

**Selektion und Charakterisierung
von P2X4-spezifischen monoklonalen Antikörpern
und Nanobodies**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
Universität Hamburg

Vorgelegt von
Philine Bergmann

Hamburg

2016

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte
Universitätsklinikum (UKE), Hamburg-Eppendorf
Martinistr. 52,
20246 Hamburg

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Ulrich Hahn
Universität Hamburg, Fachbereich Chemie
Martin-Luther-King-Platz 6
20146 Hamburg

Datum der Disputation:

22. Juli 2016

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Hamburg, 13.05.2016

Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte für das Heranführen an das faszinierende Thema meiner Doktorarbeit und die durchgehend großartige Betreuung während derselben danken. Vielen Dank für deine Hilfe, Fritz, auch bei der Bewältigung von Affen und Panikmonstern.

Bei Prof. Dr. Ulrich Hahn, möchte ich mich für die Kobetreuung während der Arbeit und für die Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Promotionsschrift bedanken.

Ein riesengroßer Dank geht an meine Kollegen am Institut für Immunologie. Allen voran an die wundertolle Gudrun Dubberke, die immer ein offenes Ohr, eine gute Idee und/oder eine starke Schulter (!) für mich hat und mit der es Riesenspaß gemacht hat vor-sich-hin-murmeln ein Labor zu teilen.

Bei Marion Nissen möchte ich u.a. Danke sagen für das liebevolle Ma-Phi-Wortspielchen und den aufheiternden schwarzen Humor.

Großen Dank auch an Fabienne Seyfried, Alien Kruse und Joanna Schmid für ihre Unterstützung bei den Immunisierungen der Ratten, der Aufreinigung von Nanobodies und der Auswahl von Birkenstocks. Ich bin dankbar für die Hilfe von Valea Schumacher in Bezug auf die Einarbeitung am FACS Canto aber auch für Mitfühlen in Höhen und Tiefen während der Doktorarbeit.

Mirjam Löw und Stephan Menzel bin ich sehr dankbar für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für den regen fachlichen und unfachlichen Austausch.

Der Werner-Otto-Stiftung möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken, die es mir auch ermöglichte mich im In- und Ausland weiterzubilden und meine Ergebnisse zu präsentieren.

Meine besondere Dankbarkeit möchte ich meiner Familie aussprechen, ohne deren Förderung und Rückhalt ich nicht hier wäre, im Speziellen meinem Mann Raphael, der in den letzten Wochen, solidarisch auf eine Menge Schlaf verzichtet hat und dessen Liebe mir regelmäßig Energie gibt, sowie meiner besten Freundin Kristina, die eine seelische Wohltat ist.

Anfertigungszeitraum

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2012 bis Mai 2016 am Institut für Immunologie, Zentrum für Diagnostik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Anleitung von Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte angefertigt.

Ermöglicht wurde diese Arbeit durch die finanzielle Unterstützung der Werner-Otto-Stiftung, Hamburg.

Liste der Publikationen

Einige Teile der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden bereits publiziert oder sind zur Publikation vorbereitet:

Danquah W, Meyer-Schwesinger C, Rissiek B, Pinto C, Serracant-Prat A, Amadi M, Iacenda D, Knop JH, Hammel A, Philine Bergmann, Schwarz N, Assunção J, Rothier W, Haag F, Tolosa E, Bannas P, Boué-Grabot E, Magnus T, Laeremans T, Stortelers C, Koch-Nolte F, 2016, **Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation.** Science Translational Medicine, *eingereicht*

Bergmann P, Dubberke G, Rassendren F, Boue E, Haag F, Koch-Nolte F. **Selection and characterization of P2X4-specific monoclonal antibodies and nanobodies.**, *in Vorbereitung*

Kongressbeiträge

Bergmann P, Dubberke G, Schmid J, Rissiek B, Kruse A, Boué-Grabot E, Koch-Nolte F. **Generation of P2X4-specific nanobodies and monoclonal antibodies.** Poster C2, 6th Joint German-Italian Purine Club Meeting, International Conference on Purinergic Signaling, Hamburg, Juli 2015.

Zusammenfassung

P2X4 ist ein ATP-gesteuerter Ionenkanal, der u.a. von Zellen des Immunsystems, Gefäßendothel- und Lungenepithelzellen in Lysosomen und anderen intrazellulären Vesikeln exprimiert wird. Nach Fusion dieser Vesikel mit der Zellmembran kann P2X4 auch an die Zelloberfläche gelangen. Die Aktivierung von P2X4 führt zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und einem Ausstrom von K^{+} -Ionen in das bzw. aus dem Cytosol. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert unterschiedliche nachgeschaltete Prozesse. Ziel dieser Arbeit war es, P2X4-spezifische Antikörper und Nanobodies als experimentelle Werkzeuge für die Untersuchung von P2X4 in humanen und murinen Zellen zu entwickeln und zu charakterisieren. Nanobodies (Nbs oder VHHs) sind Einzeldomänen-Antikörper, die sich von Schwereketten-Antikörpern der Lamas ableiten. Ihre hohe Stabilität, Löslichkeit und leichte Reformatierbarkeit ermöglichen vielfältige Anwendungen. In dieser Arbeit wurden Nanobodies und monoklonale Antikörper (mAk) aus P2X4-immunisierten Lamas (Nbs) oder Ratten (mAk) gewonnen und bezüglich ihrer Fähigkeit P2X4 spezifisch zu binden oder funktionell zu regulieren untersucht. Dabei konnten vier Antikörper und vier Nanobodies identifiziert werden, die humanes P2X4 spezifisch erkennen sowie drei Antikörper und drei Nanobodies, die Maus-P2X4 spezifisch erkennen. Drei Nanobodies zeigten schwache oder mäßige Kreuzreaktivitäten mit P2X4-Orthologen aus der Ratte. Lediglich ein Nanobody zeigte eine schwache Reaktion mit dem zu P2X4 paralogen Purinrezeptor P2X7. Analysen der relativen Dissoziationsgeschwindigkeit deuten auf höhere Bindungsaffinitäten der monoklonalen Antikörper als der bivalenten Nb-Fc-Fusionsproteine, deren Affinitäten wiederum höher erscheinen als die der monovalenten Nbs. Kreuzblockade-Analysen zeigten, dass die meisten Antikörper und Nanobodies an überlappende Epitope binden. Patch-Clamp-Analysen der ATP-induzierten Spannungsänderungen in P2X4-transfizierten *Xenopus*-Oozyten zeigten keinen signifikanten Einfluss der Nanobodies auf die Ionenkanalaktivität von P2X4. Zwei Nanobodies und ein monoklonaler Antikörper konnten erfolgreich zur Detektion und zur Translokation von endogenem P2X4 auf die Zelloberfläche von aktivierten, primären murinen Peritoneal-Mastzellen eingesetzt werden. Die in dieser Arbeit generierten Nanobodies und monoklonalen Antikörper sind hilfreiche Werkzeuge, um die Rolle von P2X4 in Gesundheit und Krankheit zukünftig genauer zu studieren.

Abstract

P2X4 is an ATP-gated ion channel which cells of the immune system, vascular endothelial- and pulmonary epithelial cells, among others, express in their lysosomes and other intracellular vesicles. After fusion of these vesicles with the cell membrane, P2X4 can also be situated on the cell surface. Activation of P2X4 leads to influx of Ca^{2+} -ions into the cytosol and efflux of K^{+} -ions. The increase in intracellular Ca^{2+} -concentration activates different downstream processes. The aim of this thesis was to generate and characterize P2X4-specific antibodies and nanobodies as experimental tools for the investigation of P2X4 in human and murine cells. Nanobodies (Nbs or VHHs) are single-domain-antibodies, which are derived from llama heavy chain only antibodies. Their high stability, solubility and ease of reformatting render them suitable for various applications.

In the present work, nanobodies and monoclonal antibodies (mAk) from P2X4-immunized llamas (Nbs) or rats (mAk) were obtained and analyzed with regard to their ability to specifically bind or functionally regulate P2X4. Thereby four antibodies and four nanobodies were identified that specifically recognize human P2X4. Also, three antibodies and three nanobodies with specificity for mouse P2X4 were found. Three nanobodies showed low or moderate cross-reactivities with rat orthologs of P2X4. Only one nanobody showed slight reaction with the paralogous purine receptor P2X7. Analyses of the relative dissociation rates indicated higher binding affinities of the monoclonal antibodies compared to the bivalent Nb-Fc-fusion-proteins which in turn appear to be higher than affinities of the monovalent Nbs. Cross-blockade analyses showed that most of the antibodies and nanobodies bind to overlapping epitopes. No significant influence of the nanobodies on P2X4 ion-channel-activity was observed by Patch-Clamp analyses of the ATP-induced voltage changes in P2X4-transfected *Xenopus* oocytes. Two nanobodies and one monoclonal antibody were successfully applied for detection and for translocation of endogenous P2X4 to the cell surface of activated, primary murine peritoneal mast cells.

The nanobodies and monoclonal antibodies generated in the course of this work represent useful tools for future investigations of the role P2X4 plays in health and disease.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Purinrezeptoren | 1 |
| 1.1.1 P2X4 | 2 |
| 1.1.2 P2X7 | 6 |
| 1.2 Antikörper | 6 |
| 1.2.1 Konventionelle Antikörper | 6 |
| 1.2.2 Schwereketten-Antikörper und Nanobodies | 9 |
| 1.2.3 Antikörper gegen P2X4 und P2X7 | 11 |
| 1.3 Ziel der Arbeit | 12 |
| 2 Material | 13 |
| 2.1 Laborgeräte | 13 |
| 2.2 Verbrauchsmittel | 13 |
| 2.3 Reagenzsysteme (Kits) | 14 |
| 2.4 Chemikalien | 14 |
| 2.5 Puffer | 16 |
| 2.6 Medien | 17 |
| 2.7 Enzyme | 18 |
| 2.8 DNA- und Protein-Standards | 18 |
| 2.9 Antikörper | 19 |
| 2.10 Oligonukleotide | 19 |
| 2.11 Mauslinien | 19 |
| 2.12 Zellen | 19 |
| 2.13 Helferphagen | 20 |
| 2.14 Plasmide | 20 |
| 2.15 Software | 20 |
| 3 Methoden | 21 |
| 3.1 Molekularbiologische Methoden | 21 |
| 3.1.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren | 21 |
| 3.1.2 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) | 21 |
| 3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 22 |
| 3.1.4 DNA-Sequenzierung | 23 |
| 3.1.5 DNA-Restriktionsverdau | 23 |
| 3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten | 24 |
| 3.1.7 Transformation chemisch kompetenter Bakterien | 24 |
| 3.1.8 Transformation elektrisch kompetenter Bakterien | 25 |
| 3.1.9 DNA-Präparation aus Bakterien | 25 |
| 3.1.10 Kultivierung von prokaryotischen Zellen | 25 |
| 3.1.11 Kryokonservierung von prokaryotischen Zellen | 26 |
| 3.1.12 Agarosegelelektrophorese von RNA- und DNA-Fragmenten | 26 |
| 3.1.13 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel | 26 |
| 3.2 Zellbiologische Methoden | 27 |
| 3.2.1 Kultivierung und Ernte von adhärennten Zellen | 27 |
| 3.2.2 Zellzahlbestimmung | 27 |
| 3.2.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen | 27 |
| 3.2.4 Transiente Transfektion von CHO- und HEK-Zellen | 28 |
| 3.2.5 Transiente Transfektion und Ernte der HEK-6E-Zellüberstände | 28 |
| 3.2.6 Transiente Transfektion von CHO-Zellen in Suspension | 29 |
| 3.2.7 Stabile Kotransfektion von CHO-Zellen mit mP2X4 und GFP | 29 |
| 3.2.8 Ratten-Immunsierungen und Selektion monoklonaler Antikörper | 30 |
| 3.3 Phagen-Display-Technologie | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.1 Lama-Immunisierungen | 31 |
| 3.3.2 Konstruktion von VHH-Bibliotheken | 31 |
| 3.3.2 Produktion einer Phagenbibliothek | 33 |
| 3.3.3 Selektion spezifischer Phagen | 34 |
| 3.3.4 Reinfektion und Amplifikation selektierter Phagen | 35 |
| 3.4 <i>Proteinbiochemische Methoden</i> | 35 |
| 3.4.1 Anfertigung von Periplasmalysaten prokaryotischer Zellen | 35 |
| 3.4.2 Produktion von Nanobody-Fc-Fusionsproteinen | 36 |
| 3.4.3 Proteinaufreinigung via Affinitätschromatographie (ProteinG) | 36 |
| 3.4.4 Proteinaufreinigung via Affinitätschromatographie (Ni-NTA) | 37 |
| 3.4.5 Entsalzung von Protein-Elutions-Fractionen | 37 |
| 3.4.6 Quantifizierung von Proteinen | 38 |
| 3.4.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 38 |
| 3.4.8 Coomassie-Färbung | 39 |
| 3.4.9 Fluorochromkonjugation von Antikörpern und Nanobodies | 39 |
| 3.5 <i>Immunologische Methoden</i> | 39 |
| 3.5.1 Durchflusszytometrie | 40 |
| 3.5.2 Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) | 40 |
| 3.5.3 Bindungsaffinitätsassay | 41 |
| 3.5.4 Blockadeassay | 42 |
| 3.5.5 Patch-Clamp-Analysen ATP-induzierter Spannungsänderungen | 42 |
| 3.5.6 Degranulationsassay an Maus-Peritonealzellen | 43 |
| 4 Ergebnisse | 45 |
| 4.1 <i>Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den Ionenkanal P2X4</i> | 46 |
| 4.1.1 Immunisierung der Ratten RG23 und RG96 | 46 |
| 4.1.2 Testung der Hybridomaklone auf ihre spezifische Reaktivität gegen P2X4 | 47 |
| 4.2 <i>Etablierung eines stabilen Expressionssystems für die Selektion von P2X4-spezifischen VHHs und Antikörpern</i> | 48 |
| 4.3 <i>Herstellung von P2X4 spezifischen VHHs</i> | 51 |
| 4.3.1 Immunisierung der Lamas 539 und 540 | 52 |
| 4.3.2 Erstellung einer primären Phagenbibliothek der Lamas 539 und 540 | 53 |
| 4.3.3 Selektion von P2X4-bindenden Nanobodies | 55 |
| 4.3.4 Ermittlung der spezifischen Reaktivität der selektierten Nanobodies | 58 |
| 4.3.5 Reformatierung der selektierten Nanobodies | 61 |
| 4.4 <i>Charakterisierung der P2X4-bindenden Nanobodies und mono-klonalen Antikörper</i> | 64 |
| 4.4.1 Analyse der Bindungsspezifität der rbFc-Fusionsproteine der selektierten VHHs | 64 |
| 4.4.2 Analyse der Bindungsaffinitäten | 67 |
| 4.4.3 Vergleichende Analyse der Bindungsepitope | 69 |
| 4.4.4 Untersuchung des Einflusses der Nanobodies auf die Funktion von P2X4 | 73 |
| 4.4.5 Untersuchung des Einflusses von Nanobodies auf die Funktion von P2X7 | 75 |
| 4.4.6 Verwendung der Nanobodies und Antikörper zur Detektion von endogenem P2X4 auf peritonealen Immunzellen der Maus | 76 |
| 5 Diskussion | 78 |
| 5.1 <i>Ausblick auf weiterführende Verwendungen der in dieser Arbeit hergestellten Nanobodies und monoklonalen Antikörper</i> | 83 |
| 6 Literaturverzeichnis | 87 |
| 7 Anhang | I |
| 7.1 <i>Abkürzungsverzeichnis</i> | I |
| 7.2 <i>GHS-Gefahrenhinweise</i> | IV |
| 7.2.A GHS-Piktogramme | IV |
| 7.2.B GHS-Gefahrenhinweise (H-Sätze) | V |
| 7.2.C GHS-Sicherheitshinweise (P-Sätze) | VI |
| 7.2.D Gefahrstoffe nach GHS | VII |

| | |
|---|------|
| 7.2.E Kategorien der KMR-Substanzen | VIII |
| 7.2.F KMR-Substanzen | VIII |
| 7.3 Plasmidkarten | IX |
| 7.4 Aminosäurealignment der primären Phagenbibliotheken der Lamas 539 und 540 | XI |

1 Einleitung

1.1 Purinrezeptoren

Purinrezeptoren sind Zelloberflächenrezeptoren, die durch extrazelluläre Nukleotide gesteuert werden. Durch ihre strukturellen und pharmakologischen Eigenschaften lassen sie sich in drei Familien unterteilen: die P1-, die P2Y- und die P2X-Rezeptoren. Bis heute wurden 19 verschiedene Subtypen isoliert und charakterisiert, von denen vier zu den P1-Rezeptoren zählen. P1-Rezeptoren sind G-Proteingekoppelte Rezeptoren, die durch Adenosin aktiviert werden.

Acht weitere Subtypen gehören zu den P2Y-Rezeptoren, ebenfalls G-Proteingekoppelte Rezeptoren, die zu ihrer Aktivierung unterschiedliche Nukleotide wie z.B. ATP, ADP oder UDP nutzen. Die verbleibenden sieben Subtypen werden den P2X-Rezeptoren zugeordnet: Adenosintriphosphat- (ATP-) gesteuerten Ionenkanälen, die als Homo- oder Heterotrimere auftreten. Alle Subtypen der P2X-Rezeptoren benötigen zur Aktivierung ATP, unterscheiden sich aber in ihrer Affinität für das Nukleotid. Je nach Zelltyp finden sich unterschiedliche Zusammensetzungen von Purinrezeptoren auf ihrer Oberfläche (Junger, 2011).

Das Nukleotid ATP, das intrazellulär vor allem bekannt für seine Funktion als Energielieferant der Zellen ist, kann außerhalb der Zelle als DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) bzw. Signalmolekül wirken, indem es die P2-Rezeptoren aktiviert (Khakh & Burnstock, 2009). Die Bindung von ATP an P2X-Rezeptoren öffnet diese Ionenkanäle und führt dadurch z.B. zu einem Ca^{2+} -Influx und K^{+} -Eflux (siehe **Abb. 1.01**). Die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Niveaus aktiviert Signalwege der Ca^{2+} -Signalkaskade (z.B. p38 MAPK oder PLA2) (Ulmann *et al*, 2010). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vor allem mit den beiden Ionenkanälen P2X4 und P2X7.

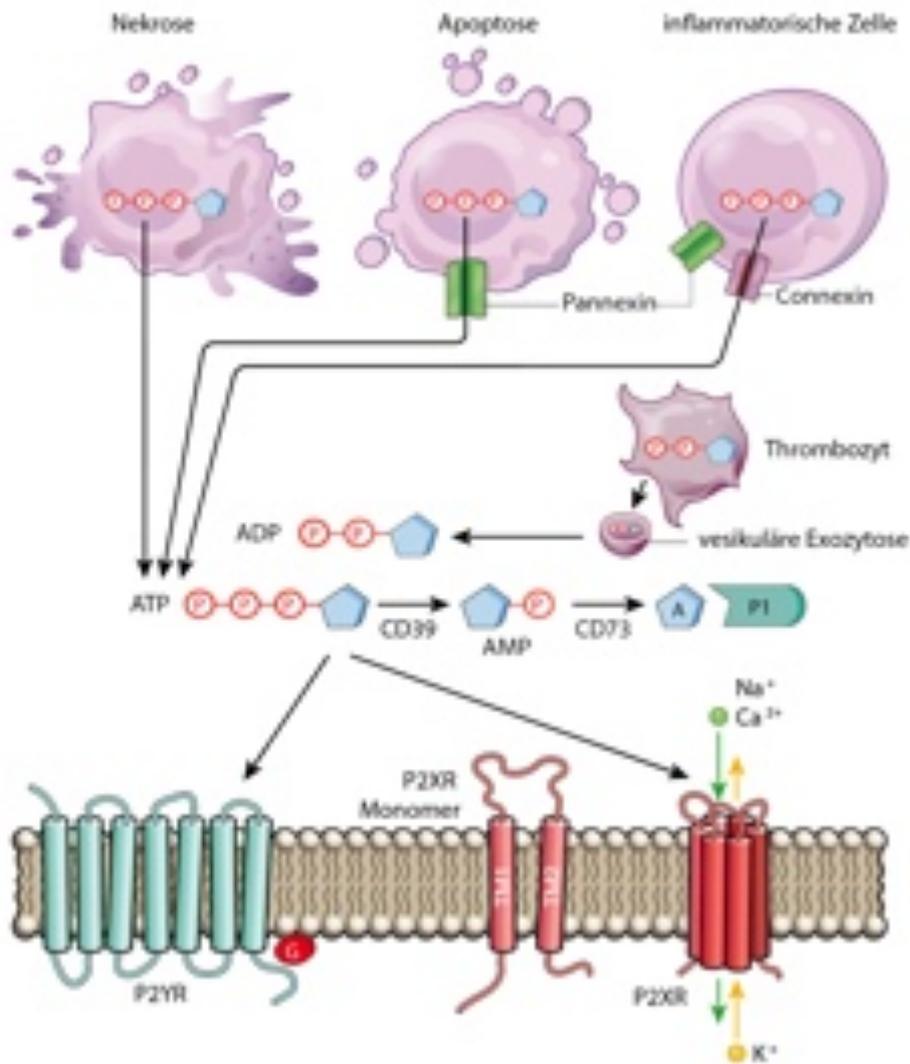


Abb. 1.01 Purinerge Signaltransduktion extrazellulärer Nukleotide. Durch Zellschädigung oder apoptotische und inflammatorische Prozesse gelangt ATP in den extrazellulären Raum und kann P2Y- und P2X-Rezeptoren auf der Plasmamembran benachbarter Zellen aktivieren. Die Aktivierung von P2X-Rezeptoren sorgt für einen Ca^{2+} -Influx und einen K^+ -Eflux durch die Ionenkanäle. Abbildung nach (Idzko *et al*, 2014)

1.1.1 P2X4

P2X4 ist das vierte Mitglied der P2X-Rezeptoren. Jede Untereinheit des homotrimeren Ionenkanals besteht aus 388 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 43 kDa. Die Untereinheiten bilden zusammen eine Membranpore, die bei der Bindung von drei Moleküleinheiten ATP permeabel für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} wird (Bean, 1990). P2X4 wird durch niedrige mikromolare Mengen von ATP aktiviert. Der Ionenkanal wird sowohl im zentralen Nervensystem als auch in der Peripherie exprimiert. Man findet P2X4 unter anderem auf Immunzellen, den Epithelien und dem Endothel. Es wurde beschrieben, dass eine Aktivierung von P2X4 vasodilatierend auf

das vaskuläre Endothel wirkt (Qureshi *et al*, 2007; Yamamoto *et al*, 2005). Tatsächlich zeigen P2X4-ko-Mäuse einen erhöhten Blutdruck (Yamamoto *et al*, 2005). Exprimiert wird P2X4 vor allem im Gehirn (Rubio & Soto, 2001), auf Makrophagen und Mikrogliazellen (Bowler *et al*, 2003). Nach Nervenschädigung kommt es zur Hochregulierung des Ionenkanals in spinalen Mikroglia, wobei P2X4 eine zentrale Rolle bei der Entstehung von neuropathischem Schmerz einnimmt (Tsuda *et al*, 2003; Ulmann *et al*, 2008). P2X4 lässt sich außerdem auf Mastzellen nachweisen (Wareham *et al*, 2009). Der Kanal ist in Mikroglia, Makrophagen und Endothelzellen vor allem in den Lysosomen lokalisiert. Die im endoplasmatischen Retikulum an den Kanal addierten N-Glykane schützen P2X4 vor der Degradation im proteolytischen Milieu des Lysosoms (Torres *et al*, 1998; Lenertz *et al*, 2010). P2X4 wird - konstitutiv und durch Antigen induziert - sehr schnell in frühe Endosomen und Lysosomen internalisiert und von dort anschließend wieder in die Plasmamembran rekrutiert (Boumechache *et al*, 2009; Ulmann *et al*, 2008; Qureshi *et al*, 2007). Die Internalisation ist abhängig von Clathrin und Dynamin und benötigt ein nicht-kanonisches endozytotisches Motiv (YXXGL, AS 378-382). YXXGL interagiert mit dem Adapter Protein 2 (AP2), einem für die Clathrin-medierte Endozytose essentiellen Protein. Mutationen im YXXGL-Motiv oder in der Tyr-Bindungstasche von AP2 führen zu einer Akkumulation der intakten Ionenkanäle in der Zellmembran (Royle *et al*, 2002). In dieser Arbeit wird in diesem Motiv mutiertes P2X4 (Y378F) verwendet, um eine erhöhte Zelloberflächenexpression des Ionenkanals zu erhalten. P2X4 gehört zur Familie der ATP-gesteuerten Ionenkanäle. Bean *et al*. postulierte schon 1990, dass mindestens drei Moleküle ATP für die Öffnung eines P2X-Kanals benötigt würden. Spätere Ergebnisse unterstützen diese Ergebnisse. Der trimere Aufbau von Mitgliedern der P2X-Familie konnte vor elf Jahren durch Rasterkraftmikroskopie (Barrera *et al*, 2005), Elektronenmikroskopie und Einzelpartikel-Analysen bestätigt werden (Mio *et al*, 2005; Young *et al*, 2008). Die Kristallisation des Zebrafisch-P2X4 im Jahre 2009 durch Kawate *et al*. bestätigte und erweiterte die vorherigen Ergebnisse (Kawate *et al*, 2009). Der US-amerikanischen Arbeitsgruppe um Eric Gouaux gelang die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des P2X4-Ionenkanals vom Zebrafisch in geschlossener Konformation (Kawate *et al*, 2009) und drei Jahre später auch in offener Konformation mit gebundenem ATP (Hattori & Gouaux, 2012). P2X4 besteht aus drei

Untereinheiten, die jeweils eine Delphin-förmige Struktur aufweisen (**Abb. 1.02**). N- und C-Termini sind intrazellulär lokalisiert, die zwei Transmembrandomänen (TM1 und TM2) jeder Untereinheit stellen die Schwanzflosse des Delphins dar und werden durch eine ca. 280 Aminosäuren lange extrazelluläre Schleife verbunden, die den Torso des Delphins repräsentiert (Stojilkovic *et al*, 2010).

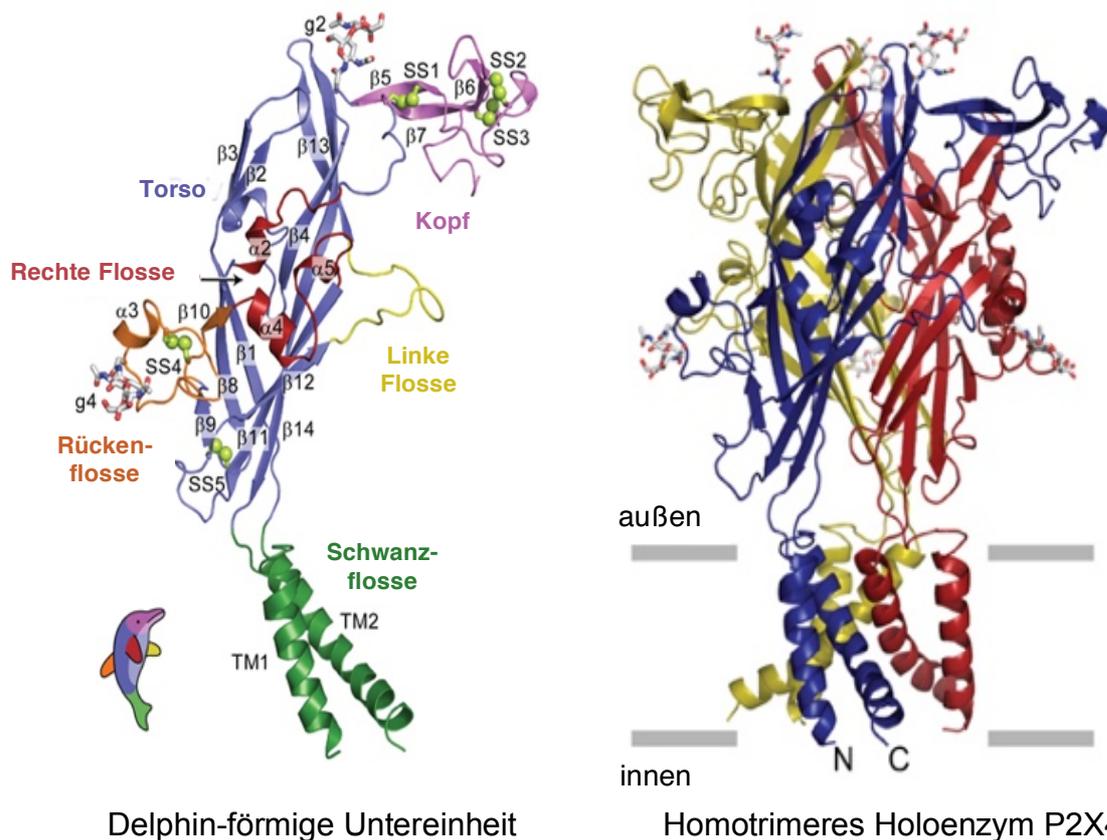


Abb. 1.02 Zebrafisch-P2X4. Links ist eine P2X4-Untereinheit gezeigt, die in ihrer Struktur einem Delphin ähnelt. Rechts ist der homotrimer P2X4-Ionenkanal mit allen drei Untereinheiten dargestellt, jede Untereinheit ist in einer anderen Farbe dargestellt. Die ATP-Bindungsstellen liegen jeweils an der Grenzfläche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten. (Kawate *et al*, 2009)

Die drei ATP-Bindungsstellen des Kanals liegen jeweils an den Grenzflächen von zwei benachbarten Untereinheiten (Wilkinson *et al*, 2006). Die Bindung von ATP führt zur Konformationsveränderung sowohl in als auch zwischen den einzelnen Untereinheiten des P2X4-Rezeptors. Durch konservierte positiv geladene und aromatische Aminosäurereste an der Fläche zwischen Transmembran- und extrazellulärer Domäne überträgt sich diese Bewegung und sorgt für die Öffnung der Pore des Ionenkanals (**Abb. 1.03**) (Jiang *et al*, 2000; Kawate *et al*, 2009; Hattori & Gouaux, 2012).

Alle Säuger-P2X-Untereinheiten weisen zehn konservierte Cysteinreste in der extrazellulären Schleife auf, von denen man annahm, dass sie untereinander Disulfidbrücken bilden und dadurch die dreidimensionale Struktur des Rezeptors stabilisieren (Clyne *et al*, 2002; Ennion & Evans, 2002). Durch die Kristallisation des Zebrafisch-P2X4s konnte diese Vermutung verifiziert werden. Mutagenesestudien an den Transmembrandomänen zeigten, dass sich diese in einer Art α -Helix strukturieren, wobei die TM2 primär für die Ionenselektivität und Tunnelbildung verantwortlich ist (Samways & Egan, 2007).

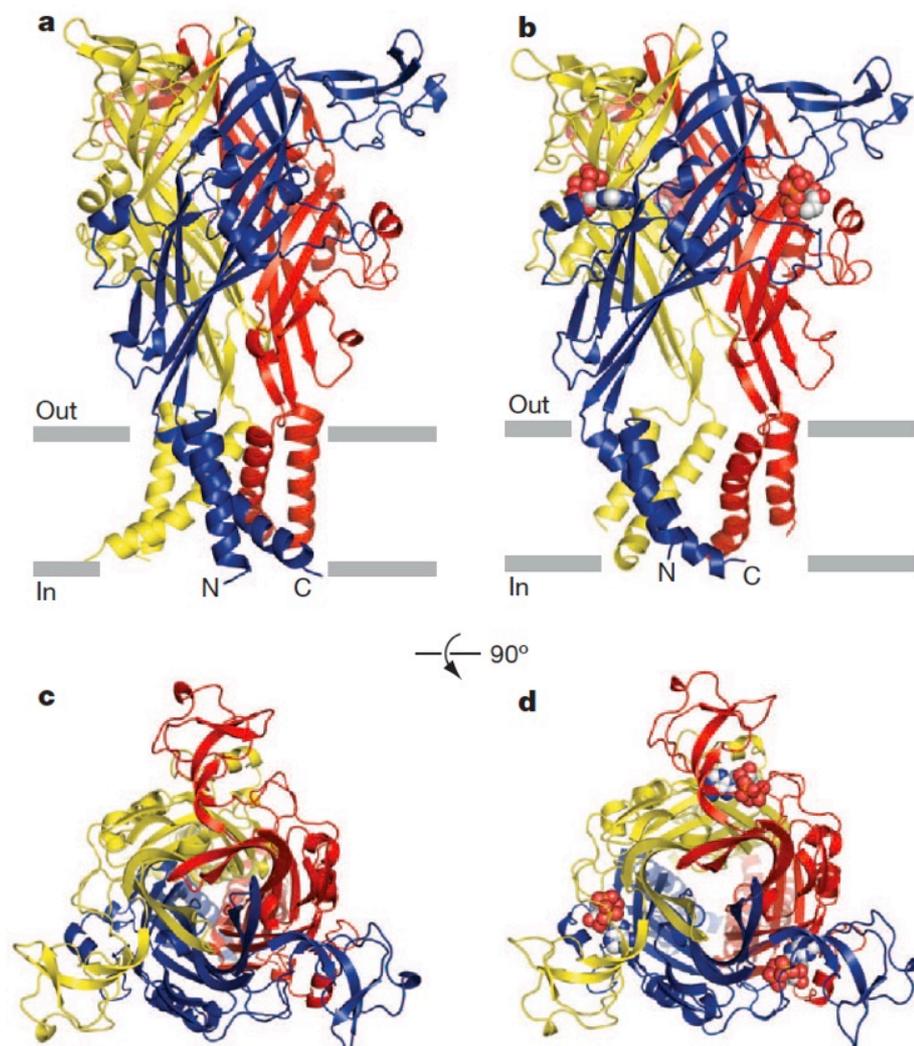


Abb. 1.03 Die Architektur von Zebrafisch P2X4 mit und ohne ATP (Hattori & Gouaux, 2012). **a, c**, Zebrafisch P2X4 in geschlossener Konformation als Apoenzym ohne ATP und **b, d**, in offener Konformation, mit gebundenem ATP. **a, b**, Ansicht parallel zur Zellmembran. **c, d**, Aufsicht auf P2X4 von der extrazellulären Seite. Jede Untereinheit ist in einer anderen Farbe dargestellt.

1.1.2 P2X7

Ähnlich wie P2X4 wird das siebte Mitglied der P2X-Familie, P2X7, vorwiegend von Epithel-, Endothel- und Immunzellen exprimiert (Boumechache *et al*, 2009; Surprenant & North, 2009). Im Gegensatz zu den anderen P2X-Purinrezeptoren, für die auch heterotrimere Formen beschrieben werden, bildet P2X7 vorwiegend Homotrimere (Torres *et al*, 1999; Nicke, 2008; Boumechache *et al*, 2009). Unter den P2X-Rezeptoren haben P2X4 und P2X7 mit ca. 50 % Aminosäuresequenzhomologie (human) die größte Ähnlichkeit. Die für die beiden Rezeptoren kodierenden Gene liegen unmittelbar benachbart auf Chromosom 12, was vermuten lässt, dass sie aus einer Genduplikation hervorgegangen sind. Das Molekulargewicht jeder der aus 595 Aminosäuren aufgebauten P2X7-Untereinheiten beträgt 72 kDa. Der Gewichtsunterschied zu P2X4 ergibt sich aus der 239 Aminosäuren langen C-terminalen cytosolischen Domäne (bei P2X4 29 Aminosäuren).

Wie u.a. in Mikroglia, Makrophagen und Mastzellen werden P2X4 und P2X7 häufig koexprimiert. Dabei ist P2X7 vor allem auf der Zelloberfläche, P2X4 vorwiegend in den Lysosomen lokalisiert (Boumechache *et al*, 2009). Im Gegensatz zu P2X4 enthält der C-Terminus von P2X7 kein Lysosomen-Lokalisationssignal.

Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich auch in ihrer Sensitivität für ATP. P2X4 wird durch niedrige mikromolare Mengen von ATP aktiviert, während P2X7 Konzentrationen von 100 μ M und höher benötigt, um aktiviert zu werden. Ein Zusammenspiel der häufig koexprimierten, aber in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisierten Rezeptoren ist bisher noch nicht näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von P2X7 durch extrazelluläres ATP die Degranulation von Mastzellen bewirkt (Wareham & Seward, 2016). Dabei gelangt auch P2X4 an die Plasmamembran. Es ist noch unklar, ob die Translokation von P2X4 an die Zelloberfläche eine direkte Folge der Aktivierung von P2X7 ist.

1.2 Antikörper

1.2.1 Konventionelle Antikörper

Antikörper gehören zur Proteinklasse der Immunglobuline und kommen in großen Mengen in löslicher Form im Blutplasma und in Körpersekreten vor. B-Lymphozyten

exprimieren die Antikörper zunächst als in der Plasmamembran verankerte Transmembranrezeptoren. Während einer Immunreaktion können sich B-Zellen zu Plasmazellen ausdifferenzieren und produzieren für mehrere Wochen lösliche Antikörper in großem Maße.

Die ca. 150 kDa schweren Y-förmigen Proteine erfüllen zwei hauptsächliche Funktionen: Sie binden unterschiedlichste Antigene mit großer Spezifität und Affinität und lösen zusätzlich immunologische Effektormechanismen gegen das erkannte Antigen aus.

In den meisten Säugetieren werden fünf verschiedene Antikörper-Isotypen gebildet: IgG, IgA, IgE, IgM und IgD. Sie unterscheiden sich vor allem in dem Effektorfunktionen vermittelnden F_c -Strukturbereich. Die gemeinsamen Merkmale der Antikörper sollen im Folgendem am Beispiel des IgG beschrieben werden.

IgG-Antikörper sind aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten zu einem achsensymmetrischen Heterotetramer zusammengesetzt. Zwei molekular identische schwere Ig-Ketten sind dabei mit zwei ebenfalls identischen leichten Ketten verknüpft. Beide schwere Ketten sind über Disulfidbrücken an der Gelenkregion (*Hinge*-Region) miteinander verbunden und jede schwere Kette ist zusätzlich durch eine Disulfidbrücke mit einer der leichten Ketten verbunden (siehe **Abb. 1.04**). Die relative Molekülmasse eines IgG-Antikörpers beträgt etwa 150 kDa, wobei jede schwere Kette eine ungefähre Masse von 50 kDa und jede leichte eine von 25 kDa aufweist. Es gibt zwei verschiedene Typen von leichten Ketten, die in Antikörpern vorkommen, die Lambda- (λ) und die Kappa- (κ) Kette. Es werden nie beide Typen miteinander kombiniert, so dass ein Immunglobulin immer nur aus zwei κ - oder zwei λ -Ketten besteht. Funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Kettentypen sind nicht bekannt.

Leichte Ketten bestehen aus einer konstanten und einer variablen Domäne, C_L und V_L , während schwere Ketten eine variable, V_H , und drei (IgG, IgA, IgD) bzw. vier (IgM, IgE) konstante Domänen aufweisen, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4} . Jede dieser Domänen besteht aus 110 Aminosäuren und sie verbinden sich zu größeren globulären Domänen, so dass das gefaltete Antikörpermolekül aus gleich großen globulären Teilen besteht, die über eine bewegliche Gelenkregion miteinander verknüpft sind.

Aus den variablen Domänen der schweren und der leichten Ketten wird die Antigenbindungsstelle der Immunglobuline gebildet. Im Vergleich von verschiedenen Antikörpern miteinander lassen sich besonders starke Strukturunterschiede in drei kurzen Abschnitten der Aminosäuresequenz dieser variablen Domänen ausmachen. Diese hypervariablen Regionen werden auch als *complementary determining regions* (CDRs) bezeichnet, da Antigen und Antikörper an der Kontaktstelle komplementär zueinander sind. Die dritte CDR (CDR3) besitzt den den größten Anteil an der Antigenerkennung. Während der B-Zell-Reifung im Knochenmark wird die kodierende Region der CDR3 durch DNA-Rekombination und -Synthese in jeder B-Zelle neu festgelegt. Beide Antigenbindungsstellen eines Antikörpers weisen dieselbe Struktur und damit auch dieselbe Spezifität bei der Bindung von Antigenen auf. Ein IgG-Molekül ist also bivalent und kann damit gleichzeitig an zwei identische Strukturen binden (Murphy *et al*, 2009; Martin & Resch, 2009; Schütt & Broeker, 2009).

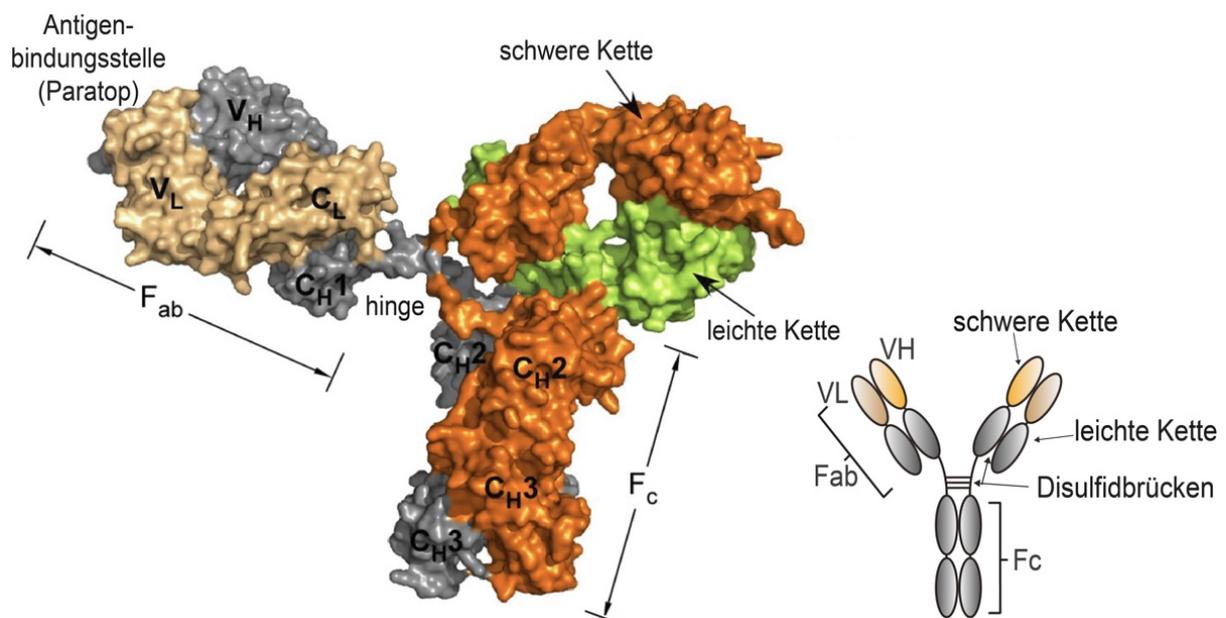


Abb. 1.04 3D-Struktur und schematische Darstellung eines humanen IgG. Immunglobuline des G-Isotyps ähneln einem Ypsilon und bestehen aus zwei schweren Ketten (orange und grau) und zwei leichten Ketten (beige und grün). Der Rumpf des Ypsilons wird durch das F_c-Fragment gebildet, während die zwei, durch Disulfidbrücken verbundenen, Arme die F_{ab}-Fragmente darstellen. Die Antigenbindungsstellen sind an den Enden der F_{ab}-Fragmente lokalisiert. F_c- und F_{ab}-Teil sind über flexible Gelenkregionen (*hinges*) miteinander verbunden (Murphy *et al*, 2009; Reyelt, 2008).

1.2.2 Schwereketten-Antikörper und Nanobodies

In Kameliden und Haien kommen, zusätzlich zu den konventionellen, Antikörper vor, die nur aus schweren Ketten aufgebaut sind. Bei diesen Schwereketten-Antikörpern wurde durch eine Mutation ein Spleißsignal im C_{H1} -Exon eingeführt. Dieses Ereignis führte zum Verlust sowohl der leichten Kette als auch der C_{H1} -Domäne der schweren Kette (Nguyen *et al*, 1999). Die gesamte Information zur Synthese der C_{H1} -Domäne wird schon auf RNA-Ebene entfernt. Ohne die C_{H1} -Domäne kann die Disulfidbrücke, die im Normalfall die schwere und leichte Kette kovalent verknüpft, nicht ausgebildet werden, wodurch die leichte Kette nicht angelagert wird. Der Antikörper besteht nur aus schweren Ketten.

Das Paratop der Schwereketten-Antikörper wird durch eine einzige Domäne determiniert, die *variable domain of the heavy chain of heavy chain antibodies* (VHH). Durch ihre geringe Größe im Nanometerbereich werden die VHHs auch als Nanobodies bezeichnet.

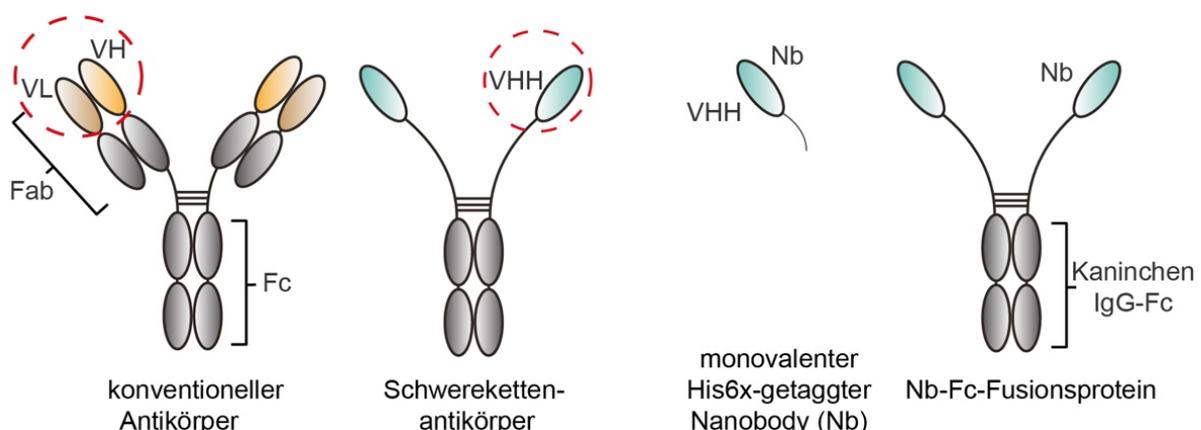


Abb. 1.05 Vergleichende Darstellung von Schwerekettenantikörpern, Nanobodies und konventionellen Antikörpern. Konventionelle Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren und leichten Ketten. Schwerekettenantikörper von Kameliden oder Haien sind homodimere Proteine, die nur aus zwei schweren Ketten bestehen. Die Antigenbindungsstelle der konventionellen Antikörper wird von je einer Domäne der schweren und der leichten Kette gebildet (V_H und V_L), während das Paratop der Schwerekettenantikörper aus nur einer Domäne (V_{HH}) hervorgeht. Nanobodies sind die rekombinanten variablen Domänen der Schwerekettenantikörper, auch als *variable domains of the heavy chain of heavy chain antibodies* (VHH) bezeichnet. Sie können in verschiedenen Formaten produziert werden (hier als ein His₆-getaggttes Monomer und als Fusionsprotein mit einem Kaninchen-IgG-Fc) (Danquah, 2012; Wesolowski *et al*, 2009).

Eine Besonderheit der VHHs ist das verstärkte Auftreten einer langen hypervariablen CDR3-Region von durchschnittlich 16 Aminosäuren. Sie ermöglicht das Ausbilden von langen fingerartigen Ausstülpungen, die in den Vertiefungen und Spalten von

Antigenen, wie den aktiven Zentren von Enzymen, binden können. Nach der Immunisierung von Lamas oder Dromedaren mit Enzymen finden sich deshalb auch VHHs, die in der Lage sind die Enzymaktivität zu inhibieren, so wie in **Abb. 1.06** für Hühnerei-Lysozym gezeigt (De Genst *et al*, 2006; Koch-Nolte *et al*, 2007; Wesolowski *et al*, 2009).

Bei einem Teil der VHHs wurde zwischen der CDR2 und der CDR3 eine zusätzliche Disulfidbrücke entdeckt. Diese erhöht vermutlich die Stabilität der langen CDR3. Gestützt wird diese Vermutung durch das häufige gleichzeitige Vorkommen von zusätzlicher Disulfidbrücke und langer CDR3 in den VHHs (Koch-Nolte *et al*, 2007; Muyldermans, 2013; De Meyer *et al*, 2014).

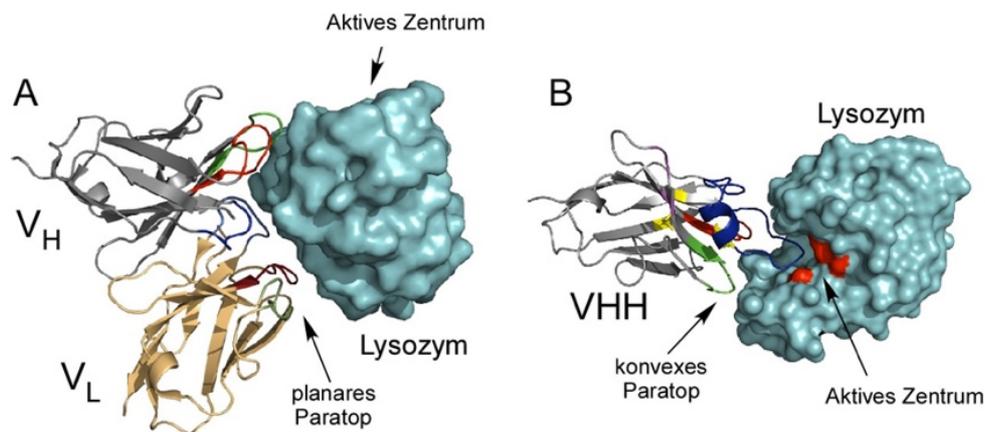


Abb. 1.06 Vergleichende Darstellung der Antigenbindung durch V_H- und V_L-Domänen und eine VHH-Domäne. Während konventionelle Antikörper planare Paratope über ihre Antigenbindungsstellen aus V_H- und V_L- Domänen ausbilden (A), formen VHHs von Schwereketten-Antikörpern häufig konvexe, fingerartige Paratope aus (B), die in Spalten und Vertiefungen, wie aktiven Zentren von Enzymen, binden können. Der hier gezeigte Einzeldomänen-Antikörper cAbsLys3 blockiert mit seiner langen CDR3 (blau) das aktive Zentrum (rot) des Hühnerei-Lysozyms (HEL). Die Abbildung wurde mit PyMOL mit Hilfe folgender pdb-Dateien erzeugt: A: pdb-Code: 1IC4, Mouse IgG1 Fab HYHEL-10 anti-HEL; B: pdb-Code: 1MEL, VHH cAbsLys3 anti-HEL

25 - 45 % der im Blut zirkulierenden Immunglobuline eines Lamas können Schwereketten-Antikörpern sein (van der Linden *et al*, 2000; Hamers-Casterman *et al*, 1993). Um spezifische Einzelkettenantikörper gegen gewünschte Zielstrukturen zu erhalten, werden Lamas oder Dromedare mit den entsprechenden cDNA-Expressionsvektoren oder rekombinantem Protein immunisiert und die RNA aus ihren peripheren Blutlymphozyten extrahiert (Wesolowski *et al*, 2009). Die gewonnene RNA wird in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern werden gezielt die variablen Regionen der Schwereketten-Antikörper PCR-amplifiziert. Die erhaltenen Amplifikate werden in Phagemidvektoren kloniert und die spezifischen

VHHs mittels Phagen-Display-Technologie selektiert (Clackson *et al*, 1991; Pardon *et al*, 2014).

VHHs lassen sich mit geringem Aufwand klonieren und rekombinant produzieren, weil sie anders als die konventionellen Antikörper nur aus einer Domäne bestehen und keine komplizierte Rekonstitution von schwerer und leichter Kette benötigen. Sie sind die kleinsten Antikörperfragmente mit Antigenbindung (Muyldermans, 2001). Die Substitution von vier hydrophoben Aminosäuren in der *Framework*-Region 2 in hydrophile Reste bedingt die gute Löslichkeit und Stabilität der Nanobodies (Vu *et al*, 1997; Nguyen *et al*, 2002). Durch ihre geringe Größe weisen sie zusätzlich eine sehr niedrige Immunogenität *in vivo* auf, wodurch sich vielfältige Einsatzgebiete für VHHs bieten (Wesolowski *et al.*, 2009).

1.2.3 Antikörper gegen P2X4 und P2X7

Die kommerziell erhältlichen Antikörper gegen P2X4 und P2X7 sind anti-Peptid-Antikörper, die gut im Western-Blot-Analysen funktionieren. Sie eignen sich nicht oder nur schlecht für den Nachweis von Proteinen in nativer Konformation.

Die AG-Nolte am UKE, Hamburg hat die DNA-Immunisierung etabliert (Koch-Nolte *et al*, 2007; Möller *et al*, 2007; Koch-Nolte *et al*, 2005). Dabei wird das von der cDNA kodierte Antigen in nativer Form von Hautzellen der immunisierten Tiere exprimiert. Dies induziert Antikörper gegen das Antigen in nativer Konformation. Bisher wurden erfolgreich polyklonale Seren gegen verschiedene P2X Rezeptoren hergestellt (Möller *et al*, 2007). Im Falle von P2X7 gelang es monoklonale Antikörper (Adriouch *et al*, 2004) und funktionelle Nanobodies (Laeremans *et al*, 2009; Danquah *et al*, 2013; Danquah, 2012). Diese haben sich als nützliche Werkzeuge für die nähere Charakterisierung von P2X7 erwiesen (Hubert *et al*, 2010; Schwarz *et al*, 2012; Scheuplein *et al*, 2009; Adriouch *et al*, 2007). Im Gegensatz dazu gab es zu Beginn dieser Promotionsarbeit noch keine vergleichbaren Antikörper oder Nanobodies gegen P2X4.

1.3 Ziel der Arbeit

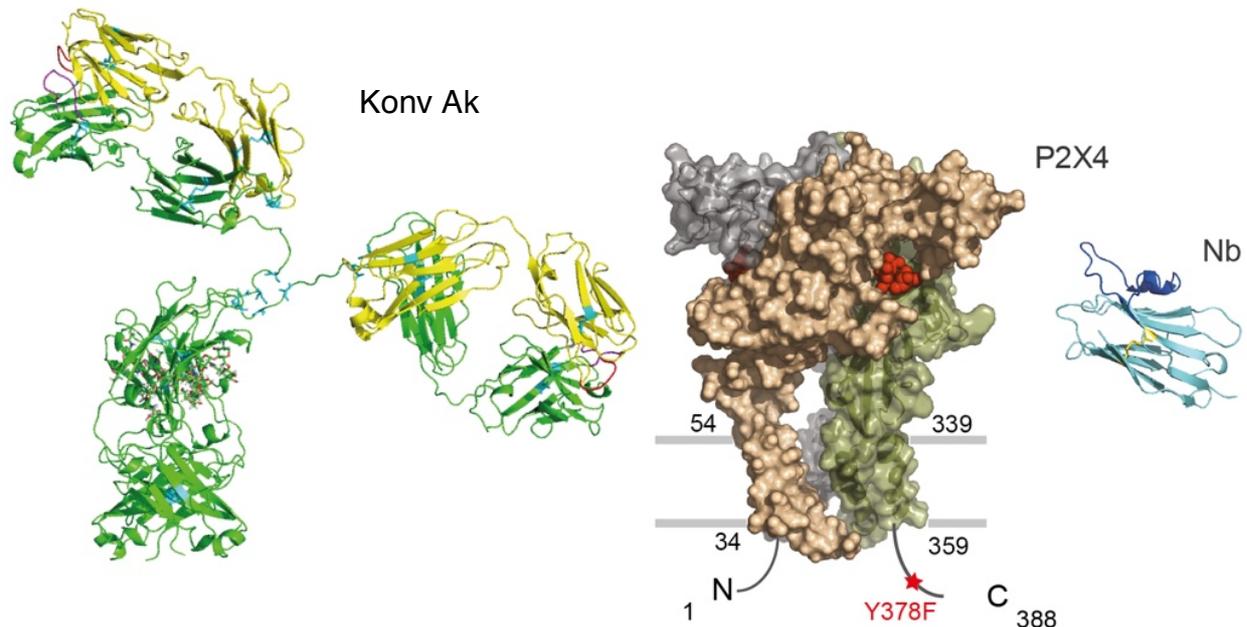


Abb. 1.07 Strukturmodelle von Nanobodies und monoklonalen Antikörpern gegen P2X4. Anfang und Ende der Transmembrandomänen sind durch die Angabe der jeweiligen Aminosäure gekennzeichnet. Der rote Asterisk markiert die Mutation an Aminosäure 378 in der AP2-Bindestelle des Ionenkanals, die zu einer erhöhten Expression an der Zelloberfläche führt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es Nanobodies und monoklonale Antikörper aus immunisierten Lamas bzw. Ratten gegen den Purinrezeptor P2X4 zu generieren (**Abb. 1.07**). Diese sollen anschließend hinsichtlich ihrer Funktionalität als Instrumente zur Untersuchung und Modulation von P2X4 charakterisiert werden. Hierfür sollen ihre Bindungsspezifität und -affinität, sowie ihr Einfluss auf die Funktionalität des Ionenkanals analysiert werden.

Die Nanobodies und monoklonalen Antikörper sollen auf ihre Tauglichkeit als Werkzeuge für den Nachweis und die funktionelle Charakterisierung von P2X4 in Zellkulturmodellen und primären Immunzellen getestet werden.

2 Material

2.1 Laborgeräte

| Gerät | Modell | Hersteller/Lieferant |
|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Analysenwaage | Typ 1412 | Sartorius (Göttingen) |
| Autoklav | Varioclave | H+P (Oberschleißheim) |
| DNA/RNA-Gelelektrophorese | 40-0708 | peqLab Biotechnologie (Erlangen) |
| Durchflusszytometer | FACSCanto II | Becton Dickinson (Heidelberg) |
| Fluoreszenzmikroskop | Evos fl | AMG (Mill Creek, WA, USA) |
| Geldokumentation | Edas290 & Kamera DC290 | Kodak (Stuttgart) |
| Genpulser | | BioRad (München) |
| Glasegefäße | Flaschen, Kolben, e.t.c. | Schott (Mainz) |
| Heizblock | Thermomixer Compact | Eppendorf (Hamburg) |
| Kühltruhe (-80°C) | HFC 586 Basic | Heraeus (Hanau) |
| Inkubator | B6060 | Heraeus (Hanau) |
| Magnetrührer | RCT S 26 | Omnilab (Bremen) |
| Mikropipetten | Typ „Research“ | Eppendorf (Hamburg) |
| Mikrowelle | M 637 EC | Miele (Gütersloh) |
| Neubauer-Zählkammer | | LaborOptik (Lancing, UK) |
| PCR-Maschine | T3000 Thermocycler | Whatman Biometra (Göttingen) |
| Photometer | NanoDrop2000c | peqLab Biotechnologie (Erlangen) |
| Pipettierhilfe | "Express" | Falcon (Heidelberg) |
| Polyacrylamid-Gelelektrophorese | Novex Xcell SureLock Mini-Cell | Invitrogen (Karlsruhe) |
| Roller | | Stuart (Staffordshire, UK) |
| Scanner | CanoScan9900F | Canon (Lake Success, NY, USA) |
| Sterile Werkbank | Typ20229 | MDH (Rüsselsheim) |
| Schüttelinkubator | HTinfors | UNITRON (Bottmingen, Schweiz) |
| Spannungsgeräte | High Voltage Power Pack P30 | Biometra (Göttingen) |
| | BI0105 LVD | Biometra (Göttingen) |
| | Power Pac 200 | BioRad (München) |
| Stickstofftank | K-Serie | Taylor-Wharton (Husum) |
| Transilluminator | Typ TI 1 | Whatman Biometra (Göttingen) |
| Verstärker | OC-725B | Warner Instruments (USA) |
| Vortex | | Neolab (Heidelberg) |
| Zentrifugen | Rotanta 460 R | Hettich (Tuttlingen) |
| | Biofuge pico | Heraeus (Hanau) |
| | Picofuge | Stratagene (La Jolla, CA, USA) |

2.2 Verbrauchsmittel

| Verbrauchsmittel | Name | Hersteller/Lieferant |
|--------------------------|--------------------|----------------------|
| Aktivkohlebeutel | Destaining Bags | Amresco |
| Cellstrainer | 70 µm Maschenweite | Becton Dickinson |
| Einwegpipetten, steril | Versch. Volumina | BD Biosciences |
| Einwegspritzen | Versch. Größen | BD Discardit |
| Elektroporationsküvetten | Gene pulser 0.1 cm | Bio-Rad |
| Gelfiltrationssäulen | PD-10 | GE Healthcare |
| FACS-Röhrchen | 5 mL roundbottom | Falcon (Heidelberg) |

| | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Kanülen | Versch. Größen | Braun (Melsungen) |
| Lowbind Reaktionsgefäß | Versch. Größen | Eppendorf |
| Mikrotiterplatten 96-well | 6-, 12-, 24-, 96-well; flatbottom | Greiner |
| Mikrotiterplatten 96-well Parafilm | 96-well; roundbottom | Greiner VWR |
| Polyacrylamid-Gele | Novex 12 % Bis-Tris | Invitrogen |
| Pipettenspitzen | Tipstack, div. Volumina | Sarstedt |
| Reaktionsgefäße | Safeseal | Sarstedt |
| Sterilfiltration | Steriflip, Stericup | Millipore |
| Ultrazentrifugationsfilter | Amicon Ultra 10000 MWCO | Millipore |
| Untersuchungshandschuh | Perform | Aurelia |
| Zellkulturflaschen | T25, T75 | Nunc |
| Zellkulturschalen | 10 cm, 25 cm | Greiner |
| Zentrifugenröhrchen | Steril, 15mL/50mL | BD Biosciences |

2.3 Reagenzsysteme (Kits)

| Kit | Name | Hersteller/Lieferant |
|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| AF647-Konjugation | Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit | Molecular Probes |
| BCA-Standardreihe | BCA Protein Assay Kit | Pierce |
| Gelextraktion u. PCR-Aufreinigung | Nucleospin Extract II | Machery-Nagel |
| Plasmid-Präparation | QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen |
| | Endofree Plasmid Maxi Kit | Qiagen |
| Färbung für Polyacrylamidgele | Colloidal Blue Staining Kit | Invitrogen |

2.4 Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller/Lieferant |
|----------------------|----------------------|
| 2xYT | BD/Difco |
| Agar | BD/Difco |
| AEBSF | Sigma |
| Agarose | Invitrogen |
| Aqua ad iniectabilia | Braun |
| ATP | Sigma |
| Bacto-Agar | Gibco-BRL |
| Bacto-Hefeextrakt | Gibco-BRL |
| Bacto-Trypton | Gibco-BRL |
| BSA | PAA |
| Carbenicillin | Serva |
| DMEM | Gibco |
| DNA-loading dye 6x | Fermentas |
| dNTPs | Invitrogen |
| DTT | Invitrogen |
| EDTA | Sigma |

| | |
|-------------------------------------|------------------|
| Ethanol, reinst, getrocknet | Merck |
| Ethanol, vergällt | Walter CMP GmbH |
| Ethidiumbromid | Molecular Probes |
| Firststrand-Buffer | Invitrogen |
| Fötales Kälberserum (FCS) | Biochrom |
| Gel-Dry Drying Solution | Invitrogen |
| GeneRuler 1 kb-DNA-Ladder | Fermentas |
| G418 | Sigma |
| Hepes, 1 M | Gibco |
| Hexamere | Invitrogen |
| Hoechst33342 | Hoechst |
| Jetpei | Polyplus |
| Kanamycin | Novagen |
| KOD-Buffer | Novagen |
| L-Glutamin | Gibco |
| LB Agar | BD/Difco |
| LB Broth | BD/Difco |
| M13K07 Helferphagen | NEB |
| Magermilchpulver | Roth |
| Methanol | Walther |
| MgSO4 | Novagen |
| Natriumchlorid | Sigma |
| Natriumhydrogencarbonat | Sigma |
| Nicht-essentielle Aminosäuren, 100x | Gibco |
| NuPAGE antioxidant | Invitrogen |
| NuPAGE sample reducing agent, 10x | Invitrogen |
| NuPAGE SDS-PAGE sample buffer, 4x | Invitrogen |
| Paraformaldehyd | Merck |
| PBS | Gibco |
| Pluronic | BASF |
| Protein G Sepharose | GE-Healthcare |
| RNAseOut | Invitrogen |
| Roti-safe | Roth |
| RPMI 1640 | Gibco |
| SOC-Medium | Sigma |
| Sucrose | Merck |
| TAE, DNA typing grade, 50x | Invitrogen |
| Terrific broth | USB Corp |
| Triton X-100 | Serva |
| Trypsin, 10x | Invitrogen |
| Tween-20 | ICI-Americas |
| Zeocin | Gibco |

2.5 Puffer

| Puffer | Zusammensetzung |
|--|--|
| Puffer für eukaryotische Transfektionen | 154 mM NaCl (Braun) |
| <u>Puffer für die Affinitätschromatographie:</u> Elutionspuffer (ProtG) | 100 mM Glycin-HCl, pH 3.5 in PBS |
| Waschpuffer (Ni-NTA) | 2.65 mM Na ₂ HPO ₄ 46.35 mM NaH ₂ PO ₄ 0.3 M NaCl 3 mM Imidazol pH 8 in deionisiertem Wasser |
| Elutionspuffer (Ni-NTA) | 2.65 mM Na ₂ HPO ₄ 46.35 mM NaH ₂ PO ₄ 0.3 M NaCl 250 mM Imidazol pH 8 in deionisiertem Wasser |
| Neutralisationspuffer | 1 M Tris-HCl, pH 8.0 in PBS |
| <u>Puffer für Phagen Display:</u> Block-Puffer | 5 % BSA, 5 % Milchpulver in PBS |
| <u>Puffer für die Immunfluoreszenz:</u> Block-Puffer | 2 % BSA, 3 % Ziegenserum, 0.5 % NP-40 in PBS |
| Antikörperlösung | 3 % Ziegenserum, 0.1 % Igepal in PBS |
| <u>Puffer für den Degranulations-Assay:</u> Peritoneallavage-Puffer Stimulationsmedium | 2mM EDTA in PBS RPMI komplett |
| Fixierungspuffer | 2 % /4 % PFA in PBS |
| <u>Puffer für die Phagenpräzipitation:</u> PEG/NaCl | 20 % PEG + 250 mM NaCl in H ₂ O |
| <u>Puffer für die Periplasmalyse:</u> TS Lyse-Puffer | 20 % Sucrose w/v 30 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM AEBSF ± 100 µg Lysozym in deionisiertem Wasser |
| <u>SDS-PAGE-Puffer:</u> Probenpuffer | 1x NuPAGE SDS sample buffer 1x NuPAGE sample reducing buffer |

Agarose-Gelelektrophorese-Puffer:

TAE-Laufpuffer 1x TAE Puffer in deionisiertem Wasser
 Probenpuffer 1x DNA loading dye

Puffer für Patch-Clamp-Analysen:

Barth's Lösung Barth's Lösung
 1.8 mM CaCl₂

Ringerlösung 115 mM NaCl
 5 mM NaOH
 2.5 mM KCl
 1.8 mM CaCl₂
 10 mM HEPES
 pH 7.4 in deionisiertem Wasser

KCl-Lösung 3 M KCl in deionisiertem Wasser

2.6 Medien

| Medium | Zusammensetzung |
|-------------------------|--|
| 2xYT | 31 g/l in deionisiertem Wasser |
| 2xYT-Agar | 2xYT, 15 g Agar |
| 2xYT-Carb | 2xYT mit 100 µg/ml Carbenicillin |
| 2xYT-Carb-20%Glu | 2xYT-Carb mit 20 % Glucose |
| 2xYT-Carb-20%Gly | 2xYT-Carb mit 20 % Glycerin |
| 2xYT-Carb-Kana | 2xYT-Carb + 50 µg/µl Kanamycin |
| LB | 25 g/l in deionisiertem Wasser |
| LB-Agar | 30.5 g/l in deionisiertem Wasser |
| DMEM komplett | 500 ml DMEM 5 ml Glutamin 5 ml Natriumpyruvat 5 ml Hepes 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren 25 ml FCS |
| RPMI komplett | 500 ml RPMI-1640 5 ml Glutamin 5 ml Natriumpyruvat 5 ml Hepes 5 ml nicht-essenzielle 25 ml FCS |
| F17-Transfektionsmedium | Gibco F17 4 mM L-Glutamin 0,1 % Pluronic |
| F17-Komplettmedium | F17-Transfektionsmedium 1 % FCS 0,5 % G418 |

| | |
|--------------------|---|
| F17 feeding-Medium | F17-Transfektionsmedium 20 % Trypton |
| SOC-Medium | 0.5 % Hefeextrakt 2 % Trypton 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose |

2.7 Enzyme

| Enzym | Hersteller |
|--------------------------------------|------------|
| SfiI | NEB |
| NcoI | NEB |
| NotI | NEB |
| PciI | NEB |
| ApaI | NEB |
| SSpl HF | NEB |
| Antarktische Phosphatase | NEB |
| KOD Hot Start Polymerase | Novagen |
| SuperscriptIII Reverse Transkriptase | Invitrogen |

2.8 DNA- und Protein-Standards

| Standard | Hersteller |
|--------------------------|---|
| <u>Protein-Standard:</u> | |
| Supermarker | AG Koch-Nolte BSA 100 µg/ml IgG 75 µg/ml Lysozym 10 µg/ml in 1x PBS |
| <u>DNA-Standards:</u> | |
| GeneRuler, 1 kb | Fermentas |
| Massruler DNA SM0403 | Fermentas |

2.9 Antikörper

| Antigen | Fluorochrom-Konjugat | Klon | Hersteller |
|---------------|----------------------|-----------|--------------------|
| CD11b | PerCP | M1/70 | Bio Legends |
| FcεR1 | PE | | |
| CD107a | FITC | 1D4B | Becton Dickinson |
| C-myc Tag | ohne | 9E10 | Santa Cruz Biotech |
| Maus IgG | PE | | Dianova |
| Ratte IgG | PE | | Dianova |
| Kaninchen IgG | PE | | Sero |
| | Alexa Fluor 647 | | Molecular Probes |
| hP2X1 | ohne | pAk 9316 | AG Koch-Nolte |
| mP2X1 | ohne | pAk CR30 | AG Koch-Nolte |
| hP2X7 | ohne | 1c81-rbFc | AG Koch-Nolte |
| mP2X7 | ohne | 1c81-rbFc | AG Koch-Nolte |
| | ohne | 14D5-mFc | AG Koch-Nolte |
| | ohne | 13A7-mFc | AG Koch-Nolte |

2.10 Oligonukleotide

| Name | Sequenz | Hersteller |
|----------------------|--|------------|
| LHF _{mu} | TCGCGGCCCCAGCCGGCCATGGCCGATGTGCAGCTGCAGGMGTCWGGRRGGAGG | Sigma |
| IgG2b _{rev} | AGGATTGGGTTGTGGTGCGGCCGCTGGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG | Sigma |
| LMB3 | CAGGAAACAGCTATGAC | Sigma |
| fdSeq1 | TGAATTTTCTGTATGAGG | Sigma |
| CMV-fn | CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG | Sigma |
| BGH-rev | TAGAAGGCACAGTCGAGG | Sigma |

2.11 Mauslinien

| Linie | Hersteller |
|-----------------------------|------------|
| C57bl/6 wt | UKE |
| C57bl/6 P2X4 ^{-/-} | UKE |

2.12 Zellen

| Zellen | Hersteller |
|---------------------------------------|----------------|
| Eukaryotische: | |
| CHO (<i>chinese hamster ovary</i>) | AG Koch-Nolte |
| HEK (<i>human embryonal kidney</i>) | AG Koch-Nolte |
| HEK-6E | AG Koch-Nolte |
| <i>Xenopus laevis</i> Oozyten | AG Boué-Grabot |
| Prokaryotische: | |
| HB2151 <i>E. coli</i> | Lucigen |
| TG1 <i>E. coli</i> | Lucigen |
| XL-2 blue <i>E. coli</i> | Stratagene |
| XL-10 gold <i>E. coli</i> | Stratagene |

2.13 Helferphagen

| Helferphagen | Hersteller |
|--------------|----------------------|
| M13K07 | Amersham Biosciences |

2.14 Plasmide

| Insert | Vektor | Hersteller |
|----------------|--------------------|----------------|
| eGFP (nukleär) | pCDNA3.1 | AG Koch-Nolte |
| mP2X4 Y378F | pCDNA3.1 | AG Koch-Nolte |
| hP2X4 Y378F | pCMV-SPORT6 | AG Koch-Nolte |
| rP2X4 | pCDNA3.1 | AG Koch-Nolte |
| mP2X7 | pCDNA3.1 | AG Koch-Nolte |
| hP2X7 | pCDNA6 | AG Koch-Nolte |
| mP2X1 | pCMV-SPORT | AG Koch-Nolte |
| hP2X1 | pCMV-SPORT | AG Koch-Nolte |
| Nb-Bibliothek | pHEN2 (Phagemidv.) | AG Goldbaum |
| versch. Nbs | pCSE2.5 | AG Koch-Nolte* |
| versch. Nbs | pCSE2.5.rbFc | AG Koch-Nolte* |

*(Jäger *et al*, 2013)

2.15 Software

| Software | Hersteller |
|----------|------------------------|
| FlowJo | TreeStarInc |
| Axograph | Axograph Scientific |
| Prism | Graphpad Software Inc. |
| 4Peaks | Mek & Tosj |

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von RNA oder DNA zu ermitteln wurden spektrophotometrische Messungen mittels Nanodrop durchgeführt. Dabei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und daraus die Konzentration ermittelt. Für RNA gilt dabei der Faktor $A_{260}=1 = 40 \mu\text{g/ml}$, für DNA der Faktor $A_{260}=1 = 50 \mu\text{g/ml}$. Aus dem Verhältnis der Absorptionen A_{260}/A_{280} konnte auf die Reinheit der Nukleinsäure zurückgeschlossen werden. Für ausreichend reine RNA musste dabei eine Ratio von 2 - 2.2 und für DNA eine Ratio von 1.8 - 2.0 vorliegen.

3.1.2 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

RNA aus peripheren Blutlymphozyten von Lamas wurde auf eine Konzentration von 200 ng/ μl eingestellt und 16 μl (3.2 μg) wurden für die Synthese von cDNA unter Verwendung der SuperScript III Reverse Transkriptase (Invitrogen) genutzt. Als Primer wurden randomisierte Hexa-Nukleotide (*random hexamers*) verwendet. Zum Schutz der RNA vor Degradation wurde RNaseOUT, ein Ribonuklease-Inhibitor, zum Ansatz hinzugegeben. Der Ansatz wurde wie in **Tabelle 1** (Ansatz A) dargestellt zusammenpipettiert und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Zur Qualitätskontrolle wurde ein Aliquot dieser Reaktion abgenommen und gelelektrophoretisch untersucht. Anschließend wurden dem Ansatz dNTPs, Puffer und die reverse Transkriptase hinzugegeben und die RNA in cDNA transkribiert (**Tab. 1** Ansatz B) In **Tabelle 2** ist das genutzte Programm für die cDNA-Synthese aufgeführt.

Tab. 1: Ansatz für die cDNA-Synthese mit randomisierten Hexa-Nukleotiden.

| cDNA-Synthese-Ansatz A) | | | | |
|-------------------------|---------|--|--|------------|
| 16.0 | μ l | RNA-Präparation | | |
| 3.0 | μ l | random hexamers (50 μ M) | | Invitrogen |
| 1.0 | μ l | RNaseOUT Ribonuklease Inhibitor | | Invitrogen |
| | | □ 10'/70°C | | |
| cDNA-Synthese-Ansatz B) | | | | |
| 10.0 | μ l | cDNA-Synthese-Ansatz-A | | |
| 4.0 | μ l | dNTP-Mix (10 mM/Nukleotid) | | Invitrogen |
| 1.0 | μ l | DTT (0.1 M) | | Invitrogen |
| 1.0 | μ l | Super Script III Reverse Transkriptase | | Invitrogen |
| 4.0 | μ l | 5x firststrand-Puffer | | Invitrogen |

Tab. 2: Programm „RT-PCR“ für die cDNA-Synthese.

| Schritt | Dauer | Temperatur |
|---------|----------|------------|
| 1 | 10' | 24 °C |
| 2 | 20' | 50 °C |
| 3 | 2' | 95 °C |
| 4 | ∞ | 4 °C |

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um das VHH-kodierende Repertoire aus der vorher synthetisierten cDNA zu amplifizieren, wurde das KOD-Hot Start Polymerase Kit von Novagen, in Kombination mit den entsprechenden Primern, verwendet (**Tab. 3**). Als DNA-Matrize diente 1 μ l cDNA. In **Tabelle 4** ist das genutzte PCR-Programm dargestellt.

Tab. 3: PCR-Ansatz zur Amplifikation der VHH-kodierenden DNA.

| PCR-Ansatz (Standard) | | | | |
|-----------------------|---------|-------------------------------|--|------------|
| 1.0 | μ l | cDNA | | |
| 5.0 | μ l | dNTP-Mix (10 mM/Nukleotid) | | Invitrogen |
| 2.0 | μ l | Primer LHFmu | | metabion |
| 2.0 | μ l | Primer IgG2b.rev | | metabion |
| 2,0 | μ l | MgSO ₄ , 25 mM | | Novagen |
| 5.0 | μ l | 10x KOD Hot Start Puffer | | Novagen |
| 1,0 | μ l | KOD Hot Start DNA Polymerase | | Novagen |
| ad 50 | μ l | H ₂ O (LiChrosolv) | | Merck |

Tab. 4: PCR-Programm zur Amplifikation der VHH-kodierenden DNA.

| Schritt | Dauer | Temperatur | Zyklenzahl | Rückkehr zu... |
|---------|----------|------------|------------|----------------|
| 1 | 2' | 95 °C | | |
| 2 | 30" | 95 °C | | |
| 3 | 20" | 55 °C | | |
| 4 | 20" | 70 °C | 39 | 2 |
| 5 | 2' | 70 °C | | |
| 6 | ∞ | 4 °C | | |

3.1.4 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden vom Dienstleister SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Dazu wurden 700 ng Plasmid-DNA und 20 pmol des jeweiligen Primers mit deionisiertem Wasser auf 7 μ l Probenvolumen aufgefüllt und an SeqLab gesendet. Die Sequenzen wurden am folgenden Tag online von SeqLab bereitgestellt und mit der Software 4Peaks (Mek&Tosj) analysiert.

3.1.5 DNA-Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs (NEB) durchgeführt. Für die Verdau-Ansätze wurden die jeweiligen geeigneten NEB-Puffer und die von NEB empfohlenen dazugehörigen Temperaturen verwendet. Die PCR-Amplifikate aus Abschnitt 3.1.3 wurden mit den Restriktionsendonukleasen SfiI und NotI geschnitten. Für die Umklonierung der VHHs vom pHEN2 Vektor in unterschiedliche Varianten des pCSE2.5-Vektors wurden Vektor und Inserts mit den Enzymen NcoI oder PciI und NotI geschnitten. Da einige der VHHs eine interne NcoI-Schnittstelle enthielten wurde ihnen in einem vorangegangenen Schritt per PCR die PciI-Schnittstelle eingeführt, bevor sie mit PciI und NotI aus dem pHEN2 Vektor geschnitten wurden. PciI- und NcoI-Enden sind miteinander kompatibel, so dass die Vektoren keine weitere Modifikation benötigten, um erfolgreich mit den VHHs ligiert zu werden. Die Zielvektoren, der Phage-Display-Vektor pHEN2 bzw. die jeweilige Variante des pCSE2.5-Vektors, wurden mit denselben Endonukleasen geschnitten wie ihre jeweiligen Inserts und wurden anschließend, um eine Religation ohne Insert zu verhüten, dephosphoryliert. Dazu wurde der jeweilige Vektor mit 1 μ l *Antarctic Phosphatase* (NEB) und 1 μ l mitgeliefertem Puffer für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Tab. 5: Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

| Enzyme | Dauer | Temperatur |
|---------------------|-------|------------|
| SfiI | 16 h | 50 °C |
| NotI | 3 h | 37 °C |
| PciI/NcoI + NotI | 3 h | 37 °C |

3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Vor der Ligation wurden Zielvektor und Insert mit denselben Restriktionsendonukleasen geschnitten und der Vektor anschließend dephosphoryliert, um eine „Selbstligation“ zu verhindern (siehe Abschnitt 3.1.5). Nach Gelelektrophoretischer Aufreinigung wurden Vektor, Insert und die T4-Ligase mit ihrem Puffer (NEB) zusammengegeben. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug dabei 1:3. Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 μ l wurde dabei 16 h bei 16 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden Ansätze ohne Insert mitgeführt. Nach der Transformation der Ansätze in *E. coli* musste das Verhältnis der gewachsenen Klone von den Ligationsansätzen mit Inserts zu den Kontrollen mindestens 5:1 betragen, damit die Klone zur Sequenzuntersuchung weiterverwendet wurden.

3.1.7 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Für Transformationen per Hitzeschock wurden chemisch kompetente selbst hergestellte XL2 blue-Zellen (AG Nolte) oder XL10 Gold ultrakompetente-Zellen (Stratagene) verwendet. Dazu wurden 100 μ l, der bei -80 °C gelagerten Zellen, für 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 1 μ l Plasmid-DNA oder 2 μ L Ligationen hinzugegeben und die Zellen wurden für 30 min bei 4 °C inkubiert, damit sich die Plasmid-DNA an die Bakterien anlagern kann. Das Tube mit den Zellen und DNA wurde für 30 s in ein 42 °C-warmes Wasserbad gehalten, um die Zellen durch den Hitzeschock porös zu machen, so dass die DNA in die Zellen gelangen kann. Im Anschluss wurden die Zellen 2 Minuten auf Eis inkubiert und 900 μ l, 37 °C-warmes SOC-Medium zu den Zellen gegeben. Nach Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C in einem Schüttelinkubator mit 250 rpm wurden 50 μ l (Ligationsansätze) bzw. 10-30 μ L (Plasmid-DNA) der Zellen auf 2xYT-Agar-Platten mit Carbenicillin ausplattiert, um die transformierten Zellen zu selektieren. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.8 Transformation elektrisch kompetenter Bakterien

Elektrisch kompetente TG1-Bakterien (Lucigen) wurden mittels Elektroporation transformiert. Dazu wurden 100 μ l der bei -80 °C gelagerten Zellen für 10 min auf Eis aufgetaut und in Aliquots von je 40 μ L aufgeteilt. Zu jedem Aliquot wurden 4 μ L Ligationsansatz hinzugegeben und die Suspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wurde anschließend in den Elektropulser (Gene-Pulser, Bio-Rad) eingesetzt und die Zellen bei 1800 V für 4-5 ms (Programm EC1) elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen unverzüglich in 960 μ l 37 °C-warmen SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C in einem Schüttelinkubator mit 250 rpm inkubiert. 50 μ l der Zellen wurden auf 2xYT-Agar-Platten mit Carbenicillin ausplattiert, um die transformierten Zellen zu selektieren. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.9 DNA-Präparation aus Bakterien

Auf 2xYT-Carb-Agar-Platten gewachsene Über-Nacht-Kolonien von transformierten Bakterien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und in 4 ml 2xYT-Medium mit Carbenicillin (100 μ g/ml) gegeben. Die Bakterienkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 230 rpm wachsen gelassen und anschließend die DNA mit dem QIAprepSpin Miniprep Kit (Quiagen) nach Herstellerangaben extrahiert.

Bei der Präparation größerer DNA-Mengen wurden Bakterienkolonien in je 100 ml Terrific Broth Medium mit Carbenicillin (100 μ g/ml) kultiviert und nach Über-Nacht-Inkubation bei 37 °C und 230 rpm wurde die DNA mittels EndoFree Plasmid Maxi Kit (Quiagen) nach Protokoll des Herstellers präpariert.

3.1.10 Kultivierung von prokaryotischen Zellen

Bakterien-Kulturen wurden in 2xYT- oder in LB-Medium angesetzt. Dafür wurden Einzelklone mit einer Pipettenspitze von Agarplatten gepickt und in ein passendes Volumen Kulturmedium mit Carbenicillin (100 μ g/ml) gegeben. Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Hauptkulturen wurden mit den Vorkulturen angeimpft und unter denselben Bedingungen weitere 3-6 Stunden inkubiert.

Bei einigen Kulturen wurde bei Erreichen einer OD_{600} von 0.5 die Proteinproduktion durch die Zugabe von IPTG (finale Konzentration 0.5 mM) induziert. Diese Bakterien wurden nach Induktion weitere 3 h kultiviert.

Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 4600 rpm für 15 min geerntet und die Kulturüberstände verworfen.

3.1.11 Kryokonservierung von prokaryotischen Zellen

Für die längere Lagerung von Bakterien wurden Glycerol-Vorräte angelegt. Aliquots der Bakterien wurden zentrifugiert und die Zellpellets in Kulturmedium mit 20 % Glycerol resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.12 Agarosegelelektrophorese von RNA- und DNA-Fragmenten

Agarosegelelektrophorese wurde verwendet, um Nukleinsäure-Fragmente verschiedener Größe aufzutrennen und aufzureinigen. Dazu wurde 1 % Agarose in 1x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und nach kurzem Abkühlen mit $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid versetzt. Die Agaroselösung wurde in einen Gelträger mit Gelkamm gegossen und gelierte bei der Abkühlung. Das erkaltete Gel wurde in eine Laufkammer überführt, die so weit mit TAE-Puffer gefüllt wurde, dass das Gel vollständig von Puffer bedeckt war. Die DNA-Probe wurde mit dem adäquaten Volumen 6x Probepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte abhängig von der Größe der DNA-Fragmente für circa 1 Stunde bei 80 V. Die RNA- oder DNA-Banden wurden entweder mittels eines UV-Transilluminators visualisiert und fotografiert oder die gewünschten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und zur weiteren Verwendung aufgereinigt.

3.1.13 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Zur Extraktion und Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel wurde das Gel Extract II Kit von Machery-Nagel genutzt. Die Aufreinigung erfolgte analog der Herstellerangaben. Die Elution der DNA erfolgte mit $15\text{-}15\text{ }\mu\text{l}$ TE-Elutionspuffer, bzw., bei der weiteren Verwendung der DNA für eine Ligation, mit destilliertem Wasser.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung und Ernte von adhärennten Zellen

Adhärennte Zellen wie HEK-, HEK-6E- und CHO-Zellen werden an den Bodenflächen von T25- oder T75-Zellkulturflaschen in DMEM Kompletmedium (HEK- /CHO-Zellen), bzw. in F17-Kompletmedium (HEK-6E), bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden, abhängig von ihrem Wachstum alle zwei bis drei Tage in neue Flaschen transferiert. Dabei wurde das alte Medium verworfen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch mehrminütige Behandlung mit 0.5 ml (T25-Flasche) bzw. 1.5 ml (T75-Flasche) der Protease Trypsin bei Raumtemperatur vom Flaschenboden gelöst. Durch Zugabe von 4 ml bzw. 8 ml des jeweiligen Kompletmediums wurde die Proteasereaktion gestoppt. Die Zellen wurden anschließend bei 560 x g zentrifugiert und der Überstand danach verworfen. Die erhaltenen Zellen wurden nun in frischem Medium in neue Flaschen ausgesät oder für Versuche eingesetzt.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Um die Anzahl von Zellen in einer Zellsuspension zu bestimmen wurde eine neue Bauer-Zellkammer (Neubauer improved, LaborOptik) mit einer Tiefe von 0.1 mm verwendet. Dabei wurde ein 10 µl Aliquot einer Suspension analysiert. Die Zellzahl in der Ausgangssuspension wurde anschließend hochgerechnet.

3.2.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Die Kryokonservierung dient der langfristigen Lagerung von Zellen. Zellen mit einer Wachstumsdichte von zirka 50 % Konfluenz wurden in Einfriermedium resuspendiert und in einem Kryoröhrchen bei -80 °C im Gefrierschrank für mindestens 24 Stunden gelagert. Die adhärennt wachsenden Zellen wurden in DMEM mit 70 % fötalem Kälberserum und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) eingefroren. Das DMSO verhindert die schnelle Bildung von Eiskristallen in der Zelle und schützt sie damit vor Schäden, da DMSO selber auf die Zellen toxisch wirkt erfolgt das Einfrieren in direktem Anschluss an die Zugabe von DMSO. Die Zellen konnten jederzeit bei Bedarf aufgetaut und kultiviert werden. Dazu wurde die kryokonservierte Zellsuspension im

37 °C warmen Wasserbad angewärmt und möglichst schnell in das vorgewärmte Komplettmedium überführt.

3.2.4 Transiente Transfektion von CHO- und HEK-Zellen

Die adhärent wachsenden CHO- (chinese hamster overy) und HEK- (human embryonic kidney) Zellen sollten zum Transfektionszeitpunkt zu zirka 50 % konfluent sein. Direkt vor der Transfektion wurde das Zellkulturmedium durch Frisches ersetzt. Die Transfektion erfolgte mit JetPEI (polyplus). Es wurden je 5 µg Plasmid-DNA und 10 µl JetPEI um eine T75-Flasche mit $4-5 \times 10^6$ zu transfizieren. DNA und JetPEI wurden in je 250 µl 150 mM NaCl-Lösung gegeben. Die JetPEI- wurde in die DNA-Lösung pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plasmid-/JetPEI-Lösung wurde direkt in das frische Medium getropft und durch Schwenken mit diesem vermischt. 20-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für Versuche eingesetzt.

3.2.5 Transiente Transfektion und Ernte der HEK-6E-Zellüberstände

HEK-6E-Zellen wurden für die Produktion von Nanobodies in verschiedenen Formaten verwendet. Einen Tag vor der Transfektion wurde das F17-Komplettmedium durch frisches Medium getauscht. Am Tag der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit dem FCS-freien Transfektionsmedium gewaschen.

Um $1-1.5 \times 10^6$ Zellen in einer T225-Flasche zu transfizieren wurden 20 µg DNA und 50 µl JetPEI-Reagenz in je 500 µl Transfektionsmedium aufgenommen. Die JetPEI- wurde in die DNA-Lösung pipettiert und für 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-/JetPEI-Lösung direkt in das frische Medium getropft und durch Schwenken mit diesem vermischt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde den Zellen 750 µl Feeding-Medium zugegeben. Die Zellen wurden weitere fünf Tage kultiviert und die in den Zellüberstand produzierten Nanobodies anschließend geerntet.

Dazu wurden der Überstand aus der Zellkulturflasche entnommen und 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert, um versehentlich transferierte Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde auf 1 ml eingeeengt und die Proteinkonzentration mit einer BCA-

Standardreihe spektrometrisch ermittelt (siehe Abschnitt 3.4.5). Ein 10 μL -Aliquot wurde gelelektrophoretisch analysiert (siehe Abschnitt 3.4.6).

3.2.6 Transiente Transfektion von CHO-Zellen in Suspension

Für Immunfluoreszenzmikroskopieanalysen wurden CHO-Zellen in Suspension transfiziert, um sie gleichzeitig auf Mikrotiterplatten umsetzen zu können. Die CHO-Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, geerntet und in 4 ml frischem Medium in einem 15 ml Falconröhrchen aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf $1-2 \times 10^6$ Zellen/4 ml eingestellt. Die Transfektion erfolgte mit JetPEI (polyplus). Für die Transfektion wurden je 5 μg Plasmid-DNA und 10 μl JetPEI eingesetzt. JetPEI und DNA wurden in je 250 μL 150 mM NaCl-Lösung gegeben. Die JetPEI-Lösung wurde in die DNA-Lösung pipettiert und diese Mischung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plasmid/JetPEI-Lösung wurde auf die 4 ml Zellsuspension getropft und diese anschließend geschwenkt. In die Näpfe einer 96 Well-Platte wurden je 100 μl DMEM-Komplettmedium vorgelegt und je 100 μl der Zellsuspension mit dem Transfektionsansatz hinzugegeben. Danach wurden die Zellen im Brutschrank für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

3.2.7 Stabile Kotransfektion von CHO-Zellen mit mP2X4 und GFP

Um CHO-Zellen mit einer gleichmäßigen Oberflächenexpression von mP2X4 zu erhalten, wurden sie stabil mit der Y378F-Mutante von mP2X4 transfiziert. Eine parallele Kotransfektion mit GFP erfolgte, da der GFP-enthaltende pcDNA3.1-Vektor zusätzlich für ein Protein kodiert, das die Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin vermittelt. Dieses wurde zur anschließenden Selektion der transfizierten Zellen verwendet. Zusätzlich ermöglicht die Expression von GFP das Erkennen transfizierter Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ohne vorherige aufwändige Färbung. Eine stabile, das heißt dauerhafte Transfektion wird durch die Linearisierung der verwendeten Plasmid-DNA begünstigt, da sich dadurch die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Plasmid-DNA in die Zell-DNA eingebaut und nicht nur temporär transkribiert wird bis sie abgebaut wird. Dazu wurde der Vektor pcDNA3.1_GFPdnLKLF mit dem Enzym SspI HF geschnitten. Das

Restriktionsenzym ApaLI schneidet dreimal im pcDNA3_mP2X4Y378F-Vektor, einmal in der kodierenden DNA für das Ampicillin-Resistenz-vermittelnde Protein, einmal im pBR322 Ori und einmal im nichtkodierenden Bereich des Vektors. Dabei entstanden drei Fragmente. Das Hauptfragment enthält die P2X4-DNA mit intaktem CMV-Promotor. Die Fragmente wurden gelelektrophoretisch größenfraktioniert, die jeweiligen Hauptfragmente aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt. CHO-Zellen wurden mit der erhaltenen mP2X4 Y378F- und GFP-DNA kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz durchflusszytometrisch überprüft und die Zellen anschließend in Selektionsmedium mit Zeocin (1:250) in einer T75-Flasche, und in einer 6-Well-Platte weiterkultiviert. Nach zwei Wochen wurden drei grün-fluoreszierende Klone aus einem 6-Well-Napf isoliert. Zwei der gepicketen Klone wurden an Tag 23 nach Transfektion vereinigt und über eine limitierende Verdünnung subkloniert. Dabei werden die Zellen in drei verschiedenen Verdünnungsstufen auf eine 96-Well-Platte ausgesät. Die erste Reihe der Platte enthält statistisch 10 Zellen pro Well, die nächsten drei enthalten 1 Zelle und die untersten vier Reihen enthalten rechnerisch 0.3 Zellen pro Well.

Zehn gewachsene Subklone wurden zwischen Tag 49 und 51 nach der ursprünglichen Transfektion auf ihre P2X4 und GFP-Expression hin durchflusszytometrisch untersucht. Ein GFP und mP2X4-koexprimierender Subklon wurde verwendet, um per FACS-Sortierung die stark doppelt-positiven Zellen aus der Population zu selektieren und unter Selektionsmedium weiter zu kultivieren. Die erhaltenen sortierten Zellen wurden später im Zellpanning verwendet (siehe Abschnitt 3.3.3).

3.2.8 Ratten-Immunisierungen und Selektion monoklonaler Antikörper

Ratten wurden in Kooperation mit der zentralen Versuchstierhaltung des UKE, Hamburg mit einer Gene Gun viermal intradermal mit einem Expressionsvektor für Maus-P2X4 (Ratte RG23) bzw. mit einer Mischung aus cDNA-Expressionsvektoren für humanes P2X4 (Y378F) und murines P2X4 (Y378F) (Ratte RG96) immunisiert (6 Schuss mit je 1 μ g cDNA/mg Goldpartikel mit 1 μ m Durchmesser) (siehe Immunisierungsschema in **Abb. 4.01**). Ratte RG23 erhielt eine finale Booster-

Immunisierung mit mP2X4-transfizierten HEK-Zellen, Ratte RG96 erhielt eine finale Booster-Immunisierung mit einer Mischung aus mP2X4 (Y378F)- und hP2X4 (Y378F)-transfizierten HEK Zellen (je 1×10^6 Zellen unfixiert, und 1×10^6 mit 2 % PFA-fixierte Zellen). Vier Tage nach den letzten beiden Booster-Immunisierungen wurden die Ratten getötet und entblutet. Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten wurden mit Sp2/0 Myelomzellen fusioniert und in HAT Medium selektioniert (Koch-Nolte *et al*, 2005; Möller *et al*, 2007). Die Antikörper-haltigen Kulturüberstände wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe Abschnitt 3.5.2) auf Reaktivität mit P2X4-transfizierten CHO-Zellen untersucht. Antikörper wurden mittels Affinitätschromatographie über Protein-G Sepharose (GE-Healthcare) gereinigt (siehe Abschnitt 3.4.3) und an Fluorochrome konjugiert (siehe Abschnitt 3.4.8).

3.3 Phagen-Display-Technologie

3.3.1 Lama-Immunisierungen

Lamas 539 und 540 wurden in Kooperation mit der Firma Ablynx, Gent, Belgien, mit Hilfe einer Gene Gun, viermal intradermal mit einer Mischung aus cDNA-Expressionsvektoren für humanes P2X4 (Y378F) und Maus-P2X4 (Y378F) immunisiert (12 Schuss mit je $1 \mu\text{g}$ cDNA/mg Goldpartikel mit $1 \mu\text{m}$ Durchmesser) (s.u. **Abb. 4.05**). Beide Lamas erhielten eine finale Booster-Immunisierung mit einer Mischung aus mP2X4- und hP2X4-transfizierten HEK-Zellen (je 1×10^7 Zellen unfixiert, und 1×10^7 mit 2 % PFA-fixierte Zellen). Vier und acht Tage nach den letzten beiden Booster-Immunisierungen wurde jedem Lama 100 ml Blut abgenommen und daraus die RNA peripherer Blutlymphozyten (PBL I-IV, s. **Abb. 4.05**) isoliert.

3.3.2 Konstruktion von VHH-Bibliotheken

Die RNA wurde per RT-PCR in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 3.1.2). Mit Primern für die VHH-Domäne von Schwere-Ketten-Antikörpern des Isotyps IgG2b wurden die für die Nanobodies kodierenden Regionen amplifiziert (siehe Schema in **Abb. 3.01**) und die erhaltenen Produkte auf einem Agarosegel größenfraktioniert. Um die

Nanobodies im späteren Zellpanning einsetzen zu können wurden die PCR-Amplifikate der erwarteten Größe von 450-550 bp aus dem Gel eluiert und mit den Restriktionsenzymen SfiI und NotI geschnitten. Der Zielvektor, der Phagemid-Vektor pHEN2, wurde mit denselben Endonukleasen geschnitten und anschließend, um eine Religation ohne Insert zu verhüten, durch eine Phosphatase dephosphoryliert (Abschnitt 3.1.5). Anschließend wurden Vektor und Insert wie in Abschnitt 3.1.12 mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt, die Elution erfolgte mit je 15 μ l. Die Ligation der VHH-kodierenden Fragmente mit dem pHEN2 Vektor erfolgte wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben. Je Lama wurden dabei vier Ligationsansätze á 20 μ l mit jeweils 50 ng Insert und 100 ng Vektor angesetzt.

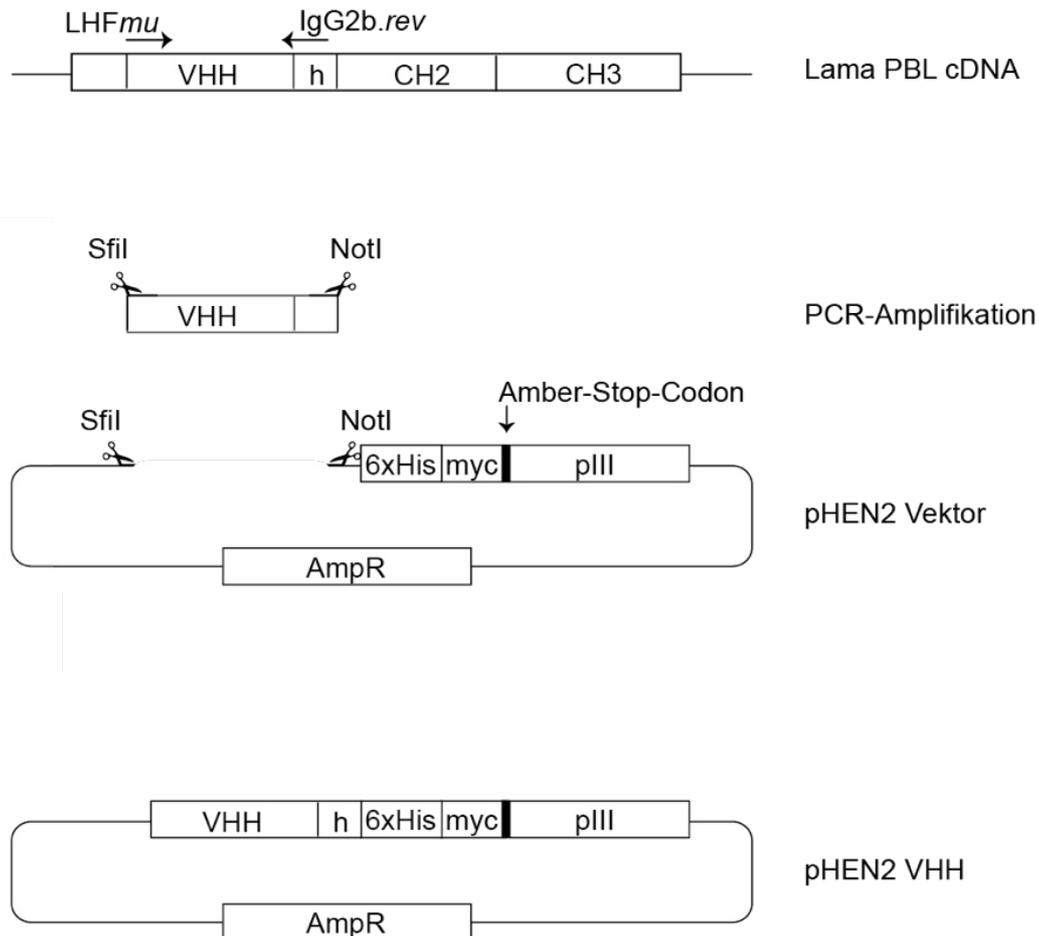


Abb. 3.01 VHH-Amplifikation und -Klonierung in den Phagemidvektor pHEN2. Die RNA der peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurde per RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die VHH-kodierenden Regionen wurden mit den Primern LHF μ und IgG2b.rev in der PCR amplifiziert (A). Das PCR-Produkt und der Phagemid-Vektor pHEN2 wurden mit den Restriktionsenzymen SfiI und NotI geschnitten (B). Der Vektor wurde anschließend mit der *Antarctic Phosphatase* dephosphoryliert und Vektor und Inserts wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und anschließend ligiert (C).

Jede so entstandene Bibliothek wurde in 20 Transformationsansätzen, mit je 4 μl Ligationsansatz, zur Elektroporation von TG1-*E. coli* (Lucigen) verwendet (Abschnitt 3.1.8). Die transformierten Zellen wurden auf 2xYT-Agar mit Carbenicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) ausgestrichen und die Anzahl der über Nacht gewachsenen Klone bestimmt. Um den Erfolg der Klonierung zu kontrollieren, wurden von einigen Klonen Plasmidpräparationen angefertigt und diese sequenziert. Aus den erhaltenen DNA-Sequenzen wurde die Diversität der Phagenbibliotheken abgeschätzt. Parallel wurden die Platten in je 20 ml 2xYT-Carb-Medium mit 20 % Glycerol geschabt und die erhaltene Suspension für 30 min auf dem Roller inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation, bei 4600 rpm für 10 min, wurde das entstandene Pellet in 2 ml 2xYT-Carb-Medium mit 20 % Glycerol aufgenommen und als Bakterienbibliothek bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Produktion einer Phagenbibliothek

Um Phagenbibliotheken zu produzieren wurde je ein Aliquot (50 μl des Glycerol-Bestandes) der Bakterienbibliotheken in 20 ml 2xYT-Carb-Medium mit 20 % Glucose bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 0.5$ wurde die Vorkultur für 10 min bei 4600 rpm zentrifugiert und in 20 ml 2xYT-Carb-Medium mit 20 % Glucose aufgenommen. Nach erneutem Hochwachsen der Zellen bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0.5$ wurden 5 ml der Kulturen mit je 50 μl der M13K07-Helferphagen superinfiziert und für 30 min bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4600 rpm wurden die Zellen einmal mit 5 ml 2xYT-Carb-Medium gewaschen und dann in 50 ml 2xYT-Carb-Kana-Medium aufgenommen, damit nur die sowohl mit Phagemid als auch mit Helferphagen transfizierten Zellen überlebten. Danach wurden die Phagen bei 30 °C und 220 rpm für 16 h produziert. Um sie zu ernten wurden die superinfizierten Bakterien für 10 min bei 4600 rpm zentrifugiert. Die Bakterien wurden dabei pelletiert und die produzierten Phagen verblieben im Überstand. Zur Präzipitation der Phagen wurden 40 ml des Überstandes in 10 ml, auf 4 °C vorgekühlten, PEG-NaCl-Puffer gegeben, durch Invertieren gut durchmischt und für 2 h auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Phagen wurden anschließend durch 10-minütige Zentrifugation bei 4600 rpm pelletiert, in 1 ml PBS resuspendiert und auf 250 μl vorgekühltes PEG-NaCl pipettiert. Die

Phagen wurden für 30 min auf Eis inkubiert, um sie erneut aus der Lösung ausfallen zu lassen. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min wurde das Pellet in des 1 ml PBS resuspendiert. Danach wurden die Phagen von etwaigen Zelltrümmern o.ä. gereinigt, indem mehrfach bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert wurde, wobei vor jeder neuen Zentrifugation der Phagen-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Die Reinigung wurde so lange durchgeführt, bis keine makroskopisch sichtbaren Pelletspuren mehr im Gefäß erkennbar waren. Die so produzierte und gereinigte Phagenbibliothek wurde bei 4 °C gelagert.

3.3.3 Selektion spezifischer Phagen

Um P2X4-spezifische Phagen aus den zuvor hergestellten Phagenbibliotheken (siehe Abschnitt 3.3.2) zu selektieren, wurde ein Panning an P2X4-transfizierten CHO-Zellen durchgeführt. Dazu wurden CHO-Zellen transient mit der Zelloberflächenmutante Y378F von humanem P2X4 transfiziert und in einer Zellkulturflasche (T75) ausgesät. Für das Panning an mP2X4 wurden stabil mit mP2X4 Y378F und GFP transfizierte CHO-Zellen verwendet. Je 200 μ l der Phagenbibliotheken wurden zu 1600 μ l Blockpuffer pipettiert und viermal auf eine untransfizierte HEK-CHO-Zell-Mischung (je 2×10^6 Zellen) gegeben, um unspezifische Zelloberflächen-Binder zu absorbieren.

Anschließend wurden die noch ungebundenen Phagen auf 2×10^6 mP2X4- bzw. hP2X4-transfizierte Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 1-2 h bei Raumtemperatur wurden die nicht gebundenen Phagen mittels wiederholter Waschschriffe entfernt. Dazu wurde die Zellsuspension bei 2500 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 10 ml Blockpuffer gewaschen. Nach Überführung der Suspension in ein neues Falcon, wurde weitere drei Male mit je 10 ml Blockpuffer gewaschen, wieder in ein neues Falcon überführt und nochmal drei Waschschriffe mit je 10 ml PBS durchgeführt. Das nach der Zentrifugation des letzten Waschganges erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und in ein Eppendorf Tube überführt. Anschließend wurde weitere zwei Male mit je 1 ml PBS gewaschen. Um die gebundenen Phagen von den Zellen zu eluieren wurde das Zellpellet nach dem letzten Waschschriff in 500 μ l der Protease Trypsin resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde die

Suspension für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Phagen wurden abgenommen und das Trypsin wurde durch die Zugabe von 50 μ l des Proteaseinhibitors AEBSF (100 mM) neutralisiert.

3.3.4 Reinfektion und Amplifikation selektierter Phagen

Um die im Panning selektierten Phagen zu vermehren wurden 5 ml einer TG1-Zellkultur ($OD_{600} = 0.5$) mit 250 μ l der Phagensuspension aus Abschnitt 3.3.3 transduziert und für 30 min bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm für 5 min. Das Pellet wurde in 100 μ l 2xYT-Medium aufgenommen und auf eine große 2xYT-Carb-Agar-Platte mit 20 % Glucose ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden gezählt, einige gepickt und zur Sequenzanalyse verwendet. Die Platten wurden anschließend mit je 10 ml 2xYT-Carb-Medium mit 20 % Glycerol geschabt und die erhaltene Suspension für 30 min bei RT auf dem Roller inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation, bei 4600 rpm für 10 min, wurde das entstandene Pellet in 1 ml 2xYT-Carb-Medium mit 20 % Glycerol aufgenommen und bei -80 °C als angereicherte Bakterienbibliothek gelagert. Ein 50 μ l Aliquot wurde für die neue Phagenproduktion, analog zu Abschnitt 3.3.2, verwendet. Die daraus resultierende angereicherte Phagenbibliothek wurde für eine zweite Selektionsrunde, analog zu Abschnitt 3.3.3 genutzt.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Anfertigung von Periplasmalysaten prokaryotischer Zellen

Periplasmalysate wurden aus den Kulturen von HB2151-*E. coli*s angefertigt, die vorher mit anti-P2X4-Nanobody-kodierenden Phagemid-Vektoren transformiert worden waren. Der Bakterienstamm HB2151 unterdrückt das Amber-Stop-Codon des Vektors nicht und produziert so nur die VHHs, ohne die Phagenproteine (siehe Abb. 3.01). Die Kulturen wurden, wie in Abschnitt 3.1.10 beschrieben, vorbereitet. Die Bakterien wurden per Zentrifugation geerntet und die Überstände verworfen. Anschließend wurden die Bakterien lysiert. Dazu wurde das Zellpellet in 5 ml TS-

Lysepuffer pro Gramm Pellet resuspendiert und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Lysate wurden bei 13000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Nanobody enthaltenden Überstände wurden anschließend per Steriflip (Millipore) steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

3.4.2 Produktion von Nanobody-Fc-Fusionsproteinen

Einige der mit der Phagen-Display-Technologie (siehe Abschnitt 3.3) selektierten Nanobodies wurden sequenziert und einige angereicherte Klone wurden ausgewählt, um für weitere Untersuchungen als Nanobody-Fc-Fusionsproteine in HEK-6E-Zellen expremiert zu werden. Dazu wurde die Nanobody-kodierende DNA aus dem Phagemidvektor pHEN2 in den HEK-6E-Expressionsvektor pCSE2.5 umkloniert. Der verwendete Vektor enthält die C_H2- und C_H3-Domänen des Kaninchen-IgGs (Fc-Teil des Antikörpers), so dass Nanobody-Fc-Fusionsproteine gebildet werden. Zur Umklonierung wurden die VHHs mit den Restriktionsenzymen NcoI/PciI und NotI aus dem pHEN2 Vektor geschnitten und in den mit denselben Enzymen geschnittenen Zielvektor pCSE2.5 ligiert (siehe Schema in **Abb. 4.12**). Einige VHHs enthielten eine interne NcoI-Schnittstelle, ihnen wurde in einem vorangegangenen Schritt per PCR eine PciI-Schnittstelle eingeführt, bevor sie mit PciI und NotI aus dem pHEN2 Vektor geschnitten wurden. PciI- und NcoI-Enden sind miteinander kompatibel, so dass die Vektoren keine weitere Modifikation benötigten, um erfolgreich mit den VHHs ligiert zu werden.

Die umklonierten VHHs wurden nach Ligation in XL2-*E. coli* transformiert, Mini-Präparationen der DNA angefertigt und die Sequenzen bestätigt. Die Plasmide der erfolgreich umklonierten Nanobodies wurden verwendet, um die Fusionsproteine in HEK-6E-Zellen zu produzieren (siehe Abschnitt 3.2.5).

3.4.3 Proteinaufreinigung via Affinitätschromatographie (ProteinG)

Um die Nanobodies ohne verunreinigende HEK-Zell-Proteine verwenden zu können, wurden sie affinitätschromatographisch aufgereinigt. Dabei wurden die Kaninchen-Fc (rbFc)-Fusionsproteine über ihren Fc-Teil an eine ProteinG-Sepharose-Säule (GE-Healthcare) immobilisiert, die ungebundenen Proteine gewaschen und die Nanobodies eluiert.

Dazu wurden die HEK-Zell-Überstände auf eine 1 ml ProteinG-Sepharose-Säule aufgetragen und der Durchfluss (DF) aufgefangen. Anschließend wurde einmal mit 10 ml PBS gewaschen und der Durchfluss verworfen. Danach wurde eine letzte Waschung mit 650 μ l PBS durchgeführt, von der der Durchfluss (LW) aufgefangen wurde. Die an die Säule gebundenen Proteine wurden mit Elutionspuffer in drei 1.25 ml-Schritten in Eppendorf Tubes eluiert. Je 10 μ l von DF, LW und von den Eluatzen wurden anschließend per SDS-PAGE größenfraktioniert (siehe Abschnitt 3.4.7).

3.4.4 Proteinaufreinigung via Affinitätschromatographie (Ni-NTA)

Um die Nanobody-Monomere ohne verunreinigende HEK-Zell-Proteine verwenden zu können, wurden sie affinitätschromatographisch aufgereinigt. Dabei wurden die Monomere über ihren His-Tag an eine Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose-Säule (Ni-NTA-Säule) immobilisiert, die ungebundenen Proteine gewaschen und die Nanobodies eluiert.

Dazu wurden die HEK-Zell-Überstände auf eine 1 ml Ni-NTA-Säule aufgetragen und der Durchfluss (DF) aufgefangen. Anschließend wurde einmal mit 20 ml PBS mit 0.5 % Triton X-100 gewaschen. Die an die Säule gebundenen Proteine wurden mit Elutionspuffer in drei 1 ml-Schritten in Eppendorf Tubes eluiert. Je 10 μ l von Durchfluss, Waschung und den Eluatzen wurden anschließend per SDS-PAGE größenfraktioniert (siehe Abschnitt 3.4.7).

3.4.5 Entsalzung von Protein-Elutions-Fractionen

Um die aus der Affinitätschromatographie eluierten Proteine in PBS lagern zu können, mussten sie entsalzt werden. Dazu wurden PD10-desalting Columns (GE Healthcare) nach Herstellerangaben verwendet. Die Proteinfractionen wurden mit Amicon Ultra Centrifugal Filter Columns (Millipore) auf 1 ml eingeeengt und ihre jeweilige Konzentration mit einer BCA-Standardreihe spektrometrisch ermittelt (siehe Abschnitt 3.4.6).

3.4.6 Quantifizierung von Proteinen

Die Konzentrationen der entsalzten Proteinfractionen wurden nach Herstellerangaben mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) bestimmt. Der Vorgang basiert auf der Fähigkeit von Peptiden in einer schwach alkalischen Lösung Cu^{2+} zu Cu^+ zu reduzieren. Im nächsten Schritt reagiert 1 mol Cu^+ mit 2 mol Bicinchoninsäure (BCA). Dabei formt sich ein wasserlöslicher lilafarbener Komplex aus Kupferionen und BCA, der eine linear steigende Absorption mit steigender Proteinkonzentration entwickelt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm im Photometer gemessen. Zur Quantifizierung wurde ein 2 mg/ml BSA-Standard verwendet, um eine Titrationskurve zu erstellen, mit der die anderen Konzentrationen bestimmt werden konnten.

Für eine praktischere Handhabung wurden alle Nanobodies auf eine Konzentration von entweder 1 mg/ml oder 2 mg/ml eingestellt. Alle im Weiteren angegebenen Verdünnungen der Nanobodies beziehen sich auf eine Grundkonzentration von 1 mg/ml.

Der größte Teil der VHHs wurde bei -80°C aufbewahrt, um die Gefahr einer Degradation durch Proteasen zu minimieren.

3.4.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach Größen zu fraktionieren wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass sie eine konstante negative Ladung aufweisen. Dadurch wandern sie bei Anlegen eines elektrischen Feldes alle in Richtung der Katode. Die kleineren Fragmente gelangen dabei schneller durch das Polyacrylamid-Gel als die größeren. Dadurch wird eine Auftrennung der Proteine bezüglich ihrer Größe erzielt. Für die SDS-PAGE wurden 12 %-tige Bis-Tris Gele (Invitrogen) und MES-Laufpuffer mit 1 mM DTT verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit dem entsprechenden Volumen des 4x LDS-Puffer und 10x DTT versetzt und für 10 Minuten bei 70°C im Heizblock denaturiert. Jeweils $20\ \mu\text{L}$ der Proben wurden neben $10\ \mu\text{L}$ eines Proteinmarkers (Supermarker) in die Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in einer

Elektrophoresekammer vom Typ Xcell SureLock Mini-Cell (Invitrogen) für ca. 45 min bei 200 V.

3.4.8 Coomassie-Färbung

Die Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen nach der SDS-PAGE erfolgte mit dem NOVEX Colloidal Blue Stain Kit (Invitrogen). Dabei wurde das Gel über Nacht in der Färbelösung (20 ml Methanol, 55 ml H₂O, 20 ml Stainer A, 5 ml Stainer B) inkubiert. Anschließend wurde es für 6-8 h in deionisiertem Wasser und unter Zugabe eines Aktivkohlebeutels entfärbt. Das Gel wurde für etwa 5 min in Drying Solution (Invitrogen) geschwenkt, zwischen zwei Blätter Zellophanfolie gelegt und in einem Trockenrahmen über Nacht getrocknet. Anschließend wurde das Gel zur Dokumentation eingescannt.

3.4.9 Fluorochromkonjugation von Antikörpern und Nanobodies

Nicht bei allen Anwendungen ist eine indirekte Anfärbung von P2X4 durch Primärantikörper in Kombination mit ihren entsprechenden Sekundärantikörpern möglich. Deshalb wurden ausgewählte anti-P2X4-Antikörper und -Nanobodies mit dem Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit (Molecular Probes) fluorochrom-gekoppelt. Die Kopplung wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Für die Nanobodies wurde eine Kopplungseinheit für drei Nanobodies verwendet, die Mengen wurden dementsprechend angepasst. Durch anschließende durchflusszytometrische Analysen wurde der Erfolg der Fluorochromkopplung überprüft.

3.5 Immunologische Methoden

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen (Abschnitt 3.5.1) und die Immunfluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 3.5.2) wurden, wenn nicht anders vermerkt, genauso durchgeführt, wie schon in der von mir erstellten Diplomarbeit beschrieben (Pfeiffer, 2011):

3.5.1 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen, die mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern oder fluoreszierenden Molekülen angefärbt wurden, durch eine Kapillare gedrückt, so dass ein Strom vereinzelter Zellen entsteht. Die einzelnen Zellen werden durch einen Laserstrahl definierter Wellenlänge erfasst. Photodetektoren messen die Lichtstreuung, die ein Maß für die Größe und Granularität der Zelle darstellt, und die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Die Lichtstreuung wird als Vorwärtsstreuung (forward scatter) und die seitliche Streuung (side scatter) registriert. Der Forwardscatter entspricht dem Schatten, den eine angestrahlte Zelle wirft und damit einem Maß für ihre Größe. Das zur Seite gestreute Licht (Sidescatter) gibt Auskunft über die Granularität der angestrahlten Zelle. Die Intensität der detektierten Fluoreszenz in den jeweiligen Kanälen entspricht der Expressionsstärke des durch Fluorochrom-gekoppelte Antikörper angefärbten Moleküls auf der Zelle bzw. der Stärke der Anfärbung mit fluoreszierenden Molekülen.

Die Antikörperanfärbungen wurden in FACS-Röhrchen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in DMEM (komplett) resuspendiert und pro Anfärbung 100 μ l Zellsuspension eingesetzt. Die Zellen wurden bei 560 x g für 5 Minuten abzentrifugiert, in 100 μ l Antikörperlösung (1:100 in 0.01 % BSA in PBS) resuspendiert und für 45 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und entweder direkt in 200 μ l PBS aufgenommen und im FACS Canto (Becton Dickinson) gemessen oder bei der Verwendung eines unkonjugierten Primärantikörpers für weitere 30 Minuten bei 4 °C mit einem Fluochrom-konjugierten Sekundärantikörper (1:200 in 0.01% BSA in PBS) inkubiert. Die Analyse der angefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo (TreeStarInc).

3.5.2 Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM)

CHO-Zellen wurden in Suspension mit verschiedenen Konstrukten transfiziert. Es erfolgte eine Kotransfektion mit GFP-dnLKLF, welches an einen Transkriptionsfaktor gekoppelt ist und somit die Kerne der transfizierten Zellen grün anfärbt. Die transfizierten CHO-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit 2% PFA für

10 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend zweimal mit je 150 μ l PBS (+/+) gewaschen.

Die Vitalzellanfärbung erfolgte in einem Zwei-Schritt-Verfahren. Dabei wurden die Zellen im ersten Schritt für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Primärantikörpern inkubiert. Als Primärantikörper wurden alternativ eingesetzt: Nanobody-haltige Periplasmalysate (1:3 in DMEM), monoklonale-Antikörper haltige Hybridomakulturüberstände (1:10 in DMEM), Immunsereen (1:100-1:3200 in DMEM), oder gereinigte Antikörper (10 ng/ μ l -10 μ g/ml in DMEM). Im Falle der Nanobody-haltigen Periplasmalysate wurden die Zellen für 1 h mit dem myc-Tag spezifischen monoklonalen Antikörper 9E10 (Maus IgG1k) inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 150 μ l PBS (+/+) gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln mit je 100 μ l eines geeigneten Phycoerythrin (PE)-konjugierten Sekundärantikörpers (anti-Maus IgG, anti-Ratte IgG, anti-Kaninchen IgG, 1:200 in DMEM) inkubiert. Um die Zellkerne anzufärben, wurde 10 min vor Ende der Inkubation der Hoechst-Farbstoff 33342 in einer 1:5000-Verdünnung zur Antikörperlösung gegeben. Die gefärbten Zellen wurden zweimal mit je 150 μ l PBS (+/+) gewaschen und konnten dann in der Immunfluoreszenz mit dem Evos-fl-Mikroskop betrachtet und dokumentiert werden. Die Fotos wurden in einer 20-fachen Vergrößerung mit fixen Einstellungen aufgenommen (Belichtungszeit für GFP: 250 ms bei 50% Helligkeit, für PE: 2.5 s bei 50% Helligkeit, Hoechst: 60 ms bei 10% Helligkeit).“

3.5.3 Bindungsaffinitätsassay

Um die P2X4-spezifischen VHHs und Antikörper bezüglich ihrer Affinität zu P2X4 zu vergleichen wurde ein Bindungsaffinitätsassay durchgeführt. Dazu wurden HEK-Zellen transient mit der Y378F-Mutante von humanem oder Maus-P2X4 transfiziert und je in zwei gleich große Aliquots (je ca. 3.5×10^6 Zellen) aufgeteilt. Ein Aliquot wurde irreversibel mit dem Zellfarbstoff eFluor450 markiert (1:250, 5 min, RT, Dunkelheit), die andere Hälfte wurde in so viele Teile wie zu untersuchende Nbs/Aks vorhanden waren, aufgeteilt, mit dem jeweiligen AF647-konjugierten Antikörper oder Nanobody gefärbt (0.5 μ g, 20 min, 4 °C, Dunkelheit). Die beiden Aliquots wurden viermal mit PBS gewaschen und der Nullwert (eFluor- und Nb/Ak-Aliquots getrennt)

am Durchflusszytometer gemessen. Anschließend wurden die eFluor gefärbten Zellen mit Nb/Ak-gefärbten Zellen in einem äquivalenten Verhältnis miteinander gemischt und nach 20 min, 2 h und 24 h erneut im Durchflusszytometer aufgenommen.

3.5.4 Blockadeassay

Um zu analysieren ob die verschiedenen P2X4-Nanobodies und -Antikörper den Ionenkanal an unterschiedlichen oder an derselben Stelle binden, also ein unabhängiges oder überlappendes Epitop haben, wurde ein Blockadeassay durchgeführt. Dazu wurden HEK-Zellen transient mit der Y378F-Mutante von humanem oder Maus-P2X4 transfiziert und mit je 5 μg VHH oder mAk (unkonjugierter Blocker) für 30 min bei 4 °C vorinkubiert. Anschließend wurden je 0.1 μg AF647-konjugierte VHH/mAk hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation bei 4 °C und Dunkelheit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend im Durchflusszytometer untersucht.

3.5.5 Patch-Clamp-Analysen ATP-induzierter Spannungsänderungen

Zur Ermittlung eines Einflusses von Nanobodies auf die Rezeptor- oder Kanalfunktion von P2X4 oder P2X7 wurden Patch-Clamp-Analysen von ATP-induzierten Spannungsänderungen in mit P2X4- oder P2X7-Expressionsvektoren transfizierten *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt. Die Präparation der Oozyten aus dem *Xenopus laevis* Frosch wurde von Johan-Till Pougnet, Universität Bordeaux, Frankreich, wie bei Bernier et al. (Bernier *et al*, 2008) beschrieben, vorgenommen. Zur Transfektion der Oozyten wurden jedem Oozyt für humanes bzw. Maus-P2X4-kodierende (300 pg) oder für mP2X7-kodierende (200 pg) Plasmid-DNA mikroinjiziert. Anschließend wurden die Oozyten circa 72 h in Barth's Lösung bei 19 °C inkubiert. Die Zwei-Elektroden-Patch-Clamp-Messungen (Vhold 5, 260 mV) wurden mit 3 M KCl-Lösung gefüllten Glaspipetten (1-3 MX) durchgeführt.

Für die elektrophysiologischen Messungen wurde je ein Oozyt zur Zeit, in einer Messkammer mit zwei Elektroden fixiert und dauerhaft mit Ringerlösung (pH 7.4, Flussrate 10-12 ml/min) umspült. Für eine Zeitspanne von 5 s wurden 10 μM (P2X4) oder 100 μM (P2X7) ATP in Ringerlösung durch die Kammer gespült. P2X4-

transfizierte Oozyten, die eine Spannungsänderung nach 10 μM ATP-Stimulation aufwiesen, wurden selektiert und weiterverwendet. Sie wurden für 20 min mit den jeweiligen rbFc-Fusionsvarianten der Nanobodies (2.5 $\mu\text{g/ml}$; für mP2X4: Nb 271, Nb 284, Nb 325; für hP2X4: Nb 301, Nb 318) oder einer Isotypkontrolle (bei mP2X4: anti-m/h/rtP2X7-Nb 1c81, bei hP2X4: anti-hP2X7-Nb 3c23) inkubiert und anschließend erneut für 5 Sekunden mit ATP (10 μM) umspült.

P2X7-transfizierte Oozyten wurden ohne vorherige Testung auf ihre ATP-Sensitivität verwendet und für 20 min mit den jeweiligen P2X7-Nanobodies (14D5, 13A7) (2.5 $\mu\text{g/ml}$ in Barth's Lösung) oder ohne Nanobody in Barth's Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 Sekunden mit ATP (100 μM) umspült.

Die Membranspannung wurde mit einem Warner OC-725B Verstärker (Warner Instruments) aufgezeichnet. ATP wurde in der Perfusionslösung aufgelöst und mittels eines Computer-gesteuerten Ventilsystems appliziert. Die Maxima der Stromstärken, definiert als die maximale Amplitude, die während der Applikation des Agonists gemessen wurden, wurden mit Axograph X (Axograph Scientific) berechnet.

3.5.6 Degranulationsassay an Maus-Peritonealzellen

Um die Verwendbarkeit der in dieser Arbeit beschriebenen P2X4-spezifischen Antikörper und Nanobodies zur Detektion von endogenem P2X4 auf der Zelloberfläche zu untersuchen, wurde ein Degranulationsassay mit murinen Mastzellen durchgeführt. Die Analyse der Peritonealzellen wurde von Björn Rissiek am Institut für Immunologie des UKE durchgeführt. Als Kontrolle dienten Mastzellen aus P2X4 ko Mäusen. Dabei wurden C57BL/6-WT- und C57BL/6-P2X4ko-Mäusen Peritonealzellen durch Peritoneallavage mit 5 ml kaltem PBS, 2 mM EDTA entnommen. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 900 μl RPMI-Komplettmedium resuspendiert und diese in An- und Abwesenheit von ATP (2 mM in 300 μl) für 10 min bei 37 °C stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS (mit FCS) gewaschen und in 100 μl Aliquots bei 4 °C mit Zelltypmarkern für Mastzellen (Fc ϵ R1-PE) und Makrophagen (CD11b-PerCP), sowie mit Antikörpern und Nanobodies gegen P2X4 (RG96A246/Nb 325 -Alexa647) und gegen LAMP1 (CD107a-FITC) angefärbt.

Die Zellen wurden anschließend im FACS Canto (Becton Dickinson) gemessen und mit der Software FlowJo (TreeStarInc) ausgewertet. Dabei wurde auf Mastzellen (CD11b lo, FcεR1⁺) gated.

4 Ergebnisse

Meine Promotionsergebnisse können in vier Teilen zusammengefasst werden:

Der erste Teil beschäftigt sich mit der Herstellung und Charakterisierung von P2X4-spezifischen monoklonalen Antikörpern. Dazu wurde eine Ratte mit P2X4-kodierender cDNA und mit P2X4-transfizierten Zellen immunisiert und die Antikörper mittels Hybridomatechnik produziert. Die erhaltenen Antikörper wurden immunfluoreszenzmikroskopisch auf ihre P2X4-Bindung hin untersucht.

Im zweiten Teil wird die Herstellung stabil P2X4-exprimierender CHO- und HEK-Zellen beschrieben, die im weiteren Verlauf für die Selektion und Charakterisierung von P2X4 spezifischen Antikörpern und Nanobodies genutzt werden.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung von rekombinanten Nanobodies. Dazu wurden aus der RNA von peripheren Blutlymphozyten P2X4-immunisierter Lamas die für die variable Region der Schwerekettenantikörper kodierenden Bereiche mittels PCR amplifiziert und in einen Phagen-Display Vektor kloniert. Per Phagen-Display-Technologie wurden P2X4-bindende Nanobodies selektiert. Nach Analyse der Nanobody-kodierenden DNA-Sequenzen wurden ausgewählte Sequenzen in eukaryotische Expressionsvektoren umklontiert.

Der vierte Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Produktion und Charakterisierung der selektierten Antikörper und Nanobodies. Spezifität und Affinität wurden durchflusszytometrisch untersucht, Epitopüberlappungen wurden durch Kreuzblockadeanalysen ermittelt. Des Weiteren wurden Nanobodies und Antikörper mit hoher Spezifität und Affinität auf ihre Fähigkeit, die P2X4-Aktivität zu beeinflussen untersucht, und für den Nachweis von endogenem P2X4 auf primären Mauszellen eingesetzt.

4.1 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den Ionenkanal P2X4

4.1.1 Immunisierung der Ratten RG23 und RG96

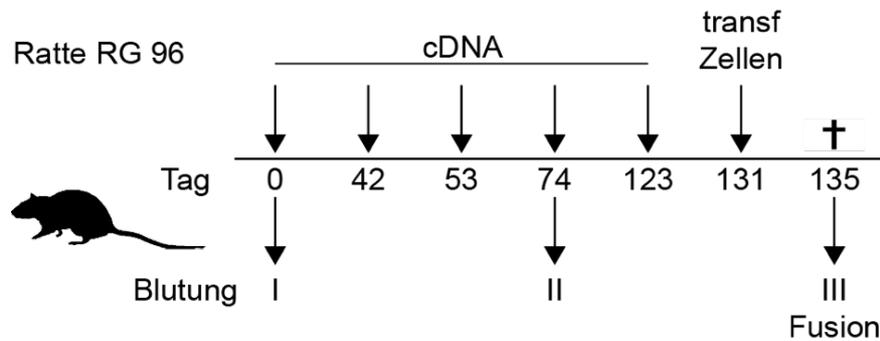


Abb. 4.01 Immunisierungsschema der Ratte RG 96. Die Ratte (RG 96) wurde mit einer Mischung von Maus- und humaner P2X4-Y378F-cDNA oder mit Maus- und humanem P2X4 transfizierten HEK-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten immunisiert. Vor der Grundimmunisierung, nach dem dritten Boost (Tag 74) und nach der Tötung (Tag 135) wurde Blut entnommen. Lymphozyten wurden aus Milz und Lymphknoten präpariert und mit Myelomzellen fusioniert. Diese Arbeiten wurden von Fabienne Seyfried und Gudrun Dubberke am Institut für Immunologie durchgeführt.

Um monoklonale Antikörper zur Detektion von murinem und humanem P2X4 zu erhalten wurden die Ratten RG23 und RG96 fünfmal mit einem Expressionsvektorgemisch für Maus-P2X4 (Ratte RG23) bzw. mit einer Mischung aus cDNA-Expressionsvektoren für humanes P2X4 (Y378F) und Maus-P2X4 (Y378F) (Ratte RG96) immunisiert. An Tag 131 bekam jede Ratte eine Booster-Immunisierung mit HEK Zellen, die zuvor mit den o.g. Expressionsvektoren transient transfiziert waren. Vier Tage nach diesem Boost wurde die Ratte entblutet, Lymphknoten und Milz präpariert und die aus den beiden Organen erhaltenen B-Zellen mit Myelomzellen fusioniert (**Abb. 4.01**). Die fusionierten Zellen wurden per limitierende Verdünnung vereinzelt. Die erhaltenen Hybridomazellen produzierten Antikörper in den Zellüberstand, der an transfizierten Zellen getestet wurde. Dabei wurden sieben Hybridome identifiziert, die Antikörper produzieren, die mit Maus- und/oder human P2X4 transfizierten Zellen reagieren (siehe **Tabelle 6**).

Tab. 6 Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper

| Ratte | RG23 | RG96 | RG96 | RG96 | RG96 | RG96 | RG96 |
|------------|----------|----------|----------|----------|--------|----------|----------|
| Klon | A194 | A225 | A246 | A19 | A128 | A133 | A344 |
| Isotyp | IgG2b, κ | IgG2b, κ | IgG2b, κ | IgG2b, κ | IgM, κ | IgG2a, κ | IgG2a, κ |
| Spezifität | h | m | m | h | h | h | m |

4.1.2 Testung der Hybridomaklone auf ihre spezifische Reaktivität gegen P2X4

Um die erhaltenen Antikörper auf ihre Reaktivität gegenüber P2X4 testen zu können, wurden CHO-Zellen transient mit Expressionsvektoren für humanes oder Maus-P2X4, sowie mit einem Expressionsvektor für nukleär lokalisiertes GFP kotransfiziert. Die zu testenden Überstände wurde in einer 1:10 Verdünnung auf die fixierten Zellen gegeben. Gebundene Antikörper wurden über einen sekundären, PE-gekoppelten anti-Ratten IgG Antikörper detektiert und immunfluoreszenzmikroskopisch visualisiert.

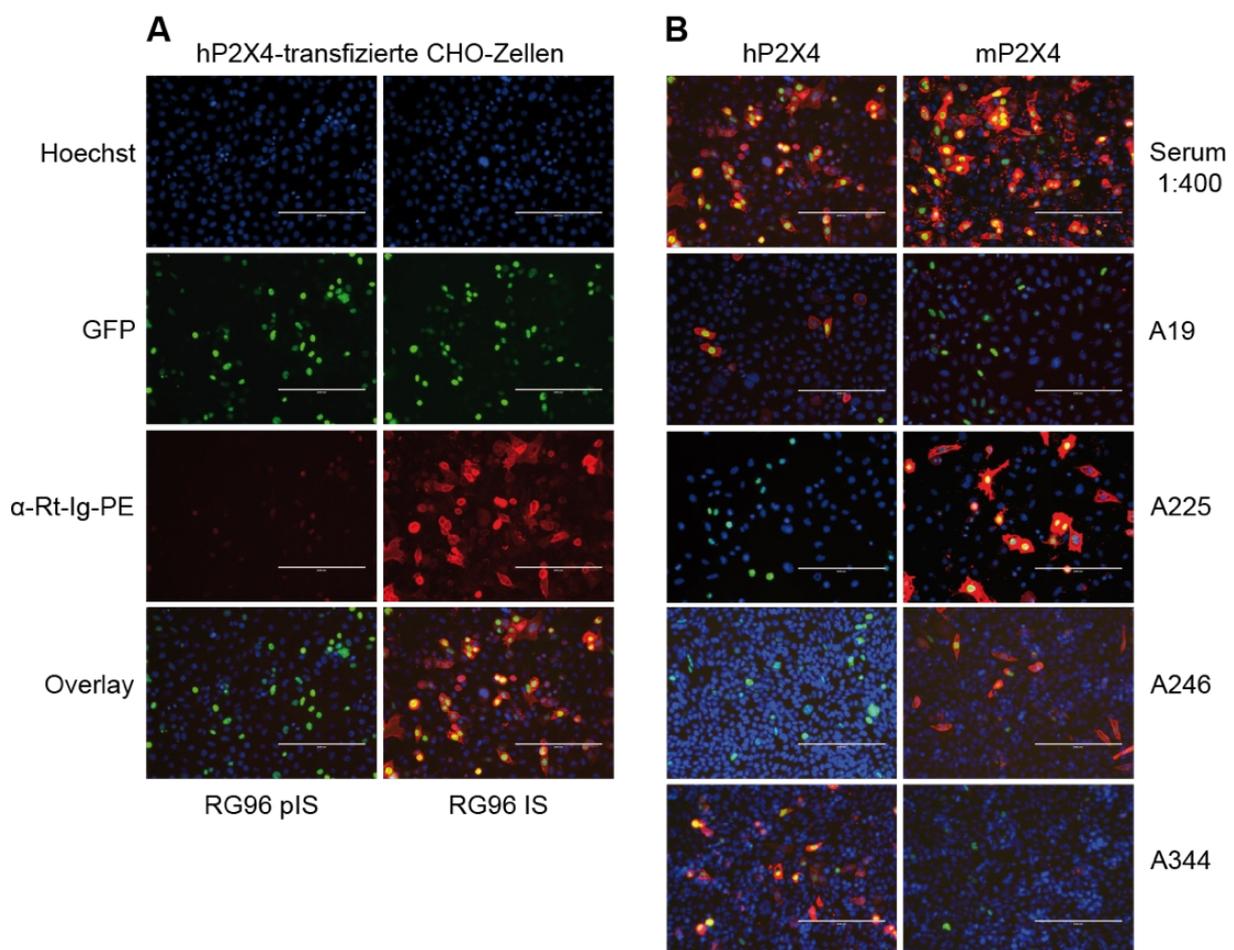


Abb. 4.02 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse an transient mit P2X4 transfizierten CHO-Zellen zur Ermittlung der Reaktivität von monoklonalen Antikörpern aus der Ratte RG96. CHO-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für nukleär lokalisiertes GFP und der Y378F-Mutante von Maus- oder humanem P2X4 kotransfiziert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit Präimmunsereum (pIS) und Immunsereum (IS) (1:1600) (A) bzw. mit Kulturüberständen von Hybridomazellen (1:10) der Ratte RG96 inkubiert (B). Gebundene Antikörper wurden über einen PE-gekoppelten anti-Ratte-Sekundärantikörper (α -Rt-Ig-PE, 1:200) gefärbt und im Immunfluoreszenzmikroskop analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μ m.

Abbildung 4.02 zeigt eine Auswahl der immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Färbung von transient transfiziertem P2X4 auf CHO-Zellen durch die Antikörper der erhaltenen Hybridomklone. Der blaue Hoechst-Farbstoff färbt alle Zellkerne an. Ca. 10 - 20 % der Zellen haben zusätzlich einen grün leuchtenden, GFP-positiven Zellkern, diese Zellen wurden erfolgreich transfiziert. Die Rotfärbung durch den PE-gekoppelten Sekundärantikörper bietet den indirekten Nachweis für die Bindung des Erstantikörpers/Immunsersums (IS) an P2X4. Das Präimmunsersum der Ratte RG96 zeigt keine Anfärbung der Zellen, während das polyklonale Serum eine starke Färbung der Zellen zeigt, die auch GFP exprimieren d.h. transfiziert sind (**Abb. 4.02 A**). Diese Ergebnisse zeigen, dass P2X4, für die Antikörper erreichbar, an der Zelloberfläche exprimiert wird. In Teil B der Abbildung ist die Färbung der einzelnen Antikörperklone dargestellt, jeweils gegen murines und humanes P2X4. Das polyklonale Serum färbt beide P2X4-Homologe an, während die einzelnen Klone entweder humanes (A19 und A344) oder murines (A225 und A246) P2X4 binden. Die unterschiedlich starke Kernfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342 lässt sich durch die Verwendung verschiedener Aliquots des Farbstoffs erklären. Die Belichtungszeiten der Immunfluoreszenzmikroskopieaufnahmen sind stets identisch.

4.2 Etablierung eines stabilen Expressionssystems für die Selektion von P2X4-spezifischen VHHs und Antikörpern

Als Transmembranprotein lässt sich P2X4 nicht in einer sezernierten Form produzieren und z.B. im ELISA verwenden, sondern kann in nativer Form nur in der intakten Zellmembran untersucht werden. Aus diesem Grund wird für die Selektion P2X4-spezifischer VHHs in der Phagen-Display-Technologie ein Expressionssystem benötigt, das viel Zielprotein auf seiner Oberfläche trägt, um möglichst viele spezifischen Phagen zu binden.

Transiente Transfektionen von CHO- (*chinese hamster ovary*) oder HEK-Zellen (*human embryonic kidney*) mit der Y378F-Mutante von P2X4 zeigen eine Expressionsrate von 10-70 %, während stabile Transfektionen nach Selektion über eine Antibiotikaresistenz auf dem eingeführten Expressionsvektor eine Rate von nahe 100 % aufweisen können (vgl. **Abb. 4.04**).

Die Verwendung von transfizierten HEK-Zellen für die letzte Booster-Immunisierung der Lamas könnte Schwereketten-Antikörper induziert haben, die mit HEK-Zellen reagieren. Darum wurden für das Zell-Panning CHO-Zellen ausgewählt. Der pcDNA3-Expressionsvektor für die Y378F-Variante von Maus-P2X4 trägt zudem ein Geneticinresistenz vermittelndes Gen. Da vorangehende Experimente zeigten, dass CHO-Zellen resistent gegenüber Geneticin sind, wurde *gfp* im pcDNA3.1-Vektor mit einem Zeocin-Resistenz-Gen kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wiesen dementsprechend eine Zeocin-Resistenz auf und konnten durch ihre grüne Fluoreszenz gleichzeitig leicht im Fluoreszenz-Mikroskop identifiziert werden. Die zusätzliche P2X4-Expression wurde durchflusszytometrisch kontrolliert.

Um den Einbau der transfizierten DNA in das Genom der CHO-Zellen zu begünstigen, wurden die Expressionsvektoren vor der Transfektion mit passenden Restriktionsenzymen linearisiert. Dazu wurde pcDNA3.1_GFPdnLKLF mit dem Enzym SspI HF geschnitten. Für die Linearisierung des pcDNA3_mP2X4Y378F-Vektors wurde das Restriktionsenzym ApaI verwendet. Dieses schneidet dreimal im pcDNA3_mP2X4Y378F-Vektor, einmal im Gen des Ampicillin-Resistenz vermittelnden Proteins, einmal im pBR322 Ori und einmal im nichtkodierenden Bereich des Vektors. Dabei entstehen drei Fragmente. Das Enzym wurde zur Linearisierung verwendet, da das Hauptfragment die P2X4-DNA mit intaktem CMV-Promotor enthält.

Das Agarose-Gel in **Abbildung 4.03** zeigt die geschnittenen Plasmide im Vergleich zu ihrer ungeschnittenen Variante. Zirkuläre DNA läuft etwas langsamer in der Gelelektrophorese als lineare, so dass die Bande des geschnittenen GFP-Plasmids, trotz gleicher Basenzahl, unter der ungeschnittenen liegt.

Für den geschnittenen P2X4-Vektor erkennt man, zusätzlich zum Hauptfragment mit ca. 5000 Nukleotiden, die erwarteten zwei kleineren Fragmente mit Größen von 1200 und 300 Nukleotiden.

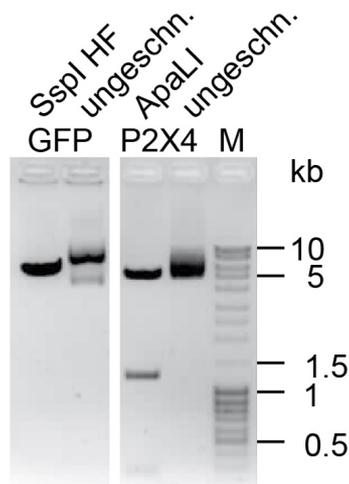


Abb. 4.03 Linearisierung von pcDNA3.1_GFPdnLKLf und pcDNA3_mP2X4Y378F für die stabile Transfektion von HEK- und CHO-Zellen und durchflusszytometrische Expressionsanalyse der Transfektion. Die Expressionsvektoren pcDNA3.1_GFPdnLKLf und pcDNA3_mP2X4Y378F wurden mit den den Restriktionsenzymen SspI HF bzw. ApaLI geschnitten, um linearisierte Vektoren zu erhalten, und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit ihrer ungeschnittenen Variante verglichen. M = DNA-Standard

Die jeweiligen Hauptfragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt. CHO-Zellen wurden mit der erhaltenen mP2X4 Y378F- und *gfp*-DNA kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz durchflusszytometrisch überprüft und die Zellen anschließend in Selektionsmedium mit Zeocin weiterkultiviert (**Abb. 4.04 T1pT**). Die Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zur untransfizierten Kontrolle (**Abb. 4.04 a**) ein Teil der transfizierten Zellen (**Abb. 4.04 b**) GFP und P2X4 koexprimiert. Zwei Wochen nach der Transfektion wurden drei grün-fluoreszierende Zellhaufen vorsichtig aus einem 6-Well-Napf isoliert und weiter kultiviert. An Tag 23 nach Transfektion wurden diese Zellen über eine limitierende Verdünnung subkloniert.

Drei Wochen später wurden die gewachsenen Subklone auf ihre P2X4- und GFP-Expression durchflusszytometrisch untersucht. Die für vier Klone in **Abbildung 4.04 c-f** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Klone #5 und #4 praktisch kein GFP exprimieren und Klon #10 nur GFP exprimiert. Einzig Subklon #2 trägt einen erkennbaren Anteil an GFP und P2X4 doppelt-positiven Zellen (**Abb. 4.04 f**). Deshalb wurde versucht, aus Klon #2 die stark doppelt-positiven Zellen per FACS-Sortierung zu selektieren und unter Selektionsmedium weiter zu kultivieren. Die erhaltenen sortierten Zellen wurden später im Zell-Panning verwendet. Zu diesem Zeitpunkt koexprimierten 95 % dieser Zellen mP2X4 und GFP (**Abb. 4.04 h**),

während der Mutterklon nur noch sehr geringe Mengen an doppelt-positiven Zellen aufwies (**Abb. 4.04 g**).

Auch für ein Expressionssystem mit humanem P2X4 wurden CHO-Zellen stabil mit hP2X4 und GFP kotransfiziert. Diese Zellen erreichten nie das Expressionslevel ihrer Maus-Variante, so dass für das Zellpanning mit jeweils transienten Transfektionen bessere Expressionsraten von humanem P2X4 erreicht werden konnten.

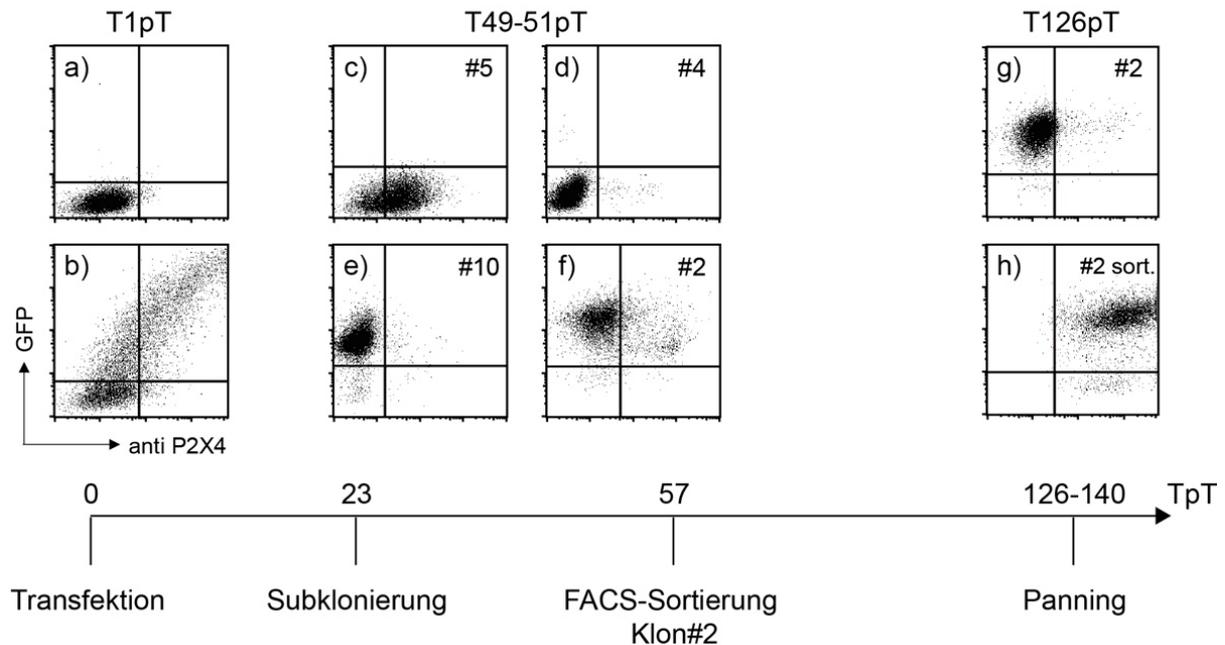


Abb. 4.04 Selektion stabil GFP-mP2X4-transfizierter CHO-Zellen für das Panning der Phagenbibliothek. CHO-Zellen wurden an Tag 0 mit Expressionsvektoren für mP2X4 Y378F und GFP kotransfiziert (b) und ab Tag 1 in Selektionsmedium (DMEM komplett mit Zeocin 1:250) kultiviert. An Tag 23 wurden die Zellen per limitierender Verdünnung subkloniert und die gewachsenen Klone drei bis vier Wochen später durchflusszytometrisch auf Expression von GFP und mP2X4 untersucht (c-f). Subklon#2 wurde an Tag 57 FACS-sortiert und weiter in Selektionsmedium kultiviert. Zehn Wochen später wurde die Expression von P2X4 auf sortierten (h) und parentalen Zellen (g) des Subklon#2 erneut untersucht. a = untransfizierte Kontrolle, TpT = Tag post Transfektion.

4.3 Herstellung von P2X4-spezifischen VHHs

P2X4 ist ein Ionenkanal, der eine Rolle in Entzündungsprozessen, neuropathischem Schmerz und anderen immunologischen Vorgängen spielt (Tsuda *et al*, 2013; Ulmann *et al*, 2010). Spezifische VHHs gegen diesen Kanal können erfolgreiche Instrumente zur näheren Charakterisierung desselben sein. Genauere Daten über Expression, Aktivierung und Folgen einer möglichen Blockade von P2X4, könnten

einen Einblick in den Verlauf der oben genannten Vorgänge in gesunden oder auch kranken Zellen geben. Der folgende Abschnitt beschreibt die Herstellung von Nanobodies, die spezifisch P2X4 erkennen, angefangen bei der Immunisierung der Lamas, über die Selektion von bindenden VHHs bis zur Reformatierung der VHHs in Fc-Fusionsproteine.

4.3.1 Immunisierung der Lamas 539 und 540

Der erste Schritt für die Produktion von Nanobodies gegen P2X4 war die Immunisierung der Lamas 539 und 540 (**Abb. 4.05**). Die Lamas wurden per *Gene Gun* viermal mit einem Expressionsvektorgemisch von Maus- und humanem P2X4 (Y378F) immunisiert. An Tag 63 nach der Grundimmunisierung wurden den Lamas HEK-Zellen, die transient mit oben genannten Expressionsvektoren transfiziert worden waren, gespritzt. Den Lamas wurde nach der Grundimmunisierung zu vier verschiedenen Zeitpunkten je 100 ml Blut abgenommen und die peripheren Blutlymphozyten (PBL I-IV) isoliert, aus denen die RNA aufgereinigt wurde. Die Immunisierungen der Lamas wurden von der Firma Ablynx (Gent, Belgien) vorgenommen.

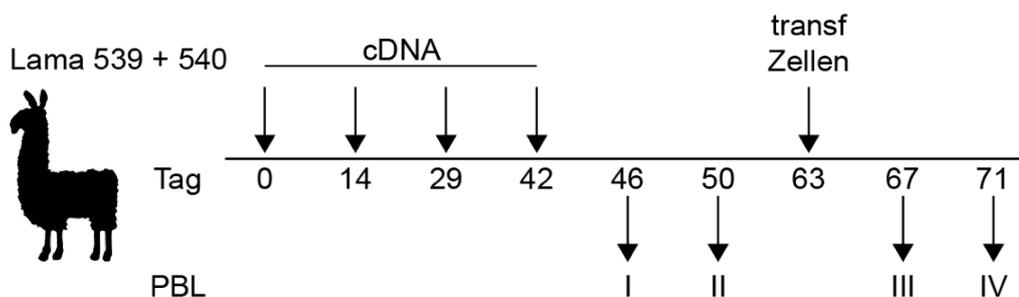


Abb 4.05 Immunisierungsschema der Lamas 539 und 540. Die Lamas 539 und 540 wurden mit einer Mischung von muriner und humaner P2X4-Y378F cDNA-Expressionsvektoren oder mit murinem und humanem P2X4 transfizierten HEK-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten immunisiert. Jedem Lama wurden viermal je 100 ml Blut entnommen. Aus den peripheren Blutlymphozyten (PBL I-IV) wurde die RNA gewonnen. Die Immunisierungen der Lamas wurden in Kooperation mit der Firma Ablynx (Gent, Belgien) durchgeführt.

4.3.2 Erstellung einer primären Phagenbibliothek der Lamas 539 und 540

Die RNA der peripheren Blutlymphozyten von Zeitpunkt III und IV (PBL III und IV) (**Abb. 4.06 A**) wurde per RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Mit Primern für die VHH-Domäne von Schwere-Ketten-Antikörpern des Isotyps IgG2b wurden die für die Nanobodies kodierenden Regionen amplifiziert und die erhaltenen Produkte auf einem Agarosegel größenfraktioniert. Um die Nanobodies im späteren Zellpanning einsetzen zu können wurden die PCR-Amplifikate der erwarteten Größe von 450-550 bp aus dem Gel eluiert und mit geeigneten Restriktionsenzymen (SfiI und NotI) geschnitten (**Abb. 4.06 B**). Der Zielvektor, der Phagemid-Vektor pHEN2, wurde mit denselben Endonukleasen geschnitten und anschließend, um die Religation ohne Insert zu reduzieren, durch eine Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurden Vektor und Insert mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (**Abb. 4.06 C**) und mittels Spektrophotometrie quantifiziert. Die Ligation der VHH-kodierenden Fragmente mit dem pHEN2 Vektor erfolgte in einem molaren Verhältnis von 1:3, Vektor zu Insert (**Abb. 4.06**).

Die Ligationsansätze wurden per Elektroporation in *Escherichia coli*- (*E. coli*-) Zellen (TG1) transformiert. Aus je 20 Transformationsansätzen wurden Bibliotheken von insgesamt 3.7×10^5 (Lama 539) bzw. 4.3×10^5 (Lama 540) Kolonien erzielt. Um den Erfolg der Klonierung zu kontrollieren, wurden von zufällig gewählten Kolonien Plasmidpräparationen angefertigt und diese sequenziert. Die erhaltenen DNA-Sequenzen zeigen einen hohen Anteil an intakten VHH-kodierenden Insertionen (41/55 bzw. 48/58) sowie eine hohe Diversität mit nur wenigen Duplikaten (2/41 bzw. 1/48) (**Tab. 7**).

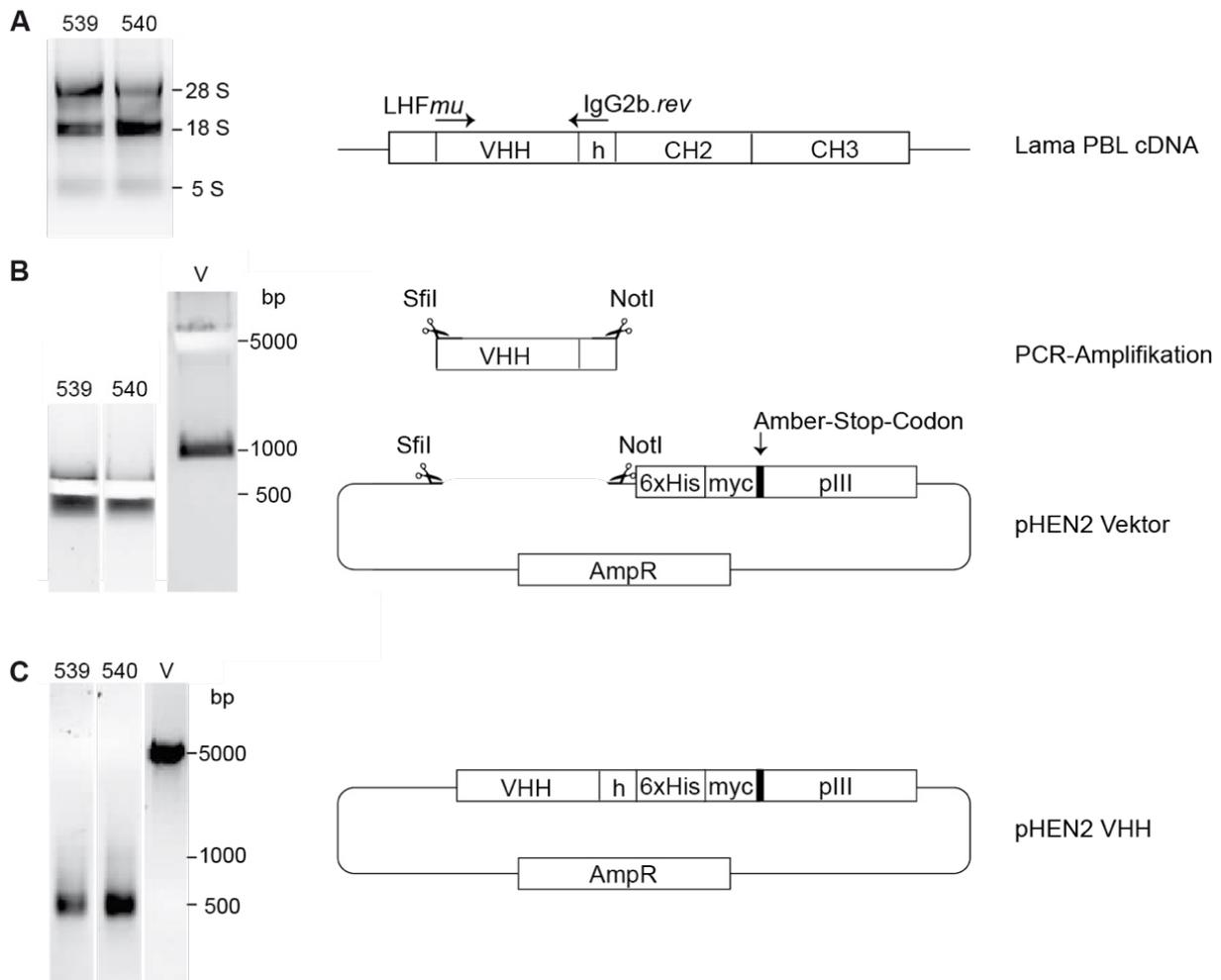


Abb. 4.06 VHH-Amplifikation und -Klonierung in den Phagemidvektor pHEN2. Die RNA der PBL III und IV wurde per RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die VHH-kodierenden Regionen wurden mit den Primern LHF μ und IgG2b.rev in der PCR amplifiziert (A). Das PCR-Produkt und der Phagemid-Vektor pHEN2 wurden mit den Restriktionsenzymen SfiI und NotI geschnitten (B). Der Vektor wurde anschließend mit der Antarctic Phosphatase dephosphoryliert und Vektor und Inserts wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und anschließend ligiert (C). Der pHEN2 Vektor beinhaltet ein His-myc-Tag, das Amber-Stop-Codon (das von bestimmten Bakterienstämmen nicht gelesen wird), das Phagenoberflächenprotein pIII und ein Ampicillinresistenz vermittelndes Protein (AmpR).

Die CDR3-Längen der Sequenzen lagen zwischen drei und 23 Aminosäuren. Mit 83 % intakten VHHs ist die Qualität der Primärbibliothek des Lamas 540 etwas größer als die der 539er-Bibliothek mit 75 % intakten VHHs. Als intakt gelten Sequenzen mit offenem durchgehendem Leseraster für Signalpeptid, VHH und Tags. Defekte Sequenzen enthielten entweder keine VHH-kodierenden Inserts oder VHH-Inserts mit einem vorzeitigen Stop-Codon oder einem durch Deletion oder Insertion verschobenen Leseraster.

Tab. 7 Charakteristika der primären VHH-Bibliotheken von Lama 539 und 540 (PBL III und IV)

| Lama | Größe | Sequenzen | CDR3 | Duplikate | % intakte VHHs |
|------|-------------------|-----------|---------|-----------|----------------|
| 539 | 3.7×10^5 | 55 | 3-23 Aa | 2 | 75 |
| 540 | 4.3×10^5 | 58 | 3-19 Aa | 1 | 83 |

4.3.3 Selektion von P2X4-bindenden Nanobodies

Die transformierten *E. coli* wurden mit M13K07-Helferphagen superinfiziert, die Phagen aus dem Überstand präzipitiert, aufgereinigt und titriert, wobei sich jeweils ein Titer von $>10^{13}$ Phagen pro Milliliter ergab. Um P2X4-bindende VHHs zu selektieren wurde ein Panning an P2X4-transfizierten CHO-Zellen durchgeführt. Dazu wurden CHO-Zellen transient mit der Y378F-Mutante von humanem P2X4 transfiziert und in einer Zellkulturflasche (T75) ausgesät. Für das Panning an mP2X4 wurden die stabil mit mP2X4 Y378F und GFP transfizierten CHO-Zellen verwendet. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie über das kotransfizierte GFP und die Anfärbung von P2X4 mit dem monoklonalen Antikörper RG96A246 (mP2X4) bzw. RG96A344 (hP2X4) überprüft (**Abb. 4.07**). Fast alle zum Panning gegen mP2X4 verwendeten stabilen CHO-Zellen tragen P2X4 auf ihrer Oberfläche, circa 60 % der transient mit hP2X4 transfizierten Zellen exprimieren den Oberflächenrezeptor. Die Phagenbibliotheken wurden viermal in Folge auf eine Mischung aus untransfizierten HEK- und CHO-Zellen gegeben, um unspezifische Zelloberflächen-Binder zu absorbieren.

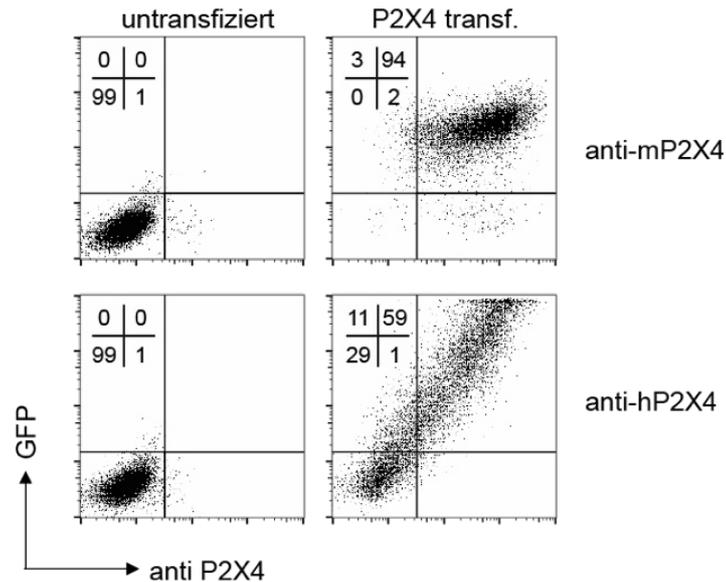


Abb. 4.07 Überprüfung der P2X4-Expression der zum Panning verwendeten transfizierten CHO-Zellen. CHO-Zellen wurden transient mit der humanen (unten rechts) und stabil mit der Maus- (oben rechts) Y378F-Mutante von P2X4 und GFP kotransfiziert, mit Antikörpern gegen mP2X4 (RG96A246 1:100) und hP2X4 (RG96A344 1:100) angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt werden, exemplarisch für alle Panningrunden, die Zellen der ersten Panningrunde. Die linke Spalte zeigt die Negativkontrolle - untransfizierte CHO-Zellen, gefärbt mit den genannten Antikörpern. Die Kreuze in der oberen linken Ecke der DotPlots zeigen die Frequenz der Zellen in den verschiedenen Quadranten an.

Anschließend wurden ungebundene Phagen auf P2X4-transfizierte Zellen gegeben. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die nicht gebundenen Phagen durch 10-maliges Waschen entfernt. Gebundene Phagen wurden anschließend mit Trypsin eluiert und per Zentrifugation von den Zellen getrennt. Trypsin wurde durch Zugabe des Proteaseinhibitors AEBSF inaktiviert und die Phagensuspension zur Transduktion von TG1-Zellen verwendet. Durch eine Superinfektion mit Helferphagen wurden die erhaltenen Phagen vermehrt und für eine neue Panning-Runde eingesetzt (siehe Panning-Schema in **Abb. 4.08**). Je 20 (1. Runde) bzw. 18 (2. Runde) zufällig ausgewählte Klone wurden sequenziert, um eine mögliche Anreicherung von Phagen mit bestimmten Sequenzen zu verfolgen. Die erhaltenen Sequenzen sind in **Abbildung 4.09** dargestellt.

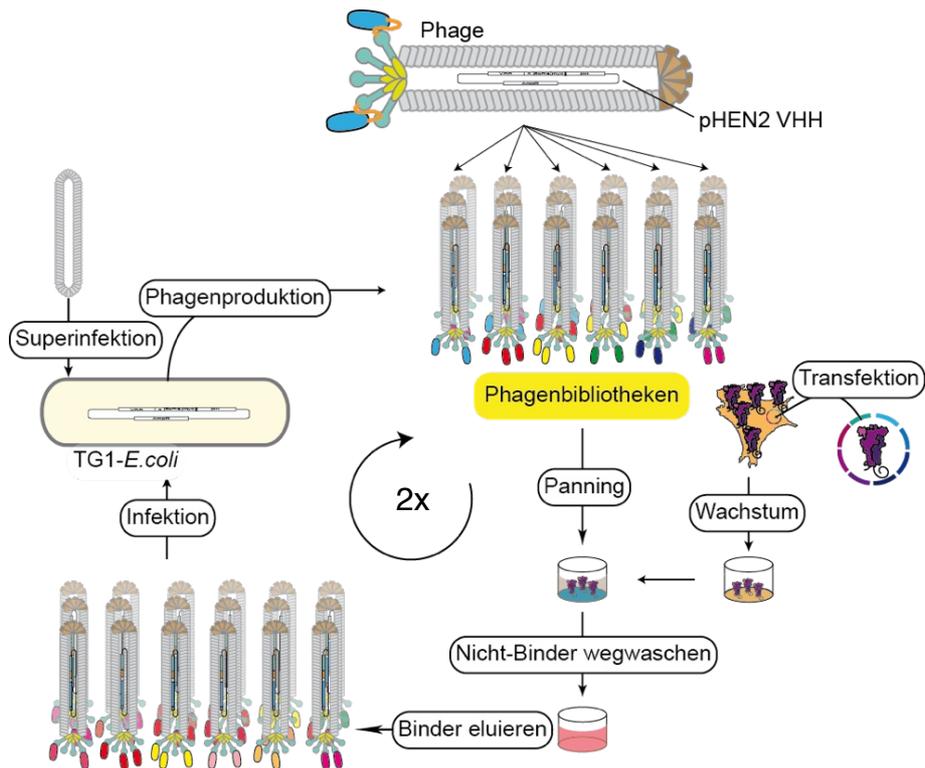


Abb. 4.08 Schema der Selektion von Phagen an P2X4. Die Phagenbibliotheken wurden zur Entfernung unspezifischer Binder mit untransfizierten HEK- und CHO-Zellen vorinkubiert. Die im Überstand verbliebenen Phagen wurden anschließend mit P2X4-transfizierten CHO-Zellen inkubiert und die Nicht-Binder mit wiederholten Waschschritten entfernt. Die Elution der Binder erfolgte mit Trypsin. Anschließend wurden TG1-*E.coli*-Zellen mit angereicherten Phagen infiziert und diese nach Superinfektion mit Helferphagen vermehrt. Zur weiteren Anreicherung wurden die erhaltenen Phagen in einer zweiten Selektionsrunde des Pannings verwendet. Abbildung modifiziert nach Stephan Menzel (Menzel, 2014).

Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung zeigen bei 18 von 20 (gegen hP2X4 selektiert) bzw. 20 von 20 (gegen mP2X4 selektiert) Klonen ein für eine VHH kodierendes offenes Leseraster. Bei der ersten Selektionsrunde an humanem P2X4 wurden zwei Klone zweimal (Familien PP04 und PP06) und ein Klon viermal (Familie PP07) gefunden. Auch die Sequenzen der Familien PP09 und PP10 (**Abb. 4.09, Markierung: ***) wurden zweimal gefunden, davon einmal unter den an untransfizierten Zellen gebundenen Klonen. Die Auswertung der Sequenzen der in einer zweiten Selektionsrunde gebundenen Klone zeigt eine weitere Anreicherung der Familie PP07 (16/19 sequenzierten Klonen), sowie eine neue Familie mit zwei Klonen (PP14).

Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung zeigen für die Selektion an Maus-P2X4 eine stark angereicherte Nanobodyfamilie (PP17) mit 18 Duplikaten. Nach der zweiten Selektionsrunde an mP2X4 entsprachen alle analysierten Klone dieser Nanobody-Familie.

Panning an hP2X4-transfizierten Zellen

```

Fam. 1. Runde 90 % intakte VHHs
01 LSCAGSGYYTLHYFAVAWFRQAPGQREFVAVETWNGVNTYYADSVKGRFTISKDSAKDTVYLQMTSLKPEDTAVVYCALDSTSQYADRGPYYTFRNFDKRWGGTQVIVA -22
02 LSCAASGLTSLSYNMG-WFRQAPGKEREFLVAIISWGRSENYADSLMGRFAISRDNAKNTLSLQMNLIPEdTAVVYCAAHGGSLGSLFLAKDSRDYLY---WGQGTQVTVS -19
03 LSCAASGNIFSFINAMG-WFRQAPGKQRELVAITISGGTT-NYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCNADRVGYYSGRYSSTFGMDF----WGKGLTVTVS -18
04 LSCAASGRTFSSYAMG-WFRQAPGKEREFLVAIINWSGDYTYYGDSVKGRTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCAARYSGSSWHAKQWYVGMDF----WGKGLTVTVS -18 2x
05 LSCAASGRTFSSNDAMA-WFRQAPGKQRELFVAVNWSGGSSYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCAAKLGPVYGGTYRSSHQYFPY----WGQGTQVTVS -18
06 LSCAASGIIFNINTMA-WYRQAPGKQRELVALITSGGST-NYADSVKGRFTISRDNASTVYLQMNLLKPEDTAVVYCNADTTIVTGSDIHASNL-----WGQGTQVTVS -15 2x
07 LSCAASGRTFSSYTMG-WFRQAPGKEREFLVAVITSGGST-NYADSVKGRFTISRDNASTVYLQMNLLKPEDTAVVYCAADATYYGLGSHEYGY-----WGQGTQVTVS -14 4x
08 LSCAASGSIILIGDMS-WYRQAPGKQRELVAEISNGGST-LYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCNAGIRDRRWIAHAY-----WGQGTQVTVS -12
09 LSCAASGSIITIGDAMN-WYRQAPGKQRELVAEISNGGST-LYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCNAGIRDRRWIAHAY-----WGQGTQVTVS -12 *
10 LSCAASGSIIRSIGTMA-WYRQTPGKQRELVAEISNGGST-NYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCNAGIKNIMGIWSTY-----WGQGTQVTVS -12 *
11 LSCAASGSIIFSNFMG-WYRQAPGKQRELVAITISNGGST-NYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCNLNNWIVSGWTNY-----WGQGTQVTVS -11
12 LSCAASGSAPFISGNAMA-WFRQAPGKQRELVATITSGGST-HYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCKGRPIDP-----WGQGTQVTVS -5
13 LSCAASGFTFSSYAMS-WYRQAPGKQRELVAITITSDGDT-NYGGSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLLQFDdTAVVYCKNSLN-----RGQGTQVTVS -3

2. Runde 100 % intakte VHHs
04 LSCAASGRTFSSYAMG-WFRQAPGKEREFLVAIINWSGDYTYYGDSVKGRTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCAARYSGSSWHAKQWYVGMDF----WGKGLTVTVS -18
07 LSCAASGRTFSSYTMG-WFRQAPGKEREFLVAVITSGGST-NYADSVKGRFTISRDNASTVYLQMNLLKPEDTAVVYCAADATYYGLGSHEYGY-----WGQGTQVTVS -14 14x
14 LSCAVSGRTLMSYRMA-WFRQAPGKEREFLVAIINWSGANSYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCAAGPYGSRHSSTYDY-----WGQGTQVTVS -12 2x
09 LSCAASGSIITIGDAMN-WYRQAPGKQRELVAEISNGGST-LYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCNAGIRDRRWIAHAY-----WGQGTQVTVS -12
15 LSCAASGSIISFNMG-WYRQAPGKQRELVAEITSGGST-NYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCNVRTWALRWSDY-----WGQGTQVTVS -10

```

Panning an mP2X4-transfizierten Zellen

```

1. Runde 100 % intakte VHHs
16 LSCAASGSIIFSVGDMG-WHRQAPGKQRELVAICIGSGCST-DYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCKGSLVRFDGSRPIWDEY-----WGQGTQVTVS -15
17 LSCAASGFTFSSYIMG-WFRQAPGKEREFLSAIMRSGGDKYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLEMNSLRPEDTAVVYCARHKGPGYSVYSPGYDY-----WGQGTQVTVS -15 18x
18 LSCAASGRTFGSWMFG-WFRQAPGKEREFLVAARSWSGGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAVVYCAADPVYRGRNRYGYHY-----WGQGTQVTVS -14

2. Runde 100 % intakte VHHs
17 LSCAASGFTFSSYIMG-WFRQAPGKEREFLSAIMRSGGDKYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLEMNSLRPEDTAVVYCARHKGPGYSVYSPGYDY-----WGQGTQVTVS -15 18x

```

Abb. 4.09 Anreicherung der VHH-Familien während der Selektion an P2X4-transfizierten CHO-Zellen. Plasmidsequenzen der nach dem Panning an Maus- und human P2X4-transfizierten CHO-Zellen eluierten Phagen wurden untereinander ausgerichtet und nach der Länge ihrer CDR3 (blau) sortiert. Die Zahlen hinter den Sequenzen geben die Anzahl der Aminosäuren der CDR3 an. Bei Klonen, die mehrfach gebunden wurden, ist zusätzlich die Häufigkeit des Auffindens angegeben. Die Aminosäuren der CDR1 sind in rot, die der CDR2 in grün dargestellt. Die an der konservierten Disulfidbrücke beteiligten Cysteine sind gelb markiert. Die Familien 09 und 10 (*) wurden in der ersten Panningrunde einmal an human transfizierten Zellen und einmal bei der Gegenselektion an untransfizierten Zellen gefunden. In der zweiten Panningrunde wurden sie dreimal bei der Gegenselektion an untransfizierten Zellen gefunden.

4.3.4 Ermittlung der spezifischen Reaktivität der selektierten Nanobodies

Um zu testen, ob die selektierten VHHs P2X4 spezifisch binden, wurden sie als Monomere in HB2151 *E.coli*, die das Amber-Stop-Codon nicht unterdrücken, produziert. Die Nanobodies wurden so ohne das p3-Protein der Phagen produziert und ins Periplasma sekretiert. Die Produktion im Periplasma wurde nach osmotischer Lyse der äußeren Membran mittels SDS-PAGE kontrolliert (**Abb. 4.10**). Die Ergebnisse zeigen jeweils 1-2 prominente Banden im Bereich von 14-20 kD. Bei der oberen Bande handelt es sich vermutlich jeweils um einen Nanobody mit intakten Tags, bei der unteren Bande möglicherweise um einen Tag-losen Nanobody. Zusätzlich wurde das erhaltene Periplasmalysat für die immunfluoreszenzmikroskopische Anfärbung von P2X4-Y378F-transfizierten CHO-Zellen verwendet (**Abb. 4.11**). Gebundene Nanobodies wurden dabei über Tag-spezifische Antikörper visualisiert.

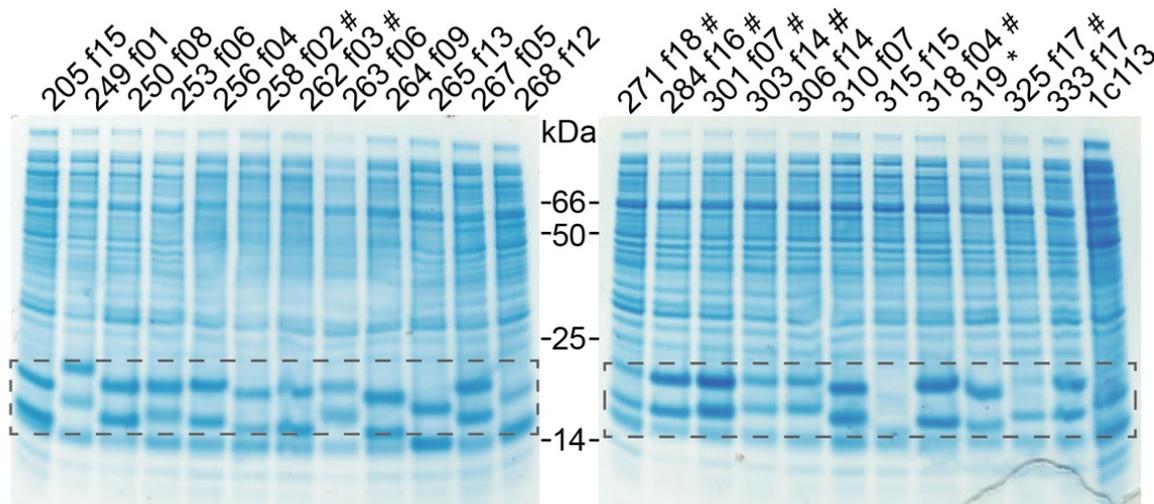


Abb. 4.10 Produktion ausgewählter VHHs in HB2151-Zellen. E.coli-Zellen des Stammes HB2151 erkennen das Amber-Stop-Codon des Phagemid-Vektors. Mit individuellen Nanobodies transformierte Klone wurden in Selektionsmedium bis zu einer optischen Dichte ($\lambda=600$ nm) von 0.5 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Transkription der VHH-kodierenden Region wurde mit 5 mM IPTG induziert und die Zellen weitere 3 h inkubiert (37°C, 230 rpm). Die äußere Zellmembran wurde durch Inkubation in TSE-Puffer (ohne EDTA) für 1 h bei 4 °C lysiert und die Sphäroblasten mittels Zentrifugation pelletiert. Die Proteine in 10 μ l des Überstandes (= Periplasmalysat) wurden jeweils über eine SDS-PAGE größenfraktioniert und Coomassie-gefärbt. Die gestrichelten Rahmen geben die Höhe der erwarteten Nanobody-Banden an. Die Zahlen geben den Namen des Klons und der Familie (fxx) an. Die mit # markierten Klone wurden weiter verwendet, Klon 319* wurde nur bei der Gegenselektion gefunden; 1c113 wurde als Kontrollnanobody für die Produktion in HB2151-Zellen verwendet.

Die Kotransfektion mit GFP bestätigte eine erfolgreiche Transfektion. 30-40 % der Zellen haben einen grün fluoreszierenden Zellkern. Die Zellen wurden für eine Stunde mit den Nanobody-haltigen PPLs inkubiert. Gebundene Nanobodies wurden mit einem myc-tag-spezifischen monoklonalen Antikörper, gefolgt von einem PE-konjugierten anti-Maus-IgG-Antikörper, detektiert (**Abb. 4.11**). Die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzanalysen zeigen eine starke Anfärbung der mit mP2X4 transfizierten Zellen durch die Nanobodies 284 und 325. Eine Reaktion dieser Nanobodies auf humanes P2X4 ist kaum (vereinzelte schwachrote Färbung bei Nanobody 284) bzw. nicht detektierbar. Demgegenüber zeigen die Nanobodies 262 und 318 eine gute Anfärbung von humanem P2X4 aber nur eine sehr schwache Färbung von mP2X4. Vier weitere Nanobodies zeigten eine schwache Anfärbung von humanem (Nb 301, Nb 303) oder Maus-P2X4 (Nb 258, Nb 271) (nicht dargestellt).

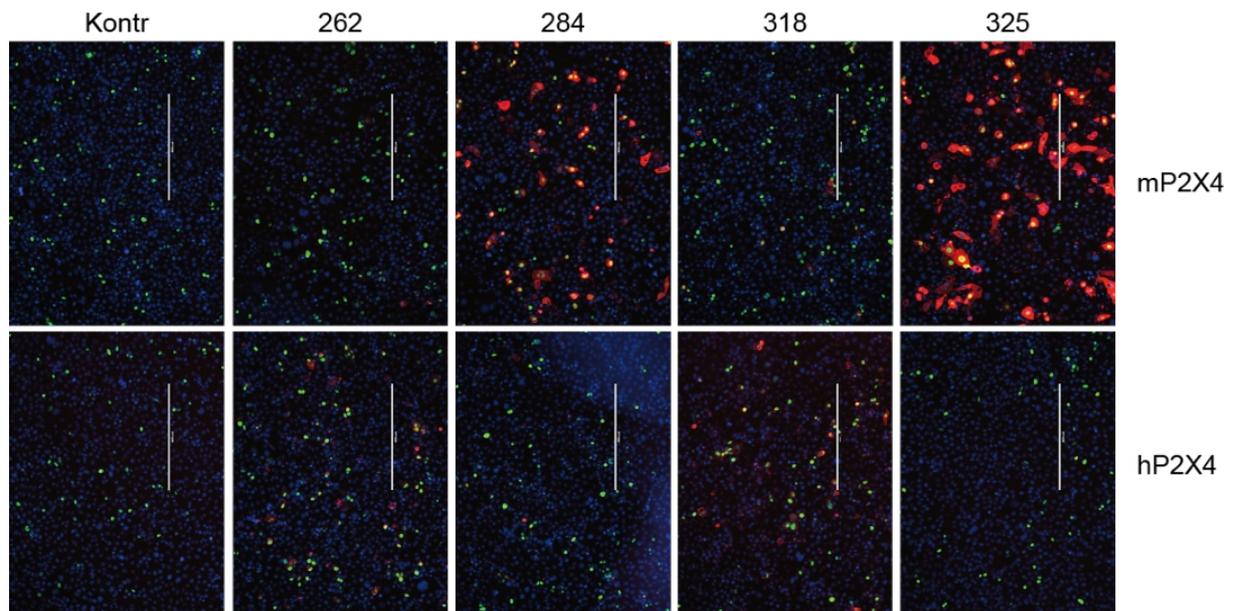


Abb. 4.11 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse der selektierten Nanobodies an transient P2X4-transfizierten CHO-Zellen. CHO-Zellen wurden transient mit der Y378F-Mutante von Maus- bzw. humanem P2X4 und mit GFP kotransfiziert, nach 24 h mit 2 % PFA fixiert und mit 30 μ l Periplasmalysat (PPL) der aus dem Panning erhaltenen Klone oder einem irrelevanten Periplasmalysat (Isotypkontrolle s+16a) angefärbt. Dabei wurden gebundene VHHs in einem Zwei-Schritt-Verfahren mit Maus-anti-myc-IgG und anti-Maus-IgG-PE detektiert. Dargestellt sind jeweils die überlagerten Bilder der GFP, Hoechst 33342 und PE-Färbungen. Der Maßstabsbalken entspricht 400 μ m.

Tabelle 8 zeigt die positiv getesteten VHHs, absteigend sortiert nach ihrer CDR3-Länge. Mit 36 von 75 Sequenzen ist Nanobody 325 der am häufigsten gefundene. Alle P2X4-bindenden Nanobodies entstammen dem Lama 540. Sie haben eine CDR3-Länge von 13 bis 19 Aminosäuren und zeigen unterschiedlich starke Anfärbungen von P2X4. Nbs 271 und 284 wurden zusätzlich zu humanem und murinem P2X4 positiv auf Ratten-P2X4 getestet.

Tab. 8 Übersicht der P2X4-bindenden VHH-Familien. Alle erhaltenen P2X4-Binder stammen aus dem Lama 540 und wurden an P2X4-transfizierten CHO-Zellen selektiert. Fam. = Familie, Häufigk. = Häufigkeit des Auffindens einzelner VHH-Familien, Var. = Anzahl der verschiedenen Varianten derselben Familie

| Fam. | Klon | Häufigk. | Var. | CDR3 | CDR3 | m | h | r |
|------|------|----------|------|------|---------------------|------|-----|------|
| 2 | 258 | 1 | 1 | 19 | HGGSFLGSFLAKDSRDYLY | + | + | - |
| 3 | 262 | 1 | 1 | 18 | DRVGYYSGRYSSTFGMDF | (+) | ++ | - |
| 4 | 318 | 3 | 2 | 18 | RYSGSSWHAKQWYYGMDN | + | ++ | + |
| 15 | 284 | 1 | 1 | 15 | SVLRFDGSRPIWDEY | +++ | (+) | +++ |
| 16 | 325 | 36 | 1 | 15 | HKPGYSVYYSPGYDY | ++++ | - | - |
| 17 | 271 | 1 | 1 | 14 | DPVYRGRNRYGYHY | +++ | + | +++ |
| 7 | 301 | 18 | 1 | 14 | DATYYGLGSHEYGY | - | ++ | - |
| 13 | 303 | 2 | 1 | 13 | GPYGSRHSGTYDY | - | (+) | n.t. |

4.3.5 Reformatierung der selektierten Nanobodies

Durch ihren Aufbau aus nur einer Domäne, lassen sich Nanobodies durch Klonierung einfach reformatieren. Nanobodies in bivalentem Format zeigen, im Vergleich zu ihren Monomeren, häufig eine erhöhte Avidität, haben aber auch die doppelte Größe. Durch die Fusion mit dem Fc-Teil eines Antikörpers gewinnen die Nanobodies die jeweiligen biologischen Effektorfunktionen des gewählten Fc-Teils. Sieben selektierte VHHs wurden in zwei Varianten des eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5 umklont. Bei Verwendung des pCSE2.5.His-Vektors bleiben die Nanobodies Monomere und lassen sich über das C-terminal fusionierte His/myc-Tag detektieren, während die Nanobodies bei Verwendung des pCSE2.5.rbFc-Vektors mit dem Fc-Teil eines Kaninchen-IgGs fusioniert werden. Wird der pCSE2.5-Vektors in HEK-6E-Zellen transfiziert, können große Mengen Protein in serumfreiem Medium hergestellt werden (Jäger *et al*, 2013).

Zur Klonierung der VHHs vom pHEN2- in den pCSE2.5-Vektor wurde das VHH-kodierende DNA-Fragment mit den Restriktionsenzymen NcoI und NotI aus dem pHEN2 Vektor geschnitten und in den mit denselben Enzymen geschnittenen Zielvektor pCSE2.5 ligiert (**Abb. 4.12**). VHH-kodierende DNA-Fragmente, die eine interne NcoI-Schnittstelle enthielten, wurden per PCR mit einer PciI-Schnittstelle an Stelle der zur Klonierung vorgesehenen NcoI-Schnittstelle ausgestattet, bevor sie mit PciI und NotI geschnitten wurden. PciI- und NcoI-Enden sind miteinander kompatibel, so dass die Vektoren keine weitere Modifikation benötigten, um erfolgreich mit den VHHs ligiert zu werden.

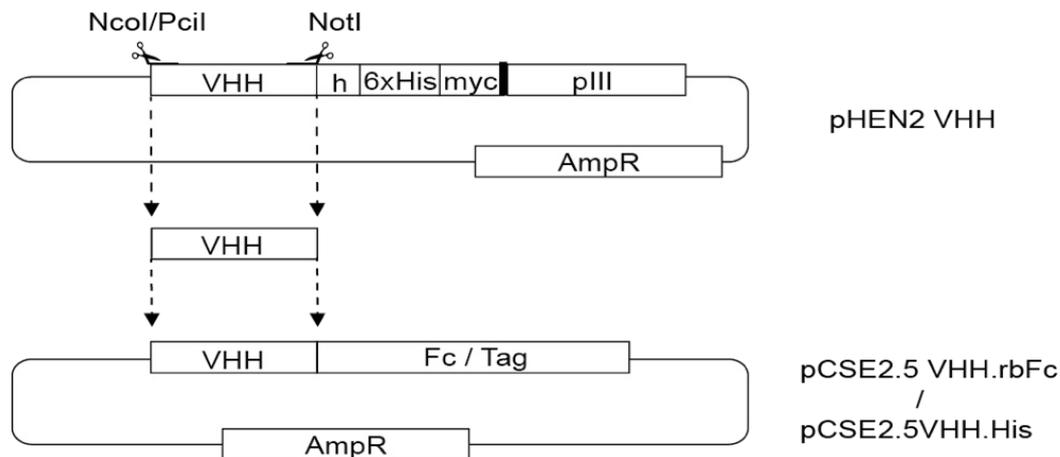


Abb 4.12 Umklonierung der VHHs in zwei Varianten des eukaryotischen Vektors pCSE2.5. Der Phagemid-Vektor pHEN2 und der eukaryotische Vektor pCSE2.5 wurden mit den Restriktionsenzymen NcoI und NotI geschnitten. Der Zielvektor wurde anschließend mit der Antarctic Phosphatase dephosphoryliert. Die herausgeschnittene VHH-DNA wurde gelelektrophoretisch aufgereinigt und in den pCSE2.5 Vektor ligiert, wobei sie mit der Sequenz des Fc-Teils des im Zielvektor enthaltenen Kaninchen-IgGs (Fc) bzw. einem His-myc-Tag (Tag) fusioniert wurden. VHH-kodierenden Fragmenten, die eine interne NcoI-Schnittstelle enthielten, wurden via PCR mit einer PciI-Schnittstelle an Stelle der zur Klonierung vorgesehenen NcoI-Schnittstelle versehen.

Die pCSE2.5-Vektoren mit umklonierten VHHs wurden verwendet, um HEK-6E-Zellen zu transfizieren. Dabei wurden die Zellen mit der jeweiligen Plasmid-DNA und JetPei-Reagenz transfiziert. Die Zellüberstände wurden nach fünf Tagen geerntet und in der SDS-PAGE analysiert. In der Coomassie-Färbung ist jeweils eine prominente Bande auf der zu erwartenden Größe zu erkennen. Dabei ist der Größenunterschied der Monomere im Vergleich zu den Kaninchen-Fc-Fusionsproteinen (rbFc) deutlich zu sehen (**Abb. 4.13 A und B**). Während die Monomere ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa aufweisen, zeigen die Fc-Fusionsproteine (nach Reduktion der intermolekularen Disulfidbrücken) ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 45 kDa. Um die Nanobodies ohne verunreinigende HEK-Zell-Proteine verwenden zu können, wurden sie affinitätschromatographisch aufgereinigt. Dabei wurden die Monomere über ihr His-Tag an eine Nickel-Nitrilotriessigsäure-(Ni-NTA-)Säule, die rbFc-Fusionsproteine über ihren Fc-Teil an eine ProteinG-Säule gebunden (**Abb. 4.13 C**), freie Proteine gewaschen und die Nanobodies mit Imidazol (Ni-NTA) bzw. einem pH-Shift (ProtG) eluiert und anschließend über eine Gelfiltration umgepuffert. VHHs wurden langfristig bei -80 °C gelagert, um eine Degradation durch Proteasen zu minimieren.

Abbildung 4.13 C zeigt, dass die Fc-Fusionsproteine an der Säule binden, da der Durchfluss (DF) im Gegensatz zum Auftrag nur sehr wenig Protein auf der erwarteten

Höhe der Nanobodies (45 kDa) zeigt. Die leere Spur der letzten Waschung (LW) lässt vermuten, dass alle nicht gebundenen Proteine erfolgreich entfernt wurden. Da die 66 kDa Bande des Markers 1 μ g aufgetragenem Protein entsprechen, lässt sich die Ausbeute aus der Ernte der HEK-Zell-Überstände nach der Aufreinigung abschätzen, bei Nb 271-rbFc etwa 3 mg in 3.5 ml nach Aufreinigung und Gelfiltration. Die Protein-haltige Lösung wurde auf ca. 1 ml eingengt und die Protein-Konzentration mit einer BCA-Standardreihe spektrometrisch ermittelt. Dabei ergaben sich Ausbeuten von 1-3.6 mg Gesamtproteinmenge. Für eine praktischere Handhabung wurden alle Nanobodies auf eine Konzentration von entweder 1 mg/ml oder 2 mg/ml eingestellt. Alle im Weiteren angegebenen Verdünnungen der Nanobodies beziehen sich auf eine Ausgangskonzentration von 1 mg/ml.

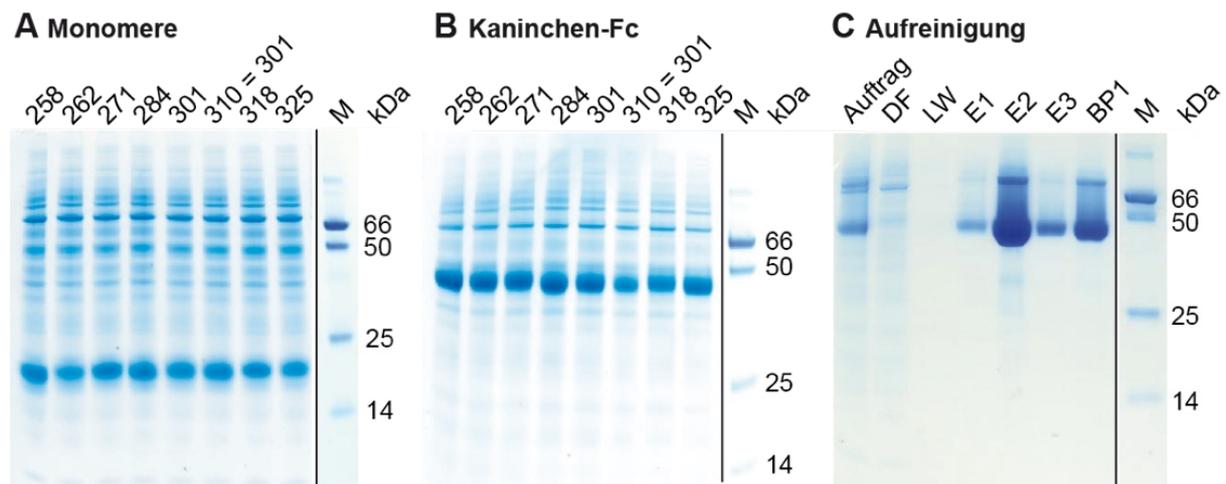


Abb. 4.13 Produktion der Nb-Monomere und Kaninchen-Fc-Fusionsproteine in HEK-6E-Zellen und anschließende Aufreinigung über ProteinG. HEK-6E-Zellen wurden mit je 20 μ g des Nanobody-kodierenden Expressionsvektors (His/Myc oder Kaninchen-Fc-Variante) transfiziert. Das Medium wurde fünf Tage nach Transfektion von den Zellen getrennt und die Proteine aus 10 μ l des Überstandes mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Anschließend wurden die Fc-Varianten über ProteinG und die Monomere über Ni-NTA (nicht dargestellt) aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde durch die Analyse eines 10 μ l-Aliquots jedes Verfahrensschrittes in der SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung kontrolliert, hier dargestellt am Beispiel des Nb 271-rbFc. **A** zeigt die SDS-PAGE der Überstände der Monomer-Varianten, **B** die SDS-PAGE der Kaninchen-Fc-Varianten. In **C** sind die verschiedenen Schritte der Aufreinigung am Beispiel des rbFc-Nb 271 dargestellt. M = Marker, Auftrag (30 ml), DF = Durchfluss (30 ml), LW = letzte Waschung (0.65 ml), E1-3 = Elution 1-3 (je 1.4 ml), BP1 = umgepuffertes Protein (3.5 ml). Es wurden jeweils 10 μ l pro Spur aufgetragen.

4.4 Charakterisierung der P2X4-bindenden Nanobodies und monoklonalen Antikörper

In diesem Abschnitt werden die in den vorangegangenen Teilen beschriebenen P2X4-spezifischen Nanobodies und monoklonalen Antikörper weiter charakterisiert. Dabei wurden diese auf ihre Bindungsspezifität gegenüber Mensch-, Maus- und Ratten-P2X4 durchflusszytometrisch untersucht und eine mögliche Kreuzreaktivität gegenüber verwandten P2X-Paralogen analysiert. Die Affinitäten zu P2X4 und mögliche Epitopüberlappungen wurden durchflusszytometrisch untersucht. Um zu testen, ob die Nanobodies oder Antikörper Einfluss auf die ATP-induzierte Kanalfunktion von P2X4 nehmen, wurden elektrophysiologische Untersuchungen an transfizierten *Xenopus*-Oozyten durchgeführt. Letzter Analysen wurden vergleichend auch mit P2X7 und P2X7-spezifischen Nanobodies durchgeführt. Im letzten Teil dieses Abschnitts wurden zwei Nanobodies und ein monoklonaler Antikörper zur Bindung von endogenem P2X4 auf Maus Peritoneal-Mastzellen eingesetzt.

4.4.1 Analyse der Bindungsspezifität der rbFc-Fusionsproteine der selektierten VHHs

Um zu überprüfen, welche P2X4-Orthologe von den selektierten Nanobodies erkannt werden, wurden HEK-293-Zellen mit Expressionsvektoren für GFP und für Y378F-mutiertes humanes, Maus- oder Wildtyp-Ratten-P2X4 transient kotransfiziert und die Bindung der Nanobodies an P2X4 durchflusszytometrisch untersucht (**Abb. 4.14**). Die mittlere Fluoreszenzintensität im GFP-Kanal zeigt eine erfolgreiche Transfektion von einer Subpopulation der Zellen an (**Abb. 4.14 A**). Diese GFP-positive Fraktion der Zellen wird durch den Nb 271-rbFc stärker angefärbt als die Fraktion der GFP-negativen Zellen. Damit kann die erfolgreiche Kotransfektion mit P2X4 bestätigt werden.

Die Histogramm-Überlagerungen zeigen jeweils vergleichend die Anfärbung der GFP-positiven Zellen mit einem Nanobody-rbFc (weiß) und als Negativkontrolle den sekundären anti-Kaninchen-igG-Antikörper alleine (grau). Nb 325-rbFc bindet spezifisch nur Maus-P2X4. Nb 262-rbFc und Nb 301-rbFc binden spezifisch humanes P2X4. Die rbFc-Fusionsproteine aus Nanobodies 271 und 284 binden alle

drei untersuchten P2X4-Orthologe, wobei 271 humanes und Maus-P2X4 stärker als 284 bindet. Nb 258-rbFc bindet mäßig sowohl humanes als auch Maus-P2X4, während Nb 318 humanes und Ratten-P2X4, dafür aber kein Maus-P2X4 färbt.

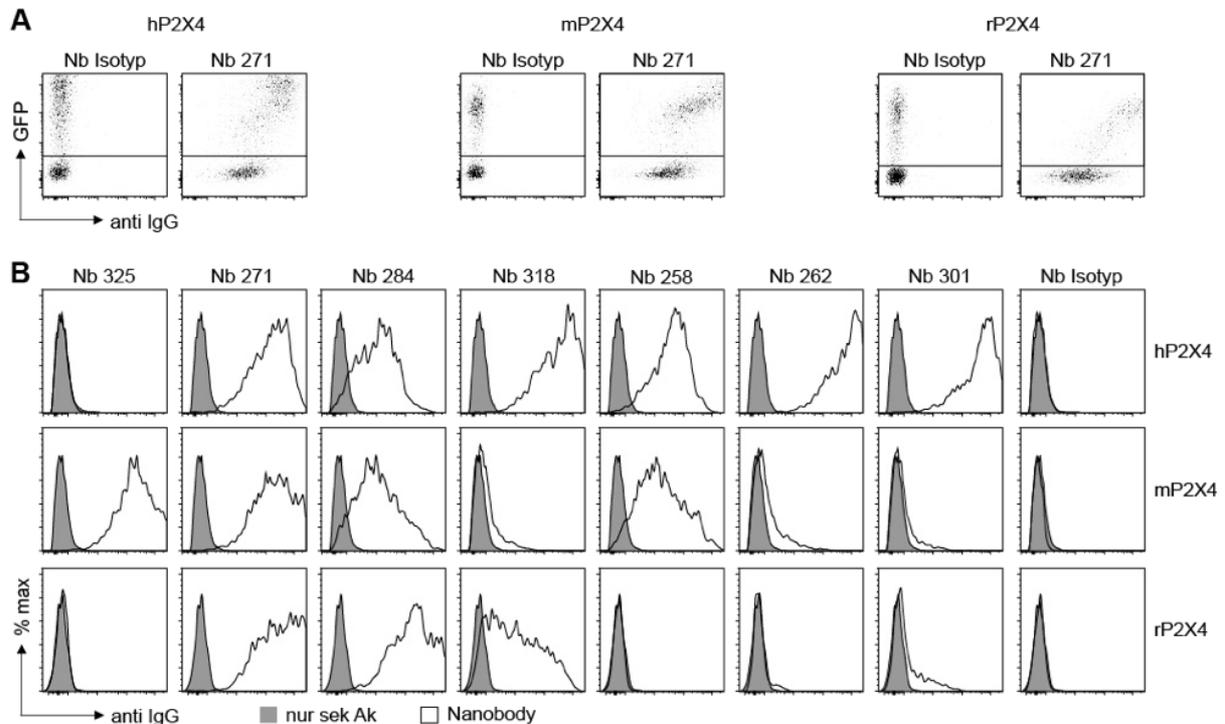


Abb. 4.14 FACS-Analyse der Bindungs-Spezifität der selektierten VHHs an transient mit humanem, murinem oder Ratten P2X4 transfizierten HEK-Zellen. Transient mit GFP und der Y378F-Mutante von humanem, Maus- oder wt-Ratten-P2X4 transfizierte HEK-Zellen wurden mit Nb-rbFc bzw. Kaninchen-Antikörpern angefärbt. Die Detektion gebundener Nanobodies erfolgte mit einem anti-Kaninchen-IgG-AF647. Bei der Auswertung wurde ein 'gate' auf GFP+ Zellen gesetzt. (A) zeigt den Nachweis der P2X4-Expression der verwendeten transfizierten HEK-Zellen. In (B) sind die Anfärbungen der Nanobodies gegen P2X4 in offener Form dargestellt. In grau ist die Färbung mit dem AF-647-gekoppelten Sekundärantikörper alleine als Negativkontrolle gezeigt.

Im Weiteren sollte eine mögliche Kreuzreaktivität mit den zwei am nächsten verwandten paralogen P2X-Familienmitgliedern P2X1 und P2X7 untersucht werden (Abb. 4.15). Dazu wurden HEK-Zellen mit P2X1 und P2X7, Maus und human, transfiziert und mit den Nanobody-rbFcs und einem fluoreszenzgekoppelten anti-Kaninchen-IgG Zweitantikörper gefärbt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Transfektion wurde jeweils ein P2X1- bzw. P2X7-spezifischer Antikörper/Nanobody als Positivkontrolle mitgeführt.

Die Histogramm-Überlagerungen der GFP-positiven Zellen zeigen jeweils die Anfärbung mit einem Nanobody-rbFc (weiß) und die Negativkontrolle (nur Sekundärantikörper - grau). Die Positivkontrollen zeigen eine deutliche Oberflächenexpression der transfizierten Proteine. Keiner der Nanobodies reagiert

mit Maus- oder humanem P2X1/P2X7; einzig Nanobody 301 bindet schwach an Human- und Maus-P2X7.

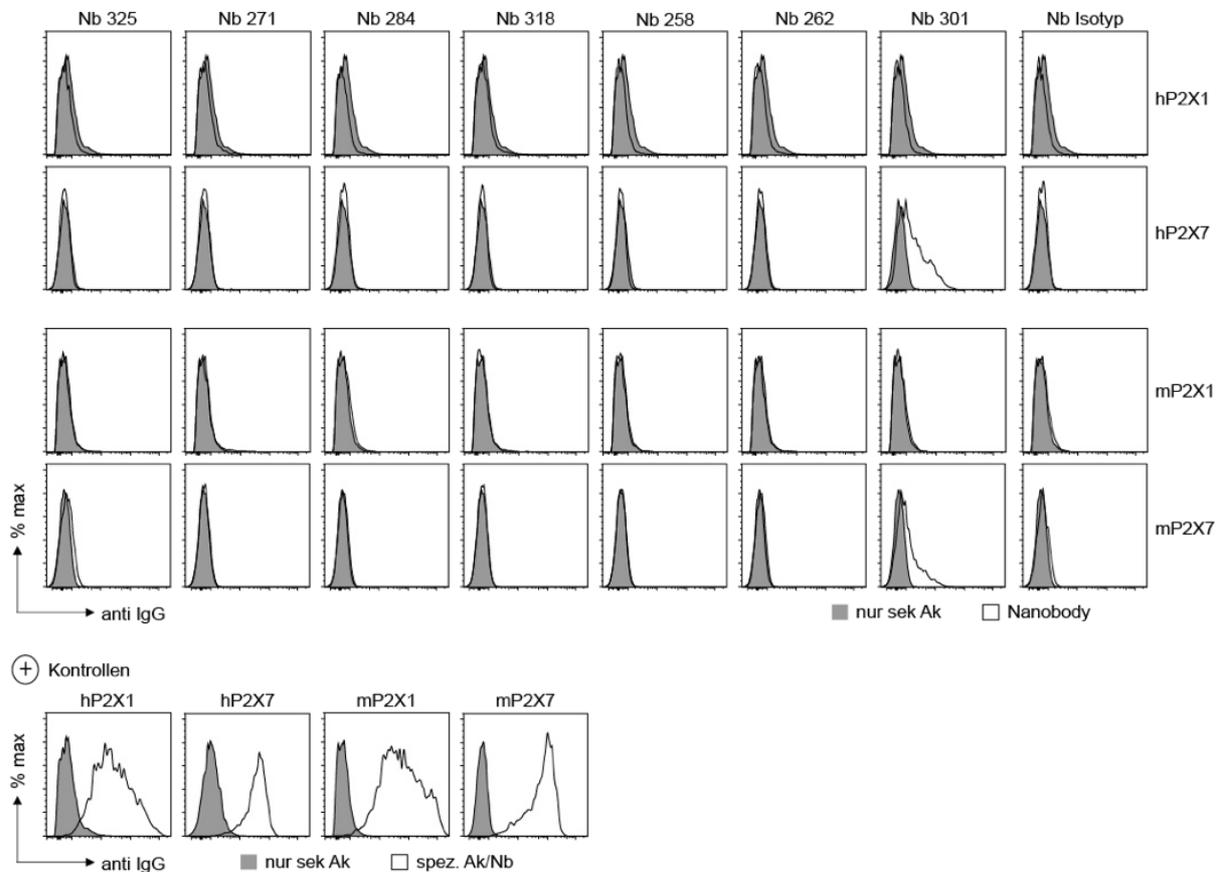


Abb. 4.15 FACS-Analyse der Bindungs-Spezifität der selektierten VHHs an transient mit humanem P2X1 oder P2X7 oder transient mit murinem P2X1 oder P2X7 transfizierten HEK-Zellen. Transient mit GFP und mit humanem P2X1 oder P2X7 oder murinem P2X1 oder P2X7 transfizierte HEK-Zellen wurden mit Nb-rbFc bzw. Kaninchen-Antikörpern angefärbt. Die Detektion gebundener Nanobodies und Antikörper erfolgte mit einem anti-Kaninchen-IgG-AF647. Bei der Auswertung wurde ein 'gate' auf GFP+ Zellen gesetzt. (+) Kontrollen zeigen den Nachweis der P2X1/7-Expression der verwendeten transfizierten HEK-Zellen durch die erfolgreiche Anfärbung mit polyklonalen Kaninchen Antikörpern bzw. Nb-rB Fc (pAb 9316 für hP2X1, Nb1c81-rbFc für h/mP2X7, pAb CR30 für mP2X1). Kontroll Färbungen mit dem Sekundäntikörper alleine sind in grau dargestellt.

Die Spezifität der Nanobodies gegenüber einer oder mehrerer Orthologe von P2X4, ohne Kreuzreaktivität gegenüber Paralogen wie P2X1 oder P2X7, ist eine wichtige Eigenschaft für spätere Experimente, *in vivo* und *ex vivo*. Dadurch lässt sich das Risiko für etwaige ungewollte Einflüsse auf verwandte Rezeptoren, die z.B. mit P2X4 zusammenwirken, minimieren und eine Aussage treffen, die sich allein auf die Rolle von P2X4 stützt.

4.4.2 Analyse der Bindungsaffinitäten

Um Aufschluss darüber zu erhalten wie fest die Bindung der monoklonalen Antikörper und der beiden Nanobody-Formate an P2X4 ist, wurde ein Bindungsaffinitätsassay durchgeführt (**Abb. 4.16**). Dabei wurden HEK-Zellen mit Maus- oder humanem P2X4 transient transfiziert. Eine Hälfte der Zellen wurde mit eFluor450 irreversibel markiert, während parallel die andere Hälfte mit den verschiedenen AF647-konjugierten Antikörpern oder Nanobodies angefärbt wurde. Die Zellen wurden getrennt durchflusszytometrisch analysiert und anschließend in einem äquivalenten Verhältnis miteinander gemischt und dann zu verschiedenen Zeitpunkten erneut im Durchflusszytometer analysiert. Die zu Anfang nur eFluor-gefärbten Zellen werden - abhängig von der Dissoziation des jeweiligen Antikörpers bzw. Nanobodies - zunehmend AF647-positiv. Die Geschwindigkeit der Umverteilung der Fluorochrom-konjugierten Nanobodies/Antikörper ist dabei indirekt proportional zu der Bindungsaffinität an P2X4.

Abbildung 4.16 zeigt exemplarisch Dot-Plot-Analysen für einen monoklonalen Antikörper (A19) sowie für den Nanobody 301 in bivalenter und in monovalenter Form. Graphisch dargestellt ist daneben die Änderung der mittleren AF647-Fluoreszenzintensität (MFI) von eFluor-positiven und eFluor-negativen Zellpopulationen über die Zeit. Die beiden Kurven treffen sich bei einer vollständigen Umverteilung der Fluorochrom-konjugierten Antikörper auf beide Zellpopulation. Dies ist im Falle der beiden monoklonalen Antikörper (RG96A19, RG96A344) selbst nach 24 h Inkubationszeit noch nicht erreicht. Die MFI-Kurven der mit den monoklonalen Antikörpern gefärbten, eFluor-positiven und eFluor-negativen Zellen nähern sich einander also vielfach langsamer an als die der Nanobodies. Dies spricht für eine langsamere Dissoziation, d.h. höhere Bindungsaffinität der monoklonalen Antikörper. Es fällt ferner auf, dass die beiden monoklonalen Antikörper sowie zwei Nb-rbFc (301 und 262) eine viel höhere Ausgangsfluoreszenz zeigen als die monovalente Form des Nanobodies 301 und einige Nb-rbFcs (284, 258). Dies deutet auf eine effizientere/stärkere Markierung der ersteren mit dem Fluorochrom Alexa 647.

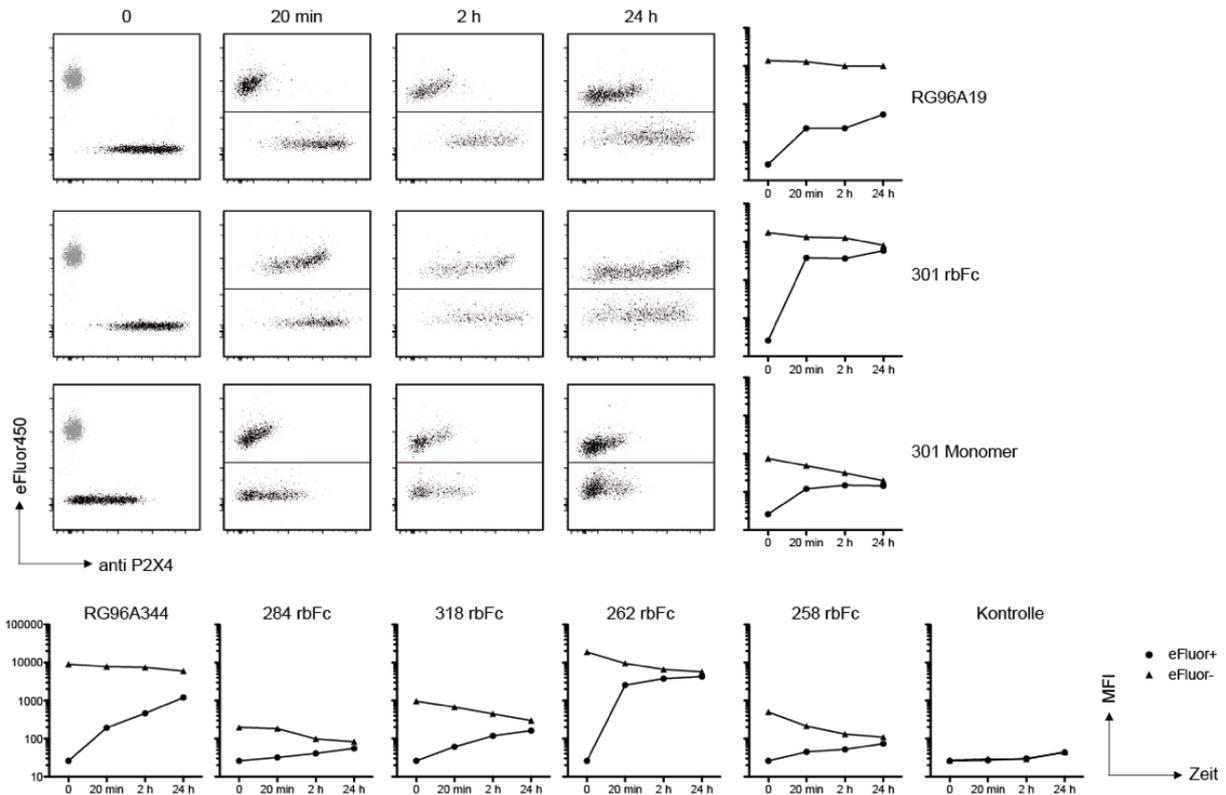


Abb. 4.16 Vergleichende Analyse der Bindungsaffinitäten der selektierten Nanobodies und monoklonalen Antikörper. Transient mit GFP und humanem P2X4 (Y378F) transfizierte HEK-Zellen wurden in zwei gleich große Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde irreversibel mit dem Zellfarbstoff eFluor450 markiert, die andere Hälfte wurde mit dem jeweiligen AF647-konjugierten Antikörper oder Nanobody gefärbt. Die beiden Aliquots wurden 1:1 gemischt und zu verschiedenen Zeitpunkten im Durchflusszytometer analysiert. Bei der Auswertung wurde ein 'gate' auf GFP+ Zellen gesetzt. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der eFluor-positiven und -negativen Zellen wurde gegen die Zeit aufgetragen.

In folgender **Abbildung 4.17** ist eine entsprechende Analyse der Bindungsaffinität der für Maus-P2X4 spezifischen Antikörper und Nanobodies gezeigt. Nanobody 271 wurde in monovalentem und bivalentem Format untersucht. Wie schon bei den oben gezeigten hP2X4-spezifischen Antikörpern/Nanobodies zeigen die monoklonalen Antikörper die höchste Affinität für P2X4, gefolgt von den bivalenten Nanobodies. Die mit der monovalenten Form von Nb 271 gefärbten Zellen zeigen schon zum Startzeitpunkt eine sehr geringe MFI, die sich nach Mischung mit den eFluor-positiven Zellen noch verringert.

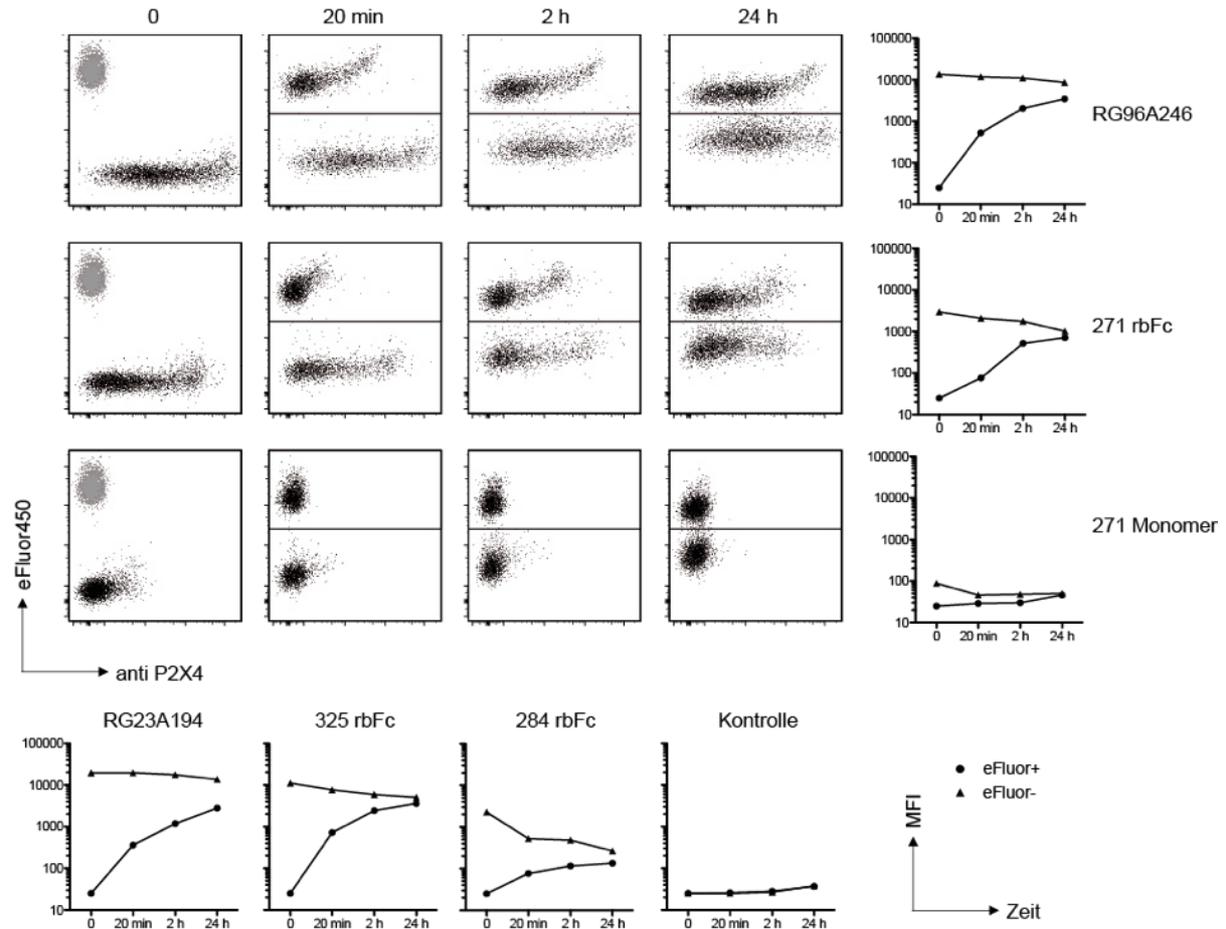


Abb. 4.17 Vergleichende Analyse der Bindungsaffinitäten der selektierten Nanobodies und monoklonalen Antikörper. Transient mit GFP und Maus-P2X4 (Y378F) transfizierte HEK-Zellen wurden in zwei gleich große Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde irreversibel mit dem Zellfarbstoff eFluor450 markiert, die andere Hälfte wurde mit dem jeweiligen AF647-konjugierten Antikörper oder Nanobody gefärbt. Die beiden Aliquots wurden 1:1 gemischt und zu verschiedenen Zeitpunkten im Durchflusszytometer analysiert. Bei der Auswertung wurde ein 'gate' auf GFP+ Zellen gesetzt. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der eFluor-positiven und -negativen Zellen wurde gegen die Zeit aufgetragen.

4.4.3 Vergleichende Analyse der Bindungsepitope

Um zu analysieren ob die selektierten P2X4-spezifischen Nanobodies und Antikörper an unterschiedlichen oder an überlappenden Epitopen binden, wurden GFP/P2X4-kotransfizierte HEK-Zellen mit einem Überschuss nicht-konjugierter Nanobodies oder Antikörper inkubiert, um alle Epitope dieses Nbs/Aks zu besetzen. Anschließend wurde eine kleine Menge desselben oder eines anderen Nb/Ak in AF647-gekoppelter Variante hinzugefügt. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurden die Zellen dahingehend untersucht, ob der zweite Fluorochrom-konjugierte Nanobody/Antikörper P2X4 binden konnte, oder ob das für ihn spezifische Epitop bereits von dem ersten Antikörper blockiert war. Diese Analyse erfolgte über die

Detektion der AF647-Fluoreszenz des zweiten Antikörpers/Nanobodies im Durchflusszytometer.

An humanem P2X4 wurden Fluorochrom-Konjugate des Nanobody 301, sowie der monoklonalen Antikörper A19 und A344 untersucht (**Abb. 4.18**). Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Färbung der GFP-positiven Zellen durch die drei unblockierten Aks/Nbs, während die Vorinkubation mit den entsprechenden ungekoppelten Varianten (Selbstblockade) erwartungsgemäß zu einer starken Minderung der Färbung führt. Die vier zur Vorinkubation verwendeten monoklonalen Antikörper (A19, A128, A133 und A344) blockieren die hier untersuchten hP2X4-Binder ebenfalls fast vollständig. Ähnlich verhält sich der Nb 301, während die drei weiteren untersuchten Nbs (Nb 258, Nb 262 und Nb 318) nicht oder nur partiell blockieren. Die Fluoreszenzintensität der mit Nb 301-rbFc gefärbten Zellen wird durch Vorinkubation mit Nb 262 oder Nb 318 deutlich, durch Vorinkubation mit Nb 258 nur gering abgeschwächt wurde.

Das Muster der Blockierung der monoklonalen Antikörper A19 und A344 durch die anderen Ak/Nbs ist sehr ähnlich. Beide werden von den Nanobodies 262 und 318 deutlich, 20-40 % der maximalen MFI (**Mittlere Fluoreszenz-Intensität**), blockiert. Die Vorinkubation mit Nb 258 verringert ihre MFI auf 70-80 %.

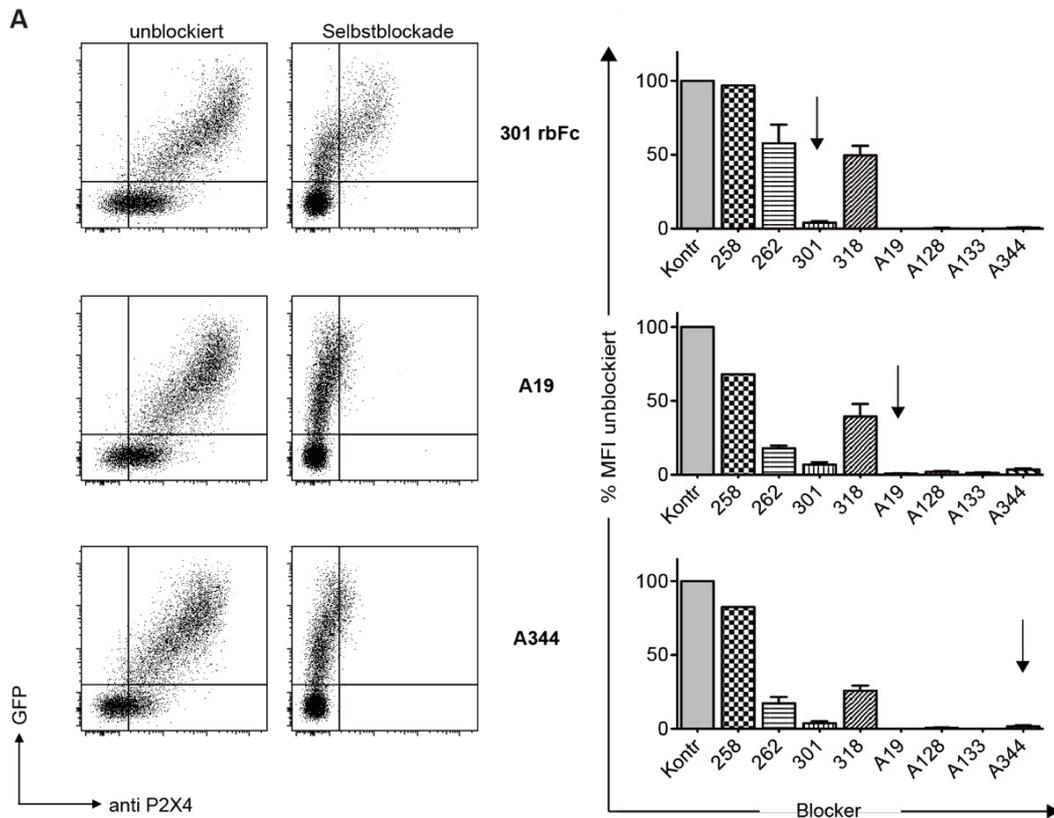


Abb. 4.18 Kreuzblockadeassay zur Bestimmung von Epitopüberlappungen der anti-hP2X4-VHVs und -mAbs. Transient mit GFP und der Y378F-Mutante von humanem P2X4 kotransfizierte HEK-Zellen wurden mit 5 μg VHH oder mAks (Blocker) für 30 min bei 4 $^{\circ}\text{C}$ vorinkubiert und anschließend nach Zugabe von 0.1 μg AF647-gekoppeltem VHH/mAk für 20 min weiter inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die exemplarisch dargestellten DotPlots zeigen Färbungen mit AF647-gekoppelten Antikörpern nach Vorinkubation mit einem irrelevanten Nanobody (unblockiert) bzw. mit dem ungekoppelten Antikörper (Selbstblockade). Die Balkendiagramme zeigen die quantitative Auswertung der Blockade (als % maximale MFI = unblockiert) der u.a. Antikörper/Nbs auf die in fett gedruckten Fluorochrom-konjugierten Antikörper/Nanobodies. Der Pfeil markiert die Selbstblockade mit dem Detektorantikörper. $n = 3$.

An Maus-P2X4 wurde die Blockade von Nb 325, sowie der monoklonalen Antikörper A194 und A246 untersucht (**Abb. 4.19**). Wieder führt die Vorinkubation mit den drei monoklonalen Antikörpern (A194, A246 und A225) zu einer fast vollständigen Blockade der untersuchten Fluorochrom-Konjugate. Nb 325-rbFc wird von allen verwendeten monoklonalen Antikörpern stark blockiert, während die Vorinkubation mit Nb 271 die MFI der P2X4-Färbung verstärkt. Nb 284 verringert die MFI auf ca. 70 %. Auch die monoklonalen Antikörper A194 und A246 blockieren sich gegenseitig und werden von mAks A225 blockiert. Hingegen wird die Bindung der monoklonalen Antikörper durch Vorinkubation mit den Nanobodies nicht (Nb 271) bzw. nur partiell (Nb 284, Nb 325) blockiert.

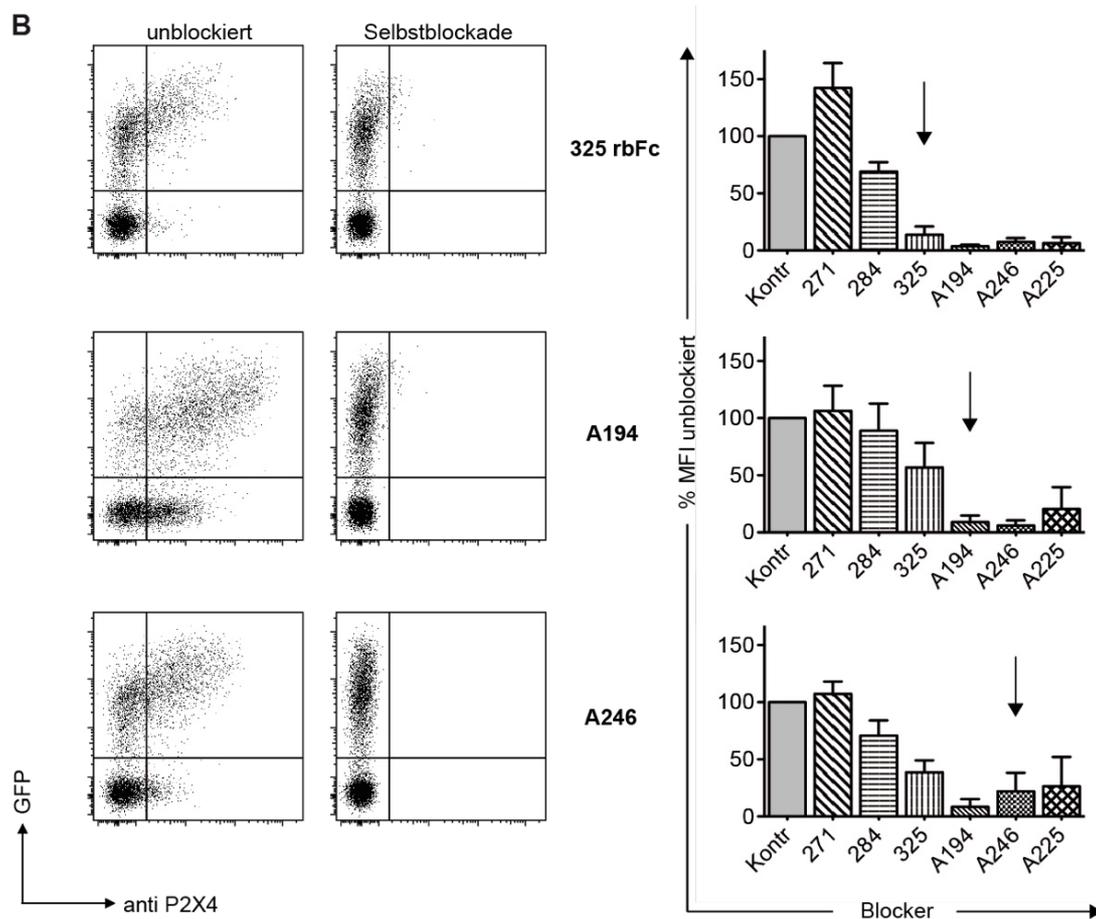


Abb. 4.19 Kreuzblockadeassay zur Bestimmung von Epitopüberlappungen der anti-mP2X4-VHVs und -mAbs. Transient mit GFP und der Y378F-Mutante von Maus-P2X4 kotransfizierte HEK-Zellen wurden mit 5 μg VHH oder mAk (Blocker) für 30 min bei 4 °C vorinkubiert und anschließend nach Zugabe von 0.1 μg AF647-gekoppeltem VHH/mAk für 20 min weiter inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die exemplarisch dargestellten DotPlots zeigen Färbungen mit AF647-gekoppelten Antikörpern nach Vorinkubation mit einem irrelevanten Nanobody (unblockiert) bzw. mit dem ungekoppelten Antikörper (Selbstblockade). Die Balkendiagramme zeigen die quantitative Auswertung der Blockade (als % maximale MFI = unblockiert) der u.a. Antikörper/Nbs auf die in fett gedruckten Fluorochrom-konjugierten Antikörper/Nanobodies. Der Pfeil markiert die Selbstblockade mit dem Detektorantikörper. $n \geq 3$.

Der Kreuzblockadeassay zeigt, dass die monoklonalen Antikörper ähnliche bzw. überlappende Epitope binden. Die starke gegenseitige Blockade lässt voneinander unabhängige Epitope auf P2X4 sehr unwahrscheinlich erscheinen. Die Nanobodies 258, 284 und 271 beeinflussen die Bindung der anderen Nanobodies/Antikörper nur gering. Ob dieser Umstand einer insgesamt schwachen Bindung oder einem unabhängigen Epitop geschuldet ist, muss in weiterführenden Versuchen geklärt werden.

4.4.4 Untersuchung des Einflusses der Nanobodies auf die Funktion von P2X4

Zur Ermittlung eines eventuellen Einflusses der vorangehend selektierten Nanobodies auf die Rezeptor- oder Kanalfunktion von P2X4 wurden Patch-Clamp-Analysen von ATP-induzierten Spannungsänderungen in mit wt-P2X4-Expressionsvektoren transfizierten *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt. Dabei wurden die Oozyten circa 72 h nach Transfektion in einer Messkammer mit zwei Elektroden fixiert und dauerhaft mit Ringerlösung umspült. Für eine Zeitspanne von 5 s wurden 10 μ M ATP in Ringerlösung durch die Kammer gespült und dadurch P2X4 aktiviert. Der daraus resultierende Ionenflux bewirkt eine Spannungsänderung, die von den Messelektroden detektiert wird. Wenn die Bindung der Nanobodies an P2X4 einen Einfluss auf die Öffnung des Ionenkanals hat, sollte sich dies in einer veränderten Spannungsamplitude niederschlagen.

Um die etwaigen Einflüsse der anti-P2X4-Nanobodies zu untersuchen wurden die mit P2X4 transfizierten Oozyten auf ihre Sensitivität für ATP getestet. Für den Versuch wurden nur jene Oozyten verwendet, die auf einen 10 μ M ATP-Stimulus eine Spannungsänderung zeigten. Diese wurden für 20 min mit den jeweiligen Nanobodies oder einer Isotypkontrolle vorinkubiert und anschließend wie oben beschrieben mit ATP stimuliert und die resultierende Spannungsänderung dokumentiert.

Teil A der **Abbildung 4.20** zeigt die ATP-induzierten Spannungsänderungen von repräsentativen Oozyten, in Anwesenheit der jeweiligen anti-hP2X4- oder dem Kontrollnanobody. In Teil B ist die quantitative Analyse von jeweils fünf Oozyten gezeigt. Die mit anti-hP2X4-Nanobodies inkubierten Oozyten zeigen tendenziell eine Erhöhung der ATP-induzierten Spannungsänderung im Vergleich zu Oozyten bei Kontrollbedingung. Diese Änderung weist nach Quantifizierung keine Signifikanz auf.

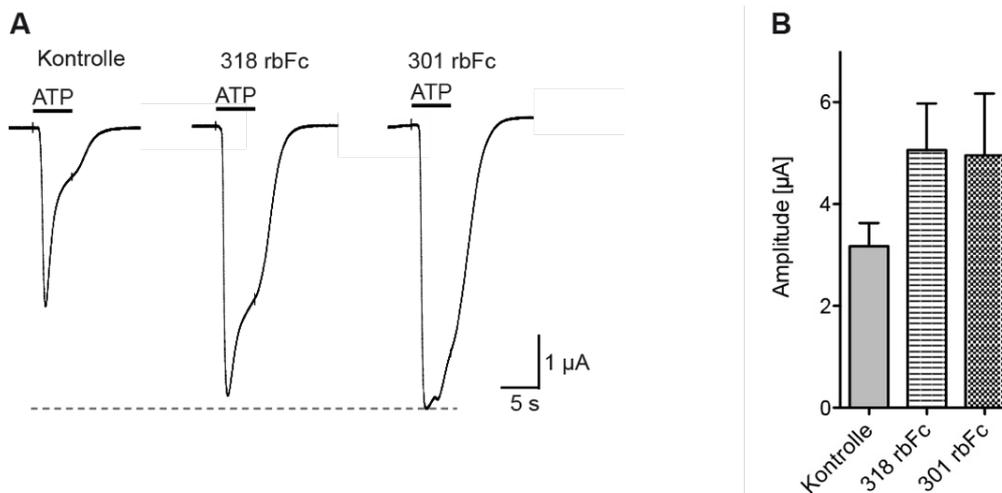


Abb. 4.20 Patch-Clamp-Analysen ATP-induzierter Spannungsänderungen in hP2X4-transfizierten *Xenopus* Oozyten. Die Oozyten wurden mit den Nb-rbFc-Fusionsproteinen oder einer Isotypkontrolle für 20 min bei RT vorinkubiert und anschließend für 5 s mit ATP (10 μ M) umspült. **A)** repräsentative Aufnahmen von einzelnen Oozyten. **B)** Quantitative Analyse von n = 5 Oozyten.

Ähnlich zeigt es sich bei den mit mP2X4 transfizierten Oozyten (**Abb. 4.21**). Die Tendenz zu einem leicht blockierenden Einfluss der anti-mP2X4-Nanobodies auf den Ionenkanal ist in der Quantifizierung von sieben Oozyten (**Abb. 4.21 Teil B**) nicht signifikant. Die getesteten Nanobodies gegen P2X4 zeigen keinen in diesem System messbaren Einfluss auf die ATP-induzierte Kanal-Funktion von P2X4.

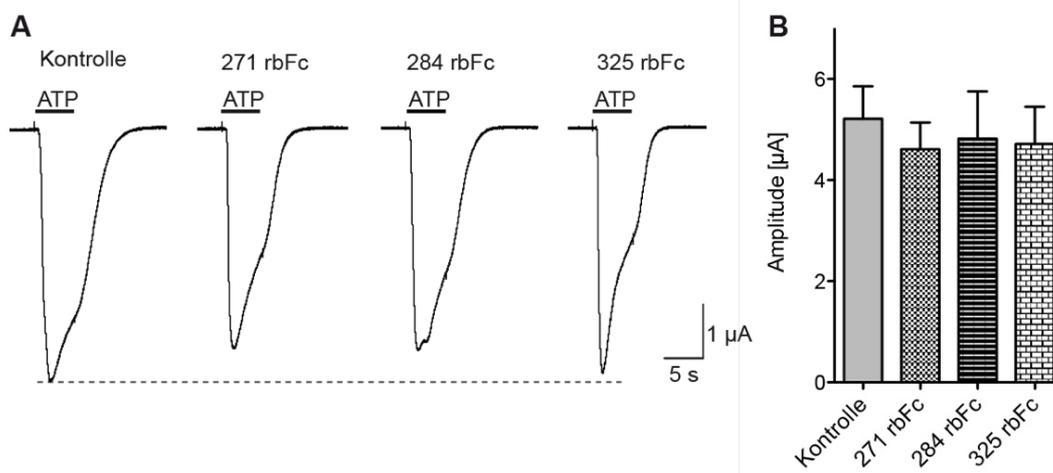


Abb. 4.21 Patch-Clamp-Analysen ATP-induzierter Spannungsänderungen in mP2X4-transfizierten *Xenopus* Oozyten. Die Oozyten wurden mit den Nb-rbFc-Fusionsproteinen oder einer Isotypkontrolle für 20 min bei RT inkubiert und anschließend für 5 s mit ATP (10 μ M) umspült. **A)** repräsentative Aufnahmen von einzelnen Oozyten. **B)** Quantitative Analyse von n = 7 Oozyten.

4.4.5 Untersuchung des Einflusses von Nanobodies auf die Funktion von P2X7

Der o.g. Versuchsaufbau wurde ferner eingesetzt, um den Einfluss von P2X7-spezifischen Nanobodies auf die Ionenkanalaktivität von P2X7 zu untersuchen. P2X7 ist das Mitglied der P2X-Rezeptorfamilie mit der höchsten Aminosäuresequenz-homologie zu P2X4 (human ca. 50 %) (Soto *et al*, 1996; Craigie *et al*, 2013). P2X7 und P2X4 werden von benachbarten Genen auf Chromosom 12 kodiert (Garcia-Guzman *et al*, 1997; Buell *et al*, 1998). Vorherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass Nb 13A7 die Aktivierung von P2X7 blockiert, Nb 14D5 dessen Funktion steigert (Danquah, 2012). Allerdings war bisher unbekannt, ob diese Nanobodies auch die ATP-induzierte Ionenkanalaktivität beeinflussen.

Dazu wurden *Xenopus* Oozyten mit P2X7 transfiziert und mit dem jeweiligen P2X7-spezifischen Nb-Fc-Fusionsprotein, oder in Barth's-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die ATP-induzierte Spannungsänderung gemessen. Da P2X7 weniger sensitiv für ATP ist als P2X4 wurden für diesen Versuch 100 μ M ATP verwendet.

In **Abbildung 4.22 A** sind die Spannungsänderungen von drei repräsentativen Messungen gezeigt. In Teil B der Abbildung sind die ermittelten Amplituden von acht verschiedenen Oozyten pro Kondition quantitativ analysiert. Nb 13A7 verhindert die ATP-induzierte Spannungsänderung nahezu vollständig, während Nb 14D5 die ATP-induzierte Spannungsänderung um mehr als das Zehnfache verstärkt.

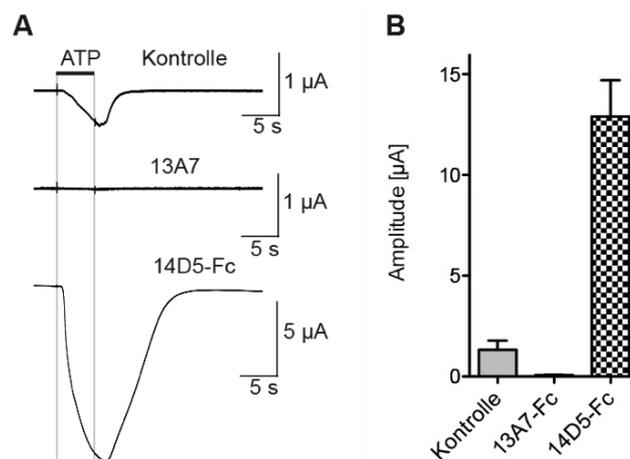


Abb. 4.22 Patch-Clamp-Analysen ATP-induzierter Spannungsänderungen in P2X7-transfizierten *Xenopus* Oozyten. Die Oozyten wurden mit Nb-msFc-Fusionsproteinen oder einer Isotypkontrolle für 20 min bei RT inkubiert und anschließend für 5 s mit ATP (100 μ M) umspült. **A)** repräsentative Aufnahmen von einzelnen Oozyten. **B)** Quantitative Analyse von n = 8 Oozyten.

Die blockierende bzw. verstärkende Wirkung der beiden Nanobodies auf die Ionenkanalfunktion von P2X7 ließ sich somit auch in dem verwendeten Versuchsaufbau bestätigen.

4.4.6 Verwendung der Nanobodies und Antikörper zur Detektion von endogenem P2X4 auf peritonealen Immunzellen der Maus

Vorherige Untersuchungen an rekombinantem P2X4 und P2X7 hatten gezeigt, dass P2X4 vorwiegend in Lysosomen lokalisiert ist, während P2X7 vorwiegend auf der Plasmamembran exprimiert wird (Boumechache *et al*, 2009). Durch Stimulation der lysosomalen Exozytose gelangt P2X4, ähnlich wie andere lysosomale Membranproteine (z.B. Lamp-1) verstärkt auf die Zelloberfläche (Qureshi *et al*, 2007). Expressionsanalysen auf mRNA Ebene hatten zudem gezeigt, dass P2X4 und P2X7 häufig koexprimiert werden (Guo *et al*, 2007). Bei Mastzellen, die eine hohe Expression von P2X7 auf der Zelloberfläche zeigen, führt die Behandlung mit ATP zu einer lysosomalen Exocytose (Sudo *et al*, 1996).

Um die Verwendbarkeit der in dieser Arbeit beschriebenen P2X4-spezifischen Antikörper und Nanobodies zur Detektion von endogenem P2X4 auf der Zelloberfläche zu untersuchen, wurde ein Degranulationsassay mit murinen Mastzellen durchgeführt. Als Kontrolle dienten Mastzellen aus P2X4-defizienten Mäusen. Dabei wurden C57BL/6-wildtyp (WT) und C57BL/6-P2X4^{-/-} Mäusen Peritonealzellen entnommen und diese in An- und Abwesenheit von ATP stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Zelltypmarkern für Mastzellen (FceR1) und Makrophagen (CD11b), sowie mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und Nanobodies gegen P2X4 und gegen LAMP1 (CD107a) angefärbt (**Abb. 4.23**).

Während unbehandelte Mastzellen nur schwach mit CD107a-spezifischen Antikörpern angefärbt werden (**Abb. 4.23 D**, graue Histogramme), zeigt sich eine deutliche Steigerung der Anfärbung nach Stimulation der Zellen mit ATP (offene Histogramme). Dies deutet an, dass eine Degranulation stattgefunden hat, d.h. die Lysosomen mit der Zellmembran fusionieren und dadurch die luminalen Domänen der lysosomalen Membranproteine auf die Zelloberfläche transloziert werden. Ein ähnliches Färbemuster zeigt sich auch für P2X4-spezifische Antikörper und Nanobodies bei Mastzellen aus Wildtypmäusen (**Abb. 4.23, Paneele A-C**). Die

entsprechenden Kontrollen - Mastzellen aus P2X4^{-/-} Mäusen - werden nicht durch P2X4-spezifische Antikörper oder Nanobodies angefärbt. Diese Ergebnisse deuten an, dass nach ATP-Stimulation auch das lysosomal lokalisierte P2X4, zusammen mit LAMP1, auf der Oberfläche der Mastzellen der WT-Mäuse exponiert wird.

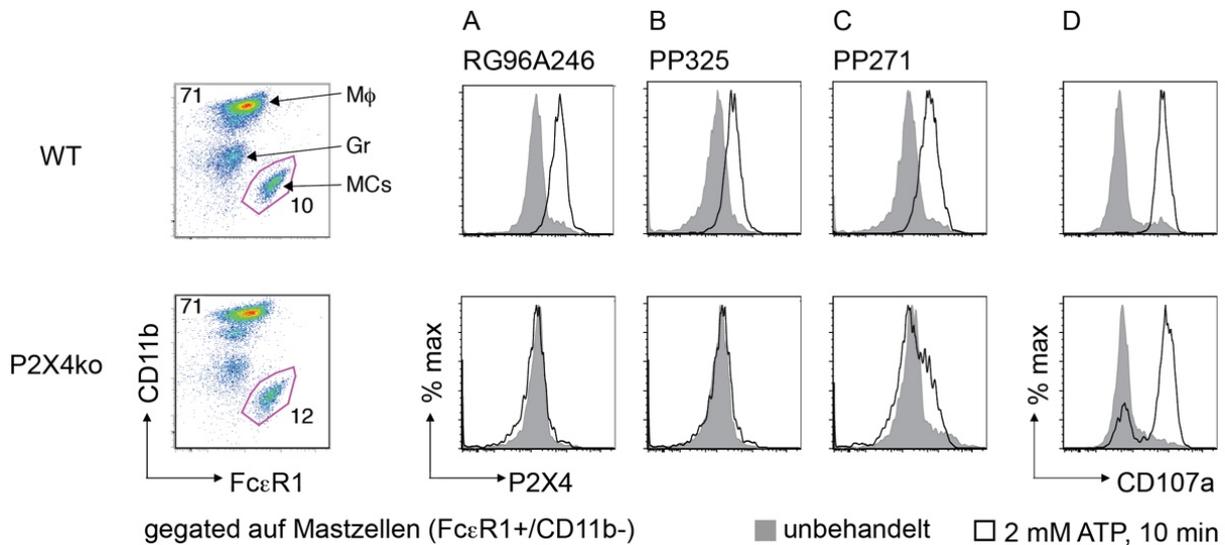


Abb. 4.23 Extrazelluläres ATP induziert die Exposition von P2X4 auf peritonealen Mastzellen und Makrophagen. Peritonealzellen von C57BL/6-wildtyp (WT) und P2X4^{-/-} (ko) Mäusen wurden für 10 min bei 37 °C mit (offene Histogramme) oder ohne (graue Histogramme) 2 mM ATP inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und bei 4 °C mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und Nanobodies gegen P2X4 (Alexa647) (**A-C**), CD107a (LAMP1-FITC) (**D**), CD11b (PerCP) und FcεR1 (PE) angefärbt. Gegated wurde auf Mastzellen (CD11b^{lo}, FcεR1⁺). Mφ = Makrophagen, MC = Mastzellen, Gr = Granulozyten. Die Analyse der Peritonealzellen wurde von Björn Rissiek am Institut für Immunologie des UKE durchgeführt.

Dieser Versuch zeigt, dass extrazelluläres ATP bei Mastzellen ein Degranulationsereignis auslösen kann, bei dem verschiedene lysosomale Proteine auf die Zelloberfläche gelangen.

Außerdem dient das Ergebnis als *proof of principle* für die Eignung des verwendeten Antikörpers A246 und der Nanobodies 325 und 271 als Werkzeuge für den Nachweis von nativem, endogenem P2X4 auf der Zelloberfläche.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mittels der Hybridomatechnik und der Phagen-Display-Technik monoklonale Antikörper und Nanobodies gegen P2X4 aus immunisierten Ratten und Lamas gewonnen werden können (**Abb. 4.02** und **Abb. 4.11**). Darüber hinaus wurde ein stabiles Expressionssystem für murines P2X4 in HEK-Zellen generiert. Die P2X4-transfizierten Zellen konnten zur Selektion von P2X4-bindenden Phagen in der Phagen-Display-Technik eingesetzt werden (**Abb. 4.04**). Die kodierenden DNA-Sequenzen der P2X4-spezifischen VHHs wurden in einen eukaryotischen Vektor umklontiert und die entsprechenden Proteine als Monomere und Fc-Fusionsproteine produziert (**Abb. 4.13**). Für mehrere monoklonale Antikörper und Nanobodies konnte eine Spezifität für mindestens ein P2X4-Homolog (Human-, Maus- oder Ratten-P2X4) nachgewiesen (**Abb. 4.14**) und gleichzeitig Kreuzreaktivitäten mit anderen Mitgliedern der P2X-Familie ausgeschlossen werden (Ausnahme Nb 301) (**Abb. 4.15**). Die in dieser Arbeit generierten Antikörper und Nanobodies erkennen P2X4 in seiner nativ gefalteten Konformation. Im Gegensatz dazu können die meisten kommerziell verfügbaren anti-Peptid-Antikörper P2X4 in denaturierter Form z.B. im *Western Blot*, nicht aber in nativer Konformation erkennen (Möller *et al*, 2007).

In dieser Arbeit wurden die generierten Antikörper und Nanobodies hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität, überlappender Epitope auf P2X4 und hinsichtlich ihres Einflusses auf die P2X4-Funktion charakterisiert. In **Tabelle 9** werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen vergleichend dargestellt. Dabei sind die Antikörper und Nanobodies nach ihrer Spezifität für Human und Maus P2X4-Homologe sortiert. Die vielversprechendsten Kandidaten sind rot markiert.

Tab. 9 Charakteristika der generierten monoklonalen Antikörper und Nanobodies

| mAb, Nb | Spezi- fität | Kreuz- reaktivität P2X4 | Kreuz- reaktivität P2X1, P2X7 | Epitop | Markierungs- stärke indirekt | Markierungs- stärke direkt | Dissozia- tion |
|--------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| mAb A344 | h | - | nu | h1 | +++ | +++ | l |
| mAb A19 | h | - | nu | h1 | ++ | +++ | l |
| mAb A128 | h | - | nu | h1 | nu | nu | nu |
| mAb A133 | h | - | nu | h1 | nu | nu | nu |
| Nb 318 | h | r | - | h1 | +++ | ++ | m |
| Nb 301 | h | - | m7, h7 | h1 | +++ | +++ | m |
| Nb 262 | h | - | - | h1 | +++ | +++ | s |
| Nb 258 | h | m | - | h2 | ++ | + | s |
| | | | | | | | |
| mAb A246 | m | - | nu | m1 | ++ | +++ | l |
| mAb A194 | m | - | nu | m1 | nu | +++ | l |
| mAb A225 | m | - | nu | m1 | +++ | nu | nu |
| Nb 325 | m | - | - | m1 | +++ | +++ | m |
| Nb 271 | m | r, h | - | m2 | +++ | ++ | m |
| Nb 284 | m | r, h | - | m3 | ++ | + | s |
| | | | | | | | |
| Abbildungen | 4.02, Tab2, 4.11, 4.14 | 4.02, Tab2, 4.11, 4.14 | 4.15 | 4.18, 4.19 | 4.02, Tab2 4.11, 4.14 | 4.16, 4.17, 4.18, 4.19 | 4.16, 4.17 |

- = keine, nu = nicht untersucht

Markierungsstärke (MFI) + 100-1000, ++ 1.000-10.000, +++ > 10.000

Dissoziation (Δ MFI/2h): s = schnell (> 50%) m = mittel (20-50%) l = langsam (<20%)

Sieben Nanobodies und sieben monoklonale Antikörper erkennen mindestens ein Homolog von P2X4. Je vier monoklonale Antikörper (A19, A128, A133, A344) und Nanobodies (Nb 258, Nb 262, Nb 301, Nb 318) reagieren mit humanem P2X4, je ein Nanobody zusätzlich mit Ratten-P2X4 (Nb 318) und einer mit Maus-P2X4 (Nb 258). Drei monoklonale Antikörper (A194, A225, A246) und drei Nanobodies (Nb 271, Nb 325, Nb 284) binden vorwiegend Maus-P2X4, zwei Nanobodies (Nb 271, Nb 284) reagieren zusätzlich mit Ratten-P2X4 und human P2X4. Drei der sieben selektierten Nanobodies sind ausschließlich für ein P2X4-Homolog spezifisch. Die anderen Nanobodies erkennen mehrere P2X4-Orthologe. Es lässt sich vermuten, dass die letztgenannten ein über die Arten konserviertes Epitop binden.

Die Ergebnisse der Analyse der Bindeepitope deuten an, dass die Nanobodies und Antikörper größtenteils überlappende Epitope binden (**Abb. 4.18** und **Abb. 4.19**). Die gegenseitige Blockade der Antikörper (A19, A128, A133, A344) und Nanobodies (Nb 262, Nb 301, Nb 318) auf humanem P2X4 (**Abb. 4.18**) legt nahe, dass sie ein überlappendes Epitop (h1) binden. Einzig Nb 258 beeinflusst die Bindung der restlichen Antikörper/Nanobodies nicht und bindet ein weiteres Epitop (h2).

Die Maus-P2X4-spezifischen Antikörper und Nanobodies binden ebenfalls überwiegend ein überlappendes Epitop. Die drei monoklonalen Antikörper und Nb325 blockieren sich gegenseitig und binden vermutlich ein Epitop (m1). Nb 271 und Nb 284 binden Epitope (m2 und m3), die die Bindung der restlichen Antikörper und Nanobodies nicht beeinflussen (**Abb. 4.19**). Es muss durch eine gegenseitige Blockade zusätzlich geprüft werden ob Nb 271 und Nb 284 dasselbe ($m2 = m3$) oder je ein unabhängiges Epitop ($m2 \neq m3$) binden. Da die Nanobodies 325 und 271 unterschiedliche Epitope auf P2X4 binden, könnte eine Fusion der beiden Nanobodies zu einem biparatopischen Antikörper einen neuen Binder mit erhöhter Bindungsaffinität generieren. Durch die Verbindung zweier unterschiedlicher Epitope auf einem P2X4-Molekül ist auch ein Einfluss z.B. auf die Konformationsänderung während der Aktivierung durch ATP denkbar.

Stellt man die Ergebnisse der Epitopanalyse in einen Zusammenhang mit denen des Bindungsaffinitätsassays (**Abb. 4.16** und **Abb. 4.17**) zeigt sich ein zusätzlicher Interpretationsansatz. Die Bindungsaffinitäten der monoklonalen Antikörper sind größer als die der Nb-Fc-Fusionsproteine, deren Affinität ist wiederum größer als die der getesteten monovalenten Formate. Alle getesteten monoklonalen Antikörper haben eine langsame Dissoziationsrate, vier Nanobodies (Nb 301, Nb 318, Nb 271, Nb 325) dissoziieren mittelschnell und drei Nanobodies (Nb 258, Nb 262, Nb 284) schnell. Die in der Epitopanalyse scheinbar unabhängig bindenden Nanobodies Nb 258 und Nb 284 gehören zu den schnell dissoziierenden Bindern (**Abb. 4.16** und **Abb. 4.17**). Ihr Blockadepotential ist dadurch geschwächt. Die Bindung an ein unabhängiges Epitop müsste deshalb durch Kreuzblockadeversuche bestätigt werden, bei denen die Nanobodies Nb 258, Nb 271 und Nb 284 als Fluorochromgekoppelte Varianten und die restlichen Antikörper und Nanobodies als Blocker eingesetzt werden.

Eine genaue Kartierung der Epitpe ist letztendlich nur durch Ko-Kristallisation von P2X4 in Komplex mit Nanobodies bzw. monoklonalen Antikörpern möglich. Das Vorliegen der Strukturen des Zebrafish P2X4 Ionenkanals sowohl in der offenen (Hattori & Gouaux, 2012) als auch in der geschlossenen (Kawate *et al*, 2009) Konformation durch Röntgenstrukturanalysen machen eine solche Herangehensweise möglich.

Aufgrund ihrer stärkeren Bindung haben sich die Antikörper A344 und A246 sowie die Nanobodies Nb 318 und Nb 325 als Favoriten für weitere Untersuchungen herausgestellt. Mit 18 bzw. 15 Aminosäuren liegt die Länge der CDR3 der beiden Nanobodies im oberen Bereich. In der Arbeitsgruppe vorhandene VHHs haben CDR3-Längen zwischen drei und 24 Aminosäuren. Durch zielgerichtete Mutagenese der drei CDRs ließen sich die Affinitäten der Nanobodies für P2X4 gegebenenfalls optimieren und höher affine Binder erhalten. Bei einer Selektion unter kompetitiven Bedingungen könnten die schwachen von den starken Bindern getrennt werden.

In dieser Arbeit konnte für die P2X7-spezifischen Nanobodies 13A7 und 14D5 der Einfluss auf die Funktion des Purinrezeptors P2X7 in einem elektrophysiologischen Setting bestätigt werden (**Abb. 4.22**). 14D5 verstärkt die ATP-induzierte Spannungsänderung, während 13A7 diese fast vollständig blockiert. In einem vergleichbaren Aufbau zeigten die P2X4-spezifischen Nanobodies keine messbare Wirkung auf die ATP-induzierte Depolarisation (**Abb. 4.20** und **Abb. 4.21**). Mögliche Gründe dafür könnten in der geringen Affinität liegen oder die Bindung an ein funktionsirrelevantes Epitop sein. Von der Gruppe um Stanko S. Stojilkovic in Bethesda, USA wurde der allosterische Modulator Ivermectin untersucht, der selektiv die Sensitivität von P2X4 herabsetzt und die Desensibilisierung des Ionenkanals nach Aktivierung durch ATP verlangsamt (Zemkova *et al*, 2014). Ein Nanobody, der ein allosterisches Epitop auf P2X4 bindet, könnte eine ähnliche Wirkung zeigen und den Einsatz der giftigen Chemikalie Ivermectin unnötig machen.

Um Nanobodies gegen andere Epitope von P2X4 zu erhalten, könnte eine erneute Selektion durchgeführt werden, bei der das dominante Epitop durch einen Überschuss der bereits verfügbaren Antikörper/Nanobodies blockiert wird. Die dabei erhaltenen Binder können nur noch freie und damit neue Epitope auf P2X4 besetzen.

Die Zugabe von Apyrase während der Phagenselektion könnte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, Nanobodies zu erhalten, die die nicht-besetzte ATP-Bindungstasche in P2X4 im geschlossenen Zustand binden. Apyrase, eine ATP-Hydrolase, setzt ATP zu ADP um und könnte während der Selektion sicherstellen, dass kein ATP im Ansatz vorhanden ist, das die ATP-Bindungstaschen von P2X4 für potentielle Binder unzugänglich macht.

Um Nanobodies zu erhalten, die an der Membranpore des geöffneten Ionenkanals binden, sollte während der Phagenselektion viel ATP vorhanden sein. In dem Fall läge der Kanal vornehmlich in geöffneter Konformation vor und böte Zugang für die potentiell bindenden Nanobodies. Eventuell ließen sich so Inhibitoren selektieren, die nun zugängliche Epitope binden und so zum Beispiel den Ionenfluss stören.

Mit dem Nachweis der ATP-induzierten Exposition von P2X4 auf peritonealen Immunzellen (**Abb. 4.23**) ist es gelungen, die Eignung der in dieser Arbeit hergestellten Nanobodies und Antikörper zur Detektion von nativem P2X4 auf primären Zellen zu zeigen. Dabei zeigte sich eine äußerst geringe endogene Zelloberflächenexpression von P2X4 auf peritonealen Mastzellen. Durch eine 10-minütige Behandlung der Zellen mit ATP wurde eine Translokation von P2X4 an die Plasmamembran ausgelöst. Unter den gleichen Bedingungen gelangt Lamp1 ebenfalls an die Zelloberfläche (**Abb. 4.23**). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit einer lysosomalen Lokalisation von P2X4 (Bobanović *et al*, 2002; Qureshi *et al*, 2007) und geben einen Hinweis darauf, dass die Stimulation von Mastzellen mit ATP eine Degranulation bzw. Fusion der Lysosomen mit der Plasmamembran auslöst, die eine Translokation der lysosomalen Proteinen an die Zellmembran nach sich zieht.

Mit diesem Versuch ist es erstmals gelungen natives P2X4 direkt auf der Zelloberfläche nachzuweisen, bisher gelang dies nur indirekt über Biotinylierung und Fluorochrom-markiertes Streptavidin oder mit der Hilfe von rekombinantem P2X4 (P2X4-GFP, P2X4-AU5 - Tag aus sechs Aminosäuren in eine extrazelluläre Schlaufe hinter AS76 inseriert) (Ulmann *et al*, 2008; Bobanović *et al*, 2002)

5.1 Ausblick auf weiterführende Verwendungen der in dieser Arbeit hergestellten Nanobodies und monoklonalen Antikörper

Die in dieser Arbeit generierten monoklonalen Antikörper und Nanobodies sind wertvolle Werkzeuge für zukünftige Untersuchungen von nativem P2X4 auf Maus- und Humanzellen. Die zielgerichtete Mutagenese der CDRs der vielversprechenden Nanobodies 325 und 271 können zur Optimierung der Bindungsaffinitäten beitragen. Durch eine neuerliche Phagenselektion unter Blockade der bereits verwendeten Epitope könnten neue Nanobodies mit neuen Bindestellen und funktionellen Auswirkungen auf P2X4 gewonnen werden. Vielversprechende Kandidaten können wiederum über o.g. Techniken optimiert und analysiert werden.

Bisher gelang die Kristallisation des Zebrafisch P2X4-Orthologs in geschlossener und ATP-gebundener offener Konformation (Kawate *et al*, 2009; Hattori & Gouaux, 2012). Basierend auf der Kristallstruktur von Zebrafisch-P2X4 machten die Gruppen um Rui Wang und Ye Yu aus China Vorhersagen über die koordinierten Bewegungen zwischen den Domänen der linken und der Rückenflosse (siehe **Abb. 5.01**), die essentiell für die Öffnung des Ionenkanals sind (Zhao *et al*, 2014). Die generierten P2X4-spezifischen Nanobodies könnten als stabilisierende Chaperone für die Kristallisation der Maus-, Ratten- oder humanen P2X4-Orthologen Verwendung finden und damit helfen die bisher gemachten strukturellen Vorhersagen zu überprüfen.

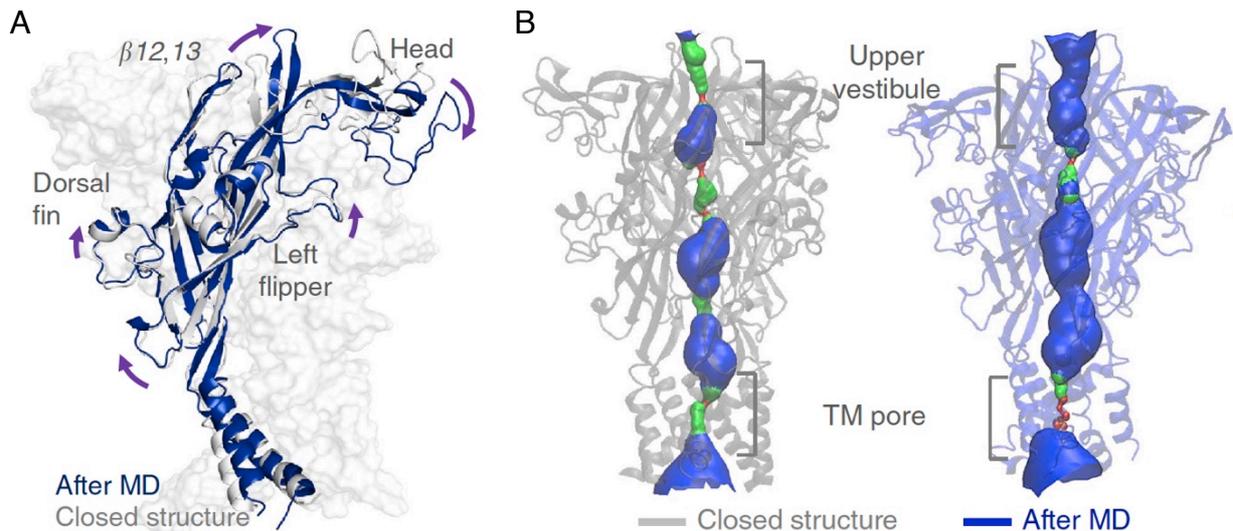


Abb. 5.01 Inhärente Bewegungsdynamik des Zebrafisch (zf)-P2X4s ohne ATP vor und nach 300-ns MD (*Molecular Dynamics*)-Simulationen (Zhao *et al*, 2014). Überlagerung der initialen (grau, PDB ID: 3H9V) und der Struktur nach 300-ns MD Simulationen (blau) am geschlossenen zfP2X4. Die Pfeile in (A) zeigen die strukturellen Veränderungen in β 12-13, Kopf (*Head*)-, linker (*Left flipper*) und Rückenflossen (*Dorsal fin*)-Domäne. (B) zeigt die Expansion des oberen Ionenkanalkorridors (*Upper Vestibule*), die während der 300-ns MD-Simulationen auftrat. *After MD* = nach der MD; *Closed Structure* = geschlossene Struktur, *TM pore* = Transmembranpore

Mit den in dieser Arbeit charakterisierten Antikörpern und Nanobodies kann endogenes P2X4 in unterschiedlichsten Zelltypen untersucht werden, und somit mögliche Artefakte bei der Einführung von Tags oder der Überexpression von rekombinantem P2X4 vermieden werden. So ließe sich unter nativen Bedingungen die lysosomale Lokalisation und der Transport von P2X4 an die Zelloberfläche bestätigen, der von der Gruppe um Ruth Murrell-Lagnado in Cambridge, UK publiziert wurde (Qureshi *et al*, 2007).

Ulmann *et al.* postulierte 2013, dass P2X4 auf durch *Status epilepticus* aktivierten Mikroglia im Hippokampus zu Excitotoxizität führt, d.h. zu einem Sterben der Neuronen durch andauernde Reizüberflutung (Ulmann *et al*, 2013). Zudem wird die Transkription von P2X4 in Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) nach Nervenschädigung hochreguliert (Tsuda *et al*, 2003) und mit der Entwicklung von neuropathischem Schmerz assoziiert (Tsuda *et al*, 2013). Mit den hier generierten Antikörpern und Nanobodies könnte die Expression von P2X4 und dessen subzelluläre Lokalisation im ZNS näher untersucht werden. Für in vivo Anwendungen wäre eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch die Nanobodies von Vorteil. Dabei könnte die Erhöhung des isoelektrischen Punktes (pI) der einzelnen Nanobodies die ZNS-Gängigkeit steigern. Wie Li *et al.* (Li *et al*, 2012) zeigen

konnten, passieren basische VHHs ($pI \geq 9.0$) die Blut-Hirn-Schranke besser und sind sogar in der Lage intrazelluläre Zielstrukturen zu binden. Um den pI der Nanobodies zu erhöhen, könnten saure Aminosäuren in basische mutiert werden. Die Affinitäten der veränderten Nanobodies müssten parallel beobachtet werden, um den Verlust der P2X4-Bindungsfähigkeit durch eventuelle Fehlfaltungen o.ä. auszuschließen. ZNS-gängige Nanobodies gegen P2X4 könnten möglicherweise auch als Transporter verwendet werden, die an sie gekoppelte, starke Fluorochrome wie z.B. GFP mit sich tragen könnten, um P2X4 in Nervenzellen oder Mikroglia zu markieren und seine Rolle in verschiedenen Krankheitsmodellen *in vivo* zu untersuchen.

Die generierten Nanobodies und Antikörper sind auch potentielle Werkzeuge für genauere Analysen der Funktion von P2X4 in anderen pathophysiologischen Prozessen, wie inflammatorischer Schmerz, vaskulärer Homeostase und der alveolären Sekretion von Surfactant. Die Gruppe um François Rassendren in Montpellier, Frankreich konnte zeigen, dass die Aktivierung von P2X4 auf Gewebeerresidenten Makrophagen die Freisetzung von Prostaglandin E₂, die mit der Entwicklung von Schmerz und Inflammation assoziiert ist, auslöst (Ulmann *et al*, 2010).

Die Aktivierung von P2X4 auf Endothelzellen beeinflusst den Blutdruck. So publizierte die Gruppe um David Erlinge aus Lund, Schweden, dass die Aktivierung von P2X4 auf Endothelzellen die Ausschüttung des Krüppel-ähnlichen Faktors 2 (KLF2) bewirkt (Sathanoori *et al*, 2015), einem Transkriptionsfaktor, der die vaskuläre Homeostase fördert und mit einem Arterien-schützenden Phenotyp assoziiert ist (Jain *et al*, 2014). Auch Yamamoto *et al*. zeigen dass P2X4 auf dem Endothel wichtig ist, um den gesunden Gefäßwiderstand in den Blutgefäßen zu erhalten. P2X4-defiziente Mäuse zeigen im Vergleich zu wt-Mäusen in ihren Untersuchungen einen erhöhten Blutdruck und eine niedrigere Produktion des Vasodilators Stickoxid (NO) (Yamamoto *et al*, 2005).

P2X4 spielt auf Zellen der Lunge, den Typ II Pneumozyten, eine Rolle bei der Exozytose von Surfactant enthaltenden intrazellulären Organellen, den Lamellenkörperchen. P2X4 wird in der Membran der Lamellenkörperchen exprimiert und bei Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran aktiviert. Der daraus resultierende Ca²⁺-Einstrom führt zu einer Expansion der sogenannten Fusionspore

und zur Freisetzung des Surfactants (Thompson *et al*, 2013; Miklavc *et al*, 2013) (siehe **Abb. 5.02**).

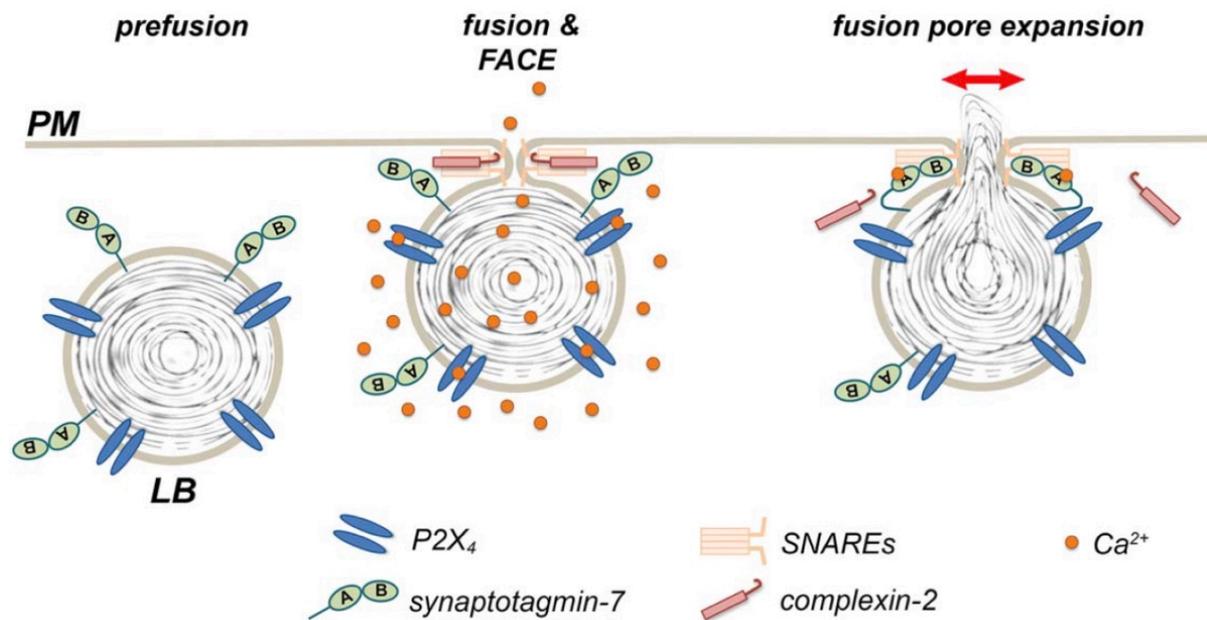


Abb. 5.02 Vesikuläre Regulation der Fusionsporenerweiterung (Neuland & Frick, 2014). P2X₄ und Synaptotagmin-7 werden auf LBs exprimiert. Aktivierung von P2X₄ in Folge der Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran führt zu lokalisiertem Ca²⁺-Einstrom und einem Anstieg der Ca²⁺ Konzentration in unmittelbarer Nähe des fusionierten Vesikels (FACE). Ca²⁺ bindet anschließend an Synaptotagmin-7, welches wiederum die Complexin-2 vermittelte Blockade der Fusionsporenerweiterung aufhebt. Dadurch wird die Pore erweitert und die Sekretion kann stattfinden. PM = Plasmamembran, LB = Lamellenkörperchen, FACE = Fusion ausgelöster Ca²⁺ Einstrom (*fusion activated Ca²⁺ entry*)

P2X₄ ist für die Regulation unterschiedlichster Körperprozesse in Gesundheit und in Krankheit notwendig. Die in dieser Arbeit generierten Nanobodies und monoklonalen Antikörper können in Zukunft verwendet werden, um die Rolle von P2X₄ in verschiedenen Zellen genauer zu untersuchen und damit die pathophysiologische Bedeutung von P2X₄ besser zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

- Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse AH, Seman M, Haag F & Koch-Nolte F (2007) ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *The FASEB Journal* **22**: 861–869
- Adriouch S, Dubberke G, Diessenbacher P, Rassendren F, Seman M, Haag F & Koch-Nolte F (2004) Probing the expression and function of the P2X7 purinoceptor with antibodies raised by genetic immunization. *Cell. Immunol.* **236**: 72–77
- Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD & Edwardson JM (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J. Biol. Chem.* **280**: 10759–10765
- Bean BP (1990) ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: concentration dependence and kinetics. *Journal of Neuroscience* **10**: 1–10
- Bernier L-P, Ase AR, Chevallier S, Blais D, Zhao Q, Boué-Grabot É, Logothetis D & Séguéla P (2008) Phosphoinositides regulate P2X4 ATP-gated channels through direct interactions. *Journal of Neuroscience* **28**: 12938–12945
- Bobanović LK, Royle SJ & Murrell-Lagnado RD (2002) P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J. Neurosci.* **22**: 4814–4824
- Boumechache M, Masin M, Edwardson JM, Górecki DC & Murrell-Lagnado R (2009) Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells. *J. Biol. Chem.* **284**: 13446–13454
- Bowler JW, Bailey RJ, North RA & Surprenant A (2003) P2X4, P2Y1 and P2Y2 receptors on rat alveolar macrophages. *British Journal of Pharmacology* **140**: 567–575
- Buell GN, Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA & Antonarakis SE (1998) Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Recept. Channels* **5**: 347–354
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD & Winter G (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**: 624–628
- Clyne JD, Wang L-F & Hume RI (2002) Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. *J. Neurosci.* **22**: 3873–3880
- Craigie E, Birch RE, Unwin RJ & Wildman SS (2013) The relationship between P2X4 and P2X7: a physiologically important interaction? *Front Physiol* **4**: 216
- Danquah W (2012) Selection and characterization of llama-derived anti-P2X7 single domain antibodies. *Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät*

- Danquah W, Koch-Nolte F, Stortelers C & Laeremans T (2013) P2X7 receptor antagonists and agonists. *Patent WO 2013/178783 A1*: 1–1
- De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, Muyldermans S & Wyns L (2006) Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 4586–4591
- De Meyer T, Muyldermans S & Depicker A (2014) Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol.* **32**: 263–270
- Ennion SJ & Evans RJ (2002) Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol. Pharmacol.* **61**: 303–311
- Garcia-Guzman M, Soto F, Gomez-Hernandez JM, Lund PE & Stühmer W (1997) Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol. Pharmacol.* **51**: 109–118
- Guo C, Masin M, Qureshi OS & Murrell-Lagnado RD (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol. Pharmacol.* **72**: 1447–1456
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N & Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**: 446–448
- Hattori M & Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **485**: 207–212
- Hubert S, Rissiek B, Klages K, Huehn J, Sparwasser T, Haag F, Koch-Nolte F, Boyer O, Seman M & Adriouch S (2010) Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J. Exp. Med.* **207**: 2561–2568
- Idzko M, Ferrari D & Eltzschig HK (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* **509**: 310–317
- Jain MK, Sangwung P & Hamik A (2014) Regulation of an inflammatory disease: Krüppel-like factors and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**: 499–508
- Jäger V, Büssow K, Wagner A, Weber S, Hust M, Frenzel A & Schirrmann T (2013) High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* **13**: 52
- Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A & North RA (2000) Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J. Biol. Chem.* **275**: 34190–34196
- Junger WG (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 201–212

- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT & Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. *Nature* **460**: 592–598
- Khakh BS & Burnstock G (2009) The Double Life of ATP. *Scientific American* **301**: 84–92
- Koch-Nolte F, Glowacki G, Bannas P, Braasch F, Dubberke G, Ortolan E, Funaro A, Malavasi F & Haag F (2005) Use of genetic immunization to raise antibodies recognizing toxin-related cell surface ADP-ribosyltransferases in native conformation. *Cell. Immunol.* **236**: 66–71
- Koch-Nolte F, Reyelt J, Schossow B, Schwarz N, Scheuplein F, Rothenburg S, Haag F, Alzogaray V, Cauerhff A & Goldbaum FA (2007) Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *The FASEB Journal* **21**: 3490–3498
- Laeremans T, Stortelers C, Koch-Nolte F, Gonzalez M, Assuncao J & Van Rompaey P (2009) Method for generation of immunoglobulin sequences. *Patent WO 2010/070145 A2*: 1–1
- Lenertz LY, Wang Z, Guadarrama A, Hill LM, Gavala ML & Bertics PJ (2010) Mutation of putative N-linked glycosylation sites on the human nucleotide receptor P2X7 reveals a key residue important for receptor function. *Biochemistry* **49**: 4611–4619
- Li T, Bourgeois J-P, Celli S, Glacial F, Le Sourd A-M, Mecheri S, Weksler B, Romero I, Couraud P-O, Rougeon F & Lafaye P (2012) Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB J.* **26**: 3969–3979
- Martin MU & Resch K (2009) Immunologie UTB
- Menzel S (2014) Regulation der ADP-Ribosyltransferase ART2.2 durch Nukleotid-induzierte Proteolyse. *Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät*
- Miklavc P, Thompson KE & Frick M (2013) A new role for P2X4 receptors as modulators of lung surfactant secretion. *Front Cell Neurosci* **7**: 171
- Mio K, Kubo Y, Ogura T, Yamamoto T & Sato C (2005) Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **337**: 998–1005
- Möller S, Jung C, Adriouch S, Dubberke G, Seyfried F, Seman M, Haag F & Koch-Nolte F (2007) Monitoring the expression of purinoceptors and nucleotide-metabolizing ecto-enzymes with antibodies directed against proteins in native conformation. *Purinergic Signalling* **3**: 359–366
- Murphy KM, Travers P & Walport M (2009) Janeway Immunologie Spektrum Akademischer Verlag

- Muyldermans S (2001) Single domain camel antibodies: current status. *J. Biotechnol.* **74**: 277–302
- Muyldermans S (2013) Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82**: 775–797
- Neuland K & Frick M (2014) Vesicular control of fusion pore expansion. *Commun Integr Biol* **8**: e1018496–e1018496
- Nguyen VK, Hamers R, Wyns L & Muyldermans S (1999) Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol. Immunol.* **36**: 515–524
- Nguyen VK, Su C, Muyldermans S & van der Loo W (2002) Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics* **54**: 39–47
- Nicke A (2008) Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **377**: 803–808
- Pardon E, Laeremans T, Triest S, Rasmussen SGF, Wohlkönig A, Ruf A, Muyldermans S, Hol WGJ, Kobilka BK & Steyaert J (2014) A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protoc* **9**: 674–693
- Pfeiffer P (2011) Molekulare Charakterisierung des Ekto-Enzyms CD38 und des Purinrezeptors P2X4 als Zielstrukturen für Einzeldomänen- Antikörper und für die Ekto-ADP-Ribosyltransferase ARTC2. *Diplomarbeit, Universität Hamburg, MIN-Fakultät*
- Qureshi OS, Paramasivam A, Yu JCH & Murrell-Lagnado RD (2007) Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J Cell Sci* **120**: 3838–3849
- Reyelt J (2008) Isolierung und Charakterisierung von inhibitorischen Einzeldomänen-Antikörpern aus dem Lama (*Lama glama* L., 1758) gegen die T-Zell-Ekto-ADP-Ribosyltransferase 2.2 der Maus (*Mus musculus* L., 1758). *Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät*
- Royle SJ, Bobanović LK & Murrell-Lagnado RD (2002) Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *J. Biol. Chem.* **277**: 35378–35385
- Rubio ME & Soto F (2001) Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *Journal of Neuroscience* **21**: 641–653
- Samways DSK & Egan TM (2007) Acidic amino acids impart enhanced Ca²⁺ permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family. *J. Gen. Physiol.* **129**: 245–256

- Sathanoori R, Rosi F, Gu BJ, Wiley JS, Müller CE, Olde B & Erlinge D (2015) Shear stress modulates endothelial KLF2 through activation of P2X4. *Purinergic Signalling* **11**: 139–153
- Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, Rissiek B, Seman M, Haag F & Koch-Nolte F (2009) NAD⁺ and ATP Released from Injured Cells Induce P2X7-Dependent Shedding of CD62L and Externalization of Phosphatidylserine by Murine T Cells. *The Journal of Immunology* **182**: 2898–2908
- Schütt C & Broeker B (2009) *Grundwissen Immunologie Heidelberg*: Springer Science & Business Media
- Schwarz N, Drouot L, Nicke A, Fliegert R, Boyer O, Guse AH, Haag F, Adriouch S & Koch-Nolte F (2012) Alternative splicing of the N-terminal cytosolic and transmembrane domains of P2X7 controls gating of the ion channel by ADP-ribosylation. *PLoS ONE* **7**: e41269
- Soto F, Garcia-Guzman M, Gomez-Hernandez JM, Hollmann M, Karschin C & Stühmer W (1996) P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 3684–3688
- Stojilkovic SS, Yan Z, Obsil T & Zemkova H (2010) Structural insights into the function of P2X4: an ATP-gated cation channel of neuroendocrine cells. *Cell Mol Neurobiol* **30**: 1251–1258
- Sudo N, Tanaka K, Koga Y, Okumura Y, Kubo C & Nomoto K (1996) Extracellular ATP activates mast cells via a mechanism that is different from the activation induced by the cross-linking of Fc receptors. *J. Immunol.* **156**: 3970–3979
- Surprenant A & North RA (2009) Signaling at Purinergic P2X Receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **71**: 333–359
- Thompson KE, Korbmacher JP, Hecht E, Hobi N, Wittekindt OH, Dietl P, Kranz C & Frick M (2013) Fusion-activated cation entry (FACE) via P2X₄ couples surfactant secretion and alveolar fluid transport. *FASEB J.* **27**: 1772–1783
- Torres GE, Egan TM & Voigt MM (1998) N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry* **37**: 14845–14851
- Torres GE, Egan TM & Voigt MM (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J. Biol. Chem.* **274**: 6653–6659
- Tsuda M, Masuda T, Tozaki-Saitoh H & Inoue K (2013) P2X4 receptors and neuropathic pain. *Front Cell Neurosci* **7**: 1–5
- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW & Inoue K (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **424**: 778–783

- Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, Buell GN, Reeve AJ, Chessell IP & Rassendren F (2008) Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J. Neurosci.* **28**: 11263–11268
- Ulmann L, Hirbec H & Rassendren F (2010) P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J.* **29**: 2290–2300
- Ulmann L, Levavasseur F, Avignone E, Peyroutou R, Hirbec H, Audinat E & Rassendren F (2013) Involvement of P2X4 receptors in hippocampal microglial activation after status epilepticus. *Glia* **61**: 1306–1319
- van der Linden R, de Geus B, Stok W, Bos W, van Wassenaar D, Verrips T & Frenken L (2000) Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J. Immunol. Methods* **240**: 185–195
- Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L & Muyldermans S (1997) Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol. Immunol.* **34**: 1121–1131
- Wareham K, Vial C, Wykes RCE, Bradding P & Seward EP (2009) Functional evidence for the expression of P2X1, P2X4 and P2X7 receptors in human lung mast cells. *British Journal of Pharmacology* **157**: 1215–1224
- Wareham KJ & Seward EP (2016) P2X7 receptors induce degranulation in human mast cells. *Purinergic Signalling*: 1–12
- Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauherhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Serreze DV, Goldbaum FA, Haag F & Koch-Nolte F (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* **198**: 157–174
- Wilkinson WJ, Jiang L-H, Surprenant A & North RA (2006) Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Mol. Pharmacol.* **70**: 1159–1163
- Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, Fukuda T, Sato T, Sekine K, Kato S, Isshiki M, Fujita T, Kobayashi M, Kawamura K, Masuda H, Kamiya A & Ando J (2005) Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* **12**: 133–137
- Young MT, Fisher JA, Fountain SJ, Ford RC, North RA & Khakh BS (2008) Molecular shape, architecture, and size of P2X4 receptors determined using fluorescence resonance energy transfer and electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **283**: 26241–26251

Zemkova H, Khadra A, Rokic MB, Tvrdonova V, Sherman A & Stojilkovic SS (2014) Allosteric regulation of the P2X4 receptor channel pore dilation. *Pflugers Arch.*: 1–14

Zhao W-S, Wang J, Ma X-J, Yang Y, Liu Y, Huang L-D, Fan Y-Z, Cheng X-Y, Chen H-Z, Wang R & Yu Y (2014) Relative motions between left flipper and dorsal fin domains favour P2X4 receptor activation. *Nature Communications* **5**: 4189

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| 2xYT | 2-fach Hefeextrakt + Typton (2x yeast extract + tryptone) |
| 3-D | dreidimensional |
| Abb. | Abbildung |
| ADP | Adenosin-5'-Diphosphat |
| AEBSF | 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid |
| AF647 | Alexa Fluor 647 |
| Ak | Antikörper |
| AMP | Adenosin-5'-Monophosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BSA | (<i>bovine serum albumin</i>) Rinderserumalbumin |
| CD | (<i>cluster of differentiation</i>) - Unterscheidungsgruppen immun- phänotypischer Oberflächenmerkmale |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CDR | <i>complementary determining region</i> |
| CH | konstante Domäne der schweren Antikörperkette |
| CHO | <i>chinese hamster ovary</i> |
| CL | konstante Domäne der leichten Antikörperkette |
| Da | Dalton |
| DMEM | Zellkulturmedium (Dulbecco' s modified Eagle medium) |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | 2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphate |
| DTT | Dithiothreitol |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| Fab | <i>Fragment antigen binding</i> |
| FACS | Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung |
| Fc | <i>Fragment crystallizable</i> |

| | |
|---------------|---|
| FCS | Fötiales Kälberserum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FR | <i>Framework regions</i> |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| HEK | <i>Human embryonal kidney</i> |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure |
| hP2X4 | humanes P2X4 |
| Ig | Immunglobulin |
| IPTG | Isopropylthio- β -galaktosidase |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kD | Kilodalton |
| LB | Luria broth |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| mP2X4 | Maus-P2X4 |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NAD | β -Nikotinamidadeninucleotid |
| Nb | Nanobody |
| Ni-NTA | Nickel-Nitrilotriessigsäure |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| pAk | polyklonaler Antikörper |
| PBL | Periphere Blutlymphozyten |
| PBS | <i>(Phosphate buffered saline)</i> Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | <i>(Polymerase chain reaction)</i> Polymerase-Kettenreaktion |
| pdb | Datenbank für Protein-3D-Strukturen |
| PE | R-Phycoerythrin |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PEI | Polyethylenimin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | pH-Wert |
| PI | isoelektrischer Punkt |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rP2X4 | Ratten-P2X4 |

| | |
|-------------|--|
| RPMI | Zellkulturmedium (aus dem Roswell Park Memorial Institut) |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate) |
| SOC | <i>SOB-(super optimal broth-)</i> Medium plus 20 mM Glucose |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TM | Transmembrandomäne |
| TS | Tris-HCl Sucrose |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| VH | Variable Domäne der schweren Kette |
| VHH | <i>variable domain of the heavy chain of the heavy chain only antibody</i> |
| VL | Variable Domäne der leichten Kette |
| WT | Wildtyp |

7.2 GHS-Gefahrenhinweise

7.2.A GHS-Piktogramme

Tab. A Gefahrenpiktogramme nach GHS

| | |
|--|--|
| GHS02 Entzündlich | |
|  | <ul style="list-style-type: none"> a) Flüssigkeiten mit Flammpunkt < 0°C und Siedpunkt ~ 35°C b) Gase, die unter Normalbedingungen bei Luftkontakt entzündlich sind c) Feststoffe, die bei kurzzeitiger Zündquellen-Einwirkung leicht entzündet werden d) Flüssigkeiten mit Flammpunkt < 21°C e) Stoffe, die bei gewöhnlicher Temperatur sich an Luft erhitzen und entzünden f) Stoffe, die bei Feuchtigkeit hochentzündliche Gase in gefährlicher Menge entwickeln. |
| GHS05 Korrosive Stoffe | |
|  | können bei Berührung lebendes Gewebe zerstören (z.B. Säuren mit pH ~ 2, Laugen mit pH ~ 11,5), |
| GHS06 Giftige Stoffe | |
|  | können in sehr geringer Menge beim Einatmen, Verschlucken oder Hautresorption zum Tode oder zu akuten oder chronischen Gesundheitsschäden führen, |
| GHS07 Reizende oder sensibilisierende Stoffe (Haut, Augen) | |
|  | <ul style="list-style-type: none"> a) können bei Kontakt deutliche Entzündungen der Haut oder Augenschäden hervorrufen. b) können bei Hautkontakt Überempfindlichkeitsreaktionen (Allergien) auslösen. |
| GHS08 reizende oder sensibilisierende Stoffe (Einatmung), Krebserregende, mutagene, teratogene Stoffe | |
|  | <ul style="list-style-type: none"> a) können beim Menschen Krebs erregen oder die Krebshäufigkeit erhöhen b) können beim Menschen vererbare genetische Schäden hervorrufen c) können beim Menschen die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen oder fruchtschädigend wirken <p>Kat. 1: bekanntermaßen Kat. 2: angenommen aufgrund hinreichender Anhaltspunkte Kat. 3: geben wegen möglicher krebserzeugender Wirkung beim Menschen Anlass zu Besorgnis – aufgrund einiger, jedoch nicht Ausreichender Anhaltspunkte</p> |
| GHS09 Umweltgefährdende Stoffe | |
|  | können Naturhaushalt, Wasser, Boden, Luft, Klima, Tiere, Pflanzen oder Mikroorganismen derart verändern, dass dadurch Gefahren für die Umwelt entstehen. |

7.2.B GHS-Gefahrenhinweise (H-Sätze)

Die Gefahrenhinweise nach GHS (Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien) werden in Tabelle B dargestellt.

Tab. B Gefahrenhinweise nach GHS

| | |
|--------|--|
| H225 | Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. |
| H228 | Entzündbarer Feststoff. |
| H300 | Lebensgefahr bei Verschlucken. |
| H301 | Giftig bei Verschlucken. |
| H302 | Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. |
| H304 | Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein. |
| H310 | Lebensgefahr bei Hautkontakt. |
| H311 | Giftig bei Hautkontakt. |
| H312 | Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt. |
| H314 | Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. |
| H315 | Verursacht Hautreizungen. |
| H316 | |
| H317 | Kann allergische Hautreaktionen verursachen. |
| H318 | Verursacht schwere Augenschäden. |
| H319 | Verursacht schwere Augenreizung. |
| H330 | Lebensgefahr bei Einatmen. |
| H331 | Giftig bei Einatmen. |
| H332 | Gesundheitsschädlich bei Einatmen. |
| H334 | Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. |
| H335 | Kann die Atemwege reizen. |
| H336 | Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. |
| H340 | Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht). |
| H341 | Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht). |
| H350 | Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht). |
| H351 | Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht). |
| H360 d | Kann das Kind im Mutterleib schädigen. |
| H361 f | Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. |
| H370 | Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht). |
| H372 | Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht). |
| H373 | Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht). |
| H411 | Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. |

7.2.C GHS-Sicherheitshinweise (P-Sätze)

Die Sicherheitshinweise nach GHS (Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien) werden in Tabelle C dargestellt.

Tab. C Sicherheitshinweise nach GHS

| | |
|--------------------|--|
| P201 | Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. |
| P202 | Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. |
| P210 | Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten nicht rauchen. |
| P233 | Behälter dicht verschlossen halten. |
| P261 | Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. |
| P264 | Nach Gebrauch ... gründlich waschen. |
| P273 | Freisetzung in die Umwelt vermeiden. |
| P280 | Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen. |
| P281 | Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden. |
| P285 | Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen. |
| P301 | BEI VERSCHLUCKEN: |
| P302 | BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: |
| P304 | BEI EINATMEN: |
| P305 | BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: |
| P308 | BEI EXPOSITION ODER FALLS BETROFFEN: |
| P309 | BEI EXPOSITION ODER UNWOHLSEIN: |
| P310 | Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. |
| P312 | Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. |
| P313 | Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P330 | Mund ausspülen. |
| P332 | Bei Hautreizung: |
| P337 | Bei anhaltender Augenreizung: |
| P338 | Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen weiter ausspülen. |
| P340 | Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. |
| P341 | Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. |
| P351 | Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. |
| P352 | Mit viel Wasser und Seife waschen. |
| P391 | Verschüttete Mengen aufnehmen. |
| P405 | Unter Verschluss aufbewahren. |
| P301 + P310 | BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. |
| P301 + P312 | BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. |
| P302 + P352 | BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. |
| P304 + P340 | BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. |
| P304 + P341 | BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. |
| P305 + P351 + P338 | BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. |
| P308 + P313 | BEI EXPOSITION ODER FALLS BETROFFEN: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P309 + P310 | BEI EXPOSITION ODER UNWOHLSEIN: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. |
| P332 + | Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. |

| | |
|-------------|--|
| P313 | |
| P337 + P313 | Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P342+P311 | Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen. |
| P405 | Unter Verschluss aufbewahren. |
| P501 | Inhalt / Behälter ... zuführen. |

7.2.D Gefahrstoffe nach GHS

Die in dieser Arbeit verwendeten Gefahrstoffe sind in folgender Tabelle D aufgeführt.

Tab. D In dieser Arbeit verwendete Gefahrstoffe

| Stoffname | Gefahrensymbol | H-Sätze | P-Sätze |
|-----------------------------------|---------------------|---|--|
| Acrylamid | GHS06, GHS08 | H350, H340, H361f, H301f, 372, H332, H312, H319, H315, H317 | P201, P280, P301+P310, P305+P351+P338, P308+P313 |
| Bisacrylamid | GHS07 | H302 | P264, P301+P312, P330 |
| Carbenicillin | GHS08 | H317, H334 | P261, P280, P342+P311 |
| Dithiothreitol (DTT) | GHS07 | H302, H315, H319 | P302+P352, P305+P351+P338 |
| EDTA | GHS07 | H319 | P305+P351+P338 |
| Ethanol | GHS02 | H225 | P210 |
| Ethidiumbromid | GHS06, GHS08 | H330, H341, H302, H315, H319, H335 | P281, P302+P352, P305+P351+P338, P304+P340, P309, P310 |
| Geneticin | GHS08 | H317, H334, H316 | P285, P304+P341, P305+P351+P338, P332+P313, P261, P280 |
| Igepal | GHS07, GHS09 | H302, H319, H411 | P273, P280, P301+P312+P330, P337+P313, P391, P501 |
| Isopropanol | GHS02, GHS07 | H225, H319 H336 | P210, P233, P305+P351+P338 |
| Kanamycin | GHS08 | H360 d | P201, P202, P281, P308+P313, P405, P501 |
| Methanol | GHS02, GHS06, GHS08 | H225, H331, H311, H301, H370 | P210, P233, P280, P302+P352, P309+P310 |
| Paraformaldehyd (PFA) | GHS02, GHS07, GHS08 | H228, H302, H332, H351, H335, H315, H319, H317 | P302+P352, P305+P351+P338, P308+P313, P304+P340 |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | GHS02, GHS06 | H228, H311, H302, H335, H315, H319 | P210, P280, P304+P340, P305+P351+P338, P309+P310 |
| Tris | GHS07 | H315, H319, H335 | P261, |

| | | | |
|----------------------------|------------------------|------------------|--|
| | | | P305+P351+P338 |
| Tris-HCl | GHS07 | H315, H319, H335 | P280, P302+P352 P305+P351+P338 |
| Triton X-100 | GHS05, GHS07, GHS09 | H302, H318, H411 | P273, P280, P305+P351+P338, P337 + P313, P391, P501 |
| Trypanblau | GHS08 | H350 | P280, P201, P202, P308+313 P405, P501 |
| Zeocin (Phleomycin) | GHS07 | H302 | - |

7.2.E Kategorien der KMR-Substanzen

Die Definitionen der KMR-Kategorien (karzinogen, mutagen, reproduktionstoxisch) werden in folgender Tabelle E dargestellt.

Tab. E Kategorien der KMR-Substanzen mit Definition

| Kategoriendefinitionen gemäß EG-CLP-Verordnung | Kategorie gemäß GHS-Kennzeichnung |
|---|-----------------------------------|
| Wirken beim Menschen bekanntermaßen KMR-erzeugend | 1 A |
| Es existieren hinreichende Anhaltspunkte für KMR-Eigenschaften | 1 B |
| KMR-Verdachtsstoffe; es existieren Hinweise, aber keine ausreichenden Anhaltspunkte | 2 |

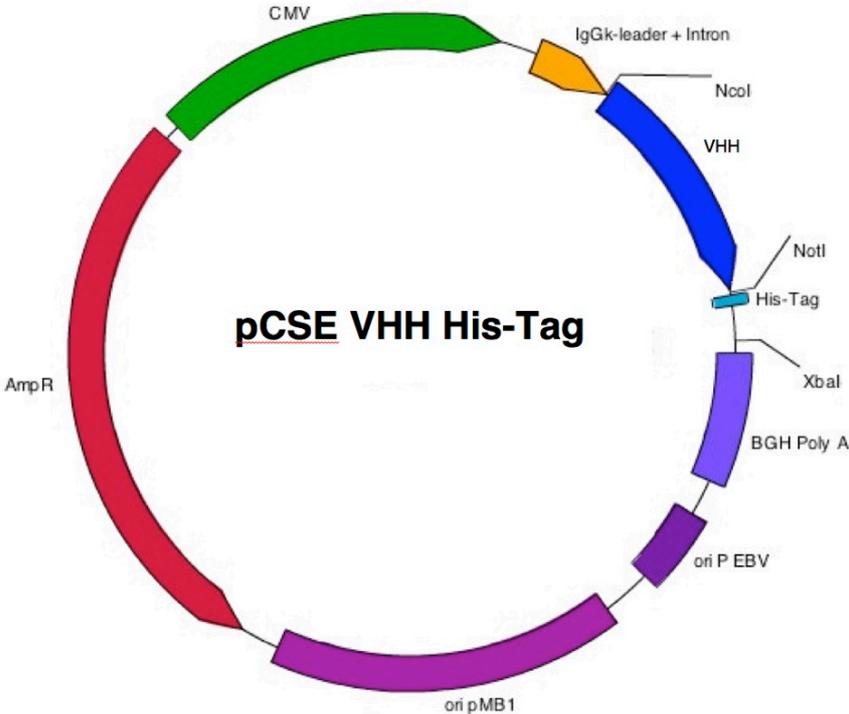
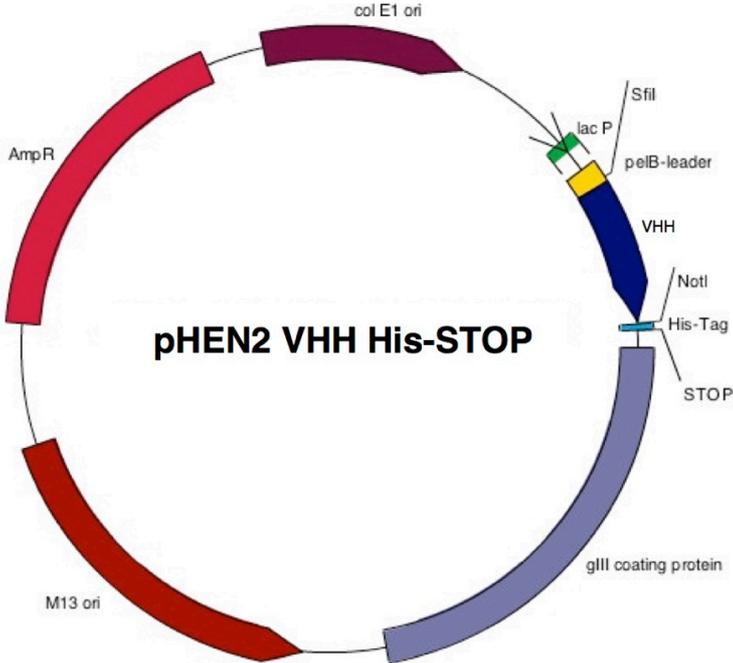
7.2.F KMR-Substanzen

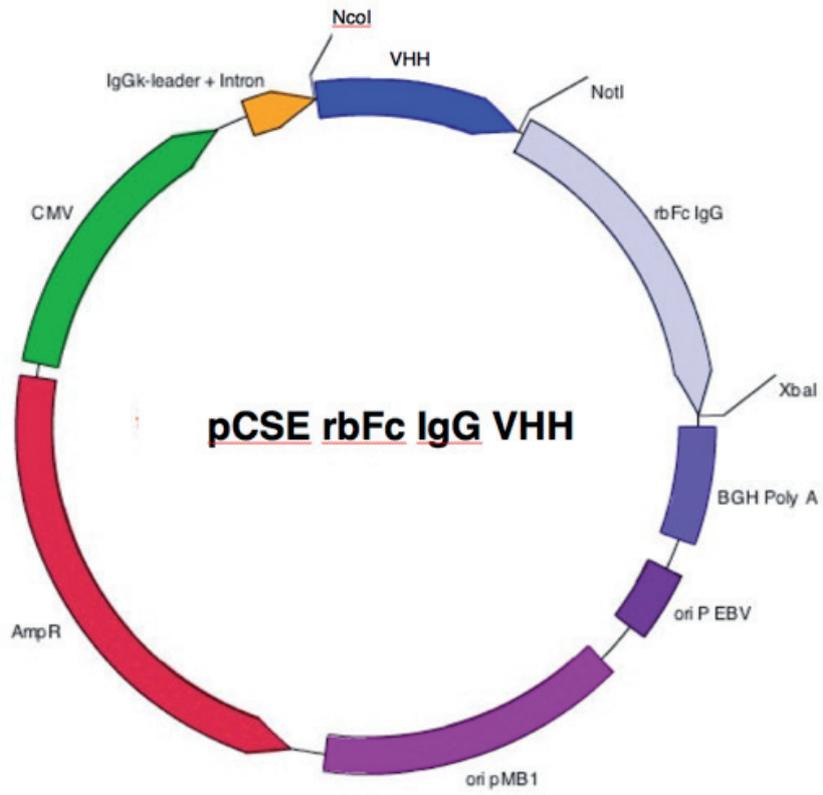
Die in dieser Arbeit verwendeten KMR-Substanzen sind in folgender Tabelle F aufgeführt.

Tab. F In dieser Arbeit verwendete KMR-Substanzen

| CAS-Nummer | Substanz | Verwendung | Kategorie |
|------------|----------------|--|--------------------------------------|
| 79-06-1 | Acrylamid | Bestandteil der Bis-Tris Gele (Invitrogen) für SDS-PAGE | K: 1B M: 1B R _F : 2 |
| 1239-45-8 | Ethidiumbromid | 10 mg/ml wässrige Lösung zur Färbung von Agarosegelen (0.5 µg/ml Endkonzentration) | M: 2 |
| 25389-94-0 | Kanamycin | 50 µg/ml wässrige Lösung für Selektionen von resistenten Phagen/Bakterien | R: 1A |

7.3 Plasmidkarten





7.4 Aminosäurealignment der primären Phagenbibliotheken der Lamas

Primärbibliothek von Lama 539

Seq.
 23 LSCAASGRTAGSYGMAWFRQGTGKEREFVAIAISWGGGTR--NYADSVKGRFTISRDSAKDTVYLQMNLSLKHEDTAVVYCAADGAYCEGNCYDHGMDY----WEGEILLVTVS
 122 LSCKVSGRITSSWYVWGFWRQPGKEREFVARSWDTGDY--HYADSVKGRFTISRDNPKNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCAADARSVHASEPLSTWDY----WGQGTQVTVS
 126 LSCAPTRHLTLTYMG--WFRQAPGEREFVASIGWNGAAT--TYSDSGKGRFTISRERDENLHLQMNLSLKPEDTAVVYCAADSTGYSGPQSTAYDY----WGQGTQVTVS
 13 LSCAPTRHLTLTYMMAWFRQAPGEREFVASIGWNGAVT--SYSDSGKGRFIIISREDENSIHLQMNLSLKHEDTAVVYCAADSTGYSGPQSTAYDY----WGQGTQVTVS
 18 LSCASSRIITFTYTMGWYRQAPGKQRELVAITSSGGST--NYADSVKGRFTISRDNVKNVTVYLQMNLSLKPDGTAVVYCAAEITTFPISERASGYDV----WGQGTQVTVS
 14 LSCAASGHTASRLAMGWYRQAPGKQRELFVAGIAPGGGTV--YYSDSAKGRFAVRGNAENTMFLQMNLSLNPEDTAVVYCAALHDPKSRMPGVEYDY----WGQGTQVTVS
 30 ISCVASGSINSINIMSWYRQAPGQRELVAITNHGVT--TYASSVKGRTISRDN--KLDLQMNLSLKPEDTAVVYCHARRYSLLDPSDLEY----WGQGTQVTVS
 15 LSCAATGSTFRLDAMGWYRQAPGKQRELVAIVSSGGT--NYADSVKGRGTISTDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCAASTVWTLIPADFAS----WGQGTQVTVS
 21 LSCASSKIVNINAMWYRRRPGKQRELVATINTGNT--NYADSVKGRFTISRDAINTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCNADDRTLFGSLIPH----WGQGTQVTVS
 16 LSCAASGRIFSTYRMGWFRQAPGKEREFVASILWSGSST--YTDVSKGRFTISRDNQNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCAVKTIVNGPFGY----WGQGTQVTVS
 20 LSCILSGSTHLLHTITWFRQTPGKEREFVSRIGRSNST--NYADFVEGRFTISRNIAKNTVMQMDNLSLKPEDTAVVYCNANSVVPYDY----WGRGVQVTVS
 131 LSCAASGRTYLINVMGWYRQAPGKQRELVAITNNGGST--NYADSAGKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRSKEDTAVVYCNAGGRIVTLNA----WGQGTQVTVS
 125 LSCAASGSTGNIRMGWYRQAPGNEREFVATITRGIT--IYAASVEGRFTISRDSAKNTIYLQMNLSLKPEDTAVVYCNVRNLSLYDY----WGQGTQVTVS
 130 LSCAASGTTFRFNSLGLWYRQAPGKQRELVAISAGGV--TYADSEGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCWKRGYFDDY----WGQGTQVTVS
 17 LSCAASGITVSSFAMRWSRQAPGKQREFVARIITSGGV--TYADSMKGRFTISRDNQNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCNADHTFAGVY----WGQGTQVTVS
 19 LSCAASGIIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAEITSSGGST--NYADSVKGRFTISRDNQNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCNADHTFAGVY----WGQGTQVTVS
 133 LSCAASGIIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAEITSSGGST--NYADSVKGRFTISRDNQNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCNADHTFAGVY----WGQGTQVTVS
 121 LSCAASVSTSSINVMGWYRQTPGKQRELVAIVSSGGST--NYADSVKGRFTISRDNQNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCNADHTFAGVY----WGQGTQVTVS
 132 LSCAASGIIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAEITSSGGST--NYADSVKGRFTISRDNQNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCNADHTFAGVY----WGQGTQVTVS
 124 LSCAASGIIILRLYDMGWYRQTPGKQRELVAEITSSGGST--NYANSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCHAADLWNGY----WGQGTQVTVS
 138 LSCAASGSIAGINVMGWHRQISGKQREVAIITSGGAT--TYADLAKGRFTISRDNKNTVWLQMNLSLKPEDTAVVYCOALVQGRYV----WGQGTQVTVS
 123 LSCAASRNIFINSMGMWYRQAPGKQRELVAITSSGGIT--TYADSVKGRFAISRDNQNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCOVKSQWRDY----WGQGTQVTVS
 134 LSCASGTTIFSIITTTMAWYRQAPGKQREFVANSYITGRT--NYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKLEDTAVVYCTTTIGARDY----WGQGTQVTVS
 11 LSCAASGTTIYSVNVMSWYRQAPGKQRELVAISRFGT--NVADSVKGRFTISYDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCNFDMRSGNY----WGPGTQVTVS
 129 LSCVASGSTSSINVMGMWYRQAPGKQRELVAQISSAGT--EYGDVSKGRGTISLNNQNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCNVAVGVVYL--WGQGTQVTVS
 127 LSCAASGIIILRLYDMGWYRQTPGKQRELVAEITSSGGST--NYANSVKGRFTISRDNQNTVYLQMNLSLKPEDTAVVYCNVTMDY----WGKSTLVNVS
 139 LSCAASGSIG--FNTMGMWYRQAPGKQRELVAITINIFGGT--NYADSVKGRFTISRDNRENTVLLQMNLSLKPEDTAVVYCNAAARY----WGQGTQVTVS

Primärbibliothek von Lama 540

| Seq. | Text |
|------|--|
| T7 | LSCVAS TRSF SNYSMA - WFRQPPGEERLFAVIGWYGGDK - YYPDSVKGRFAISRDNNAKNTVYLQMNLSLVPEDTAVYYCAARRQWFRKGEVIDPAQWSN ---WGQGTQVTVS |
| 196 | LSCVASG SIRDFNAMG - WYRQAPGKQRLVAIIPRAGDP -- TYADS VKGRFTVFRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAAAGAMSSYWSPKSEARYAY ---WGQGTQVTVS |
| 1 | LSCAASGRITGYAMG --- WFRQPGKEREFVAVSWGGERS - LLGDSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAADRGSDFWLTGNPSPWDY ---WGKGTQVTVS |
| L3 | LSCAASGRITSRYAMG - WFRQAPGKEREFVAIVSWGTIS - YYADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCTARASPISGTFPASPNEYDY ---WGQGTQVTVS 2x |
| T10 | LSCAASGRGSSNYHVG - WFRQYTGTSRDFWILLIGRT - DYSDSVKGRFTISDKPKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAAADNERTWAESRLSSMYEY ---WGQGTQVTVS |
| 170 | LSCAASGRITSSSYAMG - WFRQAPGKEREFVAAVWGGDK - QYRDSVKGRFTVSRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAADDTISIVSMWSVAEWHY ---WGQGTQVTVS |
| 2 | LSCAASGRITSRIVVTG - WFRQAPGKEREFVAAITSSGANT - YYADPVKGRFTISRDDAKNMVYLQMNLSLNPEDTAVYLCAADSARRLLTFVTPDDYDY ---WGQGTQVTVS |
| 168 | LSCAASGRITSRIVVTG - WFRQAPGKEREFVAAITSSGANT - YYADPVKGRFTISRDDAKNMVYLQMNLSLNPEDTAVYLCAADSARRLLTFVTPDDYDY ---WGQGTQVTVS |
| S8 | LSCAAS TRTFSAITMG - WFRQAPGKEREFVGGISRNGLT - EFADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAASGTITWDIRDRYDY ---WGQGTQVTVS |
| 195 | LSCAASGLPFTSYSMG - WFRQAPGKREFVVSITASIT - DYADS VKSRFTISRDLAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAARVREGYMFYRGESSYDY ---WGRGTQVTVS |
| G4 | LSCAASGRITSSYAMG - WFRQAPGKEREFVAAITGSGGST - RYADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYSCAADSFTYVLFDRGDEYDY ---WGQGTQVTVS |
| 173 | LSCAASGGTFNLLSTG - WVRQAPGKEREFVGAISWRAGTT - YYTDSVKGRFTVSRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCVARRPYDQVDTAYDY ---WGRGTQVTVS |
| 186 | LACAVTGRGPFNHRVG - WFRQAPGKEREFVWLLWQIGRT - DYADS VKNRFTIAKDSGENTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAANWRTNVLGYSVSGDY ---WGQGTQVTVS |
| S3 | LSCAASGDTSRFSMG - WFRQAPGKEREFVAVVRGDSVT - LYLDVVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCARARTYTTREPYDYDN ---WGQGTQVTVS |
| L8 | LSCAASGRIFSIYSMG - WYRQAPGKQRELVAVVSSGGT - YYADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAARDGAVVHNSGARYDY ---WGQGTQVTVS |
| T8 | LSCAASGRITSMYPMA - WFRQAPGKEREFVARINRSGGT - YYADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCNRALWVDSRGRPLRNDY ---WGQGTQVTVT |
| 180 | LSCAASGDTSDIT SMA - WYRQSPGSGQRELVAEIASGRNT - NYADS VKGRFTVSMNSARNMFLQMNLSLNPEDTAVYYCRVTVVYYPDEAEYSYDY ---WGQGTQVTVS |
| 174 | LSCVASGN IANIGTMG - WHRQAPGKQRELVAVVYGGRT - TYADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCNADILSLTGGLYARRDY ---WGQGTQVTVS |
| 163 | LSCAASGRITSSYTMG - WFRQAPGKEREFVAAINWSSST - YYADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAATHSIRAVIPGLDY ---WGQGTQVTVS |
| 193 | LSVGSGRITFSIVMG - WFRQAPGEEREFVSAISQYTDST - YYADS VKGRFTISKDNTKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAAHDKYRAIDSVLYDY ---WGQGSQVTVS |
| 199 | LSCAASGRSFSSVIMG - WFRQAPGKEREFVAAIARSFGGT - YYADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAADYSFYSAISTDQYDY ---WGQGTQVTVS |
| 192 | LSCAASGRITSSYAMG - WFRQAPGKEREFVAAINWSSGST - VYTDVSKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCGQGRYISYSYRAREYDY ---WGQGTQVTVS |
| 194 | LSCVASG IFSGKAMG - WYRQAPGQRELVAAVSTGTT - TYTDVSKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAADPRGFLYSDVNSWGY ---WGQGTQVTVS |
| G2 | LSCAASGRITFSAMG - WFRQAPGKEREFVAINWSSVMK - SYSDSVKGRFTISRDNNAKNTVFLQMKLLKPEDTAVYYCAYVDLGGDEGDDHGY ---WGQGTQVTVS |
| G7 | LSCTASGHTYRYAMG - WFRQAPGKEREFVAATSATTMAT - SYADS VKGRFTISRDSARPVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAARMYTTQNGNEYPY ---WGQGTQVTVS |
| 178 | LSCAASGYFRVGSMG - WYRQAPGQRELVATITDYTT - NYADS VKGRFTVSRDNPKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCSADVRRRSYEYTYTQY ---WGQGTQVTVS |
| 185 | LSCAASGRITSLYVMA - WFRQAPGREREFVASIDWSGPN - DYADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAASFRMTSSASSYDY ---WGQGTQVTVS |
| G9 | LSCAASG IFSFNAMG - WFRQAPGKQRELVATITNSGSI - NYADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCYADVQTASWGLAYEY ---WGQGTQVTVS |
| L1 | LSCTASGNIATIFTMD - WYRQAPGKQRELVAVFTDGNS - NYAASVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCSADLRVPGYRSREQY ---WGQGTQVTVS |
| T1 | LSCAASGTLFINTMG - WYRQAPGTQRELVAAITSRGST - SYVDSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYFCAADLVGSSRPRSVDY ---WGQGTQVTVS |
| T9 | LSCAASGRTLSSNTMG - WFRQAPGKEREFVANINWSGT --- AYGDSVKGRFAVSRDNEKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAA VRRRNGTRWSYDY ---WGQGTQVTVS |
| S7 | LSCEASGNIF SINAMG - WYRQAPGQRELVATITKGGNI - NYSHVMGRFTISDNANWVFLQMNLSLNPEDTAVYYCQAAPVLLSLRPNRY ---WGQGTQVTVS |
| 167 | LSCAASGRTLSTYAMG - WFRQAPGKEREFVGRIDWSGTT - SYADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCGAAHIWSLVVSSYAY ---WGQGTQVTVS |
| 172 | VSCAASGRTFSL SMA - WFRQAPGKEREFVADINLSGSS - RYADS VKGRFTISRDNNAKNTVALQMNRLTPEDTAVYYCAAARAFTRRASNVDY ---WGQGTQVTVS |
| 184 | LSCAAA GSMRAFAMA - WYRQVPKQRLVAVSNGGQR --- WYADFVKGRFTISRDDAKNTVHLQMNLSLNPEDTAVYYCNAGLYTGGTYRGNY ---WGQGTQVTVS |
| L5 | LSCAASRS IIRINAMA - WYRQAPGKQRELVAAITSVGST - NYANSVKGRFTVSRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAAKPNDKLNPSSYDY ---WGQGTQVTVS |
| T5 | LTCIVEGGSVAADYYY - WTWMRQSPGKELEWLGLLAYTGKPYSSPFKSRATISRDTSKNQFTLQLTSTVPEDTAVYYCARDTVLRRARREFGS ---WGQGTQVTVS |
| T3 | LACAASTIFSRNMG - WYRQAPGKQRLVASITSGGNT - WYADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCNRPFPYTRLLEHY ---WSQGTQVTVS |
| 10 | LSCVASGTFSSVIMG - WFRQAPGKEREFVAGITRHDPT - GYADS VQGRFTVSRNSAMKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCAARRAFTRRSDFEY ---WGQGTQVTVS |
| 177 | LSCATSGSIFAIGAVA - WYRQAPGNQRELVAPIPSGSGT - DVADS VKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSLNPEDTAVYYCYAFIASVAGRWSPY ---RGQGTQVTVS |
| 171 | LSCAASGRIFSSLDMG - WFRQAPGKDFVTAISRSTGT --- YYADS AKGRFTISRDNNAKNTVDLQMNLSLNPEDTAVYYCGVLTVDADQNTQY ---WGQGTQVTVS |

Fortsetzung Primärbibliothek von Lama 540

Seq.

S6 LSCAASGRITFSWTTG-WFRQAPGAEREFVATINWNGAST--YYANSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNDLKPEDTALYQCAAGLPARTVFDY-----YGQGTQVTVS
L7 LSCAASGSIFSNAMG-WFRQAPGKQRELVAITINSGSI--NYADSVKGRFTLSRDNAKNTVYLQMNLEVEDTAVYYCYLGNWRGSGWLDH-----WGQGTQVTVS
162 LSCAASGSIGRFNAMG-WYRQAPGKQRELVAITSGGFT--NYKEPEGGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCYLKVWLSLWYDY-----WGQGAQVTVS
197 LSCAASGSIASFNMA-WHRRVPGKQRELVAITAGGVT--NYADSAKGRFTISRDNARNTVALQMNLSLEPEDTAVYYCNVHWFYYKEYDY-----WGQGTQVTVS
188 LSCVASGIGIRIYSYE-WYRQTPGKQRELVAITSSITRST--NYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTALYCCARRRGPGRYDSDS-----WGQGTQVTVS
S5 LSCAASGTMNLINAMG-WYRQAPGKQREWVAIVMRSST--TYKESVKGFRFTISRDDAENTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNVFSHATWTNY-----WGQGTQVTVS
G6 LSCAASGSSFSFYDMG-WYRQAPGKQRLDVAITSSGST--NYADSVKGRFTISRDPTRKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNYNPWTASSVY-----WGQGTQVTVS
L9 LSCAASENISRFNVMG-WYRQAPGKREFVAAISWSGVRT--NYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTATYYCAIYTRPNLAI-----RGQGTQVTVS
187 LSCVASGSIFVNTQME-WHRQAPGKQRELVTGGGFT--RYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLQPEDTAVYYCNSGETSGPRAY-----WGQGTQVTVS
75 LSCAASGRIFSIGAMA-WYRQAPGKQRELVAIVSSGGIT--NYADSVKGRFTISRDNAKNTIDLQMNLSLKPEDTAVYYCNAVTDFFLEY-----RGQGTQVTVS
166 LSCAASGRITFSYGMG-WFRQAPGKREFVAAIAWSSGNT--YYADSVKGRFTISRDNPKNTMYLRMNSLKPEDTAVYYCACAPSSYDY-----WGQGTQVTVS
S4 LSCAASGGTIFSYIMG-WFRRAPGKREFVAAVSYGGST--YSDSVKGRFTISRDNVKNMVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNLRFGRNY-----WGQGTQVTVS
179 LSCAASGSTFSLNTMG-WFRQAPGKQRELVAITRVFIT--NYADSVKGRFTISRDNRNKNTVYLQNSLKPEDTAVYYCWGWDVSKNY-----WGQGTQVTVS
183 LSCAASGGVFRNYHMG-WYRQAGRQREFVAIFTSVAT--NYANAVRGRFTMSRDNAKTSVSLQMNLSLKPEDTAVYYCRAWDLKEF-----WGQGTQVTVS
182 LSCAASGSISSINMA-WYRQAPGKQRDVARATSRGNT--MYADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNILKPEDTAVYYCFLSEGGMTY-----WGKGTLVTVS
190 LSCAASGRTLRCYSVG-WFRQPPGKREFVAGISSNGVGT--TYADSVKDRFAISR-----STVYLQMNLSLKPEDTAVYYCYVFRGVHY-----WGQGTQVTVS
16 LSCAASGFAFRISMY-WFRQPPGKELEEVSAINPDGGGT--TYKWSVNGRFTVSRDNEKNTLYLQMNLSLKPEDTATYYCSRDSRGT-----RGQGTQVTVS
T2 LSCAASGSIFSNARG-WYRQAPGKQRELVAITSGGFT--NYADFVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCNTVPFGS-----WGQGTQVTVS
169 LSCAASGSIFSLNAMG-WHRQAPGKQRELVAIVIGSGST--RYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNTHPFGY-----WGQGTQVTVS
181 LSCAASGSIFSLNAMG-WHRQAPGKQRELVAIVIGSGST--RYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNTHPFGY-----WGQGTQVTVS
L6 LACSASGFTFSNYMK-WFRQAPGKRELVAIVIGSGST--NYADSVKGRFTISRDNAKNTGLQMNLSLKPEDTAVIICNTESY-----WGQGTQVTVS
191 LSCAVSGSIFRVNAMG-WYRQAPGRERELVAFISGDGRT--IYADSVQGRFTISRDNTRKNAVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNYCYGH-----WGQGTQVTVS