inwiefern die Interaktion von LMX1B und LDB1 auch in Podozyten stattfindet sowie deren physiologische Relevanz ist bis dato jedoch vollkommen unklar.

Da im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis von endogenem Lmx1b in Lysat aus murinen Podozytenzellen bereits etabliert worden war, konnte ein entsprechendes Co-Immunpräzipitations-Experiment für Lmx1b und Ldb1 mühelos angeschlossen werden. Eine Interaktion von Lmx1b und Ldb1 konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, was am wahrscheinlichsten auf die nur äußerst geringen Expressionsraten beider Proteine in mPCL zurückzuführen ist. Daher erfolgte auf der Grundlage der bereits oben in 4.3.1 geschilderten qPCR-Daten ein Systemwechsel weg von mPCL hin zur Präparation von Glomeruli aus murinen Nieren, wodurch im Gegensatz zu den immortalisierten, degenerierten mPCL mit einer stark-angereicherten, nativen Podozytenpopulation gearbeitet werden konnte.

Zuvor erfolgte jedoch abermals eine Optimierung der Co-Immunpräzipitation mit Lysat aus COS-7-Zellen, welche mit dem Konstrukt p3M/hLMX1B complete oder p3M/mldb1 bzw. mit beiden Konstrukten transient transfiziert worden waren. Hierbei konnte die Interaktion von LMX1B und Ldb1 in eukaryontischen Zellen erstmals gezeigt werden, was uns ermutigte dies auch im physiologischen Kontext zu untersuchen. Bemerkenswert ist, dass es sich im vorliegenden, artifiziellen System um eine Interaktion eines humanen mit einem murinen Protein handelt, was aber durch die fast vollständige Inter-Species-Homologität der Protein-bindenden Domänen erklärt werden kann. Zudem zeigten diese Versuche, dass es sich bei dem anti-LDB1 Antiserum 4508 (Jurata et al., 1996) um den sensitivsten LDB1-Antikörper handelt, was für die weiteren Experimente als entscheidend anzusehen ist.

Die Präparation muriner Glomeruli aus C57BL/6-Mäusen erfolgte anhand einem in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Protokoll und erbrachte leider nur einen schlechten

Reinheitsgrad bei sehr geringer Proteinausbeute von nur 90 µg Gesamtprotein pro Maus, so dass zusammenfassend weder Lmx1b noch Ldb1 im Lysat nachgewiesen werden konnten. Da die qPCR-Daten aus murinen Glomeruli aber sehr vielversprechend waren (PD Dr. Anne Rascle, unpublizierte Daten), entschlossen wir uns an der Präparation von Glomeruli festzuhalten; es sollte aber die Species gewechselt werden. Grundsätzlich basiert die von Krakower und Greenspon entwickelte Methode der Glomeruli-Präparation auf der Auftrennung der unterschiedlichen Nephronabschnitte durch den Einsatz unterschiedlicher Gewebesiebe (Krakower & Greenspon, 1951). Das in der Arbeitsgruppe etablierte Protokoll sieht für murine Glomeruli Porengrößen von 63 µm/75 µm/38 µm vor. Alternativ dazu finden sich in der Literatur verschiedene, andere Angaben [z.B. 250 µm/100 µm/70 µm in (Schiwek et al., 2004)], so dass bei Verfügbarkeit entsprechender Siebe durchaus auch dieser Ansatz geprüft hätte werden können.

Mit Hilfe von Sieben der Porengröße 106 µm/180 µm/75 µm wurden Glomeruli aus Nieren von männlichen Wistarratten präpariert, wobei lichtmikroskopisch erfreulicherweise fast ausschließlich Glomeruli enthalten waren. Die anschließend mit Vollzelllysat aus dieser Präparation durchgeführte Co-Immunpräzipitation erbrachte erstmals in der Literatur den Beweis, dass Lmx1b und Ldb1 in Podozyten miteinander interagieren. Die physiologische Wichtigkeit von Ldb1 bzw. der Interaktion von Lmx1b und Ldb1 in Podozyten spiegelt sich auch in Beobachtungen an Mäusen wider, bei denen *Ldb1* Podozyten-spezifisch inaktiviert wurde; konventionelle *Ldb1*-Knock-out-Mäuse sterben in utero, bevor die Nierenentwicklung überhaupt begonnen hat (Mukhopadhyay et al., 2003), und sind deshalb für die Beantwortung derartiger Fragen nicht von Nutzen. Der Phänotyp der Podozyten-spezifischen *Ldb1*$^{-/-}$-Tieren ist milder ausgeprägt als bei der Inaktivierung von *Lmx1b*, weist aber große Ähnlichkeiten auf. So kommt es ebenfalls zu einer Proteinurie und einem Verlust von podozytären Fußfortsätzen. Diese Beobachtungen unterstreichen, dass die im Rahmen dieser Arbeit generierten, biochemischen Daten von funktioneller Relevanz sind.

Über die Bedeutung der Interaktion von LMX1B und LDB1 für die transkriptionale Aktivität kann bis dato jedoch nur spekuliert werden. Obwohl LDB1 als transkriptionaler Aktivator von LIM-HD-Proteinen beschrieben worden ist (Bach et al., 1997) und mit LMX1A, einem mit LMX1B eng verwandten Protein, einen Komplex bildet, scheint es dessen transkriptionale Aktivität nicht zu steigern bzw. die Synergie zwischen LMX1A und E47 sogar zu blockieren (Jurata & Gill, 1997). Betrachtet man LMX1B, so wurden Hinweise gefunden, dass LDB1 zumindest an spezifischen Promotoren sogar in Abwesenheit von E47 einen inhibierenden Effekt auf LMX1B ausüben könnte (Dreyer et al., 2000). Im Kontrast dazu existieren

ebenfalls Daten, dass Ldb1 LIM-HD-Proteine mit Otx-Transkriptionsfaktoren verbindet und damit Gene aktiviert, die für die Embryogenese wichtig sind (Bach et al., 1997). Zusammenfassend lässt sich über die Bedeutung der Interaktion von LMX1B und LDB1 in vivo aktuell nur spekulieren. Zudem ist es hoch wahrscheinlich, dass diese Frage nicht allgemeingültig, sondern nur Promoter-spezifisch beantwortet werden kann, so dass es zunächst einer Aufklärung der Zielgene von LMX1B bedarf.

## 4.4 Ausblick

Die Tatsache, dass mit Hilfe der entwickelten Antikörper erstmals die Interaktion von LMX1B und einem Co-Faktor in Podozyten nachgewiesen werden konnte, zeigt die Wertigkeit der Antikörper. Zudem erbrachten die generierten Antikörper viel versprechende Ergebnisse in ersten Versuchen zur Etablierung der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP). Sie stellen damit ein grundlegendes Werkzeug zur Identifizierung der bisher unbekannten Zielgene von LMX1B mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitation-basierten Verfahren wie „ChIP-chip“ oder auch „ChIP-Sequencing“ dar. Die Aufklärung von LMX1B-Zielgenen mit Hilfe von ChIP ist Gegenstand des Promotionsprojektes von Astrid Neumann (in Vorbereitung).

Überdies wäre es für die Zukunft denkbar weitere Co-Faktoren von LMX1B zu entdecken. Hierbei könnte z.B. eine Affinitätschromatographie mit Hilfe von 193-67 gebunden an Protein A-Sepharose-Säulen eingesetzt werden. Biochemische Analysen wie z.B. Massenspektrometrie der Eluatsfraktionen könnten so zur Aufklärung weiterer im Transkriptionskomplex enthaltener Proteine führen, wobei neben Lysat aus Podozyten grundsätzlich eine Vielzahl anderer Zelllinien denkbar scheint, wodurch die Gewebe-spezifische Rolle von LMX1B bei der Entwicklung näher beleuchtet werden könnte. Zudem wäre es sehr lohnenswert, neben Wildtyp-LMX1B auch gentechnisch generierte Mutanten entsprechend den in NPS-Patienten gefundenen Mutationen (z.B. Deletion einer LIM-Domäne) zu verwenden, was einen deutlichen Wissensgewinn hinsichtlich der Ursachen der klinischen Heterogenität des Nagel-Patella-Syndroms bieten könnte.

Zusammenfassend bilden die generierten Antikörper also die Ausgangsbasis zur Beantwortung der beiden Hauptfragen hinsichtlich der Transkriptions-regulatorischen

Funktion von LMX1B: die Identifizierung von Gewebe-spezifischen Zielgenen zum einen und Co-Faktoren zum anderen rückt somit ein Stück näher!

## 5. Zusammenfassung

Bei LMX1B handelt es sich um ein Mitglied der Familie der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren, die in Vertebraten eine fundamentale Rolle bei der Entwicklung und der Aufrechterhaltung der Funktion zahlreicher Gewebe spielen. Mutationen im *LMX1B*-Gen führen zum Auftreten des Nagel-Patella-Syndroms (NPS), einer seltenen autosomal dominant vererbten Erkrankung, die nach ihren hervorstechendsten Merkmalen, einer Hypo- bzw. Dysplasie der Fingernägel gemeinsam mit hypoplastischen bzw. fehlenden Kniescheiben benannt ist. Zusätzlich können mannigfaltige, andere Anomalien auftreten, wobei eine fakultative Beteiligung der Niere die Prognose des Patienten bestimmt. Studien an *Lmx1b*-Knockout-Mäusen lieferten erste funktionelle Daten zu Lmx1b. Um die Mechanismen der transkriptionalen Regulation durch LMX1B und auch dessen Zielgene aufzuklären, bedarf es allerdings einer weiteren, molekularen Charakterisierung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, monoklonale Antikörper gegen LMX1B zu entwickeln und diese anschließend zu charakterisieren. Da LMX1B über mehrere, hochkonservierte Domänen verfügt, welche als Immunogene grundsätzlich ausscheiden, wurden die Aminosäurenbereiche 1 bis 53 bzw. 322 bis 395 von LMX1B als Epitope gewählt. Für die genannten Bereiche wurden Expressionskonstrukte generiert. Anschließend erfolgte die rekombinante Produktion der immunogenen Bereiche in *E. coli*, was sich a.e. auf Grund von Toxizität und konsekutiver Degradation als schwierig erwies. Durch Maßnahmen, welche die Plasmidstabilität und die basale Expressionsrate verbesserten, konnte jedoch genügend Protein produziert werden. Mit Hilfe der aufgereinigten Peptide hLMX1B (1-53) und hLMX1B (322-395) wurden dann jeweils 6 Balb/c-Mäuse immunisiert, wobei 3 subkutane und eine intraperitoneale Injektion durchgeführt wurden. Simultan galt es ein geeignetes Screening-Verfahren zu entwickeln. Hierzu wurde ein ELISA etabliert, welcher ebenfalls zu Antikörpertiter-Bestimmungen aus dem peripheren Blut der immunisierten Mäuse eingesetzt wurde, wodurch die Tiere mit der besten Immunantwort ausgewählt werden konnten.
Den selektierten Tieren wurde 5 Tage nach der intraperitonealen Injektion die Milz entnommen und isolierte Milzlymphozyten mit Myleomzellen fusioniert. Zuvor waren ausgehend von mehreren, gängigen Protokollen die Fusions- und Kulturbedingungen für Hybridomzellen optimiert worden. Hierbei zeigte sich die Verwendung von „Hybridoma Fusion and Cloning Supplement“ (HFCS; Roche) in Verbindung mit einer sehr niedrigen

Zelldichte bei der Kultur von Hybridomzellen als optimal. Das Screening der Hybridomzellen um den 10. Tag nach Fusion wurde mit Hilfe des generierten ELISA in 2 Stufen durchgeführt, wodurch die Spezifität des Screening-Verfahrens erhöht und falsch-positive Klone bereits sehr früh ausgeschlossen werden konnten. Spezifische Hybridomzellklone wurden weiter kultiviert und zusätzlich mittels Western-Blot und Immunpräzipitation charakterisiert, so dass basierend auf den Ergebnisse dieser Tests insgesamt 5 Klone für die Subklonierung ausgewählt werden konnten: die gegen das $NH_2$-terminale Peptid hLMX1B (1-53) gerichteten Klone 422-19 und 422-76 und die gegen das COOH-terminale Peptid hLMX1B (322-395) gerichteten Klone 193-16, 193-67 und 193-68. Nach Abschluss von insgesamt zwei Subklonierungsschritten erfolgte eine finale Charakterisierung der generierten Antikörper. Die genauen Charakteristika finden sich in Tabelle 13 in zusammengefasster Form.

**Tabelle 13: Charakteristika der generierten Antikörper.** Die Bewertung erfolgte anhand von Qualität und Spezifität der Ergebnisse in einer Abstufung von +++ (sehr gut) bis – (negativ). Zusätzlich findet sich jeweils die optimale Verdünnung bzw. Antikörpermenge. Die Angaben zur **Immunpräzipitation** beziehen sich auf Methode **A** (siehe 2.2.5E; 100 µl an unverdünntem Zellkulturüberstand auf 300 µg Gesamtprotein) bzw. Methode **B** (siehe 2.2.5E; Inkubation von 1 ml an unverdünntem Zellkulturüberstand mit 50 µl einer 50%igen Beads-Susupension über Nacht vor der IP).(n.d. = nicht durchgeführt)

| | **422-19** | **422-76** | **193-16** | **193-67** | **193-68** |
|---|---|---|---|---|---|
| **ELISA** | ++<br>unverdünnt | +++<br>unverdünnt | +++<br>unverdünnt | +++<br>unverdünnt | +++<br>unverdünnt |
| **Western-Blot** | - | +<br>1:10 | ++<br>1:10 | +++<br>1:10 | (+)<br>nur bei Überexposition;<br>1:10 |
| **Immunpräzipitation** | +<br>A: 100 µl | +<br>A: 100 µl | ++<br>A: 100 µl<br>B: 1 ml | +++<br>A: 100 µl<br>B:1 ml | ++<br>A: 100 µl |
| **ChIP (nur Pufferbedingungen)** | +<br>A: 100 µl | ++<br>A: 100 µl | ++<br>A: 100 µl | +++<br>A: 100 µl | +<br>A: 100 µl |
| **Immunzytochemie** | n.d. | n.d. | +++<br>1:100 | +++<br>1:100 | n.d. |

Auffallend war, dass die generierten Antikörper (v.a. 193-67) eine deutlich höhere Sensitivität als bisher in der Arbeitsgruppe verwendete Antikörper aufwiesen, so dass es lohnenswert erschien, mit Hilfe dieser neuen Antikörper Verfahren zur Detektion von endogen produziertem LMX1B zu etablieren. Unter Verwendung des Antikörpers 193-67 gelang es Lmx1b in Vollzelllysat aus murinen Podozytenzellen und Rattenglomeruli mittels Immunpräzipitation nachzuweisen.

Ausgehend von bisher erhobenen Daten hinsichtlich der Transkriptions-regulatorischen Funktion von LMX1B ist zu vermuten, dass LMX1B nicht alleine agieren kann, sondern Co-Faktoren benötigt, welche auch die Gewebe-spezifischen Aktivitäten von LMX1B während der Entwicklung von Niere, Gliedmaßen, Auge und Hirn beeinflussen. LDB1 stellte hierfür einen viel versprechenden Kandidaten dar; inwiefern LMX1B und LDB1 auch in Podozyten interagieren sowie die physiologische Relevanz der Interaktion war bis dato jedoch vollkommen unklar. Unter Verwendung des im Rahmen dieser Arbeit generierten Antikörpers 193-67 konnte nun mit Hilfe von Co-Immunpräzipitations-Experimenten die Interaktion von Lmx1b und Ldb1 in Podozyten (aus Rattenglomeruli) erstmals gezeigt werden. Diese Daten wurden publiziert (Suleiman et al., 2007).

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit generierten Antikörper konnte erstmals die Interaktion von LMX1B mit einem Co-Faktor im physiologischen Kontext gezeigt werden. Überdies erbrachten erste Versuche zur Etablierung der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) positive Resultate. Zusammenfassend stellen die entwickelten Antikörper also leistungsfähige und unverzichtbare Werkzeuge dar, um die Funktion von LMX1B hinsichtlich Interaktionspartnern und Zielgenen weiter aufzuklären.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| °C | Grad Celcius |
| µg | Mikrogramm ($10^{-6}$ g) |
| µl | Mikroliter ($10^{-6}$ l) |
| µM | mikromolar ($10^{-6}$ M) |
| A | Ampere |
| a.e. | am ehesten |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| *Bam* | *Bacillus amyloliquefaciens* |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinder-Serumalbumin („bovine serum albumine“) |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosohat |
| CDR | “complementary determining region” |
| ChIP | Chromatin-Immunpräzipitation |
| CIP | Calf Intestinal Alkaline Phosphatase |
| $CO_2$ | Kohlendioxid |
| COS-7 | Nierenzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze |
| d | Tag |
| d.h. | das heißt |
| DMEM | „Dulbecco’s modified Eagle Medium“ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (“deoxyribonucleic acid”) |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynucleosidtriphosphat |
| *E. coli* | *Escherichia coli* |
| EDTA | Ethlylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | “enzyme linked immunosorbent assay” |
| EMSA | „electrophoretic mobility shift assays“ |
| et al. | et alii |

| | |
|---|---|
| FCS | Fötales Kälberserum („fetal calf serum“) |
| FITC | Fluoreszein-Isothiozyanat |
| g | Gramm |
| GBM | glomeruläre Basalmembran |
| h | Stunde |
| $H_2O$ | Wasser |
| HAT | Hypoxanthin -Aminopterin- Thymidin Mediumzusatz |
| HD-Domäne | Homöodomäne |
| HEK293 | Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen („human embryonic kidney“) |
| HEK293T | mit dem Gen für das SV40 T-Antigen transfizierte HEK293-Zelllinie |
| HFCS | Hybridoma Fusion and Cloning Supplement (Roche) |
| HGPRT | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase |
| HRP | Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“) |
| HT | Hypoxanthin-Thymidin Mediumzusatz |
| IFNγ | Interferon gamma |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL-6 | Interleukin 6 |
| IP | Immunpräzipitation |
| ip. | intraperitoneal |
| kBp | 1000 Basenpaaare |
| kD | Kilodalton |
| l | Liter |
| LDB1 | „LIM-domain-binding protein 1“ |
| LIM-Domäne | benannt nach den Transkritionsfaktoren Lin-11, Isl-1 und Mec-3, in denen sie erstmals identifiziert wurde |
| LMX1B | LIM-Homöobox-Transkriptionsfaktor 1 beta |
| mg | Milligramm ($10^{-3}$ g) |
| min | Minute |
| ml | Milliliter ($10^{-3}$ l) |
| mM | millimolar |
| mPCL | murine Podozytenzelllinie („murine podocyte cell line”) |
| n | Anzahl |
| n.d. | nicht durchgeführt |

| | |
|---|---|
| ng | Nanogramm ($10^{-9}$ g) |
| nm | Nanometer ($10^{-9}$ m) |
| nM | nanomolar ($10^{-9}$ M) |
| NPS | Nagel-Patella-Syndrom |
| OD | optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“) |
| PEG | Polyethylenglykol |
| pg | Pikogramm ($10^{-12}$ g) |
| pH-Wert | negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| qPCR | quantitative PCR |
| RLIM | „RING finger LIM-domain binding protein“ |
| RNA | Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“) |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“) |
| RPMI | „Roswell Park Memorial Institute“ |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkription – PolymeraseKettenReaktion („polymerase chain reaction“) |
| s | Sekunde |
| sc. | subkutan |
| SDS | Natriumdodecylsulphat („sodium dodecyl sulphat“) |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| sog. | sogenannt |
| TAE-Puffer | Tris/Azetat/EDTA-Puffer |
| TE | Tris/EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin |
| Temp. | Temperatur |
| TK | Thymidinkinase |
| $T_M$ | Schmelztemperatur (“melting temperature”) |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| ü.N. | über Nacht |
| u.U. | unter Umständen |

| | |
|---|---|
| UV-Licht | ultraviolettes Licht |
| V | Volt |
| v.a. | vor allem |
| v:v | Verhältnis Volumen zu Volumen |
| z.T. | zum Teil |
| ZO-1 | Zonula Occludens 1 |

## 7. Literaturverzeichnis

**Agulnick, A.D., Taira, M., Breen, J.J., Tanaka, T., Dawid, I.B., Westphal, H.** (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature 384*, 270-272.

**Andersson, J. and Melchers, F.** (1978). The antibody repertoire of hybrid cell lines obtained by fusion of X63-AG8 myeloma cells with mitogen-activated B-cell blasts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol 81*, 130-139.

**Bach, I., Carriere, C., Ostendorff, H.P., Andersen, B., Rosenfeld, M.G.** (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev. 11*, 1370-1380.

**Bach, I., Rodriguez-Esteban, C., Carrière, C., Bhushan, A., Krones, A., Rose, D.W., Glass, C.K., Andersen, B., Izpisúa Belmonte, J.C., Rosenfeld, M.G.** (1999). RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nat. Genet 22*, 394-399.

**Banerjee-Basu, S. and Baxevanis, A.D.** (2001). Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucleic Acids Res 29*, 3258-3269.

**Barbaux, S., Niaudet, P., Gubler, M.C., Grünfeld, J.P., Jaubert, F., Kuttenn, F., Fékété, C.N., Souleyreau-Therville, N., Thibaud, E., Fellous, M., McElreavey, K.** (1997). Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat. Genet 17*, 467-470.

**Barker, D.F., Hostikka, S.L., Zhou, J., Chow, L.T., Oliphant, A.R., Gerken, S.C., Gregory, M.C., Skolnick, M.H., Atkin, C.L., Tryggvason, K.** (1990). Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science (New York, N. Y. ) 248*, 1224-1227.

**Bassing, C.H., Swat, W., Alt, F.W.** (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell 109 Suppl*, S45-S55.

**Batsford, S.R., Rohrbach, R., Vogt, A.** (1987). Size restriction in the glomerular capillary wall: importance of lamina densa. *Kidney Int 31*, 710-717.

**Bazin, R. and Lemieux, R.** (1987). Role of the macrophage-derived hybridoma growth factor in the in vitro and in vivo proliferation of newly formed B cell hybridomas. *J. Immunol 139*, 780-787.

**Bazin, R. and Lemieux, R.** (1989). Increased proportion of B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies of desired specificity in cultures containing macrophage-derived hybridoma growth factor (IL-6). *J. Immunol. Methods 116*, 245-249.

**Ben Bassat, M., Cohen, L., Rosenfeld, J.** (1971). The glomerular basement membrane in the nail-patella syndrome. *Arch Pathol 92*, 350-355.

**Benninghoff A and Drenckhahn D** (2008). *Anatomie Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. (München: Elsevier Urban & Fischer Verlag).

**Berg,J.M., Tymoczko,J.L., and Stryer,L.** (2003). *Biochemie*. (Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag).

**Bertolatus, J.A. and Klinzman, D.** (1991). Macromolecular sieving by glomerular basement membrane in vitro: effect of polycation or biochemical modifications. *Microvasc. Res 41*, 311-327.

**Bongers, E.M.H.F., Gubler, M.C., Knoers, N.V.A.M.** (2002). Nail-patella syndrome. Overview on clinical and molecular findings. *Pediatr. Nephrol 17*, 703-712.

**Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M.C., Niaudet, P., Antignac, C.** (2000). NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat. Genet 24*, 349-354.

**Bulger, R.E., Eknoyan, G., Purcell, D.J., Dobyan, D.C.** (1983). Endothelial characteristics of glomerular capillaries in normal, mercuric chloride-induced, and gentamicin-induced acute renal failure in the rat. *The Journal of Clinical Investigation 72*, 128-141.

**Caulfield, J.P. and Farquhar, M.G.** (1974). The permeability of glomerular capillaries to graded dextrans. Identification of the basement membrane as the primary filtration barrier. *J. Cell Biol 63*, 883-903.

**Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., Baty, D.** (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol 157*, 220-233.

**Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K.C., Pepicelli, C.V., Gan, L., Lee, B., Johnson, R.L.** (1998). Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nat. Genet. 19*, 51-55.

**Chung, C.T., Niemela, S.L., Miller, R.H.** (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A 86*, 2172-2175.

**Clough, M.V., Hamlington, J.D., McIntosh, I.** (1999). Restricted distribution of loss-of-function mutations within the LMX1B genes of nail-patella syndrome patients. *Hum. Mutat 14*, 459-465.

**Cooper, N.R.** (1985). The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol 37*, 151-216.

**Curtiss, J. and Heilig, J.S.** (1998). DeLIMiting development. *Bioessays 20*, 58-69.

**Daniel, C.R., Osment, L.S., Noojin, R.O.** (1980). Triangular lunulae. A clue to nail-patella syndrome. *Arch Dermatol 116*, 448-449.

**Daniels, B.S., Hauser, E.B., Deen, W.M., Hostetter, T.H.** (1992). Glomerular basement membrane: in vitro studies of water and protein permeability. *Am. J. Physiol 262*, F919-F926.

**Dawid, I.B., Toyama, R., Taira, M.** (1995). LIM domain proteins. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie 318*, 295-306.

**Deen, W.M., Lazzara, M.J., Myers, B.D.** (2001). Structural determinants of glomerular permeability. *Am. J. Physiol. Renal Physiol 281,* F579-F596.

**Del Pozo, E. and Lapp, H.** (1970). Ultrastructure of the kidney in the nephropathy of the nail--patella syndrome. *Am. J. Clin. Pathol. 54,* 845-851.

**Di Noia, J.M. and Neuberger, M.S.** (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem 76,* 1-22.

**Dreyer, S.D., Morello, R., German, M.S., Zabel, B., Winterpacht, A., Lunstrum, G.P., Horton, W.A., Oberg, K.C., Lee, B.** (2000). LMX1B transactivation and expression in nail-patella syndrome. *Hum. Mol. Genet. 9,* 1067-1074.

**Dreyer, S.D., Zhou, G., Baldini, A., Winterpacht, A., Zabel, B., Cole, W., Johnson, R.L., Lee, B.** (1998). Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat. Genet. 19,* 47-50.

**Dunston, J.A., Hamlington, J.D., Zaveri, J., Sweeney, E., Sibbring, J., Tran, C., Malbroux, M., O'Neill, J.P., Mountford, R., McIntosh, I.** (2004). The human LMX1B gene: transcription unit, promoter, and pathogenic mutations. *Genomics 84,* 565-576.

**Edelman, G.M.** (1991). Antibody structure and molecular immunology. *Scand. J. Immunol 34,* 1-22.

**Edman, P.** (1949). A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem 22,* 475.

**Engvall, E. and Perlmann, P.** (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry 8,* 871-874.

**Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., Bishop, J.M.** (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell Biol. 5,* 3610-3616.

**Ey, P.L., Prowse, S.J., Jenkin, C.R.** (1978). Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry 15,* 429-436.

**Eyaid, W.M., Clough, M.V., Root, H., Scott, K.M., McCormick, M.K., Zhang, X., Lisitsyn, N.A., Kearns, W.G., Francomano, C.A., Richards, J.E., McIntosh, I.** (1998). Physical mapping of the nail patella syndrome interval at 9q34: ordering of STSs and ESTs. *Hum. Genet 103,* 525-526.

**Ferencík,M., Herold,M., Mat'ha,V., and Rovenský,J.** (2006). *Kompendium der Immunologie*. (Wien, New York: Springer Verlag).

**Fong, E.E.** (1946). Iliac horns (symmetrical bilateral central posterior iliac processes): a case report. *Radiology 47,* 517-518.

**Freyd, G., Kim, S.K., Horvitz, H.R.** (1990). Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the Caenorhabditis elegans cell lineage gene lin-11. *Nature 344,* 876-879.

**Fried, M.G. and Crothers, D.M.** (1984). Equilibrium studies of the cyclic AMP receptor protein-DNA interaction. *J. Mol. Biol. 172*, 241-262.

**Galfre, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W., Howard, J.C.** (1977). Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature 266*, 550-552.

**Gefter, M.L., Margulies, D.H., Scharff, M.D.** (1977). A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic Cell Genet 3*, 231-236.

**Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., Wüthrich, K.** (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell 78*, 211-223.

**Gellert, M.** (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu. Rev. Biochem 71*, 101-132.

**Gerber, H.P., Hillan, K.J., Ryan, A.M., Kowalski, J., Keller, G.A., Rangell, L., Wright, B.D., Radtke, F., Aguet, M., Ferrara, N.** (1999). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development (Cambridge, England) 126*, 1149-1159.

**German, M.S., Wang, J., Chadwick, R.B., Rutter, W.J.** (1992). Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev. 6*, 2165-2176.

**Ghitescu, L., Desjardins, M., Bendayan, M.** (1992). Immunocytochemical study of glomerular permeability to anionic, neutral and cationic albumins. *Kidney Int 42*, 25-32.

**Goding, J.W.** (1978). Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immunol. Methods 20*, 241-253.

**Goding, J.W.** (1980). Antibody production by hybridomas. *J. Immunol. Methods 39*, 285-308.

**Goding,J.W.** (1996). *Monoclonal antibodies: principles and practice : production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry and immunology*. (Academic Press).

**Groffen, A.J., Hop, F.W., Tryggvason, K., Dijkman, H., Assmann, K.J., Veerkamp, J.H., Monnens, L.A., Van den Heuvel, L.P.** (1997). Evidence for the existence of multiple heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane and mesangial matrix. *Eur. J. Biochem 247*, 175-182.

**Grossman, T.H., Kawasaki, E.S., Punreddy, S.R., Osburne, M.S.** (1998). Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene 209*, 95-103.

**Grubb, G.R., Yun, K., Williams, B.R., Eccles, M.R., Reeve, A.E.** (1994). Expression of WT1 protein in fetal kidneys and Wilms tumors. *Lab. Invest 71*, 472-479.

**Gubler, M.C., Levy, M., Naizot, C., Habib, R.** (1980). Glomerular basement membrane changes in hereditary glomerular diseases. *Ren Physiol 3*, 405-413.

**Guo, G., Morrison, D.J., Licht, J.D., Quaggin, S.E.** (2004). WT1 activates a glomerular-specific enhancer identified from the human nephrin gene. *J. Am. Soc. Nephrol 15*, 2851-2856.

**Hamlington, J.D., Jones, C., McIntosh, I.** (2001). Twenty-two novel LMX1B mutations identified in nail patella syndrome (NPS) patients. *Hum. Mutat 18*, 458.

**Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol. 166*, 557-580.

**Haraldsson, B., Nystrom, J., Deen, W.M.** (2008). Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev. 88*, 451-487.

**Harlow E. and Lane D.** (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

**Heidet, L., Bongers, E.M., Sich, M., Zhang, S.Y., Loirat, C., Meyrier, A., Broyer, M., Landthaler, G., Faller, B., Sado, Y., Knoers, N.V., Gubler, M.C.** (2003). In vivo expression of putative LMX1B targets in nail-patella syndrome kidneys. *Am. J. Pathol. 163*, 145-155.

**Hengartner, H., Luzzati, A.L., Schreier, M.** (1978). Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63Ag8. *Curr. Top. Microbiol. Immunol 81*, 92-99.

**Hidaka, S., Kranzlin, B., Gretz, N., Witzgall, R.** (2002). Urinary clusterin levels in the rat correlate with the severity of tubular damage and may help to differentiate between glomerular and tubular injuries. *Cell Tissue Res. 310*, 289-296.

**Hoogenboom, H.R. and Chames, P.** (2000). Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol. Today 21*, 371-378.

**Huber, T.B., Kottgen, M., Schilling, B., Walz, G., Benzing, T.** (2001). Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem 276*, 41543-41546.

**Huber, T.B. and Benzing, T.** (2005). The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens 14*, 211-216.

**Hunter, R., Strickland, F., Kezdy, F.** (1981). The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. I. The role of hydrophile-lipophile balance. *J. Immunol. 127*, 1244-1250.

**Iannotti, C.A., Inoue, H., Bernal, E., Aoki, M., Liu, L., Donis-Keller, H., German, M.S., Permutt, M.A.** (1997). Identification of a human LMX1 (LMX1.1)-related gene, LMX1.2: tissue-specific expression and linkage mapping on chromosome 9. *Genomics 46*, 520-524.

**Janeway,C.A., Murphy,K., Travers,P., and Walport,M.** (2009). *Janeway Immunologie*. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).

**Jarad, G. and Miner, J.H.** (2009). Update on the glomerular filtration barrier. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens 18*, 226-232.

**Jeansson, M. and Haraldsson, B.Ã.** (2003). Glomerular size and charge selectivity in the mouse after exposure to glucosaminoglycan-degrading enzymes. *J. Am. Soc. Nephrol 14*, 1756-1765.

**Johnson, J.D., Zhang, W., Rudnick, A., Rutter, W.J., German, M.S.** (1997). Transcriptional synergy between LIM-homeodomain proteins and basic helix-loop-helix proteins: the LIM2 domain determines specificity. *Mol. Cell Biol. 17*, 3488-3496.

**Jurata, L.W. and Gill, G.N.** (1997). Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI. *Mol. Cell Biol. 17*, 5688-5698.

**Jurata, L.W., Kenny, D.A., Gill, G.N.** (1996). Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development. *Proc Natl Acad Sci U S A 93*, 11693-11698.

**Karakawa, W.W., Sutton, A., Schneerson, R., Karpas, A., Vann, W.F.** (1988). Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated Staphylococcus aureus by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun 56*, 1090-1095.

**Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohlsson, H., Edlund, T.** (1990). Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature 344*, 879-882.

**Katz, A., Fish, A.J., Kleppel, M.M., Hagen, S.G., Michael, A.F., Butkowski, R.J.** (1991). Renal entactin (nidogen): isolation, characterization and tissue distribution. *Kidney Int 40*, 643-652.

**Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.** (1979). A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol 123*, 1548-1550.

**Kelley, K.C., Huestis, K.J., Austen, D.A., Sanderson, C.T., Donoghue, M.A., Stickel, S.K., Kawasaki, E.S., Osburne, M.S.** (1995). Regulation of sCD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in Escherichia coli. *Gene 156*, 33-36.

**Kennett, R.G.** (1979). Monoclonal antibodies. Hybrid myelomas--a revolution in serology and immunogenetics. *Am. J. Hum. Genet 31*, 539-547.

**Kennett, R.H., Denis, K.A., Tung, A.S., Klinman, N.R.** (1978). Hybrid plasmacytoma production: fusions with adult spleen cells, monoclonal spleen fragments, neonatal spleen cells and human spleen cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol 81*, 77-91.

**Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C.E., Peltonen, L., Holmberg, C., Olsen, A., Tryggvason, K.** (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell 1*, 575-582.

**Kieser, W.** (1939). Die Sog. Flughaut beim Menschen. Ihre Beziehung zum Status dysraphicus und ihre Erblichkeit. *ZtschrMensch Vererb Konstitutionsl 23*, 594-619.

**Kitamoto, Y., Tokunaga, H., Tomita, K.** (1997). Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. *The Journal of Clinical Investigation 99*, 2351-2357.

**Köhler, G. and Milstein, C.** (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature 256*, 495-497.

**Krakower, C.A. and Greenspon, S.A.** (1951). Localization of the nephrotoxic antigen within the isolated renal glomerulus. *AMA Arch Pathol 51*, 629-639.

**Lane, R.D.** (1985). A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas. *J. Immunol. Methods 81*, 223-228.

**Lane, R.D., Crissman, R.S., Lachman, M.F.** (1984). Comparison of polyethylene glycols as fusogens for producing lymphocyte-myeloma hybrids. *J. Immunol. Methods 72*, 71-76.

**Lanier, L.L., Ruitenberg, J.J., Phillips, J.H.** (1988). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J. Immunol 141*, 3478-3485.

**Lefkovits,I. and Waldmann,H.** (1979). *Limiting Dilution Analysis of Cells in the Immune System*. (Cambridge: Cambridge University Press).

**Li, Z., Woo, C.J., Iglesias-Ussel, M.D., Ronai, D., Scharff, M.D.** (2004). The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev 18*, 1-11.

**Lietzke, R. and Unsicker, K.** (1985). A statistical approach to determine monoclonality after limiting cell plating of a hybridoma clone. *J. Immunol. Methods 76*, 223-228.

**Littlefield, J.W.** (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblats in vitro and their presumed recombinants. *Science (New York, N. Y. ) 145*, 709-710.

**Mackenzie, M.R., Warner, N.L., Mitchell, G.F.** (1978). The binding of murine immunoglobulins to staphylococcal protein A. *J. Immunol 120*, 1493-1496.

**Maizels, N.** (2005). Immunoglobulin gene diversification. *Annu. Rev. Genet 39*, 23-46.

**Mandel, B.** (1976). Neutralization of poliovirus: a hypothesis to explain the mechanism and the one-hit character of the neutralization reaction. *Virology 69*, 500-510.

**Marini, M., Bongers, E.M., Cusano, R., Di Duca, M., Seri, M., Knoers, N.V., Ravazzolo, R.** (2003). Confirmation of CLIM2/LMX1B interaction by yeast two-hybrid screening and analysis of its involvement in nail-patella syndrome. *Int. J. Mol. Med. 12*, 79-82.

**Matthews, J.M. and Visvader, J.E.** (2003). LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins. *EMBO Rep 4*, 1132-1137.

**McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J.** (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature 348*, 552-554.

**McGinnis, W., Levine, M.S., Hafen, E., Kuroiwa, A., Gehring, W.J.** (1984). A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the Drosophila Antennapedia and bithorax complexes. *Nature 308*, 428-433.

**McIntosh, I., Clough, M.V., Schäffer, A.A., Puffenberger, E.G., Horton, V.K., Peters, K., Abbott, M.H., Roig, C.M., Cutone, S., Ozelius, L., Kwiatkowski, D.J., Pyeritz, R.E., Brown, L.J., Pauli, R.M., McCormick, M.K., Francomano, C.A.** (1997). Fine mapping of the nail-patella syndrome locus at 9q34. *Am. J. Hum. Genet 60*, 133-142.

**McIntosh, I., Dreyer, S.D., Clough, M.V., Dunston, J.A., Eyaid, W., Roig, C.M., Montgomery, T., Ala-Mello, S., Kaitila, I., Winterpacht, A., Zabel, B., Frydman, M., Cole, W.G., Francomano, C.A., Lee, B.** (1998). Mutation analysis of LMX1B gene in nail-patella syndrome patients. *Am. J. Hum. Genet. 63*, 1651-1658.

**McIntosh, I., Dunston, J.A., Liu, L., Hoover-Fong, J.E., Sweeney, E.** (2005). Nail patella syndrome revisited: 50 years after linkage. *Ann. Hum. Genet 69*, 349-363.

**Melchers, F., Potter, M., Warner, N.L.** (1978). Lymphocyte hybridomas. Second workshop on "functional properties of tumors of T and B lymphocytes." Preface. *Curr. Top. Microbiol. Immunol 81*, IX-XXIII.

**Michelsen, J.W., Schmeichel, K.L., Beckerle, M.C., Winge, D.R.** (1993). The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90*, 4404-4408.

**Miner, J.H., Morello, R., Andrews, K.L., Li, C., Antignac, C., Shaw, A.S., Lee, B.** (2002). Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation. *J. Clin. Invest 109*, 1065-1072.

**Miner, J.H. and Sanes, J.R.** (1994). Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J. Cell Biol. 127*, 879-891.

**Morello, R., Zhou, G., Dreyer, S.D., Harvey, S.J., Ninomiya, Y., Thorner, P.S., Miner, J.H., Cole, W., Winterpacht, A., Zabel, B., Oberg, K.C., Lee, B.** (2001). Regulation of glomerular basement membrane collagen expression by LMX1B contributes to renal disease in nail patella syndrome. *Nat. Genet. 27*, 205-208.

**Mukhopadhyay, M., Teufel, A., Yamashita, T., Agulnick, A.D., Chen, L., Downs, K.M., Schindler, A., Grinberg, A., Huang, S.P., Dorward, D., Westphal, H.** (2003). Functional ablation of the mouse Ldb1 gene results in severe patterning defects during gastrulation. *Development 130*, 495-505.

**Mundlos, S., Pelletier, J., Darveau, A., Bachmann, M., Winterpacht, A., Zabel, B.** (1993). Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development (Cambridge, England) 119*, 1329-1341.

**Noakes, P.G., Miner, J.H., Gautam, M., Cunningham, J.M., Sanes, J.R., Merlie, J.P.** (1995). The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1. *Nat. Genet 10*, 400-406.

**Nordan, R.P. and Potter, M.** (1986). A macrophage-derived factor required by plasmacytomas for survival and proliferation in vitro. *Science (New York, N. Y. ) 233*, 566-569.

**Oi,V.T. and Herzenberg,L.A.** (1980). *In Selected Methods in Cellular Immunology*, B.B.Mishel and S.M.Shiigi, eds. (San Francisco: pp. 351-372.)

**Oi, V.T., Jones, P.P., Goding, J.W., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A.** (1978). Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2, and Ia antigens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol 81*, 115-120.

**Ostendorff, H.P., Peirano, R.I., Peters, M.A., Schlüter, A., Bossenz, M., Scheffner, M., Bach, I.** (2002). Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature 416*, 99-103.

**Österreicher W** (1930). Gemeinsame Vererbung von Anonychie, bzw. Ochyatrophie, Patellardefekt und Luxatio radii. Dominantes Auftreten in 5 Generationen. *Z Menschl Vererb Konstitutionsl* 465-476.

**Palmer, R.E., Kotsianti, A., Cadman, B., Boyd, T., Gerald, W., Haber, D.A.** (2001). WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein Podocalyxin. *Curr. Biol 11*, 1805-1809.

**Pan, S.H. and Malcolm, B.A.** (2000). Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). *Biotechniques 29*, 1234-1238.

**Pävenstadt, H., Kriz, W., Kretzler, M.** (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev. 83*, 253-307.

**Pelletier, J., Bruening, W., Kashtan, C.E., Mauer, S.M., Manivel, J.C., Striegel, J.E., Houghton, D.C., Junien, C., Habib, R., Fouser, L.** (1991). Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell 67*, 437-447.

**Pontecorvo, G.** (1975). Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell Genet 1*, 397-400.

**Porter, R.R.** (1959). The hydrolysis of rabbit y-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J 73*, 119-126.

**Porter, R.R.** (1991). Lecture for the Nobel Prize for physiology or medicine 1972: Structural studies of immunoglobulins. 1972. *Scand. J. Immunol 34*, 381-389.

**Possee, R.D., Schild, G.C., Dimmock, N.J.** (1982). Studies on the mechanism of neutralization of influenza virus by antibody: evidence that neutralizing antibody (anti-haemagglutinin) inactivates influenza virus in vivo by inhibiting virion transcriptase activity. *J. Gen. Virol 58*, 373-386.

**Potter, M.** (1972). Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol. Rev 52*, 631-719.

**Putaala, H., Soininen, R., KilpelÃ¤inen, P., Wartiovaara, J., Tryggvason, K.** (2001). The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum. Mol. Genet 10*, 1-8.

**Rascle, A., Suleiman, H., Neumann, T., Witzgall, R.** (2007). Role of transcription factors in podocytes. *Nephron Exp. Nephrol. 106*, e60-e66.

**Renwick, J. and Lawler, S.** (1955). Genetical linkage between the ABO and nail-patella loci. *Ann. Hum. Genet 19*, 312-331.

**Rétaux, S. and Bachy, I.** (2002). A short history of LIM domains (1993-2002): from protein interaction to degradation. *Mol. Neurobiol 26*, 269-281.

**Robbins, F.C. and Robbins, J.B.** (1986). Current status and prospects for some improved and new bacterial vaccines. *Annu Rev Public Health 7*, 105-125.

**Roekerath, W.** (1951). Hereditäre Osteo-onycho-dysplasie . *Fortschr Roentgenstr 75*, 700-712.

**Rohr, C., Prestel, J., Heidet, L., Hosser, H., Kriz, W., Johnson, R.L., Antignac, C., Witzgall, R.** (2002). The LIM-homeodomain transcription factor Lmx1b plays a crucial role in podocytes. *J. Clin. Invest 109*, 1073-1082.

**Rostgaard, J. and Qvortrup, K.** (1997). Electron microscopic demonstrations of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvasc. Res 53*, 1-13.

**Sadl, V., Jin, F., Yu, J., Cui, S., Holmyard, D., Quaggin, S., Barsh, G., Cordes, S.** (2002). The mouse Kreisler (Krml1/MafB) segmentation gene is required for differentiation of glomerular visceral epithelial cells. *Dev. Biol 249*, 16-29.

**Salmon, A.H.J., Neal, C.R., Harper, S.J.** (2009). New aspects of glomerular filtration barrier structure and function: five layers (at least) not three. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens 18*, 197-205.

**Sanes, J.R., Engvall, E., Butkowski, R., Hunter, D.D.** (1990). Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J. Cell Biol 111*, 1685-1699.

**Schägger, H. and von Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem 166*, 368-379.

**Schiwek, D., Endlich, N., Holzman, L., Holthofer, H., Kriz, W., Endlich, K.** (2004). Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int. 66*, 91-101.

**Schleutermann, D.A., Bias, W.B., Murdoch, J.L., McKusick, V.A.** (1969). Linkage of the loci for the nail-patella syndrome and adenylate kinase. *Am. J. Hum. Genet 21*, 606-630.

**Scott, M.P. and Weiner, A.J.** (1984). Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81*, 4115-4119.

**Secher, D.S. and Burke, D.C.** (1980). A monoclonal antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon. *Nature 285*, 446-450.

**Seri, M., Melchionda, S., Dreyer, S., Marini, M., Carella, M., Cusano, R., Piemontese, M.R., Caroli, F., Silengo, M., Zelante, L., Romeo, G., Ravazzolo, R., Gasparini, P., Lee, B.** (1999). Identification of LMX1B gene point mutations in italian patients affected with Nail-Patella syndrome. *Int. J. Mol. Med 4*, 285-290.

**Shulman, M., Wilde, C.D., KÃ¶hler, G.** (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature 276*, 269-270.

**Similä, S., Vesa, L., Wasz-Höckert, O.** (1970). Hereditary onycho-osteodysplasia (the nail-patella syndrome) with nephrosis-like renal disease in a newborn boy. *Pediatrics 46*, 61-65.

**Slattery, C., Ryan, M.P., McMorrow, T.** (2008). E2A proteins: regulators of cell phenotype in normal physiology and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol 40*, 1431-1436.

**Sood, P., Rojas, M., Talor, Z.** (2009). Renal involvement in nail-patella syndrome: report of three cases. *Int Urol Nephrol*.

**Stähli, C., Staehelin, T., Miggiano, V., Schmidt, J., Häring, P.** (1980). High frequencies of antigen-specific hybridomas: dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. *J. Immunol. Methods 32*, 297-304.

**Staines, N.A. and Lew, A.M.** (1980). Whither monoclonal antibodies? *Immunology 40*, 287-293.

**Suleiman, H., Heudobler, D., Raschta, A.S., Zhao, Y., Zhao, Q., Hertting, I., Vitzthum, H., Moeller, M.J., Holzman, L.B., Rachel, R., Johnson, R., Westphal, H., Rascle, A., Witzgall, R.** (2007). The podocyte-specific inactivation of Lmx1b, Ldb1 and E2a yields new insight into a transcriptional network in podocytes. *Dev. Biol. 304*, 701-712.

**Sweeney, E., Fryer, A., Mountford, R., Green, A., McIntosh, I.** (2003). Nail patella syndrome: a review of the phenotype aided by developmental biology. *J. Med. Genet 40*, 153-162.

**Takemoto, M., He, L., Norlin, J., Patrakka, J., Xiao, Z., Petrova, T., Bondjers, C., Asp, J., Wallgard, E., Sun, Y., Samuelsson, T., Mostad, P., Lundin, S., Miura, N., Sado, Y., Alitalo, K., Quaggin, S.E., Tryggvason, K., Betsholtz, C.** (2006). Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *EMBO J 25*, 1160-1174.

**Ton, C.C., Hirvonen, H., Miwa, H., Weil, M.M., Monaghan, P., Jordan, T., van Heyningen, V., Hastie, N.D., Meijers-Heijboer, H., Drechsler, M.** (1991). Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell 67*, 1059-1074.

**Tonegawa, S.** (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature 302*, 575-581.

**Touraine, H.A.** (1943). L'onycharthrose héréditaire . *Prog Med 71*.

**Tryggvason, K., Patrakka, J., Wartiovaara, J.** (2006). Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N. Engl. J. Med 354*, 1387-1401.

**Turner, J.W.** (1933). An hereditary arthrodysplasia associated with hereditary dystrophy of the nails. *JAMA* 882-884.

**Visvader, J.E., Mao, X., Fujiwara, Y., Hahm, K., Orkin, S.H.** (1997). The LIM-domain binding protein Ldb1 and its partner LMO2 act as negative regulators of erythroid differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94*, 13707-13712.

**Wagner, N., Wagner, K.D., Xing, Y., Scholz, H., Schedl, A.** (2004). The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J. Am. Soc. Nephrol 15*, 3044-3051.

**Way, J.C. and Chalfie, M.** (1988). mec-3, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in C. elegans. *Cell 54*, 5-16.

**Welsch U** (2003). *Lehrbuch Histologie*. (München Jena: Elsevier Urban & Fischer Verlag).

**Westerwoudt, R.J.** (1985). Improved fusion methods. IV. Technical aspects. *J. Immunol. Methods 77*, 181-196.

**White, J. and Helenius, A.** (1980). pH-dependent fusion between the Semliki Forest virus membrane and liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77*, 3273-3277.

**Winter, G. and Milstein, C.** (1991). Man-made antibodies. *Nature 349*, 293-299.

**Wyke, A.M., Impraim, C.C., Knutton, S., Pasternak, C.A.** (1980). Components involved in virally mediated membrane fusion and permeability changes. *Biochem. J 190*, 625-638.

**Zenker, M., Aigner, T., Wendler, O., Tralau, T., Müntefering, H., Fenski, R., Pitz, S., Schumacher, V., Royer-Pokora, B., Wühl, E., Cochat, P., Bouvier, R., Kraus, C., Mark, K., Madlon, H., Dötsch, J., Rascher, W., Maruniak-Chudek, I., Lennert, T., Neumann, L.M., Reis, A.** (2004). Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum. Mol. Genet 13*, 2625-2632.

# 8. Veröffentlichungen

## 8.1 Originalarbeiten

Suleiman, H., **Heudobler, D.**, Raschta, A.S., Zhao, Y., Zhao, Q., Hertting, I., Vitzthum, H., Moeller, M.J., Holzman, L.B., Rachel, R., Johnson, R., Westphal, H., Rascle, A., Witzgall, R. (2007). The podocyte-specific inactivation of Lmx1b, Ldb1 and E2a yields new insight into a transcriptional network in podocytes. Dev. Biol. 304, 701-712.

## 8.2 Posterbeiträge

Anne Rascle, Tanja Neumann, Anne-Sarah Raschta, Jürgen Kastner, Astrid Neumann, **Daniel Heudobler** and Ralph Witzgall, Transcriptional Regulation by the LIM-Homeodomain Protein LMX1B, 7th EMBL Transcription Meeting, August 26-30 2006, Heidelberg

## 9. Lebenslauf

| | |
|---|---|
| **Persönliche Daten** | |
| Name | Daniel Heudobler |
| Geburtsdatum | 30. September 1982 |
| Geburtsort | Hutthurm |
| Familienstand | Ledig |
| **Schulausbildung** | |
| 1989-2002 | Grundschule Thurmansbang und Landgraf-Leuchtenberg-Gymnasium Grafenau, Abschluss: Abitur, Note 1,0 |
| **Hochschulausbildung** | |
| 2002-2009 | Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg |
| 10.09.2004 | Physikum, Gesamtnote „sehr gut“ (1,00) |
| 26.05.2009 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote „sehr gut“ (1,00) |
| **Forschungsaufenthalt** | |
| 03.2007 – 09.2007 | Research Scholar bei Prof. Christopher K. Glass MD, PhD, Department of Cellular und Molecular Medicine, University of California San Diego |
| **Berufliche Tätigkeit** | |
| seit 09.2009 | Tätigkeit als Assistenzarzt und Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universität Regensburg |
| **Stipendien und Preise** | |
| 2002 - 2009 | Stipendium der Bayerischen Begabtenförderung, Freistaat Bayern |
| 11.02-04.05 | Stipendium von e-fellows.net |
| 07.2009 | Buchpreis der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg |
| 11.2009 | Förderpreis 2009 der Ehemaligen Studierenden der Universität Regensburg e.V. als Anerkennung für ausgezeichnete Studienleistungen |

## 10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Daniel Heudobler, geboren am 30.09.1982 in Hutthurm, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg im April 2011

(Daniel Heudobler)

## 11. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ralph Witzgall für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die Überlassung von Thema und Arbeitsmaterialien.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Anne Rascle für die exzellente und aufopfernde Betreuung dieser Arbeit. Ihr immenses, fachliches Wissen und ihre emotionale Unterstützung halfen mir so manchen Rückschlag zu überstehen. Es war beruhigend zu wissen, mit wissenschaftlichen Fragen und Anliegen stets zu ihr kommen zu dürfen (, was auch nächtliche Diskussionen von Ergebnissen beinhaltete). Ihr wissenschaftlicher Enthusiasmus ist ansteckend und motivierte auch in schweren Zeiten weiterzumachen!

Dr. Achim Griesenbeck sage ich Dank für die zahlreichen, motivierenden Diskussionen und Ratschläge.

Bei Prof. Dr. Rainer Deutzmann möchte ich mich für die Durchführung der Massenspektrometrie und des Edman-Abbaus bedanken.

Prof. Dr. Matthias Mack gilt mein Dank für die freundliche Überlassung der Zelllinie X63-Ag8.653.

Bei Dr. Helen Hoffmeister und Dr. Tanja Neumann möchte ich mich für ihre Freundschaft und die unzähligen Ratschläge und praktischen Tipps bedanken.

Dr. Anne-Sarah Raschta, Astrid Neumann, Ruth Kapzan, Dr. Kerstin Renner, Jürgen Kastner und Dr. Tillmann Burghardt danke ich für viele, kleine Gefallen, den Spaß, den wir gemeinsam bei der Arbeit hatten, und die vielen, positiven Erinnerungen an die gemeinsame Zeit im Ost-Labor.

Lissy Besl und Larissa Osten schulde ich Dank für die praktische Unterstützung und die Geduld, die mir entgegen gebracht wurde.

Bei Uwe de Vries möchte ich mich für die Hilfe beim Umgang mit dem Fluoreszenz-Mikroskop sowie in EDV-Fragen bedanken.

Den Fotolabor-Mitarbeitern Antje Zenker und Ton Maurer gilt mein Dank für unzählige, gescannte Gele und Tipps bei der Bildbearbeitung.

Allen anderen Kollegen des Lehrstuhls für Molekulare und Zelluläre Anatomie spreche ich meinen Dank für gute Zusammenarbeit, Rat und Tat aus.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern und meiner Schwester, bedanken. Ohne Eure Liebe und den unerschütterlichen Glauben an mich wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen!