

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. G. Reifenberger

Generierung und Charakterisierung muriner und kamelider Antikörper gegen
Reelin

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sabrina Köber
2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Carsten Korth

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Philipp Lang

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Nicholas J. Bradshaw, Svenja V. Trossbach, Sabrina Köber, Susanne Walter, Ingrid Prikulis, Sascha Weggen and Carsten Korth, (2017), Disrupted-in-Schizophrenia 1 regulates the processing of reelin in the perinatal cortex. *Schizophr Res*
2. Antony S. K. Yerabham, Andreas Müller-Schiffmann, Tamar Ziehm, Vladimir Arinkin, Andreas Stadler, Sabrina Köber, Xela Indhurkya, Rita Marreiros, Svenja Trossbach, Nicholas J. Bradshaw, Ingrid Prikulis, Oliver H. Weiergräber, Carsten Korth, (2018), Biophysical insights from a single chain camelid antibody - Disrupted In Schizophrenia 1 protein (691-836) complex. *PLoS One*
3. Nina S. Gowert, Irena Krüger, Meike Klier, Lili Donner, Friederike Kipkeew, Michael Gliem, Nicholas J. Bradshaw, David Lutz, Sabrina Köber, Harald Langer, Sebastian Jander, Kertin Jurk, Micheal Frotscher, Carsten Korth, Hans H. Bock, Margitta Elvers, (2017), Loss of Reelin protects mice against arterial thrombosis by impairing integrin activation and thrombus formation under high shear conditions. *Cellular Signalling*, (Vol 40), 210-221

Zusammenfassung

Reelin ist ein extrazelluläres Matrixprotein das sowohl im embryonalen Gehirn als auch im adulten eine wichtige Rolle spielt. Während der embryonalen Phase sorgt Reelin für eine reguläre Strukturierung des Kortex. Im adulten Gehirn wirkt Reelin positiv auf die Bildung von dendritischen Spines, sowie auf die synaptische Plastizität, ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang mit Lernen und Gedächtnis.

Zur weiteren Untersuchung von Reelin wurden zunächst einzelne Fragmente kloniert und anschließend zur Immunisierung von Mäusen und Lamas genutzt. Im Anschluss erfolgte die Charakterisierung der murinen und kameliden Antikörper sowie die Testung an humanen Proben und in primärer Zellkultur.

Im Rahmen der Charakterisierung konnten zwei N-terminale murine Antikörper identifiziert werden, die sowohl Reelin haltiges Zelllysate als auch Reelin haltigen Überstand erkannten (11G11.C6, 20E12.E5). Andere erkannten Reelin nur im gewonnenen Überstand (12G2). Kamelide Antikörper konnten sowohl gegen das N- terminale (24H10) als auch gegen das C- terminale (1949E11) Reelin Fragment identifiziert werden. Bei der Testung der Funktionalität in primären Neuronen konnte im Dab -1 Phosphorylierung Assay kein signifikanter Unterschied nach Zugabe der Antikörper identifiziert werden. Im Stripe Assay jedoch zeigten sich signifikant mehr Neuriten im Reelinstreifen nach Zugeben von 11G11.C6 ($p = 0,000009$) und 20E12.E5 ($p = 0,000008$). Die kameliden Antikörper 1949E11 ($p = 0,061$) und 24H10 ($p = 0,092$) zeigten ebenfalls tendenziell mehr Neuriten, jedoch ohne Signifikanz. Die Untersuchung von humanen Liquor Proben von Patienten mit Depression, Schizophrenie, Demenz sowie entzündlicher ZNS Erkrankung zeigte im Vergleich zu einer Kontroll- Gruppe keinen signifikanten Unterschied. Jedoch konnte ein signifikant höherer Reelingehalt im Lymphozytenlysat von Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($p = 0,019$).

Zusammenfassend konnten wir sowohl kamelide als auch murine N-terminale Antikörper herstellen. C-terminale Antikörper konnten nur als kamelide Antikörper hergestellt werden. Hinweise auf eine Funktionalität der Antikörper konnten gefunden werden, jedoch bei kleiner Testzahl sowie zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen der einzelnen Tests untereinander nicht letztlich bewiesen werden. Die murinen Antikörper erkannten zuverlässig Reelin in humanen Proben, wobei Patienten mit Schizophrenie einen höheren Reelingehalt im Lymphozytenlysat, bei insgesamt hoher Variabilität, zeigten.

Abstract

Reelin is an extracellular matrix protein that is important during brain development as well as in mature brain. While development Reelin forms the regular cortex structure. In the mature brain it is important for generation of dendritic spines as well as synaptic plasticity, so a potential correlation with learning and memory is supposed.

For further investigation of Reelin first Reelin fragments were reproduced. These were used for immunization in mouse and lama. After that the mouse and camelid antibodies were characterized and used for testing in human samples and in primary neurons.

Two N-terminal mouse antibodies were identified, which bind reelin in positive cell lysates as well as in supernatant (11G11.C6, 20E12.E5). Others only bind Reelin supernatant (12G2). Camelid antibodies could be identified for C-terminus (1949E11) as well as for N-terminus (24H10). Testing in vitro activity in primary neurons, a Dab-1 phosphorylation assay was performed. It showed no significant difference after applying the antibodies. The second test, a stripe assay, showed significant more dendrites in the green stripes after adding ($p = 0,000009$) and 20E12.E5 ($p = 0,000008$). After adding camelid antibodies for 1949E11 ($p = 0,061$) and 24H10 ($p = 0,092$) a higher amount of dendrites was identified too, but not significant. Investigation of human cerebrospinal fluid samples from patients with depression, schizophrenia, dementia as well as inflammatory disease showed no significant difference in the amount of Reelin. But in human lymphocyte lysate the amount of reelin was significant higher in patients with schizophrenia than in a healthy control group.

In summary we could identify camelid and mouse antibodies against N-terminal Reelin. C-terminal antibodies were only identified as camelids. Indication for an in vitro activity could be found, but because of a small test number as well as different results between both tests it could not be proofed. Human Reelin was reliably identified by the mouse antibodies. Patients with schizophrenia had a significant higher amount of Reelin, but a high inter testing variability.

Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
c-DNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eage Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DAB-1	<i>disabled 1</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DH5a	kompetente E.coli
ECL	<i>Enhanced chemical luminescence</i>
ELIFA	<i>Enzym-linked-immunofilter-assay</i>
ELISA	<i>Enzym-linked-immunosorbent-assay</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E.coli	Escherichia coli
FCS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HT	Hypoxanthin Thymidin
HGPRT	Hypoxantin-Guanin Phosphoribosyltransferase
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEK-Zellen	<i>Human embryonic Kidney Zellen</i>
HB2151	Bakterien zur Produktion von Antikörperfragmenten
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDA	Kilo Dalton
kbp	Kilo Basenpaare
MEM	Minimum essential medium
m-RNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
Ni-NTA Agarose	Nickel- Nitrilotriessigsäure

OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate buffered saline</i> mit Tween 20
PFA	Perfluoralkoxylalkan
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease Inhibitor)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SDS- PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEA	Triethylamin
TG1	Elektrokompetente Bakterien
UV- Licht	Ultraviolettes Licht

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Reelin.....	1
1.1.2 Struktur, Bindungsstellen, Funktion	1
1.1.3 Reelin im embryonalem Gehirn, Reeler Maus	3
1.1.4 Reelin im adulten Gehirn.....	4
1.2 Erkrankungen im Zusammenhang mit Reelin	5
1.1.5 Autosomale rezessive Lissencephalie	5
1.2.2 Morbus Alzheimer	6
1.2.3 Epilepsie	7
1.2.4 Psychiatrische Erkrankungen (Schizophrenie, Autismus, Bipolare Störung)	8
1.3 Antikörper.....	11
1.3.1 Allgemeines	11
1.3.2 Maus als Beispiel für konventionelle Antikörper.....	11
1.3.3 Camelidae und deren schwere Ketten Antikörper	12
1.4 Bestehende Antikörper gegen Reelin	14
1.5 Zielsetzung der Arbeit	15
2. Materialien und Methoden	16
2.1 Methoden	16
2.1.1 Allgemeine Materialien	16
2.1.2 Chemikalien.....	17
2.1.3 Puffer	20
2.1.4 Primer	24
2.1.5 Antikörper.....	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Allgemeine Zellkultur.....	26
2.2.2 Klonierung	28
2.2.3 Proteinexpression und Aufreinigung	35
2.2.4 Immunisierung Maus und Llama.....	40
2.2.5 Fusion	40
2.2.6 Selektion der Antikörperklone.....	44
2.2.7 Typisierung der Antikörper	47
2.2.8 Phage display	49
2.2.9 Primäre Zellkultur.....	66
2.2.10 Stripe Assay	68
2.2.11 Phosphorylierungs Assays	71
2.2.12 Liquor Proben	72
2.2.13 Lymphozyten	73
2.2.14 Minireelin	74
3. Ergebnisse	75
3.1.Klonierung und Expression von Reelin Fragmenten.....	75
3.2. Murine Antikörper N-terminal	79
3.2.1. Screening	79

3.2.2 Mutagenese	80
3.2.3 Charakterisierung der Antikörper	81
3.2.3.1 Im Western- Blot für Überstand und Lysat positive Antikörper	81
3.2.3.1.1 Subklonierung	81
3.2.3.1.2 Antikörper 11G11.C6	82
3.2.3.1.3 Antikörper 20E12.E5	83
3.2.4 Im Western-Blot nur für den Überstand positive Antikörper	84
3.2.5 Im Western-Blot negative Antikörper	86
3.3. Maus Antikörper C-terminal	87
3.4. Kamelide Antikörper	91
3.4.1. Verbesserung der Methode	91
3.4.3.Charakterisierung N-terminale Antikörper	96
3.4.4 Charakterisierung C-terminale Antikörper	97
3.4.5. ELIFA Untersuchung der Antikörper	98
3.5 CSF Blot	100
3.6 Lymphozyten Blot	107
3.7 Minireelin	109
3.8 Dab-Phosphoassay	113
3.8.1 Methodenverbesserung	113
3.8.2 Ergebnis	114
3.9 Stripe assay	117
4. Diskussion	125
4.1 Klonierung und Expression von Reelinfragmenten.....	125
4.3. Generierung und Charakterisierung der kameliden Antikörper	128
4.4 Untersuchung unterschiedlicher humanen Proben	129
4.5 Testung auf in-vitro Aktivität	130
5. Literaturverzeichnis	132

1. Einleitung

1.1 Reelin

Reelin ist ein 388 kDa großes extrazelluläres Matrixprotein, das während der embryonalen Phase von Cajal Rezinus Zellen gebildet wird (D'Arcangelo, Miao et al. 1995, Ogawa, Miyata et al. 1995, Frotscher 1998). Dieses Protein ist während der Embryonalphase für die richtige Migration und damit Positionierung der Neurone verantwortlich (D'Arcangelo, Miao et al. 1995, Frotscher 1998). Der Verlust des für Reelin codierenden Teil auf Chromosom 7q22 führt bei der Maus zu dem spezifischen Reeler Phenotyp (D'Arcangelo, Miao et al. 1995)

Beim Menschen ist die autosomale rezessive Lissencephalie mit cerebellärer Hypoplasie mit einer Reelin Mutation auf Chromosom 7q22 assoziiert (Hong, Shugart et al. 2000). Hierbei ist die Entwicklung stark verzögert, sodass Gehen oder Stehen ohne Hilfe nicht möglich sind. Weiterhin assoziiert sind eine Hypotonie und Epilepsie (Hong, Shugart et al. 2000).

Neben der Rolle im Gehirn fand man Reelin ebenfalls in Leber (Botella-Lopez, de Madaria et al. 2008, Okamura, Nomoto et al. 2011), Blut/Hämostase (Tseng, Huang et al. 2010) und Plasmazellen (Underhill, George et al. 2003).

1.1.2 Struktur, Bindungsstellen, Funktion

Reelin ist ein ca. 388 kDa großes Glykoprotein (D'Arcangelo, Miao et al. 1995). Produziert und sezerniert wird es während der embryonalen Phase von Caja Rezinus Zellen (Frotscher 1998, Forster, Jossin et al. 2006) Später findet man Reelin in GABAergen sowie glutamatergen Interneuronen (Pesold, Impagnatiello et al. 1998, Abraham and Meyer 2003).

Reelin besteht aus circa 3400 Aminosäuren (AS), die ersten 400 bilden den n-Terminus, der F-spondin ähnelt (D'Arcangelo, Miao et al. 1995). Da F-Spondin die Extension und Adhäsion der Neurite spinal reguliert (Klar, Baldassare et al. 1992), wurde recht früh vermutet, dass Reelin eine Auswirkung auf die Zellmigration haben könnte (D'Arcangelo, Miao et al. 1995).

Gefolgt wird der N- terminus von 8 350-380 AS langen Repeats, die jeweils aus 2 Subgruppen bestehen, die von einem EGF-like Motiv getrennt werden (D'Arcangelo, Miao et al. 1995).

Reelin bindet an zwei Lipoproteinrezeptoren, an den Apolipoprotein E Rezeptor 2 (ApoER2) sowie an den very-low-density Lipoprotein Rezeptor (VldLR) (Trommsdorff, Gotthardt et al. 1999). Doppel Knockout Mäuse mit $VldLR^{-/-}$ und $ApoER2^{-/-}$ zeigten eine ähnliche neuronale Fehlentwicklung wie Reeler Mäuse (Trommsdorff, Gotthardt et al. 1999). Bei jedoch nur Einfach Knockout Mäusen, die entweder $VldLR^{-/-}$ oder $ApoER2^{-/-}$ sind, konnten die typischen neuropathologischen Befunde der Reeler Maus nicht gefunden werden. Daher wird vermutet, dass die Rezeptoren ihre Funktion scheinbar gegenseitig zu einem gewissen Grad kompensieren können (Trommsdorff, Gotthardt et al. 1999). Durch Bindung von Reelin an die Rezeptoren wird eine Tyrosin-phosphorylierung von *Dab1* (*disabed 1*) bedingt und dadurch die neuronale Migration beeinflusst (Howell, Herrick et al. 1999, Howell, Herrick et al. 2000, Keshvara, Benhayon et al. 2001).

Reelin wird in vivo und vitro durch eine extrazelluläre Metalloprotease an zwei unterschiedlichen Stellen, nach Domäne 2 und 6 in 3 unterschiedlich große Fragmente gespalten, 300 kDa, 180 kDa, 70-80 kDa (Lambert de Rouvroit, de Bergeyck et al. 1999).

Das N-terminale Fragment, das das funktionsblockende CR50-Epitop enthält (Ogawa, Miyata et al. 1995) bildet Homopolymere aus über 40 Monomeren (Utsunomiya-Tate, Kubo et al. 2000). Ohne das CR-50 Epitop ist es nicht in der Lage Homopolymere zu bilden und daher kann auch keine *Dab1*-phosphorylierung erfolgen (Utsunomiya-Tate, Kubo et al. 2000). Jedoch bindet der N-Terminus nicht an die Rezeptoren (Hiesberger, Trommsdorff et al. 1999)

Das volle Länge Reelin bildet Homodimere durch Disulfidbrücken (Kubo, Mikoshiba et al. 2002)

Das zentrale Fragment (Domäne 3-6) bindet gleichermaßen an ApoER2 sowie VLDLR und kann somit eine *Dab1* Phosphorylierung bedingen (Jossin, Ignatova et al. 2004). Das zentrale Fragment entspricht funktionell dem volle Länge Reelin (Jossin, Ignatova et al. 2004).

1.1.3 Reelin im embryonalem Gehirn, Reeler Maus

1951 wurde zum ersten Mal die sogenannte Reeler Maus durch Falconer beschrieben. Auffällig war ein schwankendes Gangbild der Mäuse, im Sinne einer Ataxie, einhergehend mit einer häufigen Fallneigung (Falconer 1951). Zudem wurde ein Tremor, als auch mentale Defizite festgestellt (Falconer 1951).

Neuropathologisch zeigte sich eine Fehlstrukturierung im Kortex, Cerebellum und Hippokampus (Hamburgh 1963, Mariani, Crepel et al. 1977, Caviness and Rakic 1978). Durch Untersuchung der Reeler Maus konnte als ursächlich das Protein Reelin, ein extrazelluläres Matrixprotein identifiziert werden, das vor allem in der embryonalen Phase der Neuronalen Migration exprimiert wird (D'Arcangelo, Miao et al. 1995, Hirotsune, Takahara et al. 1995).

Die normale Entwicklung der Kortexstrukturierung wird durch ein *Inside out pattern* charakterisiert. Das bedeutet, dass die Zellen an der ventrikulären Zone gebildet werden und im Anschluss radial zur endgültigen Position migrieren (Rakic 1972). Früh gebildete Neurone bilden dann eine Schicht nahe der ventrikulären Zone, zuletzt gebildete Neurone müssen an diesen vorbei migrieren und bilden die superfizielle Zone (Rakic 1988, Frotscher 1998). Bei der Reeler Maus kann die Migration an frühen Neuronen vorbei nicht stattfinden, sodass die Position der Neurone in umgekehrter Reihenfolge vorliegt (siehe Abb 1.1) (Caviness, So et al. 1972, Rakic and Caviness 1995).

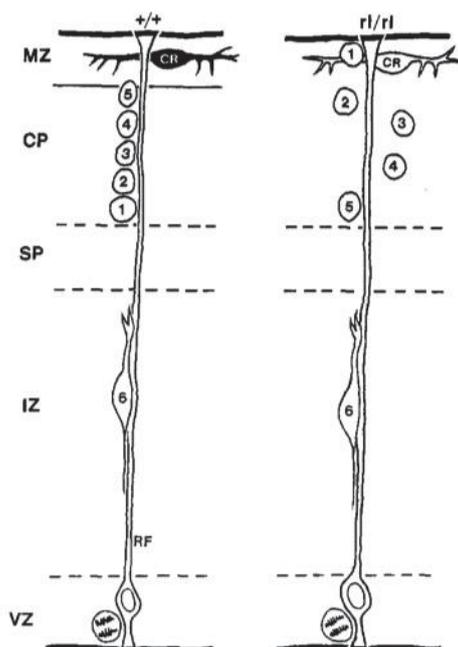


Abb.: 1.1 Skizze der neuronalen Migration in Reeler und Wildtyp Mäusen aus Rakic and Caviness (1995)

Gezeigt wird die Migration der Neurone (1-6) wobei 1 die zuerst entstandenen, 6 für zuletzt differenzierte Neurone kennzeichnet, entlang radialer Gliafasern. Die Migration erfolgt von dem Bildungsort der Ventrikulären Zone (VZ) in Richtung Marginal Zone (MZ) unter Bildung einer kortikalen Platte (CP). In der Marginalen Zone (MZ) wird durch die Cajal- Rezinus Zellen (CR) Reelin in der Wildtyp Maus (+/+) exprimiert, im Falle der Reeler Mäuse (rl/rl) nicht exprimiert. Bei der Wildtyp Maus lässt sich das *inside out pattern* darstellen, da die später gebildeten Neurone (5) am nächsten zu der Marginal Zone zu liegen kommen. In Reeler Mäusen ist die Migration der jüngeren Neurone vorbei an den älteren nicht möglich sodass sie eine umgekehrte Kortexstrukturierung aufweisen.

Während der embryonalen Phase wird Reelin von Cajal Rezinus Zellen in der Marginalzone gebildet (Abraham and Meyer 2003). Über eine Phosphorylierung an Serin³ von N-cofilin kann F-actin nicht depolymerisiert werden, was zu einer Stabilisierung des Zytoskeletts und somit zu einer Migration der Neurone in Richtung Marginalzone führt (Chai, Forster et al. 2009).

1.1.4 Reelin im adulten Gehirn

Im postnatalen Gehirn ist Reelin an der Reifung der Dendriten beteiligt (Chameau, Inta et al. 2009).

Wurde im embryonalen Gehirn das Reelin noch von den Cajal- Rezinus Zellen exprimiert (Abraham and Meyer 2003) lässt sich Reelin im postnatalem Gehirn sowohl in GABAergen als auch in glutamatergen Interneuronen (Pesold, Impagnatiello et al. 1998, Abraham and Meyer 2003) im Neocortex, Hippokampus sowie im Bulbus olfactorius finden (Alcantara, Ruiz et al. 1998, Frotscher 1998).

Die postnatale Wirkung von Reelin bezieht sich auf die Morphologie der dendritischen Spines (Stanfield and Cowan 1979). So führt ein verminderter Reelin Gehalt zu einer verminderten Ausbildung von dendritischen Spines (Liu, Pesold et al. 2001, Pappas, Kriho et al. 2001, Niu, Renfro et al. 2004). Ebenfalls führt ein Mangel an Reelin-Rezeptoren ApoER2, VLDLR sowie des Mediatorproteins Dab1 zu einer geringeren Ausbildung von dendritischen Spines (Niu, Renfro et al. 2004, Dumanis, Cha et al. 2011).

Eine weitere Funktion von Reelin im postnatalem Gehirn ist eine Erhöhung der synaptischen Plastizität durch Erhöhung der Langzeitpotenzierung (LTP= *long-term potentiation*) und somit ein starker Indikator für einen möglichen Zusammenhang zwischen Reelin und Gedächtnis bzw. Lernen (Weeber, Beffert et al. 2002, Beffert, Weeber et al. 2005, Doehner and Knuesel 2010). So führt die Zugabe von rekombinantem Reelin zu einer Erhöhung der LTPs (Doehner and Knuesel 2010), die durch repetitive Stimulation zu einer langfristigen Erhöhung der synaptischen Plastizität führen kann (Bliss and Lomo 1973). Die Reelinwirkung erfolgt durch die Bindung an ApoER2 sowie VLDLR mit anschließender Modulation der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) und AMPA (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoaxole proprionic acid*) Rezeptoren (Chen, Beffert et al. 2005, Herz and Chen 2006)

Letztlich führt eine Überexpression von Reelin zu mehr dendritischen Kontakten, mehr dendritischen Spines, sowie einer Erhöhung der LTPs und damit zu einer vermehrten synaptischen Plastizität (Pujadas, Gruart et al. 2010, Wasser and Herz 2017).

Ein weiterer Hinweis auf den Zusammenhang zwischen der Reelinkonzentration und dem Gedächtnis zeigt, dass beim physiologischen Altern die Anzahl Reelin exprimierender Neurone abnimmt, und dies mit einer Störung des episodischen Gedächtnisses korreliert (Knuesel, Nyffeler et al. 2009). Zudem akkumuliert Reelin im alternden Gehirn, co-lokalisiert zu Amyloid Plaques (Doehner, Madhusudan et al. 2010).

1.2 Erkrankungen im Zusammenhang mit Reelin

1.1.5 Autosomale rezessive Lissencephalie

Beim Menschen konnte ein Zusammenhang zwischen der autosomalen rezessiven Lissencephalie mit cerebellärer Hypoplasie mit einer Reelin Mutation festgestellt werden (Hong, Shugart et al. 2000).

Klinisch konnten Kinder mit einer milden Lissencephalie sowie einer cerebellären Hypoplasie, Hypotonie und perinatalem Lymphödem, chylärem Aszites identifiziert werden (Hourihane, Bennett et al. 1993, Hong, Shugart et al. 2000). Die kognitive Entwicklung war in allen betroffenen Kindern verzögert mit zum Teil keiner Sprachbildung und der Unfähigkeit zu Sitzen oder zu Stehen (Hourihane, Bennett et al. 1993, Hong, Shugart et al. 2000). Eine Muskelbiopsie wies zudem eine abnormale neuromuskuläre Verbindung auf (Hourihane, Bennett et al. 1993). Epilepsien konnten medikamentös behandelt werden (Hong, Shugart et al. 2000).

Neben einer Mutation des Reelin- Gens auf Chromosom 7q22, konnte bei den homozygoten betroffenen Patienten kaum bzw. kein Reelin Protein im Serum nachgewiesen werden (Hong, Shugart et al. 2000).

Die zusätzlich zu den cerebralen Auffälligkeiten auftretenden Symptome wie z.B. das perinatale Lymphödem oder der Aszites weisen auf weitere Funktionen des Reelins außerhalb des Gehirns hin (Hong, Shugart et al. 2000).

1.2.2 Morbus Alzheimer

Eine demenzielle Erkrankung wird nach der aktuellen Leitlinie durch zunehmende kognitive Einschränkungen sowie Verlust von Alltagskompetenzen definiert (DGN 2015). Es ist laut ICD 10 ein chronisch progredientes Syndrom das vor allem die höher kortikalen Kompetenzen wie zum Beispiel Denken, Orientierung, Auffassung oder Rechnen einschränkt (Gaubner 2017).

Charakteristisch für den M. Alzheimer ist das Vorkommen von hyperphosphoryliertem Tau-Protein, das sich in Fibrillen zusammenlagert (Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986), sowie die Ablagerung von β -Amyloid Plaques (Glennner and Wong 1984). Durch sequentielle Proteolyse des β -Amyloid Precursor Proteins (APP) durch β - und anschließend γ - Sekretase (Golde, Estus et al. 1992, Haass, Koo et al. 1992) kommt es zur Sekretion von β -Amyloid 40/42 welches akkumuliert (Gouras, Tsai et al. 2000)

Unter anderem scheint Reelin eine Rolle in der Entwicklung einer Alzheimer Demenz zu haben. So konnte in Reelin, VLDLR oder ApoER2 defizienten Mäusen, eine im Vergleich zu Wildtyp (WT) Mäusen höhere Konzentration an hyperphosphoryliertem Tau gefunden werden (Hiesberger, Trommsdorff et al. 1999). Dab1 knockout Mäuse zeigen ebenfalls eine höhere Tau Hyperphosphorylierung (Brich, Shie et al. 2003). Zudem konnte im Alzheimer Maus Modell eine verminderte Reelin Konzentration im Vergleich zu WT Mäusen gefunden werden (Palladino, Nicolia et al. 2017)

Vermindertes Reelin führt zudem zu einer erhöhten Anzahl sowie einem früheren Auftreten von Amyloid Plaques und vermehrte Ablagerung von Tau- Fibrillen (Kocherhans, Madhusudan et al. 2010, Pujadas, Rossi et al. 2014)

Zudem hat eine erhöhte Reelin Konzentration eine protektive Wirkung gegenüber Amyloid induzierter Neurotoxizität und wirkt kognitiven Defiziten entgegen (Durakoglugil, Chen et al. 2009, Kramer, Xu et al. 2011, Pujadas, Rossi et al. 2014).

1.2.3 Epilepsie

Eine Epilepsie wird als wiederholt auftretende epileptische Anfälle ohne erkennbaren Provokationsmechanismus definiert (Grehl 2008). Ein epileptischer Anfall ist eine pathologische exzessive oder synchrone neuronale Aktivität (Fisher, Acevedo et al. 2014). Ätiologisch werden strukturelle, genetische, infektiöse, metabolische, autoimmune und unbekannte Mechanismen unterschieden (Neurologie 30.04.2017). Häufige Manifestation ist vor dem 15. Lebensjahr, ein zweiter Gipfel nach dem 65. Lebensjahr, hierbei vor allem strukturell durch z.B. Demenzen, Schlaganfälle oder Tumore hervorgerufen (Grehl 2008).

Die Temporallappenepilepsie ist eine häufige, fokale Epilepsie des Erwachsenenalters (Manford, Hart et al. 1992). Unterschieden wird nochmals je nach genauerer Lage des Fokus eine mesiale und eine laterale Temporallappenepilepsie (Guedj, Bonini et al. 2015).

Die Mesiale Temporallappenepilepsie (MTLE) ist charakterisiert durch fokale epileptische Anfälle sowie einer Ammonshornsklerose, die histologisch durch einen Neuronenverlust des Hippokampus, sowie einer Dispersion der Körnerzellschicht (*Granule cell dispersion* = GCD) gekennzeichnet ist (Houser 1990). Eine Dispersion der Körnerzellschicht wurde bereits in Reeler Mäusen beobachtet (Caviness and Sidman 1973, Rakic and Caviness 1995), sodass ein Zusammenhang mit Reelin vermutet wurde. Ein reduzierter Reelingehalt konnte in Gehirnschnitten mit GCD, im Sinne einer inversen Korrelation, nachgewiesen werden (Haas, Dudeck et al. 2002, Frotscher, Haas et al. 2003, Heinrich, Nitta et al. 2006, Dubeau, Madhusudan et al. 2011). Jedoch handelt es sich bei der GCD um keinen Entwicklungseffekt, sondern um die Auswirkung des Reelinmangels auf adulte Körnerzellen (Heinrich, Nitta et al. 2006, Haas and Frotscher 2010). Dieser Vorgang kann durch erneutes kultivieren in reelinhaltigem Medium reversibel gemacht werden (Haas and Frotscher 2010, Orcinha, Munzner et al. 2016).

Des Weiteren konnte eine Reelinmutation bei der autosomal dominanten lateralen Temporallappenepilepsie (ADLTE) zu der bekannten *LGII*- Mutation nachgewiesen werden (Dazzo, Fanciulli et al. 2015, Michelucci, Pulitano et al. 2017).

1.2.4 Psychiatrische Erkrankungen (Schizophrenie, Autismus, Bipolare Störung)

Auch psychiatrische Erkrankung wie Schizophrenie oder Autismus, sowie Major Depression konnten mit Reelin in Verbindung gebracht werden. So konnte eine 50%ige Reduktion der Reelin m-RNA und dessen Protein im Cortex, sowie im Cerebellum und Hippokampus von Patienten mit Schizophrenie und psychotischer bipolarer Störung nachgewiesen werden (Impagnatiello, Guidotti et al. 1998, Guidotti, Auta et al. 2000).

In späteren Studien konnte man ebenfalls eine Reduktion der Reelin- Immunreaktivität im Hippocampus von nicht psychotischen Patienten mit bipolarer Störung oder Major Depression nachweisen (Fatemi, Earle et al. 2000).

Des Weiteren wurde eine Reelin Reduktion bei Patienten mit Autismus festgestellt (Fatemi, Sary et al. 2001, Persico, D'Agruma et al. 2001).

Autismus Spektrum Störungen:

Zu den Autismus Spektrum Störungen (ASD) zählen sowohl das Aspergersyndrom, der frühkindliche Autismus (Kanner- Typ) als auch schwere Entwicklungsverzögerung, sowie der atypische Autismus (Schneider 2017). Die Autismus Spektrum Störung ist durch die Symptomtrias aus Störung der sozialen Interaktion und Kommunikation, stereotypes repetitives Verhalten sowie eng umschriebene Interessen charakterisiert (Schneider 2017). Bis zu 20% der ASDs liegen im Rahmen einer syndromalen Erkrankung (z.B. fragiles X-Syndrom, tuberöse Sklerose) (Miles 2011, Persico and Napolioni 2013), 80% ohne syndromalen Zusammenhang vor (Lammert and Howell 2016).

Eine Genomanalyse erbrachte einen signifikanten Zusammenhang zwischen Autismus und Chromosom 7 q (IMGSAC 1998). Da sich Reelin auf Chromosom 7q22 (DeSilva, D'Arcangelo et al. 1997, Hong, Shugart et al. 2000) befindet wurde dieses weiter untersucht.

Ein klarer Zusammenhang zwischen ASD und dem RELN Gen konnte nicht hergestellt werden. In mehreren Studien konnten hierzu unterschiedliche Ergebnisse festgestellt werden (Persico, D'Agruma et al. 2001, Krebs, Betancur et al. 2002, Zhang, Liu et al. 2002), 2014 konnte ein SNP (*single nucleotid polymorphism*) mit einer Risikozunahme einer ASD in Zusammenhang gebracht werden (Wang, Hong et al. 2014).

Ein reduzierter Reelin (Protein) Gehalt konnte im Cerebellum von Patienten mit ASD (Fatemi, Stary et al. 2001, Fatemi, Snow et al. 2005) sowie im superioren frontalem Kortex (Fatemi, Snow et al. 2005) nachgewiesen werden.

Auch eine mögliche Assoziation zum Reelin Pathway besteht (Fatemi, Snow et al. 2005, Iwata, Izumo et al. 2012, Li, Liu et al. 2013, Shen, Xun et al. 2016). Jedoch gibt es nur wenig Evidenz die direkt auf Dab 1, VLDLR, ApoER2 in Zusammenhang mit dem Risiko eine ASD zu entwickeln steht (Fatemi, Snow et al. 2005, Li, Liu et al. 2013, Shen, Xun et al. 2016).

Bisher konnte ein ASD ähnliches Verhalten bei heterozygoten Reeler Mäuse nicht nachgewiesen werden (Moy and Nadler 2008). So weisen auch beim Menschen die heterozygoten Eltern von Kindern mit autosomaler rezessiver Lissencephalie keine Hinweise auf das Vorliegen einer ASD auf (Hong, Shugart et al. 2000, Chang, Duzcan et al. 2007).

Gen- Umwelt Interaktionen machen die ätiologische Erklärung der ASD jedoch schwierig. So wirkt sich mütterlicher Stress in der Schwangerschaft auf die Expression von Reelin durch Promotormethylierung aus (Giovanoli, Weber et al. 2014). Da Reelin anfällig für umweltbedingte epigenetische Veränderungen ist, könnte eine mögliche Erklärung zur Entwicklung einer ASD sein, dass eine bereits bestehende Mutation zu einer verminderten Reelin Produktion führt und diese durch Umweltbedingungen weiter erniedrigt wird, so dass eine kritische Schwelle unterschritten wird (Giovanoli, Weber et al. 2014, Lammert and Howell 2016).

Schizophrenie, Bipolare Störung, Major Depression

Die Schizophrenie ist, nach der aktuellen Leitlinie, durch eine Störung Wahrnehmung, Denken, Ichfunktionen, Affektivität, Antrieb und Psychomotorik charakterisiert. Hierbei treten episodisch psychotische Symptome (positiv Symptome) wie Halluzinationen oder Wahn auf. Zudem werden negativ Symptome wie kognitive Einschränkungen, Antriebsminderung oder sozialer Rückzug beschrieben (DGPPN 2006).

In postmortalen Untersuchungen des Gehirns von Patienten mit diagnostizierter Schizophrenie konnte eine Reduktion des Reelin Proteins vor allem im präfrontalen Kortex festgestellt werden (Fatemi, Earle et al. 2000, Habl, Schmitt et al. 2012). Jedoch konnte

bisher kein klarer Zusammenhang mit einer bestimmten Mutation des RELN Gens nachgewiesen werden (Chen, Bao et al. 2017).

Ein weiterer Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen neuropsychiatrischen Erkrankungen und einer verminderten Reelin Konzentration ergab sich durch die Untersuchung heterozygoter Reeler Mäuse. Diese zeigten Verhaltensauffälligkeiten wie eine eingeschränkte, mangelhafte Präpulsinhibition (Tueting, Costa et al. 1999), die ebenfalls bei Patienten mit diagnostizierter Schizophrenie eingeschränkt ist (Graham 1975, Braff, Stone et al. 1978). Zudem konnte auch eine erhöhte Ängstlichkeit bei den heterozygoten Reeler Mäusen beobachtet werden (Tueting, Costa et al. 1999).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass DISC1 (Disrupted in Schizophrenia 1), ebenfalls ein Gen das im Verdacht steht an psychiatrischen Erkrankungen beteiligt zu sein (Millar, Wilson-Annan et al. 2000) die Prozessierung Reelins inhibiert (Bradshaw, Trossbach et al. 2017).

Ähnlich konnte auch bei Patienten mit Major Depression oder bipolarer Störung auch ohne psychotische Symptome eine Reduktion des Reelin Gehalts in post mortem Gehirnuntersuchungen festgestellt werden (Impagnatiello, Guidotti et al. 1998, Fatemi, Earle et al. 2000, Guidotti, Auta et al. 2000).

Nach DSM V Klassifikation kann eine Major Depression durch Symptome wie depressive Verstimmung, deutlich vermindertes Interesse, Appetitverlust, Schlaflosigkeit, psychomotorische Verlangsamung, Müdigkeit, Konzentrationsschwierigkeiten, Suizidalität sowie Gefühle von Wertlosigkeit/Schuld diagnostiziert werden. Eine Major Depression liegt dann vor, wenn mindestens 5 der Symptome für mindestens 2 Wochen bestehen (Association 2014). Im Gegensatz zur unipolaren Depression ist die bipolare Störung nach ICD 10 mit einer Veränderung der Stimmung entweder zu Depression oder gehobenen Stimmung charakterisiert (Gaubner 2017).

1.3 Antikörper

1.3.1 Allgemeines

Das Immunsystem besteht aus einem angeborenen und einem erworbenen Teil zur Abwehr von dem Wirtsorganismus potentiell schädigenden Mikroorganismen. Weiterhin unterscheidet man die zelluläre Immunität und die humorale, die in wechselseitiger Wirkung ineinander greifen. Zur erworbenen humoralen Immunität gehören unter anderem die von B-Lymphozyten produzierten Antikörper (Hof 2000, 2009).

1.3.2 Maus als Beispiel für konventionelle Antikörper

Konventionelle Antikörper z.B. gefunden in der Maus oder auch im Menschen bestehen aus 4 Polypeptidketten die mittels Disulfidbrücken kovalent verbunden sind. Diese lassen sich in schwere und leichte Ketten einteilen. Ein Antikörper besteht aus jeweils 2 identischen schweren Ketten (Isotyp $\mu, \alpha, \gamma, \delta, \epsilon$), die eine Einteilung in unterschiedliche Isotypen ermöglicht (Hof 2000, 2009). Primär werden nach Erstkontakt mit einem Antigen, Antikörper der Klasse IgM gebildet. Dieses ist ein Pentamer und aufgrund seiner Größe vornehmend im Serum zu finden. Durch den sogenannten Isotypenswitch kann die schwere Kette eben jener Antikörper in den B-Lymphozyten ausgetauscht werden und somit IgG (bzw. IgA, IgE) gebildet werden (Hof 2000, 2009). Diese haben geänderte biologische Eigenschaften wie eine bessere Gewebegängigkeit. Durch den Isotypenswitch kann auch eine Veränderung des Bindungsverhaltens z.B. Aktivierung des Komplementsystems stattfinden (Hof 2000, 2009).

Des Weiteren lässt sich ein variabler von einem konstanten Teil unterscheiden. Der konstante Teil (C-Region) ist für die biologische Effektorfunktion zuständig und ist speziesspezifisch. Die variable Region bindet im n-terminalen Bereich sowohl der leichten als auch schweren Kette die Antigene (Hof 2000, 2009).

Zu Forschungszwecken und in der Diagnostik sind spezifische monoklonale Antikörper von großer Bedeutung (Zola, Mohandas et al. 2001). Um diese herzustellen gibt es unter anderem die Möglichkeit der Fusion von nach der Immunisierung gewonnenen Splenozyten mit Myelomzellen (Kohler and Milstein 1975). Myelomzellen sind immortalisierte Zellreihen die stabil in vitro kultivierbar sind und auf Ihre Hybridomen die Fähigkeit der Antikörper Sekretion übertragen (H. 1987). Bei einer

limitierten Dilution nach Colar und Colar (1983) werden anschließend in mehreren Schritten die Hybridomazellen soweit verdünnt bis statistisch von einer Monoklonalität auszugehen ist (Peters 1990).

1.3.3 Camelidae und deren schwere Ketten Antikörper

Kamele (Camelidae) gehören zu den Paarhufern. Unterschieden werden hierbei die Altweltkamele von den Neuweltkamelen. Zu den Altweltkamelen gehören unter anderem Dromedare, einhöckrige und zweihöckrige Kamele. Zu den Neuweltkamelen gehören unter anderem Lamas (Grzimek 2000). 1993 wurde das erste Mal das Vorkommen von zwei IgG Subtypen nur bestehend aus einer schweren Kette, sogenannte single domain oder heavy chain Antikörper in Camelidae beschrieben. Diese können bis 75% des IgGs ausmachen (Hamers-Casterman, Atarhouch et al. 1993).

Ein Unterschied zu humanen oder Mausantikörpern zeigte sich in dem vollständigen Verlust der CH1 Domäne (siehe Abb.: 1.2) (Hamers-Casterman, Atarhouch et al. 1993). Das dazugehörige Exon ist im Genom vorhanden und intakt. Grund für den Verlust ist das veränderte Splicen während m- RNA Prozessierung durch eine Punktmutation bedingt ist (Nguyen, Hamers et al. 1999). Die beiden verbleibenden konstanten Domänen (CH 2 und 3) sind den konstanten Domänen klassischer Antikörper sehr ähnlich (Woolven, Frenken et al. 1999, Muyldermans, Baral et al. 2009).

Die heavy chain Antikörper sind strikt monomer und auch ohne VL Kette in der Lage funktionell Antigene zu binden (Hamers-Casterman, Atarhouch et al. 1993, Muyldermans, Atarhouch et al. 1994, Harmsen, Ruuls et al. 2000). Das Leucin an Position 45 sorgt normalerweise für die Bindung der leichten und schweren Kette (Chothia, Novotny et al. 1985). Wird dieses durch Arginin ersetzt führt das zu einem Verlust von der VL-VH Bindung, sowie zu einer erhöhten Löslichkeit der heavy chain (VHH) Antikörper (Muyldermans, Atarhouch et al. 1994, Davies and Riechmann 1995).

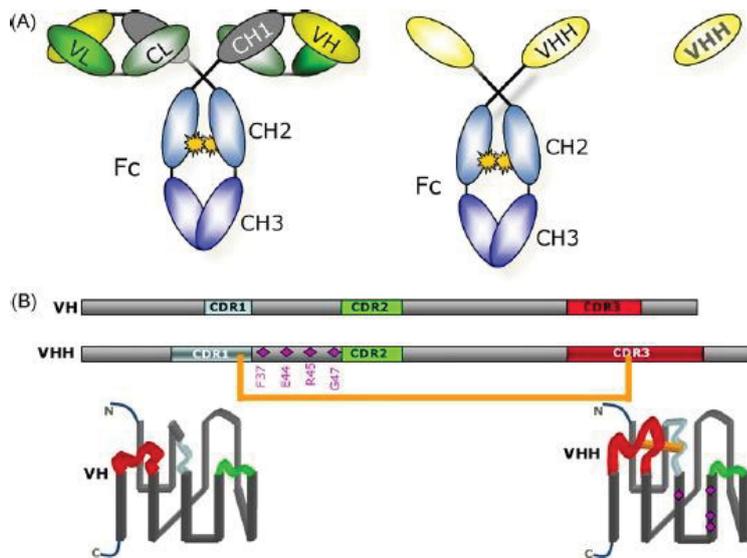


Abb. 1.2: (A) Vergleich von konventionellen Antikörper (links), mit heavy chain Antikörper (mitte), sowie den VHH oder Nanobody als kleinste Antigenbindende Einheit aus heavy chain Antikörper hergestellt (rechts), (B) Schema der Sequenz von konventionellen Antikörper (VH) im Vergleich zu heavy chain Antikörper aus Muyldermans, Baral et al. (2009)
 (A): In Heavy chain Antikörper fehlt die CH1 Domäne zusätzlich zum Fehlen einer light chain. (B) Die hypervariablen Regionen (CDR) sind in VHH Antikörper deutlich größer. Unten ist die Faltung der Antikörper dargestellt vergleichend dargestellt.

Die hypervariablen Regionen (CDR, complementarity region) sind in heavy chains Antikörper deutlich größer (siehe Abb.:1.2) (Nguyen, Hamers et al. 2000). Bei Mensch und Maus ist CDR3 durchschnittlich 12, bzw. 9 Aminosäuren groß (Wu, Johnson et al. 1993). Bei Dromedaren jedoch entsprechen sie einer Länge von 16-18 Aminosäuren, in Lamas jedoch nur 6 (Vu, Ghahroudi et al. 1997, Harmsen, Ruuls et al. 2000, Muyldermans 2001). Die erste hypervariable Region jedoch ist in allen heavy chain Antikörpern vergrößert (Kabat and Wu 1991).

Die gebildete Sekundärstruktur (Loops) der hypervariablen Regionen des Paratops der heavy chain Antikörper führen zu einem größeren Antigenbindungs- Repertoire (Decanniere, Muyldermans et al. 2000). So können zum Beispiel aufgrund der Struktur sonst nicht zugängliche Epitope erkannt und gebunden werden (Nguyen, Hamers et al. 2000, Muyldermans 2001). Die Loops werden hierbei unter anderem durch Disulfidbrücken zwischen CDR 1 und 3, bei Lama heavy chain Antikörpern auch gelegentlich zu CDR 2 gebildet (Davies and Riechmann 1995). Die Loops der heavy chain Antikörper sind im Gegensatz zu VH-VL Antikörper meist konvex geformt, VH-VL Antikörper eher konkav oder flach. Daher binden VHH Antikörper häufiger an die konkaven Seiten, die den aktiven Seiten der Enzyme entsprechen (Lauwereys, Arbabi Ghahroudi et al. 1998). Daher sind sie häufiger funktionell (Aktivator oder Inhibitor)

(Desmyter, Transue et al. 1996, Lauwereys, Arbabi Ghahroudi et al. 1998, Transue, De Genst et al. 1998).

Ein weiterer Vorteil der VHH Antikörper ist neben ihrer Größe (15KDa) (Muyldermans 2001) die Stabilität. Sie haben eine gute thermische Resistenz. So liegt die Schmelztemperatur von heavy chain Antikörpern bei 72°C und teilweise höher (Davies and Riechmann 1995, Goldman, Anderson et al. 2006). Damit wäre eine Pasteurisierung ohne Funktionsverlust möglich (Muyldermans 2001). Des Weiteren besteht auch nach 200h Inkubation bei 37°C eine 80-100%ige Bindungsaktivität nach 200h (Arbabi Ghahroudi, Desmyter et al. 1997). Die Thermoresistenz ist durch die Fähigkeit zu erklären sich beim Abkühlen in die native Konformation zurückzufalten, im Gegensatz zur irreversiblen Denaturierung und Aggregation der konventionellen Antikörper (Perez, Renisio et al. 2001, Ewert, Cambillau et al. 2002)

Ebenfalls besteht eine hohe Resistenz gegenüber denaturierenden Substanzen wie zum Beispiel Urea, Guanidinium hydrochlorid oder Ammonium isothiocyanat. So falten sich mit Guanidinium denatuierte heavy chain Antikörper unter Verdünnung der Substanz schnell zurück (Berry and Davies 1992, Muyldermans 2001).

Beim Menschen kommen single domain Antikörper nur im Rahmen der sogenannten heavy chain diseases vor. Diese sind jedoch funktionslos und neigen zur Aggregation (Franklin 1970, Seligmann, Mihaesco et al. 1979).

1.4 Bestehende Antikörper gegen Reelin

Der erste Antikörper gegen Reelin wurde durch Immunisierung einer Wildtyp Maus mit Gehirnhomogenaten von Reelin Embryos (Ogawa, Miyata et al. 1995). Beim Screening der Seren konnte ein Antikörper identifiziert werden der spezifisch Gehirnschnitte von Wildtyp Mäusen, genauer der Cajal Rezinus Zellen und derer umgebenen Extrazellarmatrix anfärbte (Ogawa, Miyata et al. 1995). Bei Kultivierung von Gehirnschnitten in Anwesenheit von CR- 50 zeigte sich eine in Reeler Mäusen vorhandene inverse Strukturierung (Ogawa, Miyata et al. 1995).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es,

1. Murine als auch kamelide Antikörper gegen unterschiedliche Epitope des Reelins zu generieren und zu charakterisieren.
2. Eine mögliche in-vitro Funktionalität der identifizierten Antikörper in 2 unterschiedlichen Assays mit primären Neuronen zu testen.
3. Die klinische Anwendbarkeit in unterschiedlichen humanen Proben zu untersuchen.
4. Ein kleineres funktionelles rekombinantes Reelin zu exprimieren

2. Materialien und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Allgemeine Materialien

Amersham Hyperfilm	Amersham RPN2103K
Amnicon Ultra, Ultracel 100kDa	Millipore UFC910008
Beckman Model J2-21	
Cellstar PP-Test tubes 15 mL	Greiner Bio-one 188271
Cellstar PP-Test tubes 50 mL	Greiner Bio-one 227261
Costar Stripette, non pyrogenic, 2 mL	Greiner Bio-one 710180
Costar Stripette, non pyrogenic, 5 mL	Corning 4487
Costar Stripette, non pyrogenic, 10 mL	Corning 4488
Costar Stripette, non pyrogenic, 25 mL	Corning 4489
Cryotube	NUNC 368632
Discofix	Braun 16496C
Elektroporations Küvetten	Peqlab 71-210-LE
ELISA Platte	NUNC 439454
Easy Titer Elifa System	Pierce 77000
Eppendorf mini spin	
Eppendorf research Pipetten 2-20 µL	
Eppendorf research Pipetten 20-200 µL	
Eppendorf research Pipetten 100-1000 µL	
Eppendorf safe-lock tubes 1,5 mL	
Eppendorf safe-lock tubes 2 mL	
Extra thick blot paper	Biorad 1703966
Graduated filter tips	
0,1-10µL	Star Lab S1120-3810
1-20µL	Star Lab S1120-8810
1-200µL	Star Lab S1120-1810
100-1000µL	Star Lab S1120-3810
Hamilton 50µL 1710 RNR	
Hamilton 100µL 1710RNR	
Hettich Rotina 46R	
Hettich Rotofix 32	

Millipore MilliQ plus	
NanoDrop, PreqLab, ND1000 Spectrometer	
Neubauer Zählkammer	
Nitrozellulose Membran 0,45µm	Protran 10401196
Petrischale 90/14mm	VWR 391-0880
Petrischale 145/20mm	Greiner bio-one 639102
Sterile Filter 0,45µm	VWR 514-0063
Sterile Filter 0,8µm	Sartorius 16592
Spritze 3mL	Braun I1417022V
T-75 Flacs	Greiner Bio-One 658175
Tissue culture Plate, 6 cm	NUNC 146775
Tissue culture Plate, 24 Well	NUNC 142475
Tissue culture Plate , 96 Well	NUNC 161093
Thermozykler	

2.1.2 Chemikalien

30% Acrylamid Mix	Roth 3029.1
Agar	
Aminopterin Hybri- Max	Sigma A5159
Ammonium persulfat (APS)	Roth 9592.5
Aqua	Braun 2351744
Bacto Agar	BD 214010
BD Bioscience Substrate A and B	Bioscience 550534 /550536
BL27	Invitrogen 17504-044
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma A7906
Bromphenolblau	Sigma B0126
β Mercaptoethanol	Sigma M3148
Carbencillin	Duchefa BiochemieC0109.0025
Chloramphenicol	Duchefa BiochemieC0113.0025
DMEM high Glucose	Gibco 41965
DMSO	Sigma D5879
DNase	Roche 10 104 159 001
DPBS	Gibco 14190-094

Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham 1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham 1059250
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	
Fast AP	Fermentas EF0654
Fast digest BamH1	Fermentas FD0055
Fast digest Dpn1	Fermentas FD1703
Fast digest Not1	Fermentas FD0596
Fast digest SaC1	Fermentas FD1133
Fast digest SFI1	Fermentas FD1824
Fast digest Sal1	Fermentas FD0644
Fetale Calf Serum (FCS)	PAA A15-649
Fluopheres carboxylate 0,5µm, yellow green	Invitrogen F8813
Geneticin (G418)	Calbiochem No. 345812
Glucose	Sigma G7528
Glutamax	Gibco 35050-038
Glycerol	Sigma G8898
HBSS	Gibco 14175-053
HCl	Sigma H1758
Hefe Extrakt	Fluka 70161
HEPES	Sigma H4034
Hybridoma Cloning Factor	Bioveris 210001
Hypoxanthin/ Thymidin Supplement (HT)	Gibco 41065-012
Imidazol	Sigma I2399
IPTG	Duchefa Biochemie I14010025
Isopropanol	Merck
IsoStrip	Roche 1493027
KAc	JT Baken 204-822-2
KCl	Sigma P9541
KH ₂ PO ₄	Sigma P0662
L-Glutamin	Gibco 25030024
Lysozym	Sigma L6876
MEM	Gibco 21090
Methanol	Merck 1.06009.2500

MgCl ₂	Merck 1058331000
Milchpulver	Oxoid LP0031
NaCl	Fluka 71381
NaF	Sigma S7920
Na ₂ HPO ₄	Sigma 30412
NaH ₂ PO ₄	Sigma 50751
NaOH	Riedel de Haen S263739-45
Na-Pyruvat	Gibco 11360039
Na ₃ VO ₄	Sigma 590088
Neurobasal- Medium	Invitrogen 21103-049
Ni-NTA Agarose	Qiagen 1018244
NiSO ₄	Sigma 227676
Nonidet P40 Substitut NP-40	USB 19628
NuPage MES SDS Running Buffer (20 fach)	Invitrogen NP0002
NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Midi Gel 12	WG1401 Box Invitrogen
NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Midi Gel 20	WG1402A
Panceau	Sigma P3504
Penicillin/ Streptomycin	GIBCO 15140-122
Phenylarsine Oxid	Sigma 1000942157
Phusion kit	Fermentas
PMSF	Sigma P7626
Protease Inhibitor Cocktail Tablette	Roche 118758001
RNeasy mini kit	Qiagen 74104
SDS	Fluka 71729
Sucrose	Sigma 84100
TEMED	Sigma T9218
Tris	Merck 1.08382.2500
Triton TX-100	Sigma T9284
Tryptophan	Fluka 95039
Tween	Serva 37470
T ₄ Ligase	Fermentas EL0011
Urea	Sigma 5378
Xylen	
EDTA	

Ficoll

RPMI-Medium

2.1.3 Puffer

Tabelle 2.1 : Allgemeine Puffer

Agar Platten (DYT)	DYT-Medium, 15 g/L Agar 1:1000 Carbencillin (100 mg/mL) ,1:1000 Chloramphenicol (34 mg/mL)
Bakterien Lyse Puffer	20 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mg/mL Lysozym, 1% Triton X-100, 20 mM MgCl ₂ , 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 25 µL DNase
Destin	5% Mathanol, 7% Essigsäure
DNA Loading buffer	60 mM Tris pH 8, 6 mM EDTA, 30% Glycerin, 1 Spatelspitze Xylen, 1 Spatelspitze Bromphenolblau
DYT- Medium	10 g/L NaCl, 10 g/L Hefe Extrakt, 20 g/L Tryptophan
Loading buffer für Protein Elektrophorese	200 mM Tris pH 6,8, 8% SDS, 40% Glycerol, 0,2% Bromphenolblau, 4% β-Mercaptoethanol
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM Na ₂ HPO ₄
PBS-T	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,05% Tween
Running buffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS
SOB Medium	2% Bacto-trypton, 1% Bacto-yeast extract, 0,05% NaCl, 5 mL 2M MgCl ₂ /L
SOC Medium	2% Tryptone, 1% Yeast, 0,05% NaCl, 5 mL 2 M MgCl ₂ , 20 mL 1 M Glukose

Transfer Puffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20% Methanol
VRL Puffer	50 mM HEPES pH 7,5, 250 mM Sucrose, 5 mM MgCl ₂ , 100 mM KAc
YTAG Platten	0,8% Tryptone, 0,5% Yeast, 0,5% NaCl, 100 µg/mL Carbencillin, 1% Glukose, Bacto Agar 15 g/L
2TY Medium	1,6% Tryptone, 1% Yeast, 0,5% NaCl
2YTAG Medium	1,6% Tryptone, 1% Yeast, 0,5% NaCl, 100 µg/mL Carbencillin, 1% Glukose

**Tabelle 2.2: Puffer zur Aufreinigung
von bakteriell exprimiertem Protein**

Elutions Puffer	20 mM Tris pH 8, 300 mM Imidazol, 300 mM NaCl
Equilibriums- Puffer	20 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100
Extraction Puffer	50 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 8 M Urea
Wasch Puffer 1	20 mM Tris pH 8, 10 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100
Wasch Puffer 2	20 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 1 M NaCl
Urea Puffer	50 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 8 M Urea, 10 mM β- Mercaptoethanol
Urea Elutionspuffer	50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 8 M Urea
Urea Waschpuffer	50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 8 M Urea, 10 mM Imidazol, 10 mM β-Me

**Tabelle 2.3: Puffer zur Aufreinigung
von kameliden Antikörpern**

Elutions Puffer	20 mM Tris pH 8, 500 mM Imidazol, 300 mM NaCl
Wasch Puffer 1	20 mM Tris pH 8, 30 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100
Wasch Puffer 2	20 mM Tris pH 8, 30m M Imidazol, 1 M NaCl

**Tabelle2.4: Puffer zur Herstellung
eines DNA Elektrophorese Gel**

1 %ig	1 g Agar, 100 mL TAE Puffer, 3 µL Ethidiumbromid
0,8%ig	0,8 g Agar, 100 mL TAE Puffer, 3 µL Ethidiumbromid

**Tabelle 2.5: Puffer zu Herstellung
von Protein Elektrophorese Gele**

Untere Phase	
10%ig	Wasser dest. 4 mL, 30% Acrylamid Mix 3,3 mL, 1,5 mM Tris pH 8,8 2,5 mL, 10% SDS 0,1 mL, 10% ammonium persulfat 0,1 mL, TEMED 0,004 mL
12%ig	Wasser dest. 3,3 mL, 30% Acrylamid Mix 4,0 mL, 1,5 M Tris pH 8,8 2,5 mL, 10% SDS 0,1 mL, 10% ammonium persulfat 0,1 mL, TEMED 0,004 mL
15%ig	Wasser dest. 2,3 mL, 30% Acrylamid Mix 5,0 mL, 1,5 M Tris pH 8,8 2,5 mL, 10% SDS 0,1 mL, 10% ammonium persulfat

	0,1 mL, TEMED 0,004 mL
Obere Phase	Wasser dest. 1,35 mL, 30% Acrylamid Mix 0,33 mL, 1,5 M Tris pH 6,8 0,25 mL, 10% SDS 0,04 mL, 10% APS 0,04 mL, Temed 0,0004 mL

Tabelle 2.6:
genutzte
Zellkulturmedien

Einfrier Medium	FCS, 10% DMSO
GKN Medium	24 g NaCl, 1,2 g KCl, 4,26 g Na ₂ HPO ₄ , 1,8 g NaH ₂ PO ₄ , 6 g Glucose, 0,03 g Phenol-rot Auf 300 mL pH 7,4
HEK Lyse Puffer	DPBS+ 0,75% NP-40
HEK Medium	DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin, 1% Na-pyruvat, Geneticin (G418) c=50 mg/mL: 150-200 µL pro 10 mL Medium
HEK Medium FCS frei	DMEM, 1% Penicillin/ Streptomycin, 1% Na-Pyruvat
HT Medium	MEM, 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin, 1% L- Glutamin, 2% HT Supplement (50X)
Lymphoblasten Lyse Puffer	VRL Puffer, 1% TX-100+ Protease Inhibitor, 1 µL DNase auf 40 µL Puffer
Lymphoblasten Medium	RPMI-Medium , 15% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin, 0,5% L- Glutamin (2,5 mL/ 500 mL)
NB Medium	Neurobasal Medium, 1% BL27, 1% Penicillin/ Streptomycin, 1% GlutaMAX
Selektions-Medium	DMEM high Glucose, 15% FBS, 1% Pen/Strep, 1% Na-Pyruvat, 2% HT- Supplement (50x Hypoxanthine 0,68 g/L(5 mM), Thymidine 0,194 g/L (0,8 mM)), 2% Aminopterin Hybri- Max (50X), 10% Hybridoma Cloning supplement

2.1.4 Primer

Rekombinantes Reelin

Die Beschriftung ReIn bezieht sich auf das Reelin Protein, die Nummerierung für die klonierte Aminosäuresequenz, fwd bzw rev auf die Nutzungsrichtung

ReIn24fwd.: 5`-aaa aaa gga tcc cgc gcg cgc ggc cac cgg cta-3`

RIn500rev.: 5`-aaa aaa gcg gcc gcc ttt gca tat aag atg at -3`

RIn1949fwd.: 5`-aaa aaa gtc gac gga aac aat ttg aac cc-3`

RIn2662rev.: 5`-aaa aaa gcg gcc gcc gag atg agg aca ttg tca at-3`

RIn198fwd.: 5`-aaa aaa gga tcc cag tga cag tgt gat cct acg a-3`

RIn428rev.:5`-aaa aaa gcg gcc gcc tgg etc tca aat tet tet g-3`

ReIn1949-2662seq.:5`-ttt cca gtg gga aca acct c-3`

Mutagenese

Die Beschriftung F_ bzw R_ bezieht sich auf die Nutzungsrichtung, aa mit anschließender Nummerierung die jeweilige Aminosäure nach der ein Stop Kodon eingefügt wurde

F_aa100_Reelin_STOP: 5`-ga etc tat acc tcg aca agc **tga** cag tct tct cag agc att gg-3`

R_aa100_Reelin_STOP: 5`-cca atg etc tga gaa gac tgt cag ctt gtc gag gta tag agt c-3`

F_aa200_reelin_STOP: 5`-cac ctt gct gaa ata cac agt **tga** agt gtg atc cta cga gat gac-3`

R_aa200_reelin_STOP: 5`-gtc atc tcg tag gat cac act tca act gtg tat ttc agc aag gtg-3`

F_aa300_reelin_STOP: 5`-gct gat tgg att cag ctg **tga** aaa att aga gcc cct tcc aat g-3`

R_aa300_reelin_STOP: 5`-cat tgg aag ggg etc taa ttt ttc aca gct gaa tcc aat cag c-3`

F_aa400_reelin_STOP: 5`-c att tat ttc cat gga aat gaa **tga** agc gag ttc aat ttt gcc acc-3`

R_aa400_reelin_STOP: 5`-ggg ggc aaa att gaa etc gct tca ttc att tcc atg gaa ata aat g-3`

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2.7 : Primäre Antikörper

G10

Cofilin (D59) Antikörper	Cell Signaling
p-Cofilin 1hSer3)-R:sc-12912-R	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-Dab1 (Tyr220) Antikörper	Cell Signaling
Dab1 (H-103): sc-13981	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Neurabin II	Sigma
GAPDH (A-3): sc-137179	Santa Cruz Biotechnology
Neuronal Class III β -Tubulin (TUJ)	Convance

Tabelle 2.8 : Sekundäre Antikörper

Anti Maus

Anti Kaninchen

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkultur

a. HEK- 298 Zellen (DSMZ Braunschweig)

Bei HEK -Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, die in diesem Fall entweder mit Reelin oder mit GFP als Kontrolle transfiziert waren. So waren die Zellen in der Lage Reelin zu sekretieren, GFP dagegen nicht. Die Zellen wurden in T75 Flaschen in 25ml HEK Zell Medium (DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Zum selektionieren der GFP und Reelin positiven Zellen wurden alle 2-3 Zyklen Geneticin (G418) c=50 mg/mL: 150-200 µL pro 10 mL Medium hinzugefügt. Für die weiteren Experimente wurden sowohl die Überstände als auch Zelllysate genutzt.

1. HEK- Zellen einfrieren

- a. Wenn in der T75 Flasche ein Zellrasen gewachsen war, wurde das Medium abgesaugt und mit sterilem DPBS gewaschen, um die Medium Reste zu entfernen.
- b. Das DPBS wurde auch abgesaugt.
- c. 1 mL Trypsin wurde hinzugefügt und die Zellkulturflasche für 2-3 min in den Brutschrank gelegt.
- d. Es wurden 10 mL HEK-Zell Medium hinzugefügt, alles in ein 15 mL Tube überführt und anschließend bei 1.000 rpm für 5 min zentrifugiert.
- e. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 3 mL gekühltem FCS+ 10% DMSO gelöst
- f. Je 1 mL wurde in ein Gefrier Tube geben und sofort bei -80°C eingefroren

2. Reelin Überstände aus HEK Zellen sammeln

Wenn in der T75 Flasche mit HEK Zellen ein vollständiger Zellrasen angewachsen war wurden 10 mL DMEM + 1% Penicillin/ Streptomycin ohne FCS hinzugefügt und das Medium für 2-4 Tage auf den Zellen belassen. Das Medium wurde abgenommen, zentrifugiert und der Überstand vorsichtig separiert. Der überstand wurde in 15 mL Falcons bei 4°C gelagert.

3. HEK Zellen lysieren

- a. Die HEK Zellen wurden den Tag vorher 1:10 gesplittet und in eine 6cm Schale mit 10 mL HEK-Zell Medium und bis zum nächsten Tag in den Brutschrank gestellt.
- b. Das Medium wurde abgesaugt, die Schale mit DPBS gespült und dieses wieder abgesaugt.
- c. 400 μ L Lyse Puffer für HEK Zellen (DPBS+ 0,75% NP-40) wurde hinzugefügt und die Schale mit einem Zellschaber von den Zellen möglichst vollständig befreit.
- d. Nach der Zentrifugation bei 5000 \times g bei 4°C für 5 min wurde der Überstand vorsichtig abgenommen in ein neues Gefäß gegeben und bei -20°C gelagert.

b. Hybridoma Zellen

Weiterhin nutzte ich Hybridoma- Zellen, die durch die Fusion von Splenozyten der Maus und Tumorzellen (DSMZ Braunschweig) entstanden. Sie wurden in HT-Medium (MEM, 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin, 1% L- Glutamin, 2% HT Supplement (50X)) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Um die Hybridoma Zellen von nicht miteinander fusionierten Zellen zu selektionieren wurde dem Medium Hypoxantin, Thymidin (HT) und Aminopterin hinzugefügt. Das Hypoxantin aktivierte den Salvage pathway über die HGPRT (Hypoxantin-Guanin Phosphoribosyltransferase), Aminopterin blockierte andere Purin Biosynthesewege. Da Myelomzellen keine HGPRT haben, sterben die nicht fusionierten Myelomzellen ab. Die Splenozyten hingegen haben zwar eine funktionierende HGPRT, sterben nicht fusioniert aber durch die fehlende Immortalisierung. Da durch das Aminopterin auch kein Thymidin gebildet werden konnte, musste es auch hinzugefügt werden. Diese Zelllinie produzierte im Überstand Maus-Antikörper gegen die jeweiligen Proteine.

Eingefroren wurden die Hybridomas äquivalent den HEK Zellen, das Medium nach der Zentrifugation jedoch in ein neues Falcon überführt und bei 4 °C gelagert, da dieses die gewünschten Antikörper enthielt.

c. Immortalisierte Lymphoblasten von Schizophrenen und Kontrollpatienten

Die immortalisierten Lymphoblasten wurden in RPMI- Medium (mit 15% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin, 0,5% L-Glutamin (2,5 mL /500 mL)) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank im S2 Labor kultiviert. Die Zellen wurden bei einem durchgehenden Zellrasen lysiert und die Lysate auf Ihren Reelin- Gehalt untersucht.

Lyse immortalisierte Lymphoblasten

1. Die Zellen wurden ab gespült in ein 15 mL Tube geben und bei 1000 rpm zentrifugiert
2. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 10 mL PBS gewaschen und anschließend 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert
3. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 mL PBS aufgenommen, in 1,5 mL Eppendorf Tube umgefüllt und für 10 min zentrifugiert.
4. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µL Lysepuffer (VRL Puffer+ 1% TX-100+ Protease Inhibitor+ 1 µL DNase auf 40 µL) aufgenommen.
5. Es wurde erst 5 min auf Eis und anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert. Zum Schluss wurde erneut zentrifugiert, der Überstand in ein neues Tube überführt und bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Klonierung

RNA Gewinnung

1. Aufreinigung mittels RNeasy Kit von Quiagen
2. m-RNA Gewinnung mittels (Oligotex)
3. Aufreinigung mittels Trizol

Zellyse:

- a. Zu dem in der Zellkultur abzentrifugierten Zellpellet der HEK Reelin Zellenplus wurde 1ml Trizol hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert.
- b. Nach Hinzufügen von 0,2 mL Chloroform wurde das Gemisch kurz geschüttelt und für 3 min. bei Raumtemperatur inkubiert

- c. Zentrifugiert wurde bei maximaler Geschwindigkeit bei 4 °C für 15 min.

RNA Präzipitation:

- d. Die klare Phase wurde vorsichtig abgenommen und 0,5 mL Isopropanol hinzugefügt
- e. Für 10 min. wurde bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubiert und anschließend bei 1200 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert.

RNA Waschen

- f. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen
- g. Zum übriggebliebenen Pellet wurden 1 mL 70% Ethanol hinzugefügt und vermischt
- h. Zentrifugiert wurde für 5 min. bei 4 °C.

Lösen der RNA aus dem Pellet

- i. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde bei Raumluft trocknen gelassen
- j. Zum Schluss wurde das Pellet in RNase freiem Wasser gelöst

Herstellung c-DNA mittels Reverse Transkriptase (RevertAid Premium)

1. Um c-DNA herzustellen wurden zunächst als Template die 1 pg- 5 µg totale RNA oder 0,1 pg- 500 ng polyA RNA, 1 µL (100 pg) Oligo(dt)18primer, 1 µL (0,5 mM finale Konzentration) dNTP Mix zusammengesetzt und mit Wasser auf 15 µL aufgefüllt.
2. Die reverse Transkription wurde vergleichend mit 10 µL totaler RNA, (800 ng/µL), aufgereinigt durch das RNeasy kit, 4 µL totale RNA mittels Trizol aufgereinigt (3266,7 ng/µL) und 13 µL m-RNA mittels Oligotex kit aus der bereits mittels RNeasy kit aufgereinigten totalen RNA (14,8 ng/µL) benutzt.
3. Das Ganze wurde für 5 min. bei 65 °C inkubiert, was gerade für GC reiche Templates oder bei ausgeprägten sekundär Strukturen empfohlen wird. Da Reelin ein sehr großes Protein ist, liegt die Wahrscheinlichkeit für ausgeprägte Sekundärstrukturen sehr hoch.

4. Zu dem Grundstock wurde weiterhin 4 μL 5x RT- Puffer und 1 μL (200U) RevertAid Premium Enzyme Mix hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 20 μL entstand.
5. Die Reaktion fand für 60 min bei 55 °C statt.
6. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 85 °C für 5 min terminiert

Präparation genomischer DNA

1. Die Hek Reelin Zellen wurden zentrifugiert und das Pellet in 500 μL Lyse Puffer (100 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PK) suspendiert. Bei 55 °C wurde die Lösung anschließend für 3 h schüttelnd inkubiert.
2. Anschließend wurde bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min zentrifugiert.
3. Die DNA, die schleimige Konsistenz besaß wurde vorsichtig abgenommen und zu 500 μL Isopropanol gegeben und bei maximaler Geschwindigkeit bei 4 °C für 20 min zentrifugiert.
4. Gewaschen wurde mit 200 μL 70% Ethanol erneut zentrifugiert und die DNA anschließend überführt und mit 200 μL EB Puffer (aus Quiagen Kit) resuspendiert und für 2 h bei 42 °C inkubiert.
5. Da das Ergebnis noch sehr viskös war wurde ein NOT1 Verdau für 30 min bei 37 °C angeschlossen.

Polymerase Ketten Reaktion (PCR) (Phusion)

1. Es wurden zusammengefügt 5x Phusion 4 μL GC Puffer, 0,5 μL 10 mM, was einer Endkonzentration von 200 μM jedes dNTP's entspricht, 0,5 μL (0,5 μM) Primer A, 0,5 μL (0,5 μM) Primer B, 1 μL Template DNA, optional 1 μL (5%) DMSO und 0,1 μL (0,02 U/ μL) Phusion DNA Polymerase. Aufgefüllt wurde es mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μL . Hierbei wurde der GC- Puffer verwendet, da dieser besonders geeignet ist für lange oder schwierige Templates, z.B. GC reiche Templates oder schwierige sekundär Strukturen. Der HF- Puffer hingegen weist eine niedrigere Fehlerrate auf.

- a. Reelin Aminosäure 24-500 :
- Primer A: Rln24fwd.: 5`-aaa aaa gga tcc cgc gcg cgc ggc cac cgg cta-3`
- Primer B: Rln500rev.: 5`-aaa aaa gcg gcc gcc ttt gca tat aag atg at -3`
- b. Reelin Aminosäure 198-428:
- Primer A: Rln198fwd.: 5`-aaa aaa gga tcc cag tga cag tgt gat cct acg a-3`
- Primer B: Rln428rev.:5`-aaa aaa gcg gcc gcc tgg ctc tca aat tct tct g-3`
- c. Reelin Aminosäure1949-2662;
- Primer A: Rln1949fwd.: 5`-aaa aaa gtc gac gga aac aat ttg aac cc-3`
- Primer B: Rln2662rev.: 5`-aaa aaa gcg gcc gcc gag atg agg aca ttg tca at-3`

2. Thermozykler Programm

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	30s	1
Denaturierung	98°C	10s	35
Annealing	57°C	30s	
Elongation	72°C	1.20 min.	
Finale Elongation	72°C	5-10 min.	1
	4°C	hold	

Die Elongationszeit wurde auf 1.20 min festgelegt da bei genomischer DNA eine Zeit von 40 sec pro 1 Kilobasen empfohlen wird. Der letzte Schritt von 4°C wurde zum Kühlen des Endprodukts benötigt, sodass dieses stabil bis zum nächsten Schritt blieb.

DNA Gelelektrophorese

- Um 1%ige Gele herzustellen, gab man 1 g Agarose in 100 mL TEA Puffer (0,04 M Tris, 0,001 M EDTA, 0,02 M Essigsäure) und erwärmte dies in der Mikrowelle.
- Nach kurzem Abkühlen wurden 3 µL Ethidiumbromid hinzugefügt und gut durchgemischt.
- Anschließend wurde die noch warme Masse in die dafür vorgesehene Form gegeben, ein Kamm mit der vorgesehenen Menge an Slots eingesteckt und Aushärten gelassen.

4. Zum Beladen wurde das Gel entnommen und in die Laufkammer gefüllt mit TEA-Puffer gelegt, sodass die Slots am negativen Pol lagen.
5. Die DNA-Proben wurden mit DNA Ladepuffer vermischt und jeweils in ein Slot pipettiert. Der erste Slot wurde dabei für die benötigte DNA-Leiter genutzt, um die richtige Größe der gewollten Fragmente zu identifizieren.
6. Das Gel für 20 min bei 180 V laufen lassen.
7. Unter UV-Licht fluoreszieren die DNA Fragmente durch das enthaltene Ethidiumbromid, sodass die PCR-Produkte der richtigen Größe ausgeschnitten und mittels Invisorb Spin DNA Extraction Kit aus der Agarose aufgereinigt. Die Konzentration wurde mit Hilfe von Nano drop bestimmt.

Restriktionsverdau (fast digest Fermentas)

1. Restriktionsverdau der PCR- Produkte

Zusammenfügen von 20 μL der aufgereinigten DNA, 2,5 μL 10x Fast digest Puffer, 1 μL Restriktionsenzym 1, 1 μL Restriktionsenzym 2, aufgefüllt auf ein Gesamtvolumen von 25 μL mit Wasser. Inkubation für 2-3 h bei 37 °C im Heizblock.

- a. Reelin Aminosäure 24-500, Reelin Aminosäure 198-428:

Restriktionsenzym 1: BamH1

Restriktionsenzym 2: Not1

- b. Reelin Aminosäure 1949-2662

Restriktionsenzym 1: Sal1

Restriktionsenzym 2: Not1

Anschließend wurde 1 μL Fast AP (alkalische Phosphatase) hinzugefügt und nochmals für eine Stunde bei 37 °C inkubiert

2. Restriktionsverdau des Vektors pet22b(+)

Zusammenfügen von 10 μL Vektor, 5 μL 10x Fast Digest Puffer, 2 μL Restriktionsenzym 1, 2 μL Restriktionsenzym 2 auf ein Gesamtvolumen von 50 μL mit Wasser auffüllen. Inkubation bei 37 °C für 2 h.

- a. Reelin Aminosäure 24-500, Reelin Aminosäure 198-428:
 Restriktionsenzym 1: BamH1
 Restriktionsenzym 2: Not1
- b. Reelin Aminosäure 1949-2662
 Restriktionsenzym 1: Sal1
 Restriktionsenzym 2: Not1

Anschließend wurde 1 µL Fast AP (alkalische Phosphatase) hinzugefügt und nochmals für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, und die geschnittene DNA wie oben mittels DNA-Gelelektrophorese aufgereinigt

Ligation

Zur Ligation wählte ich 3 Verschiedene Verhältnisse vom Vektor zum Insert:

Vektor: Insert= 1:1

Vektor: Insert= 1:3

Vektor: Insert= 3:1

Zudem wurde noch ein Religationsansatz, in dem nur Vektor ohne Insert mit Ligase versetzt wurden, gemacht. So konnte man anhand der auf dem Agar gewachsenen Kolonien sehen ob die Ligation vermutlich geklappt hat oder nicht. Waren auf der Religationsplatte so viele Kolonien gewachsen wie auf den anderen Platten, war zu vermuten, dass auch dort lediglich eine Religation des Vektors stattgefunden hat.

Da das Verhältnis nicht die Menge in Nanogramm sondern die Anzahl der Moleküle berücksichtigt, musste die noch errechnet werden

$$\text{Masse}_{\text{Insert}}(\text{ng}) = \frac{X(\text{Verhältnissfaktor}) \times \text{Masse}_{\text{Vektor}}(\text{ng}) \times \text{Länge}_{\text{Insert}}(\text{bp})}{\text{Länge}_{\text{Vektor}}(\text{bp})}$$

Abb.2.1: Formel zur Berechnung der benötigten Insertmenge für ein bestimmtes Ligationsverhältnis

In diesem Fall betrug die Masse des Vektor 4ng, die Länge des Vektors 5,4 kb, die Länge des Inserts Reelin Aminosäure 1949-2662 2,1 kb ,Aminosäure 24-500 1,4 kb und Aminosäure 198- 428 0,7 kb. Die Konzentration des Vektors betrug 2 ng/µL , die der

Inserts Aminosäure 1949- 2662 13,9 ng/μL, Aminosäure 24- 500 19,9 ng/μL und Aminosäure 198- 428 24,3 ng/μL.

1. Zu dem Volumen des Inserts und des Vektors wurde 1 μL 10x Puffer und 0,3 μL T4 Ligase hinzugefügt.
2. Inkubation über Nacht im Thermocycler

1 min 37 °C	←
1 min 22 °C	
1 min 16 °C	
3. Anschließend wurden die Plasmide in kompetente DH5α (E.coli) (5-10 μL pro 100 μL Bakterien) transformiert, auf Carbencillin Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.
4. Am nächsten Tag wurden 6 Klone gepickt, in jeweils 6 mL DYT Medium mit 6 μL Carbencillin (100 mg/mL) gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert.
5. Am nächsten Tag wurde eine Mini Präparation mittels (Invisorb Spin Plasmid Mini Two) gemacht und der Testverdau angeschlossen, um zu überprüfen ob das Insert auch tatsächlich in den Vektor legiert wurde.

Testverdau nach Ligation

1. Zu jeweils 500 μg DNA (10 μL) wurden 2 μL 10x FD Puffer green (schon zur Elektrophorese gefärbt) und jeweils 1 μL Restriktionsenzym 1 und 2 hinzugefügt. Um auf ein Gesamtvolumen von 20 μL zu kommen wurde Wasser hinzugefügt.
 - a. Reelin Aminosäure 24-500, Reelin Aminosäure 198-428:
Restriktionsenzym 1: BamH1
Restriktionsenzym 2: NotI
 - b. Reelin Aminosäure 1949-2662
Restriktionsenzym 1: SalI
Restriktionsenzym 2: NotI
2. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 h.
3. Die Proben wurden auf ein DNA- Elektrophorese Gel auftragen, bei 180 V für 20 -30 min laufen gelassen und anschließend unter UV- Licht fotografiert.

4. Die Proben die eine Bande auf der passenden Höhe für das jeweilige Insert (Reelin Aminosäure 1949- 2662 2,1 kb, Aminosäure 24- 500 1,4 kb und Aminosäure 198- 428 0,7 kb) zeigten wurden als positive Klone zum sequenzieren weggeschickt.

2.2.3 Proteinexpression und Aufreinigung

Protein- Expression

1. Transformation in BL21 (E.-coli) **Tag 1**
 - a. 3-4 μL Plasmid mit Insert (z.B. Reelin 24- 500 im Pet 22b+) wurden zu 50 μL auf Eis aufgetauten Bl21 gegeben und 30 min auf Eis inkubiert.
 - b. Das Gemisch wurde für 45 sec bei 42 °C erhitzt und sofort zurück auf Eis gestellt, um das Eindringen des Plasmids in durch die Bakterienwand zu ermöglichen ohne diese abzutöten.
 - c. Die Bakterien wurden anschließend auf Carbencillin, Chloramphenicol DYT Agar Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2. Vorkultur ansetzten **Tag 2**
 - a. Es wurden zwei Mal 20 mL DYT-Medium in 50 mL Falcons gegeben und zum Medium 1:100 20% Glucose (200 μL), 1:100 1 M MgCl_2 (200 μL), 1:1000 34 mg/mL Chloramphenicol (20 μL) und 1:1000 100 mg/mL Carbencillin (20 μL) hinzugefügt
 - b. Jeweils ein Klon wurde mit einer Pipettenspitze von der Platte genommen, in 1 mL Medium gelöst und dieses auf beide Falcons verteilt. Erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3. Fermenter mit 1,8 L DYT- Medium autoklaviert **Tag 2**

4. Hauptkultur ansetzten **Tag 3**
 - a. Morgens früh wurden zu den 1,8 L Medium 18 mL 20% Glucose, 18 mL 1 M MgCl_2 , 1,8 mL Chloramphenicol, 1,8 mL Carbencillin und die beiden Vorkulturen hinzugefügt.
 - b. Der Fermenter wurde auf eine Heizplatte gestellt, ein Rührfisch hinzugefügt, die Luftzufuhr angeschlossen und in NaOH Flasche

ausgeleitet. Heizstab und Thermometer wurden angeschlossen und auf eine Temperatur von 37 °C eingestellt.

- c. 200 µL Antifoam wurden hinzugefügt um eine übermäßige Schaumbildung zu vermeiden.
- d. Nach circa 2-3 Stunden wurde die OD (optische Dichte) gemessen. Falls diese größer Eins war wurde die Produktion des Proteins mit 1:1000 IPTG induziert.
- e. Nach 4-5 Stunden Produktion, wurde der Fermenter abgebaut, der Inhalt in Zentrifugenbecher umgefüllt und jeweils 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet im nächsten Schritt lysiert.
- f. Alternativ konnte die Kultur über Nacht bei Raumtemperatur das Protein exprimieren, was im Fall des Reelin Aminosäure 1949- 2662 Fragments nötig war. Durch die langsamere Produktion bei niedrigerer Temperatur konnte die Restriktion durch Proteasen gemindert werden, wodurch gerade lange Proteine länger unverdaut bleiben.

5. Lyse: **Tag 3 oder Tag 4**

- a. Die Bakterienpellets wurden in insgesamt 50 mL Bakterien Lyse Puffer (20 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mg/mL Lysozym, 1% Triton X-100, 20 mM MgCl₂, 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 25 µL DNase) aufgenommen und durch pipettieren gut gemischt.
- b. Das Gemisch wurde zur Inkubation und weiteren Durchmischung für mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C aufs Drehrad gestellt.
- c. Um die DNA und Zellreste im Überstand zu zerkleinern und damit ein besseres weiter bearbeiten möglich war, wurden die Proben drei Mal für jeweils 20 sec sonifiziert.
- d. Für 30 min wurde nochmals zentrifugiert

6. Aufreinigung des löslichen Teils (Überstand nach der Lyse) **Tag 4**

- a. Herstellung der Säule:
 - i. An eine 3 mL Spritze wurde ein drei Wege Hahn angebracht.
 - ii. 2 Filterpapiere in Größe des Stempels wurden ausgeschnitten.

- iii. Das erste Filterpapier wurde in destilliertem Wasser nass gemacht auf den Boden der Spritze gelegt.
 - iv. 4 mL Ni-NTA Agarose wurde hinzugefügt und ablaufen gelassen bis nur noch eine schmale Wasserschicht über der Nickel Säule zu sehen war.
 - v. Das zweite Filterpapier wurde ebenfalls in destilliertem Wasser angefeuchtet und vorsichtig sowie möglichst gerade auf die Nickel Säule gelegt.
 - vi. Die Säule wurde zuerst mit 10 mL Wasser und anschließend mit 10 mL Equilibrium Puffer (20 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100) gespült.
- b. Aufreinigung über die Säule
- i. Überstand des Lysates steril filtrieren (0,8 µm) und anschließend auf die Säule geben.
 - ii. Mit 10 CVs (20 mL) Equilibriumspuffer (20 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100) wurde im nächsten Schritt gewaschen.
 - iii. Anschließend wurde mit 10 CVs (20 mL) Waschpuffer 1 (20 mM Tris pH 8, 10 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100), danach mit 10 CVs (20 mL) Waschpuffer 2 (20 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 1 M NaCl) gewaschen.
 - iv. Mit 10 mL Elutionspuffer (20 mM Tris pH 8, 300 mM Imidazol, 300 mM NaCl) wurden jeweils 1 mL in 9 1,5 mL Tubes langsam eluiert, um die Proteinmenge möglichst in einem der Eluate zu konzentrieren.
 - v. Die Konzentration wurde durch Nano Drop bestimmt. Die drei Proben mit der höchsten Konzentration wurden mittels Proteinelektrophorese auf Reinheit und richtige Größe untersucht.

7. Lösen des Pellets im Ureapuffer Tag 4

Die nach der Lyse mit anschließender Zentrifugation entstandene Pellets wurden in insgesamt 100 mL Ureapuffer (50 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 8 M Urea, 10 mM β-Mercaptoethanol) gelöst und über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert.

8. Aufreinigung des in Urea gelösten Teils **Tag 5**
 - a. Die Säule wurde mit 10 CVs (20 mL) Extraktionspuffer (50 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 8 M Urea) gespült
 - b. Das gelöste Pellet im Ureapuffer wurde zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Der Überstand wurde steril durch eine Membran mit Poren von 0,8 µm filtriert, um ein Verstopfen des Filterpapiers in der Säule durch größere gelöste Zellreste zu verhindern. Bei der Aufreinigung des Proteins Reelin Aminosäure 1949-2662 war dies sehr schwierig, weshalb der Überstand vorher zweimal durch Filterpapier filtriert wurde.
 - c. Der Überstand wurde auf die Säule gegeben
 - d. Anschließend wurde mit 30 mL Waschpuffer (50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 8 M Urea, 10 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol) gewaschen
 - e. Mit 10 mL Elutionspuffer (50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 8 M Urea) wurden je 1 mL in 9 1,5 mL Tubes langsam eluiert, um die Konzentration möglichst in wenigen Gefäßen zu maximieren
 - f. Die Konzentration wurde mittels Nano Drop gemessen

9. Aufbewahrung der Säule **Tag 5**
 - a. Die Säule wurde mit 15 mL H₂O gespült
 - b. Anschließend wurde die Säule mit 20%igem Ethanol überschichtet, luftdicht zum Beispiel mit Parafilm verschlossen und konnten bei 4 °C aufbewahrt und wiederverwendet werden.

10. Regeneration der Säule

Bevor eine weitere Aufreinigung über die vorher benutzte Säule machen zu können musste diese regeneriert werden. Die Säulen wurden nur für die Aufreinigung des auch vorher damit aufgereinigten Proteins benutzt. Die für die Urea Aufreinigungen genutzten Säulen wurden ebenfalls nur für weitere Urea Aufreinigungen genutzt. Hierfür wurden nacheinander folgende Substanzen über die Säule gegeben:

 - a. 10 mL H₂O
 - b. 10 mL 0,5 NaOH
 - c. 10 mL H₂O
 - d. 10 mL 100 mM EDTA

- e. 10 mL H₂O
- f. 10 mL 100 mM NiSO₄
- g. 10 mL H₂O

11. Protein SDS-Elektrophorese

- a. Die Proben sowie eine Probe vor der Induktion der Bakterienkultur, eine nach der Induktion, eine Probe des Flow Through, also des Überstandes nachdem es über die Nickel-NTA Säule gelaufen ist, und eine Probe der benutzten Säule wurden mit Ladepuffer für Protein Elektrophorese (200 mM Tris pH 6,8, 8% SDS, 40% Glycerol, 0,2% Bromphenolblau, 4% β-Mercaptoethanol) gemischt. Diese wurden je nach errechneter Größe des Proteins auf ein 10%iges bis 15%iges Gel aufgetragen.
- b. Das Gel wurde bei 180 V circa 45 min laufen gelassen
- c. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer genommen und 20 min in Coomassie gefärbt.
- d. Das Coomassie wurde abgegossen und mit Wasser gewaschen.
- e. Zum Schluss wurde es mit Destin (7% Essigsäure, 5% Methanol) über Nacht entfärbt, sodass die unspezifischen Färbungen verschwanden und die Banden deutlich sichtbar wurden. Am nächsten Tag wurde das Gel eingeschweißt um es problemlos einscannen zu können.

Dialyse gegen PBS

Benötigt wurde eine Membran (10 kD Porengröße) und ein Becher mit wahlweise 1 L oder 2 L PBS

1. Die Membran wurde angefeuchtet und die zu dialysierende Probe mittels einer Spritze in die Kammer gefügt. Die enthaltene Luft wurde mit Hilfe der Spritze aus der Kammer entfernt umso die Oberfläche, die zur Dialyse genutzt wird, zu maximieren.
2. Die Dialysekammer wurde mit einem Schimmer in den Becher gehängt, ein Rührfisch hinzugegeben und auf niedriger Stufe schwimmen gelassen.
3. Nach 1 h wurde das PBS ausgetauscht. Bei 1 L im Gefäß wurde dieser Schritt drei bis viermal wiederholt, bei 2 L PBS im Gefäß zweimal.

4. Zum Schluss wurde die Dialysekammer wieder mit einer Spritze angestochen, 3 mL Luft hineingegeben um die Probe problemlos abziehen zu können.

2.2.4 Immunisierung Maus und Llama

Ein weibliches Llama (durchgeführt durch die Firma Preclinics GmbH (Potsdam, Germany), Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES), Oldenburg, Germany (Az 33.9-42502-05-09A618)) wurde immunisiert an Tag 0, 17, 32, 65 mit aufgereinigtem rekombinatem Reelin Fragmenten (Reelin 24- 500, Reelin 1949- 2662, Reelin 198- 28) in 0,5 mL PBS Lösung das mit der gleichen Menge an kompletten (Injektion Tag 0) bzw. inkompletten (alle weiteren Injektionen) freudsches Adjuvanz gemischt wurde. An Tag 70 erfolgte die Abnahme von 550 mL Blut. Immunsierung und Blutabnahme wurde durch Preclinics GmbH (Potsdam, Germany) durchgeführt.

Äquivalent hierzu wurden Reeler Mäuse (LANUV Az 84-02.05.30.11.070) an Tag 0, 21, 42 mit dem rekombinanten Reelin immunisiert, an Tag 50 erfolgte die Entnahme der Milz zur Fusion.

2.2.5 Fusion

Wichtig: immer warme GKN Lösung, sterile und zügige Arbeitsweise

1. In eine 60 mm Petrischale wurde ein steriles Metallsieb (Porengröße ca. 200 μ m) gelegt und 10 mL warme GKN Medium hinzugegeben.
2. Das Fell der unmittelbar vor der Milzentnahme getöteten Maus wurde mit viel Ethanol desinfiziert.
3. Links unterhalb des Rippenbogens wurde ein Schnitt gemacht. Dabei war es sehr wichtig auf die Sterilität zu achten, also zum Eröffnen des Peritoneums und zu der Milzentnahme selbst das Besteck zu wechseln. So konnte das Risiko einer Kontaminierung der späteren Zelllinie minimiert werden.
4. Die Milz wurde auf das sterile Metallsieb gelegt und mittels eines sterilen 5ml-Spritzen- Kolbens zerdrückt, bis keine Gewebeteile mehr erkennbar waren.
5. Die 10 mL GKN- Lösung mit Milz wurden gleichmäßig auf zwei 15 mL- Tubes verteilt und dabei eventuell noch sichtbare Bindegewebsstücke in der Petrischale belassen.

6. Das Sieb wurde gründlich mit 10 mL GKN Medium gespült und diese anschließend auch auf die beiden 15 mL- Tubes verteilt.
7. Die Tubes wurden bei Raumtemperatur, Bremse Stufe 0, Beschleunigung Stufe 2, bei 1750 rpm (ca. 1300 x g), für 5 min in der Beckmann Tischzentrifuge zentrifugiert.
8. Die Tubes wurden auf Eis gestellt und mit einer 10 mL Pipette der Überstand vorsichtig abgenommen, sodass maximal ein Volumen von ca. 250 µL verblieb.
9. Zum Lysieren der Erythrozyten wurden je 5 mL eiskalte NH₄Cl 0,75% Lösung hinzugefügt und für 10 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden die Tubes dreimal geschüttelt.
10. Die Suspension wurde in ein 50 mL Falcon überführt und 35 mL warmes GKN Medium hinzugefügt.
11. Parallel dazu wurden die P3U- Zellen (Tumorzellen), aus einer 2 Tage bestehenden Kultur in einer T 75 Flasche abgewaschen und in einem 50 mL- Tube mit GKN Medium aufgefüllt.
12. Sowohl die Splenozyten als auch die P3U Zellen wurden bei Raumtemperatur, Bremse Stufe 0, Beschleunigung Stufe 2, 1750 rpm (ca. 1300 x g), für 5 min in der Beckmann Tischzentrifuge zentrifugiert.
13. Beide Überstände wurden vorsichtig abgesaugt und 50 mL GKN Medium hinzugegeben.
14. Erneut wurde die beiden Tubes bei Raumtemperatur, Bremse Stufe 0, Beschleunigung Stufe 2, 1750 rpm (ca. 1300 x g), für 5 min in der Beckmann Tischzentrifuge zentrifugiert.
15. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und 10 mL warme GKN Medium hinzugefügt.
16. Zellzahlbestimmung erfolgte mittels einer Neubauer Zählkammer in die ca. 100 µL jeweils von den Splenozyten- und P3U Zell Suspensionen gegeben wurde. Unter dem Mikroskop wurden jeweils 4 Quadranten ausgezählt und der Querschnittswert gebildet.
17. Das Mischungsverhältnis wurde anhand folgender Formel bestimmt

$$\frac{X \text{ Splenozyten } \times 10.000 \times 10 \text{ ml}}{2 * (\text{Myeloma P3U} * 10.000)} = Z \text{ ml P3U auf 10 mL Splenozyten}$$

a.) Erste Fusion, Selektion Reelin Aminosäure 24- 500

P3U: Ø 83 Splenozyten: 25/ 18/ 14/ 16 = Ø 20

$$\frac{20 \text{ Splenozyten } * 10.000 * 10 \text{ mL}}{2 * (83 \text{ Myeloma P3U} * 10.000)} = 0,8 = 2 \text{ mL P3U auf 10 mL Splenozyten}$$

b.) Zweite Fusion, Selektion Reelin Aminosäure 1949-2662

P3U: Ø 65 Splenozyten: Ø 40

$$\frac{40 \text{ Splenozyten } * 10.000 * 10 \text{ mL}}{2 * (65 \text{ Myeloma P3U} * 10.000)} = 3,7 \text{ mL P3U auf 10 mL Splenozyten}$$

Abb. 2.2: Berechnung der Menge in ml der Myelomzellen, die zu den Splenozyten hinzugefügt werden müssen

18. Das Zellgemisch wurde mit warmer GKN Lösung auf 50 mL ausgefüllt und anschließend bei Raumtemperatur, Bremse Stufe 0, Beschleunigung Stufe 2, 500 rpm (ca. 400 x g) für 4 min in der Beckmann Tischzentrifuge zentrifugiert.
19. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, sodass der Rest-Überstand circa 0,1 mL betrug.
20. Das Pellet wurde durch leichtes Klopfen vorgelöst und 500 µL 50%iges Polyethylenglycol 4000- GKN (37°C) unter ständigem Schütteln hinzugefügt, bis sich eine gleichmäßige Suspension ergibt. Dieser Schritt destabilisiert die Membranen der Splenozyten und der P3U Zellen sodass diese miteinander fusionieren können.
21. Zentrifugation bei Raumtemperatur, Bremse Stufe 0, Beschleunigung Stufe 2, 500 rpm (ca. 400 x g), für 4 min in der Beckmann Tischzentrifuge, damit die Zellen näher aneinander liegen und so eine Fusion wahrscheinlicher wird.
22. Tropfenweise wurden 10 mL warmes GKN Medium unter konstantem Schütteln hinzugeben, um das Polyethylenglycol langsam zu verdünnen. Nochmals wurden langsam erst 10 mL dann 30 mL warme GKN-Lösung hinzugefügt.
23. Bei Raumtemperatur, Bremse Stufe 0, Beschleunigung Stufe 2, bei 1700 rpm (ca. 1300 x g) wurde für 5 min in der Beckmann Tischzentrifuge zentrifugiert.

24. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und Pellet in 30 mL DMEM (high glucose) 10% FCS gelöst. Das Ganze wurde in eine Zellkulturflasche überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.
25. Die Zellen wurden sorgfältig abgespült, in ein 50 mL Tube überführt und bei 1000 rpm für 5 min in der Beckmann Tischzentrifuge zentrifugiert.
26. Das Zellpellet wurde in 200 mL HAT Medium aufgenommen und auf 20-21 96-well Platten mit 100 µL pro Well verteilt.
27. Nach 5 Tagen wurde jeweils 150 µL HAT Medium ohne Hybridoma Cloning Supplement hinzugefügt.

GKN Medium

24 g NaCl, 1,2 g KCl, 4,26 g Na₂HPO₄, 1,8 g NaH₂PO₄, 6 g Glucose, 0,03 g Phenol-rot pH 7,4, Auf 300 mL mit MilliQ Wasser auffüllen und steril filtrieren.

Selektions-Medium,

DMEM high Glucose, 15% FBS, 1% Pen/Strep, 1% Na-Pyruvat, 2% HT- Supplement (50x Hypoxanthine 0,68 g/L(5 mM), Thymidine 0,194 g/L (0,8 mM)), 2% Aminopterin Hybri- Max (50X), 10% Hybridoma Cloning supplement (PAA)

Hybridoma-Medium

MEM Medium (Gibco 21090), 10% FCS , 1% Penicillin/ Streptomycin
1% L-Glutamin, 2% HT Supplement (50× → Hypoxathine 0.68 g/L (5 mM),
Thymidine 0.194 g/L (0.8 mM))

2.2.6 Selektion der Antikörperklone

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

1. ELISA Platten beschichten

a. Screening Platten

Auf 96 Well Maxisorp Nunc Immuno Plates wurden mit 0,5-1 μg des gewünschten Screening Reagenz (Reelin Aminosäure 24- 500 oder Reelin Aminosäure 1949- 2662) in 50 μL DPBS gelöst pro Well aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit H₂O gewaschen und die restlichen Bindungsstellen auf der Platte mit 200 μL 5% BSA pro Well über Nacht bei 4 °C blockiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Platten nochmals mit H₂O gewaschen und anschließend bei -40 °C eingefroren.

b. BSA Platten

96 Well Maxisorp Nunc Immuno Plates wurden mit 200 μL 5% BSA pro Well befüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit H₂O gewaschen und bei -40 °C eingefroren.

2. Screening

a. Die Zellkultur 96-well Platten wurden mit einem Spiegel von unten betrachtet und alle Wells, die gelb gefärbt waren, wurden ausgewählt, da dies ein Zeichen für Stoffwechselaktivität ist. Zusätzlich wurden alle Wells mit einem großen sichtbaren Zellhaufen ausgewählt.

b. 100- 110 μL Medium wurden vorsichtig, möglichst ohne Mitnahme von Zellen, aus den Wells genommen und auf die BSA Platte im notierten Muster gegeben. Zusätzlich wurden Medium als negativ Kontrolle, G10 als positiv Kontrolle, und 1:1000 in DPBS verdünntes Serum aufgetragen.

c. Je 50 μL pro Well wurden aus der BSA Platte auf die Screening Platte überführt und für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

d. ELISA Platten wurden mit H₂O gewaschen. Anschließend wurde PBST hinzugefügt für 10 min inkubiert und nochmals mit H₂O gewaschen.

e. 100 μL pro Well α - Maus POD 1:5000 in PBST wurde hinzugeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

- f. Erneut wurden die ELISA Platten gewaschen, erst mit H₂O dann 10 min mit PBS-T und zuletzt erneut mit H₂O. Das wurde noch einmal wiederholt.
- g. Es wurde 50 µL pro Well des ELISA Substrats (Mischung Substrat A+B 1:1) hinzugegeben. Sobald sich die Wells blau färbten, genauer gesagt die Positivkontrolle der Screening Platte wurden 50 µL Schwefelsäure dazu gegeben. Die vorher blauen Wells färbten sich gelb. Positive Ergebnisse, also das die Antikörper im Überstand das Protein auf der Platte binden, zeigten sich anhand der gelben Färbung. Keine Färbung war als negatives Ergebnis zu werten.
- h. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen.

Enzyme linked immunofilter assay (ELIFA) mittels Easy Titer ELIFA System

1. Eine 0,2 µm Nitrozellulosemembran wurde in das ELIFA System eingespannt und jeweils die Hälfte mit der Testsubstanz und der Kontrollsubstanz beladen. Als Substanzen wurden 100 µL 1:50 verdünntes HEK- Zelllysate (1,2 mg/mL) GFP gegen Reelin oder 200 µL FCS freie Überstände der HEK Zellen GFP gegen Reelin genutzt. Alternativ wurden 1:250 verdünntest 10%iges Gehirnhomogenat, Reeler Gehirn gegen Wildtyp bzw. E18 Wildtyp Ratte, in VRL Puffer je nach Belieben mit 1% Triton oder in 8 M Urea in DPBS genutzt.
2. Die Substanzen wurden ansaugt sodass die zu untersuchenden Substanzen (Reelin gegen GFP) auf der Membran hängen blieben, die Lösungsmittel allerdings durchgesogen wurden.
3. Die Membran wurde mit jeweils 100 µL/ Well DPBS gewaschen, dass anschließend ebenfalls durch die Membran gesaugt wurde.
4. Die Membran wurde aus dem ELIFA System herausgeholt und mind. 1 h mit Milchpulver in PBS-T gelöst geblockt.
5. Nach kurzem Waschen mit PBS-T wurde die Membran wieder in das ELIFA System eingebaut. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Abdrücke der Wells auf den jeweiligen lag.
6. Es wurden jeweils 50 µL Antikörper Überstand der positiv im ELISA getesteten Antikörperklone aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

7. Die Antikörper wurden ausgeschlagen und die einzelnen Wells mit H₂O gewaschen und erneut ausgeschlagen. Anschließend wurde die Membran aus dem System genommen und in einer Western Blot Schale dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen.
8. Mit in PBS-T gelöstem sekundär Antikörper (α Maus POD) 1:50000 wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
9. Der sekundäre Antikörper wurde abgegossen und 3 x 10 min mit PBS-T gewaschen.
10. Auf die Membran wurde 1,5 mL 1:1 Western Blot Substrat A+B gegeben und in Klarsichtfolie eingeschweißt.
11. Entwickelt wurde auf Röntgenfilmen die Belichtungszeit war je nach Bedarf normalerweise 30 sec oder 3 min.

Herstellung von Gehirnhomogenaten

1. Das Gehirn der Reeler Maus (O22/03; ZETT), E18 Ratte der Wildtypmaus (WT Mo29) wurden auf Trockeneis gelagert.
2. Das Gehirn wurde gewogen. Für ein 10% Homogenat gilt:
 $X \text{g Hirn} * 10 = Y \text{ ml VRL-Puffer} - X \mu\text{L}$ als eigenes Volumen des Hirns
 z.B.: $0,1658 \text{ g} * 10 = 1,658 \text{ mL VRL} - 165,8 \mu\text{L} = 1,492 \text{ mL VRL Puffer}$ in der das Gehirn homogenisiert wird
3. Gehirn wurde mittels Homogenatoren soweit zerrieben bis es eine homogene Masse ergab.
4. 200 μL für den ELIFA wurde mit 5 μL DNase versetzt, damit diese die Membranen nicht verstopft, und über Nacht auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden jeweils 20 μL in Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.7 Typisierung der Antikörper

Mutagenese PCR

Um die Bindungsstellen der Maus Antikörper gegen Reelin Aminosäure 24- 500 genauer identifizieren zu können, fügte ich Stoppsignale nach Aminosäure 100, 200, 300 und 400 ein mittels Mutagenese. Dafür entwarf ich entsprechende Primer und führte eine PCR durch.

1. Es wurden 5 μ L 10X Puffer (Endkonzentration einfach), 0,5 μ L dNTP (Endkonzentration 250 μ M), 1,5 μ L Primer A (150 ng), 1,5 μ L Primer B (150 ng), 5 μ L Template (25 ng des pet22b+ mit Reelin Aminosäure 24- 500) und 1 μ L Pfu-Polymerase (2,5 U) zusammengesetzt und mit H₂O auf 50 μ L Gesamtvolumen aufgefüllt. Bei Bedarf konnte 5% DMSO hinzugefügt werden.
2. Thermozykler :

	Temperatur	Zeit
	95°C	2 min
Denaturierung	95°C	30 sec
Annealing		
100- 300stop	58°C	30 sec
400 stop	55°C	30 sec
Elongation	72°C	10 min (zurück zur Denaturierung 30X)
	72°C	20 min

3. Anschließend wurde das Produkt mit DpnI (1 μ L) 2-3 Stunden bei 37 °C inkubiert und über Invitak spin column aufgereinigt. DpnI schneidet nur methylierte DNA, sodass das Template zerschnitten wird, das PCR Produkt allerdings nicht.
4. Nach der Aufreinigung wurde es in DH5 α transformiert, auf Carbencillin Platten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.
5. Einzelne Klone wurden gepickt und eine DNA Mini Präparation mit Insorb spin plasmid mini two durchgeführt.
6. Nach der Transformation einzelner Klone in BL21 wurde eine 20 mL Kultur mit IPTG beimpft, jede Stunde eine Probe genommen und zentrifugiert. Das Pellet wurde in SDS Ladepuffer gelöst und anschließend eine SDS-Protein Elektrophorese durchgeführt.

Western Blot

1. Durchführen einer Protein SDS-Gelelektrophorese.
2. Blotten
Die Blotting Vorrichtung wurde auf die schwarze Seite in H₂O gelegt. Darauf wurde Wartmann Papier, anschließend das Gel, die Nitrozellulosemembran und noch ein Wartmann Papier gelegt. Anschließend wurde es in die Blotting Kammer gestellt und diese mit Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20% Methanol) vollständig aufgefüllt. Über Nacht wurde bei 150 mA geblottet.
3. Überprüfen des Blottens
Pousseurot wurde zu der Membran in einer Western Blot Schale gegeben und 3- 5 min geschwenkt. Anschließend wurde mit H₂O gewaschen bis die einzelnen Proteinbanden sichtbar wurden. Falls der Blot unterteilt werden sollte, musste jetzt eine Markierung erfolgen. Anschließend wurde der Blot mit PBS-T über 5 bis 10 min wieder entfärbt
4. Blocken
Zu der Membran wurde in PBS-T gelöstes Milchpulver gegeben und für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde mit PBS-T gewaschen.
5. Primärer Antikörper
Der Antikörper gegen das aufgetragene zu untersuchende Protein wurde in empfohlener Konzentration hinzugegeben. Bei dem Überständen eigens hergestellter Antikörper wurde eine 1:1 Verdünnung in PBS versucht und anschließend die richtige Konzentration gesucht. Das Ganze für wurde 1 h auf dem Schüttler inkubiert.
6. Waschen
Die primären Antikörper wurden verworfen und PBS-T hinzugefügt. 10 min wurde auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das PBS-T verworfen und frisches PBS-T hinzugefügt. Insgesamt wurde dies dreimal durchgeführt.
7. Sekundärer Antikörper
Dieser wurde abhängig von der Spezies der primären Antikörper, im Fall der Antikörperüberstände α Maus POD, 1:50.000 in PBS-T hinzugefügt und für 1 h auf dem Schüttler inkubiert.
8. Waschen
Wurde wie oben dreimal 10 min lang in PBST durchgeführt.

9. Entwickeln

Der Blot wurde auf eine Folie gelegt und mit 1-1,5 mL Substrat (Reagens 1+2=1:1) draufgegeben. Die Folie zwei bis dreimal angehoben um das Substrat gleichmäßig auf der Membran zu verteilen. Anschließend wurde überflüssiges Substrat mit einem Tuch rausgestrichen und zu geschweißt. Der eingeschweißte Blot wurde in eine Röntgenkassette und darauf Röntgenfilm gelegt. Nach verschließen der Kassette wurde der Röntgenfilm eine beliebige Zeit exprimiert, z.B. zuerst 30 min. War diese Expression zu stark und die einzelnen Banden nicht gut voneinander zu differenzieren wurde eine kürzere Belichtungszeit versucht. War diese zu schwach wurde eine längere Belichtungszeit gewählt.

2.2.8 Phage display

Lymphozyten aus Llama Blut extrahieren

1. Das Llama Blut wurde 1:1 mit PBS verdünnt.
2. 15ml Ficoll wurde in 50 mL Falcons gegeben und vorsichtig mit 30 mL Blut überschichtet ohne dass es sich mischt.
3. Nach einer Zentrifugation bei 22 °C für 30 min bei 350 x g bildeten sich 4 Schichten, Plasma, Lymphozyten, Ficoll und Erythrozyten mit den restlichen Blutbestandteilen.
4. Die Lymphozyten vorsichtig abnehmen und die 18 mL Lymphozyten wurden mit 32 mL PBS gewaschen bei 100 x g für 10 min zentrifugiert.
5. Der Überstand wurde verworfen und je 6 Pellets in 50 mL PBS aufgenommen. In einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen gezählt. Im Falcon 1 waren es $29 \cdot 10^7$ Lymphozyten und im Falcon 2 $40 \cdot 10^7$ Lymphozyten.
6. Anschließend wurde bei 200 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit einer Endkonzentration von 10^7 Zellen/mL PBS gelöst.
7. Je 1 mL wurde in ein 1,5 mL Eppendorf Tube gefüllt und für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Pellets in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese wurden bei -80 °C aufbewahrt

RNA Präparation

Die RNA Präparation aus den Lymphozyten wurde mittels Quiagen RNeasy kit im doppelten Ansatz durchgeführt. Eluiert wurde mit 100 µL enthaltenem Elutionspuffer durch beide Säulen hintereinander umso eine möglichst hohe Endkonzentration zu erreichen, in diesem Fall 250 ng/µL

Reverse Transkriptase

1. 11,5 µL Template, sprich das Ergebnis der RNA Präparation, wurde mit 1 µL oligo(dt)₁₈ primer gemischt und anschließend bei 65 °C für 5 min inkubiert.
2. Es wurden 4 µL 5fach Reaktionpuffer, 0,5 µL RiboLockTM RNase Inhibitor, 2 µL dNTP Mix 10 mM jeweils und 1 µL Revert Aid TM M-MuLV Reverse Transkriptase hinzugefügt. Für 60 min bei 42 °C wurde das Gemisch inkubiert. Die Reaktion wurde durch 70 °C für 10 min terminiert.

1.PCR:

Primer Paare:

- 1) MJ1+CH2
- 2) MJ2+CH2
- 3) MJ3+ CH2
- 4) MJ1+ CH2b3
- 5) MJ2 + CH2b3
- 6) MJ3+ CH2b3

Auf Eis wurden 10 µL GC-Puffer, 1 µL 10 mM NTP's, 2,5 µL Primer (1:10), 2 µL cDNA und 0,5 µL Phusion Polymerase zusammengefügt und mit H₂O auf 50 µL aufgefüllt.

Thermozykler

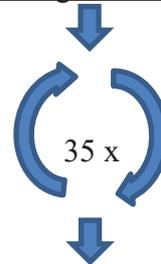
Im Thermozykler wurden das reguläre Programm (Phusion) mit dem Programm Touch down, wo die Annealing Temperatur zu Beginn höher war und stufenweise abnahm, verglichen. Die hohe Annealing Temperatur beim Touch down Programm führt zu einer spezifischeren Primerbindung, wodurch wenig Hintergrundsignal entsteht und mehr von

dem gewollten Produkt. Der Nachteil daran ist, dass eine Vorselektionierung stattfindet, der Antikörper die nicht optimal mit dem Primer binden. Daher wurden beide Methoden im Vergleich getestet.

Programm Phusion :

	98°C	30 sec	
Denaturieren	98°C	15 sec	} 35 Mal
Annealing	56°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Final Elongation	72°C	10 min	

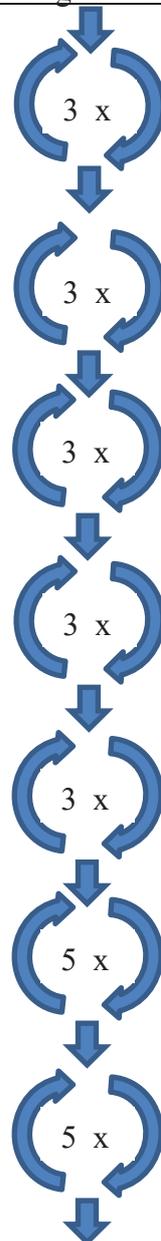
Flow chart Programm Phusion:



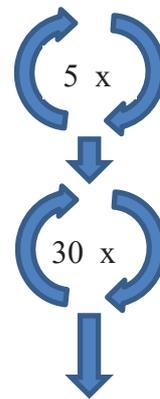
Programm Touch down:

Initiale Denaturierung	95°C	30 sec	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 3 Mal
Annealing	72°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 3 Mal
Annealing	70°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 3 Mal
Annealing	68°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 3 Mal
Annealing	66°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 3 Mal
Annealing	64°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 5 Mal
Annealing	62°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 5 Mal
Annealing	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	

Flow chart Programm Touch down:



Denaturierung	95°C	30 sec	} 5 Mal
Annealing	58°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 30 Mal
Annealing	56°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	5 min	



Anschließend wurde eine Aufreinigung über ein Gelelektrophorese durchgeführt, indem die jeweiligen Banden ausgeschnitten und mittels Invisorb Spin DNA Extraction Kit aufgereinigt wurden.

2.PCR

Primer: MJ7+ JH3

Auf Eis wurden 10 µL GC-Puffer, 1 µL 10 mMol NTP's, 2,5 µL Primer (1:10), 2 µL Produkt der 1. PCR und 0,5 µL Phusion Polymerase zusammengefügt und mit H₂O auf 50 µL aufgefüllt. Genutzt wurden abermals das Phusion und das Touch down Programm.

Aufgereinigt wurde das Produkt mittels Gelelektrophorese, wo die jeweiligen Banden ausgeschnitten und mittels Invisorb Spin DNA Extraction Kit aufgereinigt wurden

Restriktionsverdau

Der PIT₂ Vektor und die PCR Produkte wurden mit SFI 1 und NOT 1 geschnitten. Zusätzlich um eine Religation zu verhindern wurde der Vektor mit 1µl alkalischer Phosphatase und 10-fach AP-Puffer für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Die SfiI Restriktion wurde bei 70 °C für 4 h und die Not I Restriktion bei 37 °C für 4 h nacheinander durchgeführt. Diese Temperaturen wurden ausgesucht, weil die jeweiligen Restriktionsenzyme unter dieser Bedingung jeweils am besten schneiden.

Herstellung elektrokompetenter TG1 Bakterien (E.coli)

1. Eine kleine Probe der TG1 Bakterien wurden auf eine LB-Medium Platte ohne Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.
2. 1 Klon von der Platte wurde in 10 mL SOB Medium (2% Bacto-trypton, 1% Bacto-yeast extract, 0,05% NaCl, 5 mL 2 M MgCl₂ /L) überführt und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert.
3. Insgesamt 500 mL SOB Medium (je 250 mL in 2x 2 L Kolben) wurden mit der über Nacht gewachsenen Vorkultur versetzt und ca. 3 h bei 37 °C 200 rpm bis zu einer OD = 0,8 wachsen gelassen.
4. Die Kolben wurden sofort auf Eis gestellt, so wie alle der folgenden Schritte auf Eis gemacht worden sind. Die Bakterienkultur wurde in 50 mL Falcons überführt und bei 4000 \times g und 4 °C für 10 min in der Beckmann Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und nochmals kurz zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde komplett abgenommen, um keine Salze übrig zu lassen.
5. Das Bakterienpellet wurde in 25 mL eiskaltem, steril filtriertem 10% Glycerol resuspendiert. Danach wurde nochmals 25 mL 10% Glycerol hinzugegeben. Nach der Zentrifugation bei 4 °C 4000 \times g für 10 min wurde der Überstand entfernt und dieser Waschschrift noch zweimal wiederholt.
6. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und das Pellet in circa 5 mL eiskaltem steril filtriertem 10% Glycerol resuspendiert.
7. 1 μ L der Suspension wurde in 1 mL SOB Medium gegeben und die OD bestimmt: OD = 0,14. Die OD sollte zwischen 0,2 und 0,3 liegen. Daher wurde nochmals 10 min zentrifugiert und das Pellet in 2 mL eiskalten, steril filtrierten 10% Glycerol aufgenommen. Wieder wurde 1 μ L in 1 mL SOB Medium gegeben und die OD gemessen: OD = 0,35.
8. Elektrokompetente TG1 wurden zu je 100 μ L Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Kompetenztestung der Bakterien

1. Zu 50 μL TG1 Bakterien wurden 50 pg PUC 19 (Kontroll-DNA) gegeben und das Gemisch in eine Elektroporationsküvette (rot/lang peq-lab 71-2010-LE) gegeben. Dabei war es wichtig, dass keine Luftblasen entstanden, da diese die Elektroporation verschlechtern. Anschließend wurde der Inhalt der Küvette 10 min auf Eis inkubiert.
2. Elektroporation: Ein 1800 V 15 μF 335 R Puls wurde abgegeben. Die Zeit sollte circa. 5,0 msec sein, war diese länger oder kürzer hatte die Elektroporation nicht funktioniert.
3. Mithilfe von 1 mL warmen SOB Medium wurde möglichst alles aus der Küvette entfernt, in ein 15 mL Falcon überführt und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.
4. Anschließend wurden 1 μL davon in 1 mL SOB Medium und 1 μL in 100 μL SOB Medium gegeben und 10 μL auf LB- Carbencillin Platten ausgestrichen. Über Nacht wurden die Platten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
5. Kompetenz:
1:100 ca. 150 Klone auf einer halben Patte = $150 \cdot 2 \cdot 100$ (Verdünnung) * 100 (da nur 10 μL auf die Platte aufgetragen wurde 1000 μL Gesamtvolumen/aufgetragenes Volumen) * 1000 (initiales Gesamtvolumen in μL) = $3 \cdot 10^{10}$
1:1000 30 Klone * 1000 (Verdünnung) * 100 (da nur 10 μL auf die Platte aufgetragen wurde 1000 μL Gesamtvolumen/ aufgetragenes Volumen) * 1000 (initiales Gesamtvolumen) = $6 \cdot 10^{10}$
Kompetenz zwischen $3 \cdot 10^{10}$ - $6 \cdot 10^{10}$

Herstellung kompetenter KM13 Helfer Phagen

1. Kompetente TG1 Bakterien wurden bis zu einer OD = 0,4 wachsende lassen und 200 μL davon mit 10 μL KM13 Phagen versetzt. Dieses Gemisch wurde 1:10², 1:10⁴ und 1:10⁶ verdünnt und 30 min bei 37 °C inkubiert.
2. 1% Agarose wurde in LB-Medium mit 5 mM MgCl₂ im Wasserbad geschmolzen und anschließend im Wasserbad auf ca. 42 °C heruntergekühlt. Gleichzeitig wurden LB-Platten ohne Selektionsmarker auf 37 °C erwärmt.

3. Das Bakterien- Phagen Gemisch wurde in 3 mL des bereits abgekühlten LB-Agarose Mix gegeben und gut gemischt auf die LB-Platte geschüttet. Hier ist es wichtig möglichst schnell zu arbeiten, um eine möglichst konfluente Bedeckung zu schaffen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.
4. Kompetente TG1 Bakterien wurden bis zu einer OD = 0,4 wachsen gelassen. In 5 mL TG1 1 wurde Plaque Phagen von den Platten des Vortages gegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Plaques bilden sich, weil die Bakterien an dieser Stelle von den Phagen infiziert wurden und daher abstarben. Dadurch entstehen Plaques im Bakterienrasen.
5. Die 5 mL TG1 Bakterien mit Phagen infiziert wurden in einen 2 L Kolben gefüllt mit 500 mL 2TY gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert.
6. 50 µg/mL Kanamycin Endkonzentration wurde hinzugefügt und über Nacht bei 30 °C Phagen exprimiert.
7. Phagen Bakterien Gemisch wurde vorsichtig, wegen der bestehenden Kontaminationsgefahr mit den Phagen, in 50 mL Falcons vorsichtig umgefüllt und bei 10800 x g 15 min zentrifugiert.
8. Der Überstand wurde abgenommen, 400 mL davon mit 100 mL PEG/NaCl (20% Polyethylenglycol 6000; 2,5 M NaCl) gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Phagen sind in normalem Medium im Überstand zu finden. Durch das PEG/NaCl fallen diese im Pellet aus.
9. Für 30 min wurde bei 10800 x g zentrifugieren und das PEG/NaCl abgenommen. Die Pellets wurden jeweils in 8 mL PBS aufgenommen und 2 mL PEG/NaCl hinzugefügt. Anschließend wurde es für 20 min auf Eis inkubiert.
10. Abermals wurde für 30 min bei 3300 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Phagenpellet wurde in 5 mL PBS + 15% Glycerol aufgenommen und nochmals in einer Mikrozentrifuge bei 11600 x g für 10 min zentrifugiert.
11. Die Phagen wurden zu jeweils 250 µL in 1,5 mL Eppendorf Tubes gegeben und bei -80 °C eingefroren.
12. Zur Qualitätstestung der Phagen wurde ein Aliquot wieder aufgetaut und 1 µL Phagen in 1 mL PBS gegeben. Dieses wurde dann 1:10³, 1:10⁵, 1:10⁷, 1:10⁹, 1:10¹¹, 1:10¹³, 1:10¹⁵ verdünnt und jeweils 50 µL davon auf 1 mL TG1 Bakterien (OD = 0,4) gegeben und bei 37 °C für 30 min inkubiert.

13. Für jede Verdünnung wurde 1% Agarose in 3 mL 2TY geschmolzen und auf 42 °C im Wasserbad abgekühlt. Das Bakterien-Phagen Gemisch wurde hinzugegeben, gut gemischt und auf die vorgewärmten LB Platten ohne Selektionsmarker gegeben. Über Nacht wurden die Platten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
14. Die Phagenhöfe wurden am nächsten Tag gezählt:
 1:10⁹: 21Stück*2 (nur die Hälfte der Phagen wurden hinzugefügt da Verdünnung immer in 100 µL) *10⁹ (Verdünnung)*10³ (Anfangsverdünnung)
 = 4*10¹³ = Kompetenz

Herstellung der Bibliothek

YTAG Platten (3x 90 mm, 5x 150 mm)

0,8% Tryptone

0,5% Yeast

0,5% NaCl

+100 µg/mL Carbencillin + 1% Glucose

+ Bacto Agar 15 g/L

2 YTAG Medium

1,6% Tryptone	} 2TY Medium
1% Yeast	
0,5% NaCl	

+100 µg/mL Carbencillin + 1% Glucose

SOC Medium

2% Tryptone

1% Yeast

0,05% NaCl

+5 mL 2 M MgCl₂ + 20 mL 1 M Glucose

Ligation

2 µg Vektor = 51 µL

0,5 µg DNA = 18 µL

8 µL 10x Ligase Puffer

1 µL T₄ Ligase

Add to 80 µL H₂O

Über Nacht bei 15 °C ligieren

1. Die Ligation über Quiagen PCR Purification Säule aufgereinigt
Eluat 1: 40 µL a' 30 ng/µL
Eluat 2: 20 µL a' 6 ng/µL
2. 10 Ansätze: 8x 50 µL TG1 + 5 µL Eluat 1; 2 x 5 µL TG1 + 10 µL Eluat 2 wurden vorsichtig in die Elektroporationsküvetten pipettiert und 10 min aus Eis inkubiert.
3. Elektroporation: 1800 V 15 mF 335 R (alle um die 5 msec)
4. Jeweils 1 mL warmes SOC Medium wurde hinzugegeben in ein 15 mL Falcon überführt und 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.
5. Anschließend wurde für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und 800 µL Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in den restlichen 200 µL resuspendiert.
6. Je 10 µL, 1 µL, 0,1 µL wurden auf eine 90 mm YTAG Platte ausgestrichen. Der Rest wurde auf die 5 150 mm YTAG Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.
7. Die Anzahl der gewachsenen Klone wurden auf den Verdünnungsplatten gezählt. Auf der Platte wo 0,1 µL Bakteriengemisch aufgetragen wurden wuchsen 190 Klone in einem Quadranten. Das führt zu einer Bibliothek der Größe $1,5 \cdot 10^6$ ($190 \cdot 4 \cdot 2000$) * 8 (8 Ansätze mit 5 µL Insert) = ungefähr 10^7 .
8. Auf die 150 mm Platten wurde je 1 mL 2 YTAG Medium mit 15% Glycerol gegeben und mit einem Zellschaber wurden die Kolonien vorsichtig abgetragen. Die Bakterien wurden in insgesamt 10 mL 2YTAG mit 15% Glycerol aufgenommen und zu je 0,5 mL bei -80 °C eingefroren.
9. 60 einzelne Kolonien wurden von den Verdünnungsplatten gepickt und über Nacht in 5 mL 2 YTAG Medium inkubiert. Um die Komplexität der Bibliothek zu ermitteln, wurde am nächsten Tag eine Mini Präparation durchgeführt um die DNA sequenzieren zu lassen. Alternativ wurde eine Restriktion durchgeführt um über

eine Gelelektrophorese gegebenenfalls Banden der richtigen Größe zu identifizieren.

Selektion

1. Selektion

ELISA Platte beladen

ELISA Maxisorp Platte (NUNC)

1. Jeweils 2 Wells wurden mit 10 µg in insgesamt 50 µL beladen, sprich zweimal Reelin Aminosäure 24- 500 und zweimal Reelin Aminosäure 1949- 2662, und über Nacht bei 4 °C inkubiert.
2. Die Platten wurden ausgeschlagen und anschließend zweimal mit H₂O gewaschen.
3. Blockiert wurden die restlichen Bindungsstellen mit 5% BSA 150 µL/Well 1 h bei 37 °C.
4. Die Platten wurden ausgeschlagen und erst mit H₂O, PBS und wieder mit H₂O gewaschen.

Phageninfektion für 1. Selektion

1. 50 µL aus der Bibliothek wurde in 200 mL 2YTAG- Medium in einem 1 L Erlenmeyerkolben bei 37 °C bis zu einer OD = 0,4 wachsen gelassen.
2. 50 mL der Bakterien, je 25 mL in einem 50 mL Falcon, wurden mit $2 \cdot 10^{11}$ KM13 Helfer Phagen versetzt und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde bei $3000 \times g$ für 10 min zentrifugiert.
3. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 100 mL 2TY mit 0,1% Glucose, 50 µg/mL Kanamycin und 100 µg/mL Carbencillin gelöst. Über Nacht wurde bei 30 °C inkubiert, beziehungsweise die Phagen exprimiert.
4. Für 30 min bei $3300 \times g$ wurde zentrifugiert und 80 mL Überstand mit 20 mL PEG/NaCl gemischt. Anschließend wurde das PEG/NaCl Gemisch 1 h auf Eis inkubiert.
5. Abermals wurde für 30 min bei $3300 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 mL PBS mit 15% Glycerol aufgenommen. Erneut wurde für

10 min bei 11600 x g zentrifugiert und der Überstand zu je 200 μ L in Nunc Cryo Tubes bei -80 °C eingefroren.

1. Selektion

1. 50 μ L Phagen wurden mit 1% BSA versetzt und $\frac{1}{2}$ h bei Raumtemperatur inkubiert. So sollte die Wahrscheinlichkeit nur Reelin bindende Antikörper zu finden erhöht werden, da die kreuzreagierenden Antikörper gegen BSA vorher rausgefangen werden. Anschließend wurden diese auf die beladenen Wells gegeben und 2 h inkubiert.
2. Mit PBST wurde 10 mal gewaschen. 1 Waschschrift entsprach 200 μ L PBST 15 mal hoch und runter in einem Well pipettiert. Bei jedem 5. Waschschrift wurde das PBST für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.
3. ELUTION
 - a. TEA (Triethylamin)

50 μ L 150 mM TEA in H₂O verdünnt wurde auf die Platte gegeben und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das TEA abgenommen in ein 1,5 mL Tube überführt und mit Tris pH 8 Endkonzentration 100 mM neutralisiert.
 - b. NaOH

Nach der TEA Elution wurden 50 μ L 150 mM NaOH in das Well gegeben, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und auch in ein 1,5 mL Tube überführt.
4. Zu 1,75 mL TG1 Bakterien bei einer OD = 0,4, 60 μ L wurden entweder der TEA Mix oder die 50 μ L NaOH Mix gegeben und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
5. Je 10 μ L, 1 μ L, 0,1 μ L für Reelin Aminosäure 24- 500 und Reelin Aminosäure 1949- 2662 sowohl TEA als auch NaOH Elution wurden auf eine 2YTAG Platte 90mm ausgestrichen. Der Rest wurde jeweils auf eine 150 mm 2YTAG Platte ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.
6. Die Platten auf denen die NaOH Eluate ausgestrichen wurden waren leer. Daraus lässt sich schließen, dass alle Antikörper bereits mit dem TEA aus der Bindung mit der ELISA Platte gelöst wurden.

7. Auf den TEA Eluat Platten zeigte sich:

RLN 24- 500: 1 μL Platte $190 * 1700$ (Gesamtvolumen in μl)= $3 * 10^5$

RLN 1949- 2662: 1 μL Platte $240 * 1700$ (Gesamtvolumen in μl)= $4 * 10^5$

Von den großen 150 mm Platten wurden die Kolonien mit jeweils 2 mL 2TY mit 15% Glycerol und einem Zellschaber vorsichtig abtragen.

2. Selektion

Phagen aus 1. Selektion herstellen

1. Die aus der ersten Selektion gewonnenen TG1 Bakterien wurden bis zu einer OD = 0,4 wachsen gelassen. Dann wurden 10 mL der Kultur mit $5 * 10^{10}$ Helfer Phagen infiziert und 30 min auf Eis inkubiert.
2. Nach einer Zentrifugation bei $3000 \times g$ für 10 min wurde der Überstand abgenommen.
3. Pellet wurde zur Expression der Phagen in 50 mL 2YT Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Carbencillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin und 0,1% Glucose aufgenommen und über Nacht bei 30 °C inkubiert.
4. Für 15 min wurde bei $3000 \times g$ zentrifugiert und 40 mL des Überstandes mit 10 mL PEG/NaCl gemischt. Anschließend wurde es 1 h auf Eis inkubiert.
5. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei $3300 \times g$ wurde der PEG/NaCl Überstand abgenommen. Je nach Größe des Pellets wurde es in mehr oder weniger PBS mit 15% Glycerol gelöst. In diesem Fall war es für Reelin Aminosäure 24- 500 100 μL und für Reelin Aminosäure 1949- 2662 in 200 μL .

ELISA Platte für 2. Selektion

1. Jeweils 2 Wells wurden mit 10 μg in insgesamt 50 μL beladen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.
2. Die Platten wurden ausgeschlagen und anschließend zweimal mit H_2O gewaschen.
3. Blockiert wurden die restlichen Bindungsstellen mit 3% Milch 150 $\mu\text{L}/\text{Well}$ 1 h bei Raumtemperatur.
4. Die Platten wurden ausgeschlagen und erst mit H_2O , PBS und wieder mit H_2O gewaschen.

2. Selektion

1. Die Phagen wurden mit einer Endkonzentration von 3% Milch $\frac{1}{2}$ h inkubiert, um wie bei der 1. Selektion die Phagen bereits zu binden, die gegen Milch gerichtet sind.
2. Die Phagen wurden auf die ELISA Platte gegeben und 2 h inkubiert.
3. Gewaschen wurde 20 mal mit PBST, 20 mal mit PBS und einmal mit H₂O. Bei jedem 5. Mal wurde der Inhalt für 5- 10 Minuten inkubiert. Der einzelne Waschschrift wurde wie bei der 1. Selektion durchgeführt
4. Zur Elution wurde 50 μ L 150 mM TEA in jedes Well hinzugegeben und 5 min inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen in ein 1,5 mL Tube gegeben und mit 100 mM Tris pH 8 neutralisiert.
5. Die eluierten Phagen wurden zu 1,7 mL TG1 (OD = 0,4) gegeben und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
6. 1 μ L, 10 μ L wurden jeweils auf kleine YTAG Platten ausgestrichen. Der Rest wurde auf eine 150 mm YTAG Platte ausgestrichen und über Nacht 37 °C inkubiert.
7. Ergebnis:
RLN 24- 500: 10 μ L Platte: 97 Klone *200 (Gesamtvolumen in μ L/ 10 μ L)
= 19.000
RLN 1949- 2662: 1 μ L Platte: 225 Klone * 2000 (Gesamtvolumen in μ L/ 1 μ L)
= 450.000
8. Kolonien wurden von der großen 150 mm YTAG Platten mittels 1 mL 2YT mit 15% Glycerol und einem Zellschaber vorsichtig abtragen.

3. Selektion

Phagen aus 2. Selektion herstellen

1. 50 μ L der Bakterien aus der 2. Selektion wurden in 50 mL YTAG Medium gegeben und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert bis die OD = 0,4 betrug.
2. Zu 10 mL der Bakterienkultur wurden $5 \cdot 10^{10}$ Helfer Phagen gegeben und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
3. Bei 3300 x g wurde für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

4. Das Pellet wurde in 50 mL 2TY Medium mit 100 µg/mL Carbencillin, 50 µg/mL Kanamycin und 0,1 Glucose gelöst und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.
5. Bei 3300 x g wurde für 15 min zentrifugieren und zu 40 mL des Überstandes 10 mL PEG/NaCl hinzugegeben. 1 h wurde es auf Eis inkubiert.
6. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 3300 x g für 30 min wurde der Überstand verworfen und die Pellets in PBS mit 15% Glycerol gelöst. In diesem Fall war es für Reelin Aminosäure 24- 500 200 µL und für Reelin 1949- 2662 500 µL. Bis auf 50 µL wurden die Phagen bei -80 °C eingefroren.

ELISA Platte

1. Jeweils 2 Wells wurden mit 10 µg in insgesamt 50 µL beladen, sprich zweimal Reelin Aminosäure 24- 500 und zweimal Reelin Aminosäure 1949- 2662, und über Nacht bei 4 °C inkubiert.
2. Die Platten wurden ausgeschlagen und anschließend zweimal mit H₂O gewaschen.
3. Blockiert wurden die restlichen Bindungsstellen mit 2% Fischgelantine 150 µL/Well 1 h bei Raumtemperatur.
4. Die Platten wurden ausgeschlagen und erst mit H₂O, PBS und wieder mit H₂O gewaschen.

3. Selektion

1. 50 µL der hergestellten Phagen wurden mit 2% Fischgelantine ½ h bei Raumtemperatur inkubiert, um alle Antikörper die Fischgelatine binden abzufangen.
2. Die restliche Prozedur wurde äquivalent zu der 2. Selektion durchgeführt
3. Selbst in die 0,1 µL Verdünnung waren sowohl bei Reelin Aminosäure 24- 500 als auch bei Reelin Aminosäure 1949- 2662 so viele Kolonien über Nacht gewachsen, dass diese nicht mehr zählbar waren. Es wurde auch erwartet, dass es in diesem Schritt wieder mehr werden, da die Reelin bindende Klone angereichert wurden.
4. Kolonien wurden von der großen 150 mm YTAG Platten mittels 1 mL 2YT mit 15% Glycerol und einem Zellschaber vorsichtig abtragen.

Produktion löslicher Antikörper-Fragmente

Phagen aus 3. Selektion herstellen

Die Phagen wurden äquivalent zu den Phagen aus 2. Selektion hergestellt.

Reelin Aminosäure 24- 500 und Reelin Aminosäure 1949- 2662 Pellet wurde jeweils in 200 µL PBS mit 15% Glycerol aufgenommen.

Produktion der Fragmente

1. HB2151 Bakterien wurden bis zu einer OD = 0,4 wachsen gelassen.
2. Auf 200 µL Bakterienkultur wurden 10 µL Phagen aus 3. Selektion gegeben und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
3. Davon wurden 1:10², 1:10⁴, 1:10⁶, 1:10⁸ Verdünnungen in 2YT Medium gemacht und auf YTAG Platten ausgestrichen.
4. Einzelne Klone wurden in je 100 µL 2YTAG in eine 96- Well Platte gepickt und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Zum Einfrieren bei -80 °C wurde 15% Glycerol hinzugefügt.
5. Je 2 µL wurden aus der 96 -Well Platte wurden in 100 µL 2TY Medium mit 100 µg/mL Carbencillin, 50 µg/mL Kanamycin und 0,1% Glucose in eine neue 96- Well Platte überführt. Diese Platte wurde circa. 3½ h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert bis die OD circa bei 0,9 lag. Da dies nicht bestimmt werden konnte wurde der nächste Schritt bei wolkigem Aussehen eingeleitet.
6. Hinzugefügt wurden jeweils 25 µL 2TY mit 100 µg/mL Carbencillin und 9 mM IPTG, sodass die Endkonzentration 1 mM IPTG betrug. Über Nacht wurde das Ganze bei 30 °C inkubiert.

Monoklonaler ELISA für kamelide Antikörper

ELISA Platte

1. 1 Maxisorp Nunc Platte wurde mit Reelin Aminosäure 24- 500 und eine mit Reelin Aminosäure 1949- 2662 beladen. Dafür wurden jeweils 2 µg rekombinantes Reelin pro Well in insgesamt 50 µL PBS über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Die Platten wurden ausgeschlagen und zweimal mit H₂O gewaschen.

3. ELISA Platte und zusätzlich 2 weiteren Maxisorp Platten zur BSA Kontrolle wurden mit 100 μ L 5% BSA 2 h bei Raumtemperatur geblockt.
5. Die Platten wurden ausgeschlagen und erst mit H₂O, PBS und wieder mit H₂O gewaschen.

ELISA

1. Die über Nacht inkubierte 96 Well Platte wurde für 10 min bei 1800 x g zentrifugiert.
2. Je 50 μ L Überstand mit 3% BSA Endkonzentration wurde auf die Screening- und die BSA Platte geben. 1½ wurde inkubiert bei Raumtemperatur.
3. Gewaschen wurde dreimal 10 min mit PBST.
4. Ein α -Myc Antikörper in Form von einem Hybridoma Überstand des laboreigenen Klons 9E10 wurde 50 μ L pro Well aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Es wurde dreimal 10 min mit PBST gewaschen.
6. Ein α -Maus-POD Antikörper wurde 1:5000 in PBST verdünnt und jeweils 50 μ L pro Well aufgetragen.
7. Es wurde nochmal dreimal 10 min mit PBST gewaschen.
8. 50 μ L OPTIEA Substrat (1:1) wurden pro Well dazu gegeben und eine Blaufärbung abgewartet. Anschließend wurde die Reaktion mit 50 μ L pro Well 25%ige Schwefelsäure abgestoppt.

Produktion größerer Mengen an kameliden Antikörpern

24B10, 24C6, 1949E8, 1949B11

Kultur

1. Vorkultur: 1 μ L HB2151 Bakterien aus der 96 Well platte wurden zu 5 mL 2 YTAG Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert.
2. Jeweils 500 mL 2YTAG in 2 L Kolben wurden mit 5 mL Vorkultur versetzt und ca. 4 h bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD = 0,9 wachsen gelassen.
3. Die Kultur wurde mit 1 mM IPTG induziert und 3 h exprimiert.

4. Anschließend wurde die Kultur in Falcons umgefüllt und für 30 min bei 5000 rpm zentrifugiert.

Aufreinigung

1. Lyse: je 25 mL Lysepuffer (20 mM Tris pH 8; 5 mM EDTA; 1 mg/mL Lysozym; 1 mM PMSF; 1% Triton X-100; 20 mM MgCl₂; 5mM Imidazol; 500 mM NaCl +. 25 µL DNase) wurde auf die Pellets gegeben und 1 ½ h auf dem Drehrad inkubiert.
2. Es wurden 4 mal 1 mL Ni-NTA Säulen gemacht und mit 10 mL Equilibriumspuffer (20 mM Tris pH 8; 5 mM Imidazol; 500 mM NaCl; 1% Triton X-100) gespült.
3. Jeweils 1 Probe a´ ½ mL wurden für 15 min auf 80 °C erhitzt um das als mögliche Aufreinigungsart zu testen.
4. Für 40 min wurde bei 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand steril zentrifugiert und über die Säule gegeben.
5. Erst wurde mit 10 mL Waschpuffer 1 (20 mM Tris pH 8; 30 mM Imidazol; 500 mM NaCl; 1% Triton X-100) gewaschen anschließend mit 10 mL Waschpuffer 2 (20 mM Tris pH 8; 30 mM Imidazol; 1 M NaCl).
6. Die 1. Elution (20 mM Tris pH 8; 500 mM Imidazol; 300 mM NaCl) wurde ohne EDTA durchgeführt und ergab 8 Fraktionen a´1 mL.
7. Die 2. Elution (20 mM Tris pH 8; 500 mM Imidazol 300 mM NaCl; 100 mM EDTA) wurde mit EDTA durchgeführt, um wirklich alles an Protein von der Säule zu lösen. Es ergab 8 Fraktionen a´1 mL
8. Die Konzentrationen wurden im Anschluss mittels Nano drop bestimmt, und das richtige Protein mittels SDS identifiziert. Es folgte die Dialyse gegen PBS vor der Nutzung zu weiteren Analysen z.B. ELIFA.

2.2.9 Primäre Zellkultur

Projektnummer O22/03; ZETT

1. Das Muttertier wurde mit Isofluran betäubt und anschließend dekapitiert.
2. Zügig wurden per Kaiserschnitt die Embryonen im Uterus herausgeholt und in eine Petrischale auf Eis gelegt.
3. Uterus und Fruchtblase wurden eröffnet, die Embryonen dekapitiert und die Köpfe in eine 2 cm Schale mit DPBS gefüllt überführt.
4. Die Kopfhaut und der Schädelknochen wurden unter dem Binokular mit 2 Pinzetten abgezogen.
5. Das Gehirn wurde mit Löffel vorsichtig von der Schädelbasis gelöst und in eine neue 2 cm Schale mit DPBS gefüllt überführt.
6. Das Gehirn wurde mit der aufklappbaren Seite nach oben gelegt. Der Bulbus olfaktorius und der Hirnstamm wurden abgelöst. Die Hemisphären wurden voneinander getrennt.
7. Die Meningen wurden vorsichtig mit zwei Pinzetten abgezogen. Der Hippocampus wurde identifiziert als weißere halbmondförmige Struktur am inneren Rand der Hemisphärenmuschel und herauspräpariert.
8. Hippocampi und Kortices wurden jeweils in eine 2 cm Schale mit HBSS gefüllt überführt.
9. Nach der Präparation aller Gehirne, wurden alle Hippocampi und alle Kortices in 10 mL 0,05% igen warmen Trypsin aufgenommen.
10. Die Hippocampi wurden 15 min auf dem Schüttler, die Kortices 20 min auf dem Schüttler inkubiert.
11. Die Reaktion wurde mit 10 mL NB Medium abstoppt , sowohl zu den korticalen als auch zu den hippokampalen Neuronen 20 μ L DNase hinzugefügt und für 10 min auf dem Drehrad inkubiert.
12. Bei 800 x g wurde 5 min lang zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen.
13. Die Hippocampi wurden in 5 mL, die Kortices in 10 mL Neurobasalmedium resuspendiert.
14. Durch ein sterilisiertes Sieb wurden die Neurone in ein neues 15 mL Falcon filtriert und erneut bei 800 x g die hippokampalen, bei 1000 x g die korticale für 5 min zentrifugiert.

15. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 10 mL Neurobasalmedium resuspendiert.
16. Die Neurone wurden zur Zellzahlbestimmung 1:1 mit 20 μ L Trypanblau gemischt, sodass die toten Zellen blau angefärbt werden. In der Neubauer Zählkammer wurden anschließend die lebenden Zellen ausgezählt.
17. Jeweils 2 mio, 500.000, 200.000, 100.000 wurden 10.000 ausplattiert.
18. In den 24- Well Schalen wurden je 1 mL Neurobasalmedium hinzugefügt, in der 6-well Schalen 2 mL Neurobasalmedium und in den 6 cm Schalen 5 mL Neurobasalmedium.
19. Am darauffolgenden Tag wurde das Neurobasalmedium gewechselt, um die toten Zellen zu entfernen.
20. Die primären Neurone konnten bis 4 Wochen in Kultur gehalten werden. Jede Woche musste 500 μ L Neurobasalmedium hinzugefügt werden, da im Brutschrank bei 37 °C immer ein wenig Medium verdampft.

Neurobasalmedium:

500 mL NB (Neurobasalmedium Gibco 21103), 10 mL B27 supplement (GIBCO 17504-044), 5 mL Pen-Strep (Penicillin 10000 Units/mL, Streptomycin 10000 μ g/mL; GIBCO 15140-122), 5 mL GlutaMAX (100x GIBCO 35050)

2.2.10 Stripe Assay

Protokoll für Streifenassays

Testsubstanzen:

1. 20-fach Überstände von HEK Reelin und HEK GFP Zellen
2. rekombinantes Reelin:
 - a. Reelin Aminosäure 24- 500: 1,23 mg/mL
 - b. Reelin Aminosäure 1949- 2662: 0,23 mg/mL
3. Kamelide Antikörper
 - a. 1949D4 (C-terminal): 0,41 mg/mL
 - b. 1949E11 (C-terminal): 0,40 mg/mL
 - c. 24D6 (N-terminal): 0,76 mg/mL
 - d. 24H10 (N-terminal): 0,40 mg/mL
4. Maus Antikörper (N-terminal)
 - a. 11G11.C6 0,38 mg/mL
 - b. 20E12.E5 0,23 mg/mL
 - c. 12G2.C7 0,37 mg/mL

Tabelle 2.7: Testkombinationen Stripe

Assay

Reelin Überstand mit Mikrosphären (Streifen)	Reelin Überstand
	GFP Überstand
	Antikörper
	Rekombinantes Reelin
GFP Überstand mit Mikrosphären (Streifen)	GFP Überstand

	Reelin Überstand
Antikörper mit Mikrosphären (Streifen)	GFP Überstand
	Reelin Überstand
Rekombinantes Reelin mit Mikrosphären	GFP Überstand
	Reelin Überstand

Matrix Protokoll:

1. Poly-L-Ornithin (1 mg/mL in 150 mM Borat Puffer pH 8,5) wurde 1:50 verdünnt.
2. Glasplättchen mit 15 mm Durchmesser wurden mit 60 µL Poly-L-Ornithin (20 µg/mL) beschichtet für mindestens 1 h inkubiert. Anschließend wurden sie mit 60 µL DPBS gewaschen und trocken gelassen.
3. Die Matrix wurde verkehrt herum auf eine Petrischale gelegt und auf die Seite mit den Rillen die beschichtete Seite der Glasplättchen daraufgelegt.
4. Über den inlet channel wurde mit einer 50 µL Hamilton Spritze die Testsubstanz in diesem Fall Reelin oder Antikörper hineingespritzt, bis sich der outlet channel füllte. Dabei war es wichtig das zügig unter geringem Druck zu machen und zu überprüfen ob sich die Rillen alle auch tatsächlich füllten.
5. Die Lösung wurde für 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Ein Becherglas wurde zur Inkubation über die Matrix gestülpt um ein austrocknen zu verhindern. Weiterhin wurde das Becherglas mit Aluminiumfolie umwickelt und das Licht auf der Sterilbank ausgemacht, da die fluoreszierenden Mikrosphären lichtempfindlich sind.
6. Zum Waschen wurde die überschüssige Testsubstanz über inlet channel abgesaugt und 100 µL PBS mit einer 100 µL Hamilton Spritze hineingegeben. Das PBS wurde abgesaugt und der Schritt noch zweimal wiederholt.
7. Das Glasplättchen wurde vorsichtig von der Matrix abgenommen, durch kurzes Eintauchen in ein mit PBS gefülltes Tube spülen und mit der beschichteten Seite nach oben in eine 24 Well Platte gegeben.
8. 100 µL der Kontrollsubstanz, zum Beispiel GFP Überstand, wurde auf das Glasplättchen gegeben und erneut für 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Weiterhin war es wichtig die 24 Well Platte mit Aluminium Folie abzudunkeln und

das Licht in der Sterilbank auszumachen, damit die Mircospheren geschützt werden.

9. Die Glasplättchen wurden zweimal mit 200 μ L PBS gewaschen.
10. Bis zum Gebrauch konnten die vorbereiteten Stripes in Neurobasalmedium bei 37 °C 5% CO₂ gelagert werden. Die Spritzen und Matrix wurden mit H₂O gewaschen.
11. Primäre Neurone 50.000/ Well wurden auf die Glasplättchen in den 24- Well Platten gegeben. 24 h später wurden die Neurone auf den Plättchen fixiert.

Stripe Assay Färbungs-Protokoll

1. Fixierung: Neurobasal medium abnehmen und mit DPBS waschen. Anschließend jeweils 0,5 mL 4% PFA pH 7,4 dazu geben und bei Raumtemperatur für 30 min stehen lassen.
2. PFA abnehmen und mit DPBS waschen
3. Blocken: 0,5 mL 5% Milch, 1% BSA, 0,5% Saponine für mindestens ½ h
4. Blocking Reagenz abnehmen und jeweils 250 μ L 1:1000 α Neurofilament AK in 1% BSA und 0,5% Saponine dazu geben. Über Nacht bei 4 °C inkubieren lassen.
5. Dreimal wurde mit PBS, für jeweils 10 min inkubiert, gewaschen.
6. Der sekundäre Antikörper Alexa Fluor goat anti- Rabbit 594 wurde 1:500 in PBS je 200 μ L/Well hinzugefügt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.
7. Wieder wurde dreimal mit PBS, für jeweils 10 min inkubiert, gewaschen.
8. Die Glasplättchen wurden vorsichtig mit einer Kanüle aus der 24 Well Platte entfernt und mit der beschichteten Seite und einem Tropfen Fixierungsmittel auf einen Objektträger gelegt und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet und ausgewertet.

2.2.11 Phosphorylierungs Assays

Dab1 Phosphorylierungs Assay

1. Die primären Neurone zuerst 20min bei späteren Versuchen 24 h bei 37 °C mit z.B. 500 µL konzentriertem Reelin Überstand und gegebenenfalls anderen Testsubstanzen wie den Antikörpern inkubiert.
 - a. vom 22.12.11:
500 µL unterschiedlich konzentrierter HEK- Zell Überstand, 10-facher Überschuss Reelin Aminosäure 24- 500, 7 mL 20E12.E7 (0,26 µg/µL, 1,8 nM), 7 mL 17E7.G2 (0,64 µg/µL, 4,4 nM)
 - b. vom 10.09.12:
500 µL 20-fach konzentrierter HEK-Zell Überstand, 200 µL jeweils der Maus Antikörper (11G11.C6 (0,38 mg/mL), 20E12.E5 (0,23 mg/mL), 12G2.C7 (0,37 mg/mL)), 50 µL der Kamel Antikörper (1949D4 (0,41 mg/mL), 1949E11 (0,40 mg/mL), 24D6 (0,76 mg/mL), 24H10 (0,40 mg/mL)), 20 µg des rekombinanten Reelins (24- 500 oder 1949- 2662), jeweils 10 µg des rekombinanten Reelins (24- 500 und 1949- 2662) gemeinsam.
 - c. vom 04.02.13:
einfacher Reelin Überstand Endkonzentration in NB- Medium (100 fach konzentrierter Reelin Überstand), 71 µg 11G11.C6 (1,33 mg/mL), 71 µg 20E12.E5 (2,13 mg/mL)
2. Zum lysieren wurden 100 µL Zelllyse Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40) auf die 6-well Zellkulturplatten gegeben und der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden abgetragen.
3. 50 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM Phenylarsinoxid, 2 mM EDTA und Protease Inhibitor Tablette (Komplette Mischung) wurden hinzugefügt und für 10 min bei 4 °C inkubiert.
4. Anschließend wurde für 1 min zentrifugiert (bei 13400 rpm) und der Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß gegeben.
5. Die Proteinmenge der einzelnen Proben wurden mit der Methode nach Bradford bestimmt und gleichmäßige Menge mit SDS Ladepuffer aufgekocht und auf ein 4-12% Bis-Tris Gel geladen.
6. Anschließend wurde auf eine PVDF Membran transferiert und eine Western Blot Färbung mit Maus Anti Phospho-Dab1 (Tyr220) Antikörper (cell signaling) 1:1000

über Nacht bei 4 °C und anschließend mit Dab1 (H-103):sc-13981 (santa cruz) 1:1000 über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

7. Zur Ladekontrolle wurde Neuronal Class III β -Tubulin (TUJ) Antikörper, in der Verdünnung 1:1000 über Nacht inkubiert, genutzt

Cofilin Phosphorylierungsassay

1. Der Assay wurde äquivalent dem Dab Phosphorylierungsassay durchgeführt.
2. Der Western Blot wurde mit p-Cofilin 1 (hSer 3) -R:sc 12912-R (Santa cruz) 1:1000 über Nacht bei 4 °C und anschließend mit Cofilin (D59) Antikörper (cell signaling) 1:1000 über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

2.2.12 Liquor Proben

Die Liquorproben wurden von der Klinik für Neurologie von Prof. Dr. Mathias Bähr der Universitätsklinikum Göttingen zur Verfügung gestellt. Die Einverständniserklärung der Probanden sowie ein postiven Ethikvotum (Antragsnummer: 9/6/08) lagen vor.

Depression: A2404, A2437, A2459, A2460, A2334, A2496, A2118, A2404, A2168, A2173, A2095

Schizophrenie: A2556, A2452, A2272, A1930, A1620, A1583/11

Bipolare Störung: A2157, A2094, A1829, A1471

Neurodegenerative Erkrankungen:

Alzheimer: A2027, A2345, A1363

M. Parkinson: A345/11, A3872/10

Lewy-Körperchen Demenz: A559/11, A1767/11, A2132, A3988/10, 19,

Frontotemporale Demenz: 26, 118

Vaskuläre Demenz: 168, 168

Demenz: 104

Entzündliche ZNS Erkrankungen:

Multiple Sklerose: 137, 94, 38, 111

Retrobulbärneuritis: 29, 113

sonstige: 9, 95, 133 (Myelitis), 131 (virale Meningitis)

Gesunde Kontrollen: 123, 3063, 2703

Hämatonkologische Proben: 178 (CLL), 177 (cALL), 174 (ALL)

Sonstige: 154 (Schmerzsyndrom), 57 (NPH), 152 (Pseudotumor cerebri)

Western Blot Analyse:

Zum einen wurde ein 4-12% Midi Bis-Tris Gel mit jeweils 30 µL Liquorprobe und 10 µL vierfach SDS Ladepuffer laufen gelassen und anschließend geblottet. Zum anderen wurden die Proteinmengen der einzelnen Liquorproben mit der Methode nach Bradford bestimmt, jeweils 6,68 µg mit SDS Ladepuffer aufgeköcht und auf ein 4- 12% Bis-Tris Gel geladen. Diese wurde bei 180 V für circa 45 min laufen gelassen und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Western Blot Färbung wurde mit den Hybridoma Überständen in unterschiedlicher Verdünnung über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Im Fall von PFHN Überständen wurde eine Verdünnung von 1:1000 genutzt.

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 2.3 für Mac. Ergebnisse mit $p < 0.05$ wurden als signifikant erachtet.

2.2.13 Lymphozyten

Es wurde eine Western Bot Analyse der Lymphoblastenlysate durchgeführt.

Dazu wurden zuerst die jeweilige Proteinmenge der einzelnen Lysate mit der Methode nach Bradford bestimmt, gleichmäßige Menge mit SDS Ladepuffer aufgeköcht und auf ein 4-12% Bis-Tris Gel geladen. Als primäre Antikörper wurden der 12G2.C7, 20E12.E5 und 11G11.C6, in Verdünnung von 1:25 bis unverdünnt über Nacht bei 4 °C inkubiert, genutzt. Anti-Maus POD wurde als sekundärer Antikörper 1:50.000 in PBS, 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Ladekontrolle wurde ein GAPDH Antikörper, 1:1000 verdünnt 1 h über Nacht inkubiert, genutzt.

2.2.14 Minireelin

Um ein eventuell biologisch aktives Miniatur Protein aus Reelin zu klonieren, versuchten wir das N-terminale Aminosäure 24- 500 und das C-terminale Aminosäure 1949- 2662 Fragment aneinander zu klonieren. Um ein eventuell benötigtes Erweitern durch weitere Fragmente zu ermöglichen wurden mit Hilfe des Primers weitere Schnittstellen eingefügt. Dazu klonierte ich das Aminosäure 1949- 2662 Fragment in das bereits bestehende, Pet22b+ mit beinhaltendem 24- 500 Fragment, Konstrukt. Dazu waren ein paar Änderungen zum generellen Vorgehen wie bei der vorherigen Klonierung nötig.

PCR:

Die optimale Annealing Temperatur für die genutzten Primer lag bei 55 °C und 60 °C. Die Elongationszeit wurde auf 1 min geändert, da 15 sec pro 1 kb empfohlen wurden.

Restriktionsverdau:

Die Restriktion erfolgte mit EagI bei 37 °C für 1 h.

Ligation:

Vektor: 6,99 kb, 4 ng/μL benutzte Menge 28 ng

Insert: 2,1 kb 8 ng/μL

Verhältnis Vektor zu Insert 1:1,3:1,1:3

Testverdau nach Ligation:

Wurde mit 1 μL SaC 1 37 °C für 1 h durchgeführt. So konnte überprüft werden ob das Insert auch richtig herum rein ligiert wurde, da nur über eine Schnittstelle ligiert wurde. Wenn das Insert die Richtige Richtung aufwies wurde ein Restriktionsfragment von 1,2 kb erwartet, bei falscher Richtung ein Fragment von 3 kb.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung und Expression von Reelin Fragmenten

Da Reelin als extrazelluläres Matrixprotein eine Größe von circa 400 kD hat und dies nicht durch eine Bakterienkultur exprimiert und in großen Mengen aufgereinigt werden kann, entschlossen wir uns den n-terminalen Teil der bekannter Weise immunogen wirkt und einen c-terminal gelegenen Teil, der für die Bindung an die Rezeptoren zuständig ist separat voneinander zu klonieren. Als Vektor wurde der pet22b(+) verwendet.

Für die Klonierung von Aminosäure 24- 500, sowie von Aminosäure 198- 428 wurden die Schnittstellen BamH 1 und Not 1 ausgewählt. Da eine Stelle in der DNA-Sequenz der Aminosäure 1949- 2662 der Bam Schnittstelle entsprach wählten wir dort Sal 1. Nach dem Primerdesign wurde die PCR mit unterschiedlich gewonnen Templates durchgeführt. Zum einem wurde die extrahierte genomische DNA verwendet. Nach Aufreinigung der RNA und m-RNA mittels Quiagen Kit und der RNA-Aufreinigung mittels Trizol, wurde mittels Reverse Transkriptase die c-DNA hergestellt und ebenfalls als PCR Template genutzt.

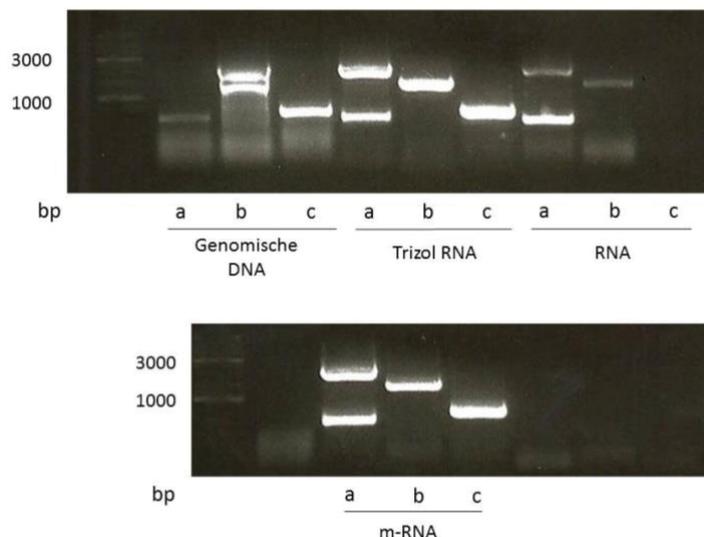


Abb. 3.1: Gelelektrophorese der PCR zur Klonierung der Reelin Fragmente

a- Reelin Fragment 1949- 2662, **b-** Reelin Fragment 24- 500, **c-** Reelin Fragment 198- 428. Als Template wurden zum einen präparierte genomische DNA und c- DNA aus unterschiedlichen RNAs genutzt. Die RNA wurde mittels Trizol aufgereinigt, mittels Invisorb Kit aufgereinigt und die m-RNA ebenfalls mittels Invisorb Kit aufgereinigt. Die Banden waren bei m-RNA und Trizol RNA am gleichmäßigsten ausgeprägt.

Die Banden waren sowohl bei dem Template aus Trizol aufgereinigter RNA und bei dem Template aus m-RNA am deutlichsten (siehe Abb. 3.1), sodass diese zur weiteren Benutzung aus dem Gel aufgereinigt worden sind. Nach der Restriktion wurden die

jeweiligen Fragmente in den Pit22b Vektor ligiert. Zur Überprüfung ob Religationen stattgefunden haben und zur Identifizierung eines passenden Klons für die Expression des Proteins wurde zunächst ein Testverdau mit BamH1 bzw. SAL 1 und Not 1 durchgeführt.

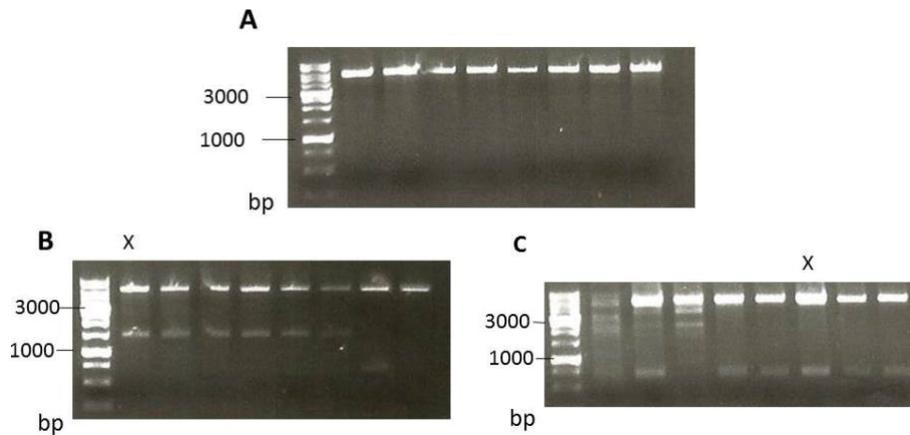


Abb. 3.2: Identifizierung von Klonen mit einem Insert der richtigen Größe nach Ligation
A Reelin 1949- 2662 , B Reelin 24- 500, C Reelin 198-4 28
 Die ausgewählten Klone wurden mit X markiert. Für Reelin Aminosäure 1949- 2662 fand sich kein Klon mit einem Insert der richtigen Größe.

Sowohl für das Reelin Fragment AS 24- 500 als auch AS 198- 428 fanden sich 6 positive Klone mit einem Insert der richtigen Größe. Bei dem Fragment AS 24- 00 zeigte sich auch ein Klon mit einem zu kleinen Insert. Bei dem Reelin Fragment Aminosäure 1949- 2662 fand sich kein Klon mit einer erfolgten Insertliagation. Dies lies auf eine erhöhte Religationsrate bei Reelin 1949- 2662 schließen. Weitere Klone wurden untersucht.

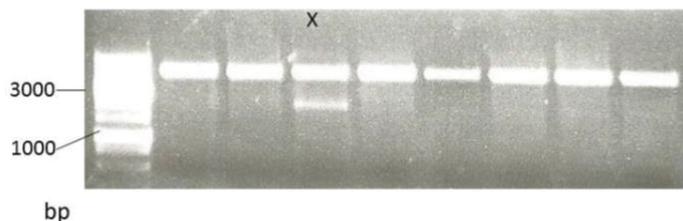


Abb. 3.3: Restriktionsverdau erneuter Klone des Reelin Fragments 1949- 2662 zur Identifizierung derer mit einem Insert der richtigen Größe
 Ausgewählte Klone sind mit X markiert. Nur 1 Klon der 8 enthielt ein Insert.

Hierbei fand sich 1 Klon, der positiv auf das gewünschte Insert war (Abb. 3.3). Zur Überprüfung nach möglichen Sequenzfehlern die bei einer PCR entstehen könnten, wurden Proben der gewählten Klone zur Sequenzierung geschickt. Der gewählte Klon mit dem Konstrukt Aminosäure 1949– 2662 war in der Sequenzierung Mischklon, sodass die Bakterien erneut auf eine Carbencillin Platte ausgestrichen wurde.

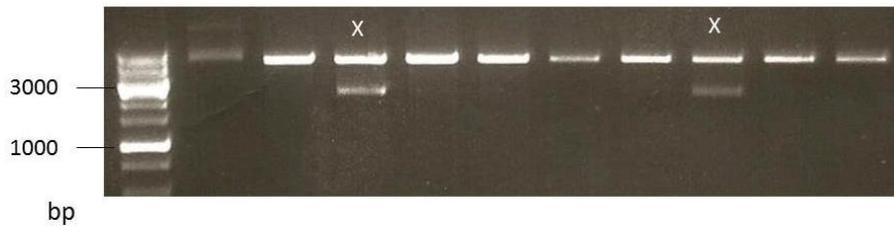


Abb. 3.4: Erneuter Restriktionsverdau nach Subklonierung des Mischklons Reelin Fragment 1949-2662
Klone mit Inserts der richtigen Größe sind mit X gekennzeichnet.

Der erneute Testverdau zeigte zwei positive Klone, von denen einer auch in der Sequenzierung dem Reelin Fragment Aminosäure 1949- 2662 entsprach (Abb 3.4).

Die Expression der Proteine erfolgte über eine Bakterienkultur im Fermenter. Nach einer Induktion mit IPTG nach Erreichen einer OD von mindestens 0,8 wurde für 3 h bei 30 °C exprimiert. Anschließend wurde das lösliche Protein aufgereinigt über eine Nickel-NTA Säule. Die nicht löslichen Proteine im Pellet wurden in einem zweiten Schritt mit Hilfe von Urea und β -Mercaptoethanol ebenfalls über eine Nickel-NTA Säule aufgereinigt. Da die Ausbeute der vollen Länge des Proteins Aminosäure 1949- 2662 nur sehr gering war, mussten die Expressionsbedingungen angepasst werden, sodass wir zuerst die Expressionszeit auf 5 h verlängerten.

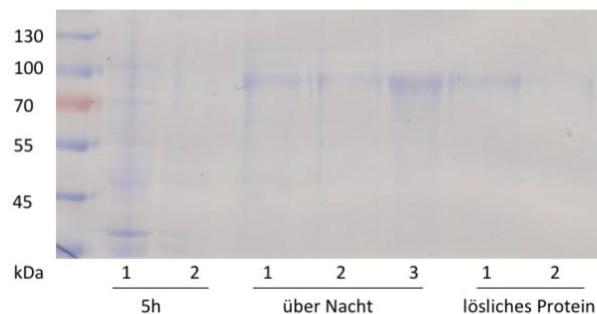


Abb. 3.5: Verbesserung Expressionsdauer und Aufreinigungsmethode für das Reelin Fragment Aminosäure 1949- 2662, SDS- PAGE mit Coomassie Färbung

5 h- Expression bei 30 °C für 5 h anschließend Urea Aufreinigung, über Nacht- Expression über Nacht bei Raumtemperatur anschließend Urea Aufreinigung, lösliches Protein- Expression über Nacht bei Raumtemperatur anschließende Aufreinigung ohne Urea. 1-3: jeweilige aufeinanderfolgende Eluate (jeweiliges Volumen 1ml) einer 2ml NiNTA Säule nummeriert. Bande bei circa 80 kDa bei einer Expression von 5 h kaum sichtbar. Über Nacht Expression bringt eine deutliche Anreicherung des gewünschten Fragments. Am meisten ist dabei im Eluat 3 der mit Urea aufgereinigten Proben.

Da ebenfalls ein kleineres Fragment mit aufgereinigt wurde, lag die Vermutung nahe, dass Proteinasen das Protein bereits während der Expression spaltet. Da Proteinasen bei niedrigerer Temperatur eine verminderte Aktivität aufweisen, entschlossen wir uns die Expression über Nacht bei Raumtemperatur durchzuführen.

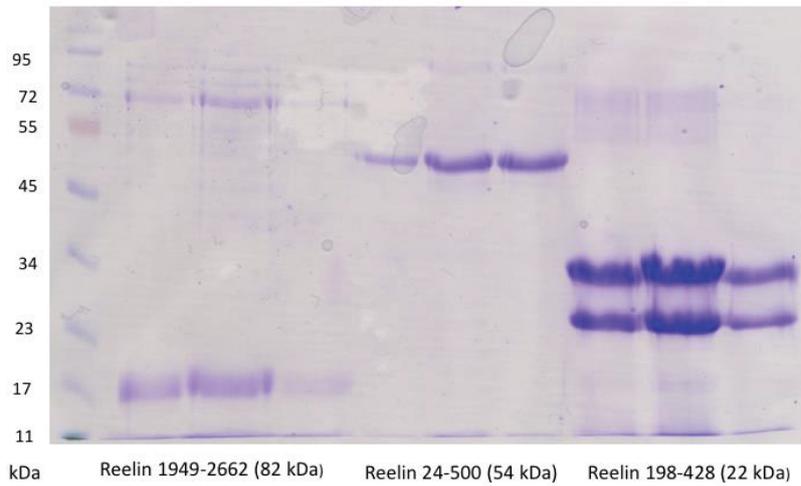


Abb. 3.6: SDS PAGE und Coomassie Färbung des genutzten Proteins für die Immunisierung der Mäuse und des Lamas

Reelin Fragmente Aminosäure 1949- 2662, 24- 500 und 198- 428. Sowohl Fragment 1949- 2662 als auch 198- 428 haben zusätzlich zu der vollen Größe des erwartenden Proteins eine weitere kleinere Bande.

Hier zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Ausbeute des Proteins der vollen Länge (Abb 3.5). Jedoch war weiterhin eine zweite 17 kDa Bande sichtbar (Abb. 3.6).

3.2. Murine Antikörper N-terminal

Nach der Immunisierung von Reeler Mäusen, wurden deren B-Lymphozyten aus der Milz gewonnen und mit P3U Myelomzellen fusioniert um immortalisierte antikörperbildende Zellen zu erhalten. und auf 96- Well Platten inkubiert. Insgesamt wurden mehrere Antikörperproduzierende Klone identifiziert und anschließend einem Screeningverfahren zugeführt.

3.2.1. Screening

Die Klone wurden mittels ELISA initial gescreent. Dort ergaben sich 21 auf das rekombinante Reelin 24- 500 positive Klone. Diese wurden in einem zweiten Schritt im ELIFA untersucht. Hierzu wurden FCS- freie Überstände der Hek Reelin oder GFP Zellen genutzt.

Klon	Reaktivität im ELIFA gegen Überstand von Reelin positiven ZellenRLN	Reaktivität im ELIFA gegen lysierte Reelin exprimierende Zellen
11G11	++	+++
20E12	++	+++
12G2	++	Schwach positiv jedoch auch für GFP Lysat
5B5	++	Schwach positiv jedoch auch für GFP Lysat
16A11	++	Schwach positiv jedoch auch für GFP Lysat
8E11	++	Schwach positiv jedoch auch für GFP Lysat
6F11	++	Schwach positiv jedoch auch für GFP Lysat
3G5	++	negativ
13H10	++	Positiv jedoch auch für GFP Lysat
3H9	++	Schwach positiv jedoch auch für GFP Lysat
10B7	++	negativ
5F5	++	Positiv jedoch auch für GFP Lysat
9D8	++	Schwach positiv jedoch auch für GFP Lysat
8B9	Negativ	Negativ
20D3	Negativ	Negativ
9C6	Negativ	Schwach positiv jedoch auch für GFP Lysat

14B9	Negativ	Schwach positiv jedoch auch für GFP Lysat
14B6	Negativ	Schwach positiv jedoch auch für GFP Lysat
7H7	Negativ	Schwach positiv jedoch auch für GFP Lysat
8G11	Negativ	Schwach positiv jedoch auch für GFP Lysat
11D6	Negativ	Positiv jedoch auch für GFP Lysat

Tabelle 3.1: Übersicht über die N-terminalen Antikörper gegen Reelin 24- 500

Bei der Untersuchung konnten drei Gruppen unterschieden werden (siehe Tbl. 3.1). Einige der Antikörper waren sowohl für das Lysat als auch den Überstand positiv, andere nur für den Überstand positiv und die letzte Gruppe war sowohl für das Lysat als auch den Überstand negativ.

3.2.2 Mutagenese

Um mögliche Bindungsstellen der einzelnen Antikörper näher eingrenzen zu können, entschlossen wir uns mittels Mutagenese PCR das Reelin Aminosäure 24- 500 Fragment weiter zu unterteilen. So wurde jeweils nach Aminosäure 100, 200, 300 und 400 ein Stoppsignal eingefügt. Nach Ligation und Transformation in kompetente DH5 alpha Bakterien wurden einzelne Kolonien von den Carbencilin Platten gepickt und eine kleinere Expression gestartet. Dabei wurden jeweils Proben vor Induzierung und 1h, 2h danach und eine über Nacht genommen und mittels SDS PAGE untersucht.

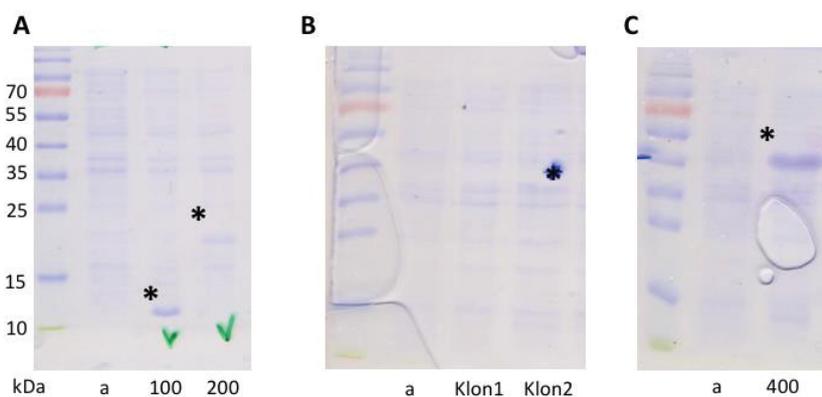


Abb. 3.7: SDS PAGE und Coomassie Färbung der unterschiedlichen Mutagenese Produkte
A- Fragment Aminosäure 24-100 und 24-200 , B- Fragment Aminosäure 24-300 , C- Aminosäure 24-400 Stop, a- Probe vor IPTG Induzierung, induzierte Banden der richtigen Höhe wurden mit * markiert. Das Fragment Aminosäure 24-100 ist ca. 11 kDa groß, 24- 200 ca. 2 kDa, 24-300 ca. 30 kDa und 24-400 ca. 40 kDa groß.

Dort sah man, dass nach Induktion der Produktion mit IPTG eine Bande erschien, für das Fragment bis AS 100 bei circa 11 kDa, für das Fragment bis AS 200 bei circa 20 kDa, für das Fragment bis AS 300 circa 30 kDa und für das Fragment bis AS 400 circa 40 kDa (Abb. 3.7). Somit konnten diese Proben für das Epitopmapping der N-terminalen Antikörper genutzt werden.

3.2.3 Charakterisierung der Antikörper

Zur Charakterisierung führte ich Western-Blot Untersuchungen der bisher positiv getesteten Antikörper durch. Hierzu nutze ich die in der Mutagenese hergestellten Fragmente des Proteins Aminosäure 24- 500, sowie in der Zellkultur gewonnene Überstände von Hek- Reelin und GFP Zellen und deren Lysate.

3.2.3.1 Im Western- Blot für Überstand und Lysat positive Antikörper

3.2.3.1.1 Subklonierung

Die am meisten erfolgversprechenden Klone, die im ELIFA positiv gegenüber Reelin Lysat und Überstand gewesen sind, 11G11 und 20E12 wurden subkloniert. Dies erfolgte um einen möglichst spezifischen antikörperbildenden Klon zu gewinnen. Hierzu wurden

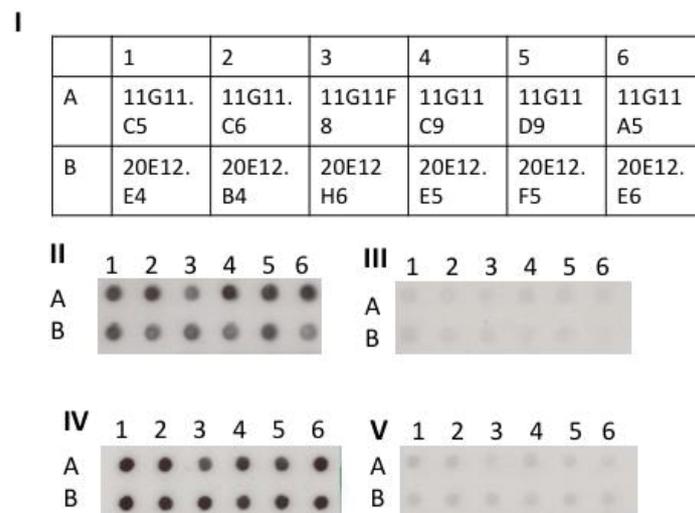


Abb. 3.8: ELIFA Testung der Subklone von 11G11 und 20E12
I Auftragemuster, II Hek Reelin Zellüberstand, III Hek GFP Zellüberstand, IV Hek Reelin Zellysat, V Hek GFP Zellysat. Alle Subklone binden selektiv Reelin sowohl im Lysat als auch im Zellüberstand. Jedoch sind im Überstand unterschiedliche Stärke der Bindung sichtbar. Daher wurden 11G11.C6 und 20E12.E5 ausgewählt für weitere Untersuchungen.

die Zellen der jeweiligen Klone in einer Verdünnungsreihe vereinzelt und in 96 Well Platten inkubiert. Anschließend wurde eine erneute Testung mittels ELISA und ELIFA durchgeführt.

Hier zeigte sich, dass alle zuvor im ELISA getesteten Subklone sowohl Reelin im Zelllysate als auch im Überstand spezifisch erkannten (Abb. 3.8). Jedoch zeigte sich eine unterschiedlich starke Affinität bei der Erkennung von Reelin Zellüberstand. Es wurde jeweils für 11G11 und 20E12 der Klon identifiziert der sowohl im ELIFA als auch im ELISA die stärkste Reaktion zeigte. Dies waren 11G11.C6 und 20E12.E5.

3.2.3.1.2 Antikörper 11G11.C6

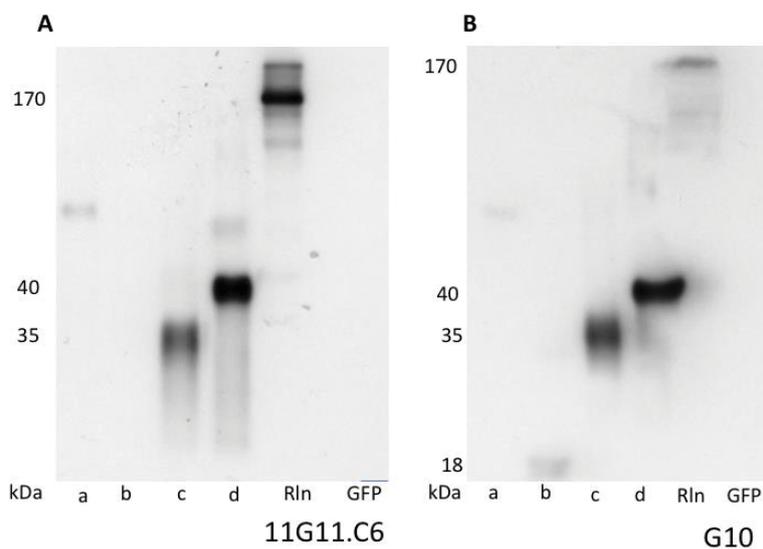


Abb.3.9: Western-Blot zum Epitopmapping von 11G11.C6 (A) im Vergleich zum erworbenen Reelin Antikörper G10 (B)

a-d: rekombinante Reelin Fragmente von a- Aminosäure 24-100 , b- Aminosäure 100-200, c- Aminosäure 200-300, d- Aminosäure 300-400, Rln- Überstand von Hek Reelin Zellen, GFP- Überstand von HEK GFP Zellen. Western Blot staining mit Überstand des Hybridomen Klons 11G11.C66 und G10. Der Antikörper bindet an das rekombinante Reelin Fragment 24-300 jedoch nicht an das 24-200, sodass die Bindungsstelle zwischen Aminosäure 200 und 300 liegen muss, im Gegensatz zu G10 der bereits zwischen Aminosäure 100 und 200 bindet. Im Vergleich zu G10 ebenfalls erkennen des volle Länge Reelins durch 11G11.C6, sogar deutlichere definierte Bande sichtbar. 11G11.C6 ist als gleichwertiger Antikörper zu sehen.

In der Western-Blot Untersuchung zur Bestimmung des Epitops, zeigte sich das 11G11.C6 an das Aminosäure 200-300 bindet, jedoch keine Bande auf der Höhe des Fragments 100-200 sichtbar ist. Somit ist das Epitop zwischen Aminosäure 200 und 300 (Abb. 3.9). Zudem zeigte sich das der Antikörper 11G11.C6 das Reelin im Überstand der HEK- Reelin Zellen genauso wie der G10 Antikörper erkennt. Die Reelin Bande ist bei dem 11G11.C6 sogar definierter, sodass von einem besseren Bindungsverhalten auszugehen ist.

Isotyp des Antikörpers

Bei dem Antikörper 11.G11.C6 handelte es sich um den Isotyp IgG1

3.2.3.1.3 Antikörper 20E12.E5

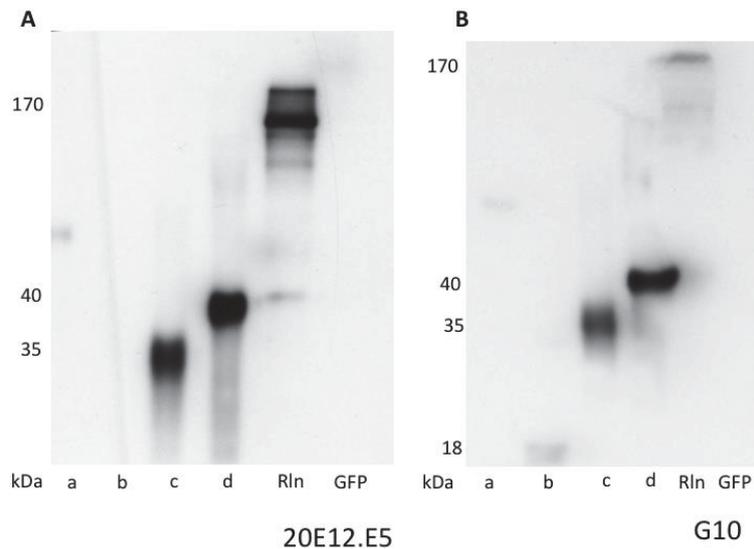


Abb. 3.10: Western-Blot zum Epitopmapping von 20E12.E5 (A) im Vergleich zum erworbenen Reelin Antikörper G10 (B)

a-d: rekombinante Reelin Fragmente von a- Aminosäure 24-100, b- Aminosäure 100-200, c- Aminosäure 200-300, d- Aminosäure 300-400, Rln- Überstand von HEK Reelin Zellen, GFP-Überstand von HEK GFP Zellen. Western Blot staining mit Überstand des Hybridomen Klons 20E12.E5 und G10. Der Antikörper bindet an das rekombinante Reelin Fragment 24-300 jedoch nicht an das 24-200, sodass die Bindungsstelle zwischen Aminosäure 200 und 300 liegen muss, im Gegensatz zu G10 der bereits zwischen Aminosäure 100 und 200 bindet. Im Vergleich zu G10 ebenfalls erkennen des volle Länge Reelins durch 20E12.E5, sogar deutlichere definierte Bande sichtbar. 20E12.E5 ist als gleichwertiger Antikörper zu sehen.

In der Western-Blot Untersuchung zur Bestimmung des Epitops, zeigte sich das 20E12.E5 an das Aminosäure 200- 300 bindet, jedoch keine Bande auf der Höhe des Fragments 100- 200 sichtbar ist. Somit ist das Epitop zwischen Aminosäure 200 und 300 (Abb. 3.10). Zudem zeigte sich das der Antikörper 20E12.E5 das Reelin im Überstand der HEK- Reelin Zellen genauso wie der G10 Antikörper erkennt. Die Reelin Bande ist bei dem 20E12.E5 sogar definierter und stärker ausgeprägt, sodass von einem besseren Bindungsverhalten auszugehen ist.

Isotyp des Antikörpers

Bei dem Antikörper 20 E12.E5 handelt es sich um den Isotyp IgG1

3.2.4 Im Western-Blot nur für den Überstand positive Antikörper

In der Gruppe der für Reelin Überstand aber nicht für das Reelin Lysat positiv getesteten Antikörper, zeigte sich das alle Antikörper ihr Epitop zwischen AS 100 und 200 haben. Im Unterschied dazu zeigten die Antikörper, die sowohl Reelin im Überstand als auch im Lysat erkannten ein Epitop zwischen AS 200 und 300. Somit führt das früher gelegene Epitop dazu, dass Reelin nicht mehr im Lysat erkannt wird.

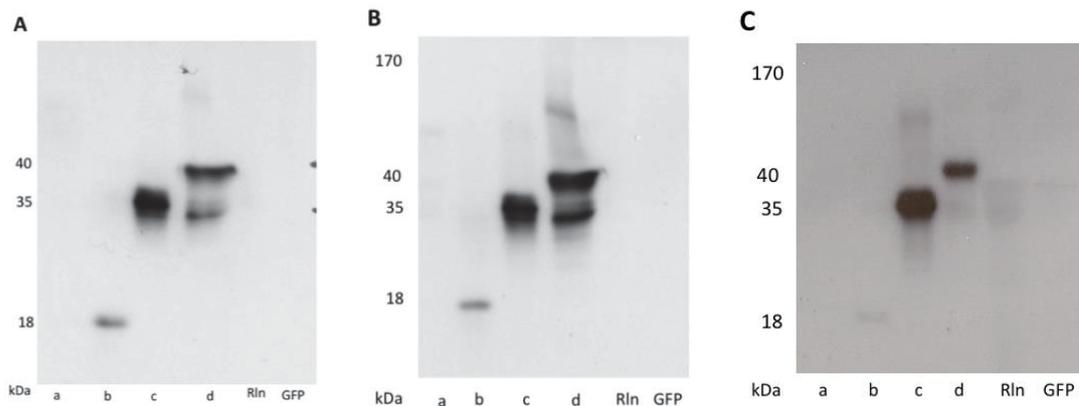


Abb. 3.11: Epitopmapping der nur Reelin Überstand positiven Antikörper

A Antikörper 8E11, **B** Antikörper 6F11, **C** Antikörper 5B5, a-d: rekombinante Reelin Fragmente von a- Aminosäure 24- 100 , b- Aminosäure 24 200, c- Aminosäure 24- 300, d- Aminosäure 24- 400, Rln- Lysat von Hek Reelin Zellen, GFP- Lysat von HEK GFP Zellen. Das Epitop liegt bei den nur für den Überstand positiven Antikörper zwischen Aminosäure 100 und 200 da das bis zu Aminosäure 100 reichende Fragment nicht gebunden wird, das bis 200 schon.

Im Western ist sichtbar, dass das Fragment bis Aminosäure 100 nicht gebunden wird. Das Fragment bis Aminosäure 200 hingegen wird gebunden. Die jeweiligen Antikörper binden nicht an das Reelin aus dem Zelllysate (Abb 3.11). Um zu zeigen, dass auch im Western-Blot Reelin im Überstand erkannt wurde, nutzte ich exemplarisch 12G2 (Abb. 3.12). Exemplarisch für diese Gruppe wurde 12G2 subkloniert um sicherzugehen, dass das Bindungsverhalten nicht auf einen Mischklon zurückzuführen ist.

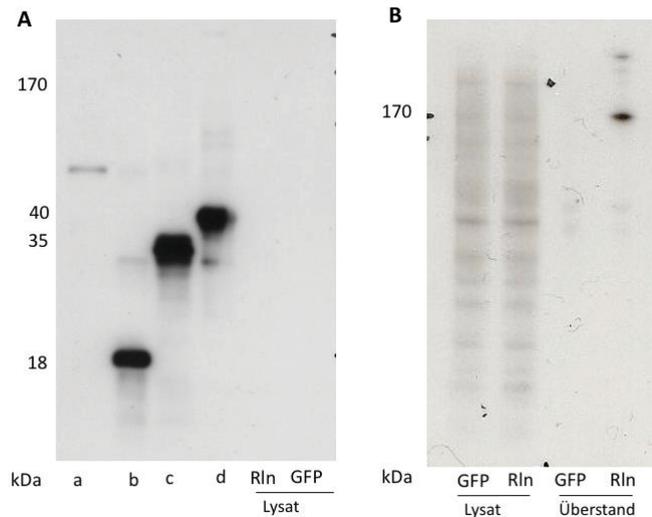


Abb. 3.12: Charakterisierung Antikörper 12G2, nur im Überstand Reelin positiv
A Epitopmapping, B Zelllysate versus Zellüberstände. a-d: rekombinante Reelin Fragmente von a- Aminosäure 24- 100, b- Aminosäure 24- 200, c- Aminosäure 24- 300, d- Aminosäure 24- 400, Rln-Reelin. Das Epitop von 12G2 ist zwischen Aminosäure 100 und 200. 12G2 erkennt Reelin im Überstand jedoch nicht im Lysat

Im ELIFA zeigten sich zuvor im ELISA positiven Klone das gleiche Bindungsverhalten wie der 12G2 Klon. Reelin wurde im Überstand erkannt, jedoch nicht im Lysat

(Abb. 3.13). Der als positiv Kontrolle aufgetragene 11G11.C6 jedoch erkannte Reelin sowohl im Lysat also auch im Überstand. Somit kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund des früher gelegenen Epitop das Erkennen von Reelin im Lysat nicht möglich ist.

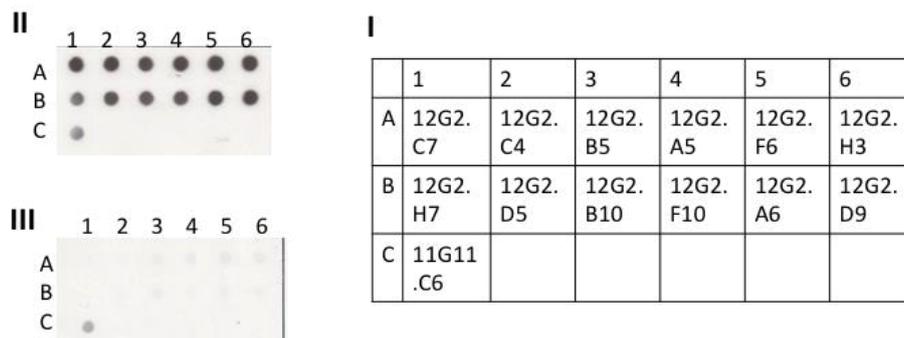


Abb. 3.13: ELIFA Testung der Subklonierung Antikörperklon 12G2
I Auftragungsmuster, II Reelin Überstand, III Zelllysate von Reelin positiven Zellen, positiv Kontrolle 11G11.C6. Alle Klone wie schon zuvor binden Reelin nur im Überstand und nicht im Lysat.

3.2.5 Im Western-Blot negative Antikörper

Bei der Epitopcharakterisierung der im ELISA negativen Klone, zeigte sich eine sehr inhomogene Gruppe. Einige zeigten ein Epitop im Bereich von AS 100- 200 ähnlich wie die nur für den Reelin Überstand positiven Klone (Abb. 3.14)

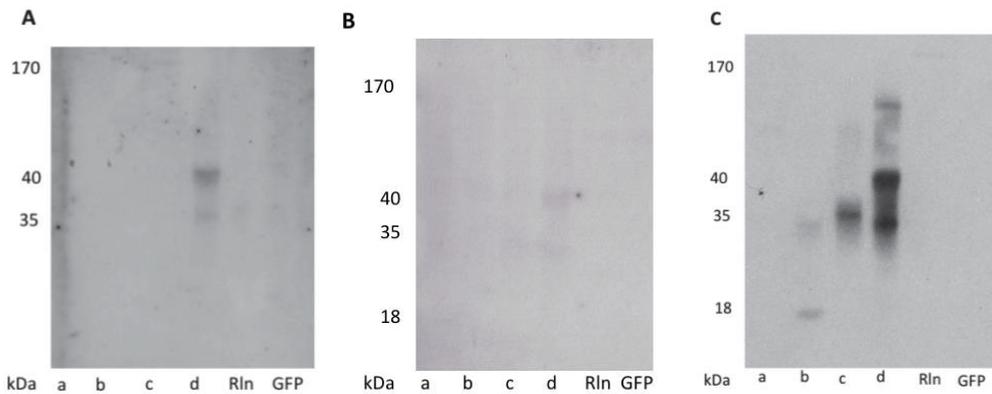


Abb. 3.14: Charakterisierung der im ELISA sowohl für den Reelin Überstand als auch für das Zelllysate negativ getesteten Antikörper

A Antikörper 8B9, B Antikörper 11D6, C Antikörper 9C6, a-d: rekombinante Reelin Fragmente von a- Aminosäure 24-100 , b- Aminosäure 24-200, c- Aminosäure 24-300, d- Aminosäure 24-400, Rln-Überstand von Hek Reelin Zellen, GFP- Überstand von HEK GFP Zellen. 8B9 und 11D6 binden zwischen Aminosäure 300 und 400. 9C6 bindet an das Epitop zwischen Aminosäure 100- 200.

Andere wiederum banden erst zwischen Aminosäure 300- 400. Alle Klone die ihr Epitop zwischen AS 300- 400 hatten konnten das volle Länge Reelin nicht binden.

3.3. Maus Antikörper C-terminal

Um die C-terminalen Antikörper die gegen Reelin 1949- 2662 gerichtet waren zu selektionieren wurde eine weitere Fusion von B-Lymphozyten und PU3 Zellen durchgeführt.

AK	ELISA	ELIFA									
		HEK Reelin Lysat	HEK GFP Lysat	HEK Reelin Überstand	HEK GFP Überstand	Hirn-homogenat Mo 29	Hirn-homogenat Reeler (Mo77)	Homogenat E18 + 1% TX100	Homogenat Reeler + 1% TX100	Homo-genat E18 + 8M Urea	Homo-genat Reeler + 8M Urea
17D7	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	pos.	schwach pos.	neg.	neg.				
16G3	pos./ BSA neg.	schwach pos.	schwach pos.	neg.	neg.	pos.	schwach pos.	neg.	neg.	neg.	neg.
16D3	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	schwach pos.				
8D4	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	pos.	schwach pos.	neg.	neg.	neg.	neg.
20C11	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	neg.	neg.
6D11	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
18B10	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	schwach pos.
16B7	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.			schwach pos.	pos.	pos.	pos.
9C7	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	neg.	schwach pos.	pos.	pos.	schwach pos.	schwach pos.	neg.	neg.
15E5	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	stark pos.	stark pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
11G12	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.		
12G9	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	schwach pos.	neg.
12B1	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	schwach pos.	schwach pos.	pos.	schwach pos.
1D9	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2G1	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	pos.	schwach pos.
1E1	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	neg.	neg.
2H3	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	stark pos.	pos.	stark pos.	pos.	pos.	neg.
4F12	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
17E7	pos./ BSA neg.	pos.	schwach pos.	pos.	schwach pos.	schwach pos.	neg.	schwach pos.	neg.	schwach pos.	neg.
19H9	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	schwach pos.	pos.	schwach pos.	neg.
7A11	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	neg.
7D10	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	stark pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.
8E8	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	stark pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	schwach pos.
6G3	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
20H9	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
16D10	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	neg.	neg.	schwach pos.	neg.
4G9	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	schwach pos.	neg.	neg.	neg.	schwach pos.	neg.
4H12	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	stark pos.	stark pos.	pos.	pos.	pos.	schwach pos.
10G9	pos./	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

	BSA neg.										
15C11	pos./ BSA neg.	schwach pos.	neg.	pos.	pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	neg.
14B12	pos./ BSA neg.	schwach pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	neg.
14F1	pos./ BSA neg.	pos.	schwach pos.								
2D5	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	stark pos.	stark pos.	pos.	pos.
6B8	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
19A11	pos./ BSA neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.				
17D4	pos./ BSA neg.	pos.	schwach pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
9C10	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	schwach pos.	schwach pos.			neg.	neg.	neg.	neg.
11B12	pos./ BSA neg.	schwach pos.	schwach pos.	pos.	pos.	schwach pos.	schwach pos.	neg.	neg.	schwach pos.	schwach pos.
11G2	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2E2	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
13C9	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
13F11	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	neg.
4G8	pos./ BSA neg.	pos.	schwach pos.	pos.	pos.	pos.	pos.				
15F4	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.
3B4	pos./ BSA neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
8C9	pos./ BSA neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
8G9	pos./ BSA neg.	pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	schwach pos.	neg.	neg.	neg.

Tabelle 3.2 : Übersicht c-terminaler Antikörper

ELISA: Ergebniss der ELISA Untersuchung mit Frage nach Bindung des rekombinanten Reelin 1949-2662. ELIFA: Testung der Antikörper auf Bindungsverhalten in HEK Zell Reelin Überständen, in Gehirnhomogenaten von einer Wildtyp Maus (Mo29) und E18 Maus im Vergleich zu Reeler Gehirnhomogenaten, mit und ohne Detergenzien

Im Anschluss erfolgte die Selektionierung der einzelnen Klonen äquivalent zu denen gegen den N-Terminus gerichteten Antikörper. Im ELISA konnten knapp 50 positive Klone identifiziert werden. Im ELIFA mit Reelin Überstand im Vergleich zum GFP Überstand zeigten viele Antikörper ein positives Bindungsverhalten im GFP Überstand. Zur weiteren Charakterisierung führten wir daher im Anschluss weitere ELIFA mit unterschiedlichen Hirnhomogenaten durch. Bei nur schwachem Signal der Positivkontrolle (G10-anti Reelin Antikörper) tauschten wir das Wildtyp Gehirnhomogenat gegen E18 Gehirnhomogenat bei vorbeschriebener erhöhter Reelin Konzentration im embryonalem Gehirngewebe. Zudem wurden unterschiedliche Detergenzien hinzugefügt um eventuelle Fehlerquellen im Sinne von Unzugänglichkeit zum Epitop durch komplexe Faltung zu vermeiden. In Zusammenschau der Ergebnisse erschien vor allem 17E7 ein guter Kandidat für eine weitere Untersuchung, da dieser in allen 3 ELIFA Versuchen ein zwar nur

schwaches oder kongruentes Bindungsverhalten gegen über den Reelin positiven Proben zeigte (siehe Tbl. 3.2).

Viele der weiteren Antikörper zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse in den einzelnen Untersuchungen sodass diese zunächst nicht weiterverfolgt wurden.

Subklonierung 17E7

Bei nur schwachem Bindungsverhalten des Antikörpers 17E7 in allen ELIFA Untersuchungen wurde eine Subklonierung vorgenommen. Hierbei konnten 4 Klone mit Bindung von Reelin positiven Zelllysate im ELIFA sowie einer mit Bindung von Reelin Überstand im ELIFA identifiziert werden. Ein Klon (17.E7D10) zeigte ein positives Signal im ELIFA mit E18 Hirnhomogenat, fraglich war auch ein schwaches positives Ergebnis im ELIFA mit Reelin Überstand.

Alle Subklone von 17E7, sowie weitere getestete Antikörper (14B12, 12B1, 8E8, 2H3, 7A11, 12G9, 16D10, 18B10, 2G1, 4G9, 7D10, 14F1) konnten im Western-Blot weder Reelin im Zellüberstand noch Reelin Zelllysate identifizieren (Tbl. 3.3).

Subklone 17E7	ELIFA			WESTERN	IP
	Reelin Lysat	Reelin Überstand	E18 Hirnhomogenat		
17E7.G2	+			-	(+)
17E7.F10	+			-	(+)
17E7.A11	+			-	
17E7.A7	+			-	
17E7.G8		+		-	
17E7.D10		(+)	+	-	

Tabelle 3.3 : Subklone C-terminaler Antikörper 17E7

ELIFA Reelin Lysat/ Überstand vs. GFP, E18 vs. Reeler Hirnhomogenat, Western= Westernblot Reelin, IP= Immunpräzipitation Reelin Überstand. +: positives Ergebnis, (+): schwach, fraglich positives Ergebnis, -: negativ

In der Immunpräzipitation von Reelin Überstand mit 17E7.G2 sowie 17E7.F10 konnte fraglich ein positives Bindungsverhalten identifiziert werden (Abb.3.15). In wiederholten Testungen zeigte sich jedoch eine Bande der Probe mit Reelin ohne Antikörper.

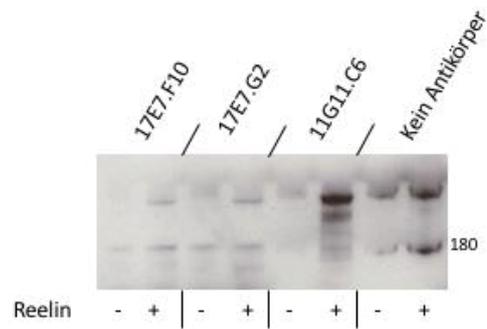


Abb. 3.15: Western-Blot Analyse nach Immunpräzitation der 17E7 Subklone
Kein Antikörper: Negativkontrolle, 11G11C6 Positivkontrolle, Reelin vorhanden (+), GFP Kontrolle (-). Sowohl 11G11C6, als auch die beiden Subklone scheinen in der Reelinprobe selektiv etwas zu binden. Jedoch sind diese Banden auch in der Negativkontrolle sichtbar (dort ebenfalls bei der GFP Probe)

Zusammenfassend konnte kein C-terminaler Antikörper identifiziert werden der Reelin im Western Blot darstellen kann.

3.4. Kamelide Antikörper

Nach Immunisierung des Lamas wurde 550 mL Blut gewonnen und die Lymphozyten von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Aus den Lymphozyten wurde zuerst RNA und dann mittels reverse Transkriptase c-DNA gewonnen. Mittels einer Phagenbibliothek erfolgte die Selektionierung Antigenbindender Klone.

3.4.1. Verbesserung der Methode

Um eine möglichst hohe Ausbeute an Inserts aus der PCR zu erreichen, wurden zunächst unterschiedliche Bedingungen getestet um die PCR zu optimieren und damit eine möglichst komplexe Phagenbibliothek zu generieren. Dazu wurden im ersten Schritt unterschiedliche Programme des PCR- Zyklers verglichen. Auf der einen Seite wurde das Programm Phusion genutzt. Dies hatte eine Annealingtemperatur von 56 °C. Verglichen

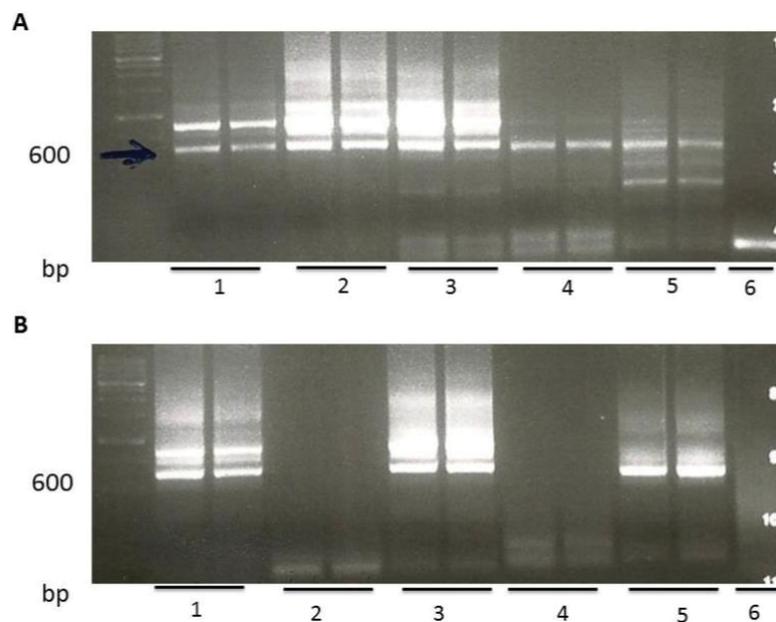


Abb. 3.16: Gelelektrophorese der ersten PCR der nested PCR zur Herstellung des Phagen Displays. Zyklus Programm Phusion (A) und Touch down (B)
1- Primer MJ1 und CH2, 2- Primer MJ2 und CH2, 3- Primer MJ3 und CH2, 4- Primer MJ1 und CH2b3, 5-Primer MJ2 und CH2b3, 6-Primer MJ3 und CH2b3.. Programm Phusion hatte dabei eine Annealingtemperatur von 56 °C, wohingegen das Touch down Programm mit einer Annealingtemperatur von 72 °C startete, die in Schritten von 2 °C erniedrigt wurde. Das Phusion Programm lieferte homogenere Ergebnisse.

damit wurde das Touch down Programm. Diese hatte eine höhere Annealingtemperatur zu Beginn von 72°C. Je nach 3 Zyklen mit dieser Annealingtemperatur wurde die Temperatur um 2°C reduziert, bis zum Schluss die Annealingtemperatur ebenfalls 56°C betrug. Der

Vorteil des Touch down Programmes liegt darin, dass durch die hohe Annealingtemperatur die Bindung der Primer spezifischer ist und die PCR Banden daher deutlicher sein sollten, da weniger Hintergrund entsteht. Der Nachteil jedoch ist, dass dadurch auch eine gewisse Vorselektionierung der späteren Antikörper entstehen kann, sodass auch das Phusion Programm getestet wurde.

Das Phusion Programm zeigte eine homogenere Bandenbildung im Hinblick auf die unterschiedlichen Primerpaare (Abb. 3.16) als das Touch down Programm, sodass wir die anschließende 2. PCR mit den aufgereinigten Produkten der ersten PCR ebenfalls mit dem Phusion Programm durchführten

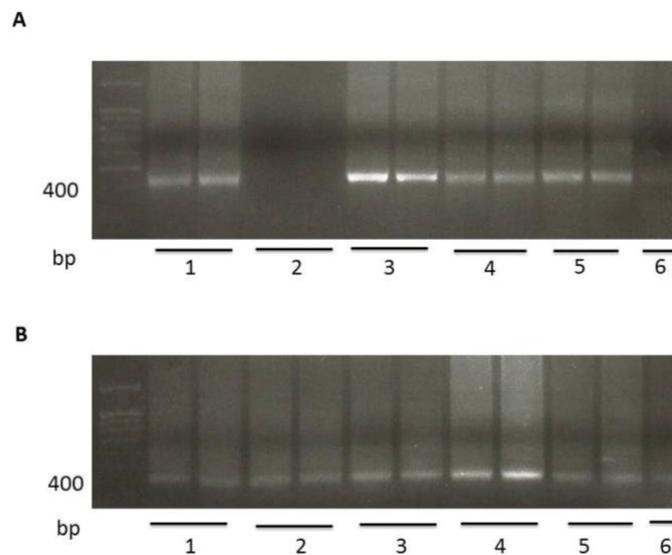


Abb. 3.17: Gelelektrophorese der zweiten PCR der nested PCR zur Herstellung des Phagen Displays. Primer MJ7 und JH3. Zyklusprogramm Phusion (A) und Touch down (B) 1-6 Produkte der ersten PCR mit unterschiedlichen Primern hergestellt. 1- Primer MJ1 und CH2, 2- Primer MJ2 und CH2, 3- Primer MJ3 und CH2, 4- Primer MJ1 und CH2b3, 5-Primer MJ2 und CH2b3, 6-Primer MJ3 und CH2b3.. Programm Phusion hatte dabei eine Annealingtemperatur von 56 °C, wohingegen das Touch down Programm mit einer Annealingtemperatur von 72 °C startete, die in Schritten von 2 °C erniedrigt wurde. In beiden PCRs wurde zu wenig Produkt generiert, zudem deutet der ausgeprägte Schmier auf der Gelelektrophorese auf eine Unreinheit der Produkte hin.

Hier zeigte sich ein zu großes Hintergrundrauschen, sodass davon auszugehen war die die Produkte nach einer Aufreinigung leider nicht rein genug wären. Zudem waren die Banden insgesamt zu schwach ausgeprägt und zu ungleichmäßig verteilt, sodass davon auszugehen war, dass die daraus entstehende Bibliothek nicht die gewünschte Komplexität erreichen würde (Abb 3.17).

Zur weiteren Verbesserung der PCR wurde das Touch down Programm verändert. Die Zeiten der Denaturierung, Annealing und Elongation wurden auf 10 sec gekürzt, da das gewünschte Produkt nur 600 Basenpaare groß sein sollte.

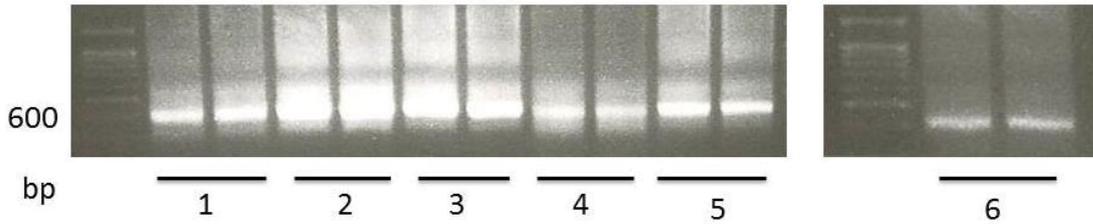


Abb. 3.18: Verbesserung der PCR zu Herstellung eines Phagen Displays. Reduzierung der Denaturierungs-, Annealing- und Elongationszeit auf 10 sec im Zyklusprogramm Touch down. . 1- Primer MJ1 und CH2, 2- Primer MJ2 und CH2, 3- Primer MJ3 und CH2, 4- Primer MJ1 und CH2b3, 5-Primer MJ2 und CH2b3, 6-Primer MJ3 und CH2b3. Das Touch down Programm startete mit einer Annealingtemperatur von 72 °C die in Schritten von 2 °C erniedrigt wurde. Deutliche Verbesserung der Produktmenge durch Änderung der Zeiten, jedoch waren die einzelnen Banden im Vergleich miteinander zu unterschiedlich.

Diese Veränderung verbesserte das PCR Ergebnis deutlich, jedoch waren die Produkte der einzelnen Primerpaare im Vergleich noch zu unterschiedlich (Abb 3.18).

Daher wurde das Primerpaar mit der schwächsten Bande, in Form von MJ2/CH2b3 ausgewählt um die PCR weiter zu verbessern. Verglichen wurden unterschiedliche Reaktionspuffer. Der HF- Puffer hat eine geringere Fehlerquote, der GC- Puffer jedoch eignet sich besser für lange oder schwierige Templates, wie zum Beispiel GC reiche Templates oder welche mit komplexen Sekundärstrukturen. Weiterhin wurde getestet ob das Hinzufügen von DMSO oder Q Substrat die PCR verbessert.

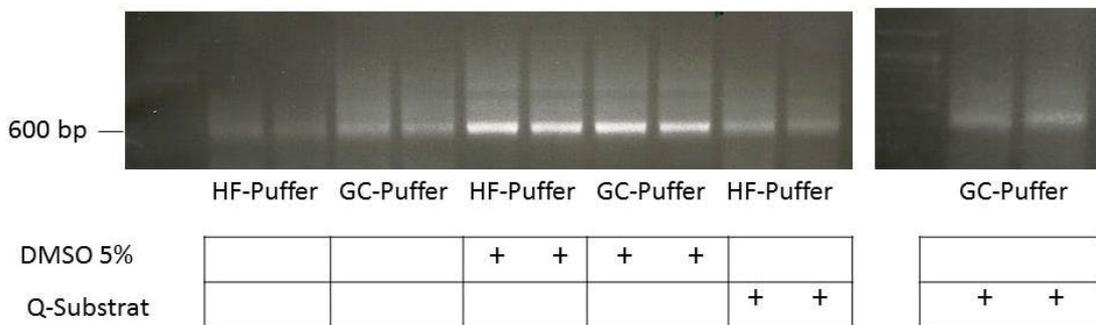
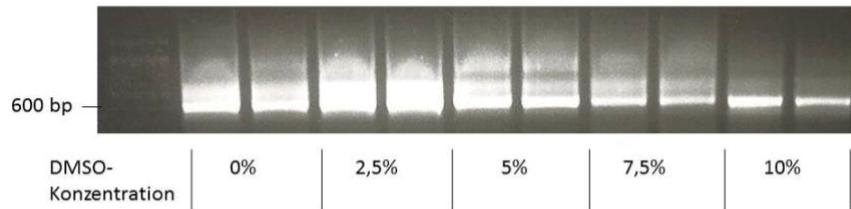


Abb. 3.19: Verbesserung der PCR Bedingungen anhand Primerpaar MJ2/CH2b3 durch Vergleich von unterschiedlicher Puffer und Hinzufügen von DMSO oder Q-Substrat Die Banden sind stärker ausgeprägt wenn 5% DMSO hinzugefügt wurde, unabhängig vom Puffer.

Es wurde ein deutlicher Vorteil durch das Hinzufügen von DMSO unabhängig vom Reaktionspuffer festgestellt (Abb 3.19). Da DMSO in einer Konzentration bis zu 10% bei einer PCR eingesetzt werden kann, wurde noch die optimale Konzentration von DMSO getestet werden.

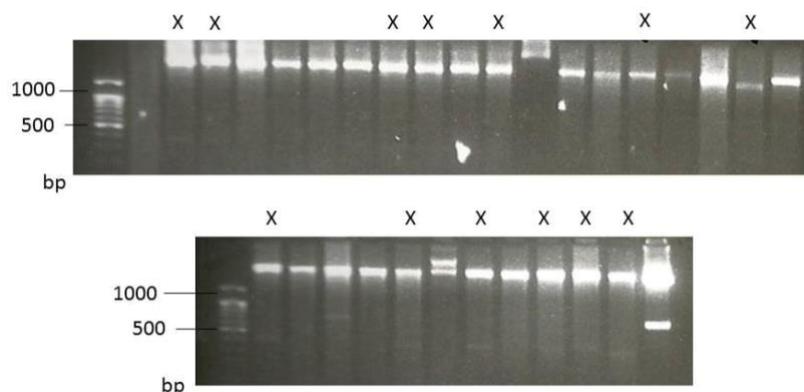


**Abb. 3.20: Verbesserung der PCR Bedingungen anhand Primerpaar MJ2/CH2b3 durch Hinzufügen unterschiedlicher Mengen DMSO
Die stärksten Banden sind in der PCR mit 2,5% DMSO zu sehen.**

Da die PCR optimale Produktmengen mit einer DMSO Konzentration von 2,5% erbrachte, wurden die weiteren PCRs auf diese Weise durchgeführt (Abb. 3.20).

Bibliothekgröße und Testverdau,

Nach dem Restriktionsverdau der PCR Produkte mit SFI 1 und NOT1 wurden diese mit dem PIT2 Vektor ligiert. Dieses Produkt wurde mittels Elektroporation in elektrokompetente TG1 Bakterien transformiert. Durch zählen einzelner Klone auf unterschiedlichen Verdünnungsplatten, konnte die Größe der Bibliothek auf ca. 10^7 bestimmt werden. Um die Klone auf mögliche Religation zu testen, und damit die Bibliothekgröße genauer bestimmen zu können, wurde ein Testverdau zunächst mit SFI durchgeführt



**Abb. 3.21: Restriktionsverdau zur Identifizierung der Religationsrate zur Bestimmung der Bibliotheksgröße.
Klone mit einem Insert von 400 bp mit X markiert.**

Hier zeigte sich das in nur 13 von 27 Klonen Inserts der passenden Größe von 400 bp vorlagen (Abb 3.21). Die zu vermutende Blibliothekgröße lag daher nun bei $6 \cdot 10^6$. Die Banden waren zum Teil jedoch sehr schwach, sodass ein weiterer Test zur Bestimmung der Religationsrate benötigt wurde. Da SFI 1 methylierungssensitiv ist wurde ein weiterer Testverdau der vorher negativen Klone mit NCO 1 durchgeführt.

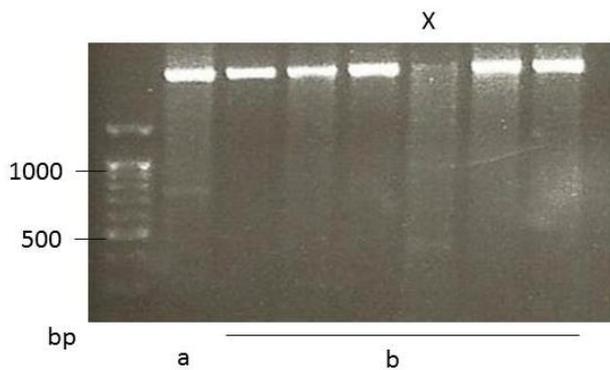


Abb. 3.21: Restriktion zur Identifizierung der Religationsrate mit NcoI zur Bestimmung der Bibliotheksgröße
a- zuvor positiver Klon, b- zuvor negative Klone,
Der zuvor positive Klon beinhaltet jetzt ein zu großes Insert. Mit X gekennzeichnete Klon nun mit Insert der gesuchten Größe.
 geschickt.

Ein Klon, der zuvor kein Insert hatte, zeigte nun eins der erwarteten 400 bp (Abb 3.21). Zur Kontrolle wurde auch ein zuvor positiv getesteter Klon überprüft. Dieser jedoch enthielt nun ein zu großes Insert, sodass auch diese Restriktion nicht sicher die tatsächliche Größe der Bibliothek ermitteln kann. Um die Größe sicher zu bestimmen wurden 16 positiven Klone und 2 negative Klone ausgewählt und zur Sequenzierung

In den 2 negativen scheinbaren Leervektoren fanden sich circa 20 pb große Inserts. Hierbei handelt es sich am ehesten um Primerdimere oder sehr kleine Fragmente von Antikörpern. Diese sind zu klein um in der Gelelektrophorese aufzufallen, weshalb die Vektoren in der Testrestriktion scheinbar leer erschienen. Die positiven Klone unterschieden sich bis auf 2 alle in ihrer variablen und hypervariablen Region.

3.4.2. Selektionierung

Die Selektionierung wurde mittels auf ELISA Platten gebundenes rekombinantes Protein durchgeführt. Die Phagen wurden auf die ELISA Platte gegeben, sodass diejenigen mit passenden Antikörpern auf der Oberfläche daran binden konnten. Anschließend wurde die Platte mehrfach gewaschen um die unspezifischen Bindungen zu minimieren. Die Selektion wurde dreimal durchgeführt. Dabei wurde immer eine andere Substanz zum Blocken der ELISA Platte genutzt um die Anhäufung von Antikörper gegen die eine spezifische blockende Substanz, z.B. Milch zu vermindern. Nach jeder Elution wurden TG1 Bakterien mit den selektionierten Phagen infiziert, um die selektionierten Antikörper erneut zu bilden. Im nächsten Schritt wurden wieder Phagen mit den Antikörpern auf der Oberfläche und der Sequenz als Plasmid im Inneren hergestellt um die erneute Selektion durchzuführen.

Nach der ersten Selektion fanden für die Antikörper gegen Reelin Aminosäure 1949- 2662 $3 \cdot 10^5$ Klone, für die Antikörper gegen Reelin Aminosäure 24- 500 $4 \cdot 10^5$ Klone. Nach der zweiten Selektion verminderte sich die Anzahl der Klone auf bei Antikörper gegen Reelin Aminosäure 1949- 2662 450.000 und bei Antikörper gegen Reelin Aminosäure 24- 500 19.000. Diese Reduktion der Klone sprach für eine funktionierende Selektion auf gegen die Reelin Fragmente gerichtete Antikörper. Nach der dritten Selektion stieg die Menge an Klonen wieder an, sodass eine Anreicherung der gegen Reelin Fragmente gerichteten Antikörpern erfolgt ist.

3.4.3.Charakterisierung N-terminale Antikörper

Im ersten Schritt wurden ein monoklonaler ELISA gegen das rekombinante Reelin Fragment Aminosäure 24- 500 durchgeführt. Es zeigten sich 3 stark positive Klone, sowie 15 schwächere. Diese Klone wurden zum Sequenzieren geschickt. Da zur Testung der Funktionalität der Antikörper mittels ELIFA größere Mengen der Antikörper benötigt wurden, wurde diese mittels Bakterienkultur exprimiert. Anschließend fand eine Aufreinigung mittels Ni- Säule sowie eine Expressionkontrolle mittels SDS- PAGE statt.

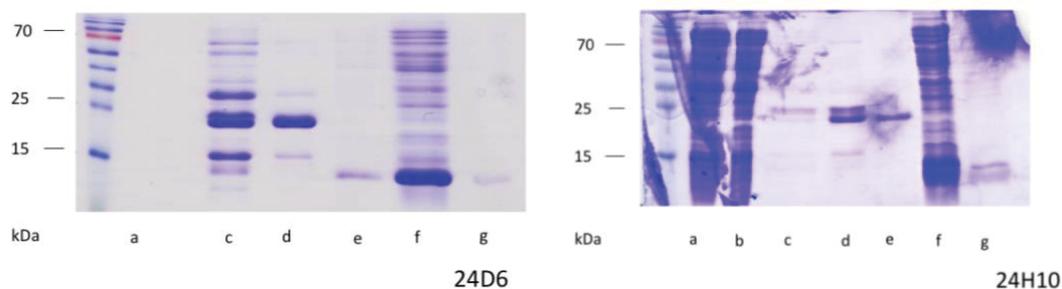


Abb. 3.22: SDS- PAGE und Coomassie Färbung der Aufreinigung bakteriell exprimierter Antikörper der Klone 24D6 und 24 H10 gegen das n-terminale Teil von Reelin
a- Probe vor IPTG Induzierung, b- Probe nach IPTG Induzierung, c-e: einzelne aufeinanderfolgende Eluate (1ml Volumen) der Aufreinigung über Ni-NTA (1ml Volumen), f- Flow through, g: Wasch Puffer. Es zeigt sich die selektive Anreicherung des gewünschten Produktes von einer Größe von ca. 20 kDa , sowohl für den Klon 24D6 als auch für 24H10

Hier zeigte sich für die ausgesuchten Klone eine quantitative sowie qualitative Aufreinigung und Anreicherung in einem Eluat. Im Flow through konnte kein weiteres Produkt der gewünschten Größe gefunden werden, sodass von einer effektiven Aufreinigungsform auszugehen war (Abb3.22).

In durchgeführte Sequenzierung konnte bestätigen das es sich um zwei kamelide Antikörper als Inserts handelte. Die hypervariablen Regionen waren unterschiedlich ausgeprägt, sodass von 2 unterschiedlichen Antikörper auszugehen war.

3.4.4 Charakterisierung C-terminale Antikörper

Der monoklonale ELISA wurde in diesem Fall gegen das rekombinante Reelin Fragment 1949- 2662 durchgeführt. Hier ergaben sich über 40 stark positive Klone. 40 Klone wurden ausgewählt und zur Sequenzierung geschickt.

Um eine Untersuchung mittels ELIFA durchzuführen wurden größere Mengen der Antikörper benötigt. Diese wurden in einer Bakterienkultur hergestellt und anschließend über eine Nickel-NTA Säule aufgereinigt.

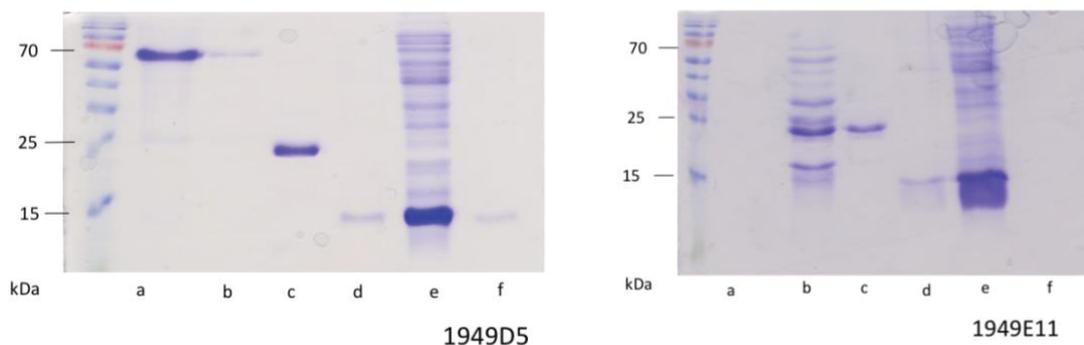


Abb. 3.23: SDS- PAGE und Coomassie Färbung der Aufreinigung bakteriell exprimierter Antikörper der Klone 1949D5 und 1949E11 gegen das C-terminale Teil von Reelin
a- Probe vor IPTG Induzierung, b-d: einzelne aufeinanderfolgende Eluate (1ml Volumen) der Aufreinigung über Ni-NTA (1ml Volumen), e- Flow through, f- Wasch Puffer. Es zeigt sich die selektive Anreicherung des gewünschten Produktes von einer Größe von ca. 20 kDa, sowohl für den Klon 1949D5 als auch für 1949E11

Auch bei den ausgewählten Klone 1949D5 und 1949E11 zeigte sich im SDS-PAGE die induzierte und aufgereinigte Bande bei circa 20 kDa (Abb. 3.23).

Auch in der Sequenzierung der c-terminalen Antikörper konnte das Vorliegen von jeweils unterschiedlichen hypervariablen Regionen festgestellt werden (siehe Anhang)

3.4.5. ELIFA Untersuchung der Antikörper

Zur Testung ob die Antikörper auch das volle Länge Reelins binden, wurde eine ELIFA Untersuchung durchgeführt. Aufgrund des fehlenden FC Teils musste die Entwicklung mit 2 sekundären Antikörpern erfolgen. Zuerst erfolgte die Inkubation mit einem anti- Myc (9E10) Antikörper, anschließend wurde ein anti- Maus POD Antikörper genutzt.

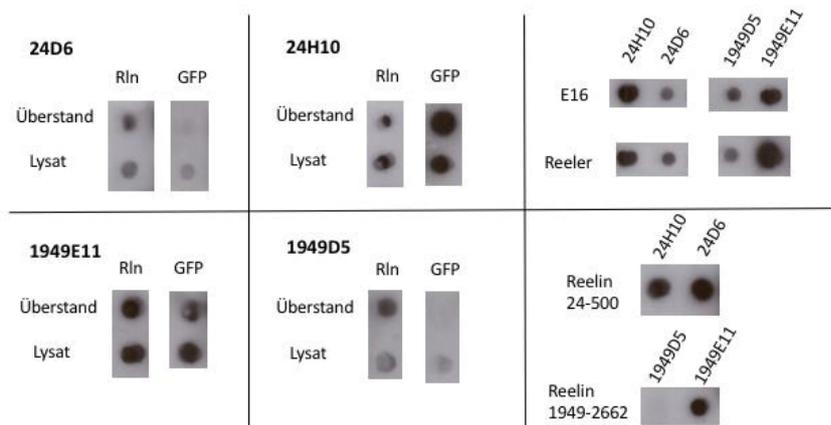


Abb. 3.24: ELIFA zur Identifikation des Bindungsverhalten der Kamel Antikörper gegenüber nativem Reelin voller Länge n-terminale Antikörper (24D6, 24H10), c-terminale Antikörper (1949E11,1949D5) wurden vergleichend auf Reelin (Rln) und GFP HEK Zell Überstand oder Lysat getestet. Zudem wurde E16 Gehirnhomogenate (E16) sowie Reeler Gehirnhomogenate (Reeler) getestet und das Bindungsverhalten auf das rekombinante Reelin (Reelin 24- 500, Reelin 1949- 2662)

Im ELIFA konnte jeweils ein N- terminaler sowie ein C-terminaler Antikörper identifiziert werden, die Reelin im Überstand erkannten. 24D6 sowie 1949D5 hatten ebenfalls ein stärkeres Signal im Reelin Zelllysat vergleichend mit der GFP Zelllysat Kontrolle, so dass auch hier von einem positiven Bindungsverhalten auszugehen ist. 1949E11 hingegen zeigte ein starkes Signal im Reelin Überstand sowie Lysat, in der GFP Kontrolle im Lysat ein ähnlich starkes Signal. Lediglich im GFP Überstand erzeugte 1949E11 ein nicht ganz so kräftiges Signal wie im Reelin Überstand. 24H10 erzeugte ein stärkeres Signal in den GFP Kontrollen (Abb. 3.24).

24H10 und 1949D5 zeigten ein leicht stärkeres Signal im E16 Gehirnhomogenat als im Reeler Homogenat. Die n-terminalen Antikörper banden beide das rekombinante n-terminale Reelin 24- 500. 1949D5 band das rekombinante C-terminale Reelin 1949- 2662 kaum bis gar nicht.

Zusammenfassend konnten wir jeweils einen N-terminalen (24D6) sowie einen c-terminalen (1949D5) kameliden Antikörper identifizieren, der Reelin im Zellüberstand identifizieren konnte.

3.5 CSF Blot

Die identifizierten Maus Antikörper 11G11.C6 und 20E12.E5 wurden zur Testung des Reelin Gehaltes in Liquorproben von Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen wie

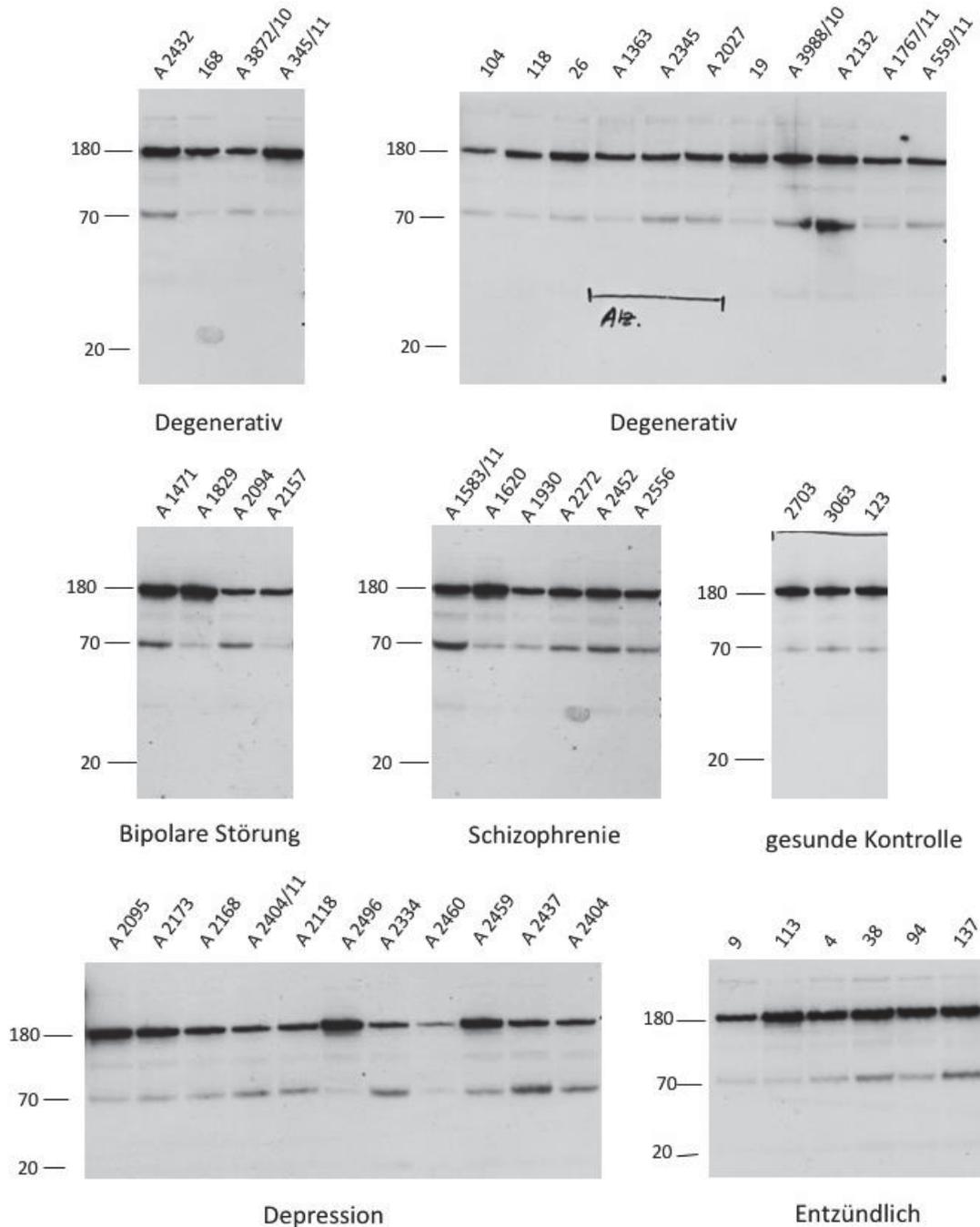


Abb. 3.25 : Western- Blot Untersuchung von Liquorproben zum Vergleich des Reelingehaltes Teil A Vergleich von Liquorproben von Patienten mit Depression, bipolarer Erkrankung, Schizophrenie, neurodegenerativen Erkrankung, entzündlichen Erkrankung, sonstige/neoplastisch im Vergleich zu Kontrollproben.

Depression, Bipolare Störung und Schizophrenie. Des Weiteren wurden Liquorproben von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen untersucht im Vergleich zu Normalproben.

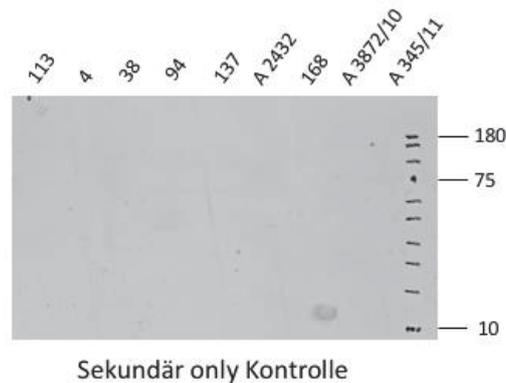


Abb. 3.25 : Western- Blot Untersuchung von Liquorproben zum Vergleich des Reelingehaltes Teil B
Repräsentative Sekundär only negativ Kontrolle

Nach auftragen von jeweils 30 μ L Liquor pro Probe konnte zeigte sich eine Bande von 180 kDa sowie 70 kDa die zuvor in der Kontrolle mit dem sekundären Antikörper nicht sichtbar waren(siehe Abb. 3.25). Rein optisch war ein geringerer Reelingehalt des 180 kDa Fragments im Liquor von Patienten mit diagnostizierten Depression auffällig. Nach densitometrischer Auswertung konnte dies bestätigt werden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich zwischen den Untergruppen (Depression, Bipolare Störung, Schizophrenie, Entzündlich, Neurodegenerativ, Sonstige/ Neoplastisch, Kontrolle) ein signifikanter Unterschied findet; ANOVA: $F(6, 49) = 3,512$, $p = 0,006$

In der Post hoc Testung mittel Tukey zeigte sich der Unterschied zwischen dem Reelingehalt im Liquor der Patienten mit Depression signifikant geringer als der Patienten mit entzündlicher Erkrankung; Post hoc Vergleiche: $D = 1,105$, $p = 0,002$.

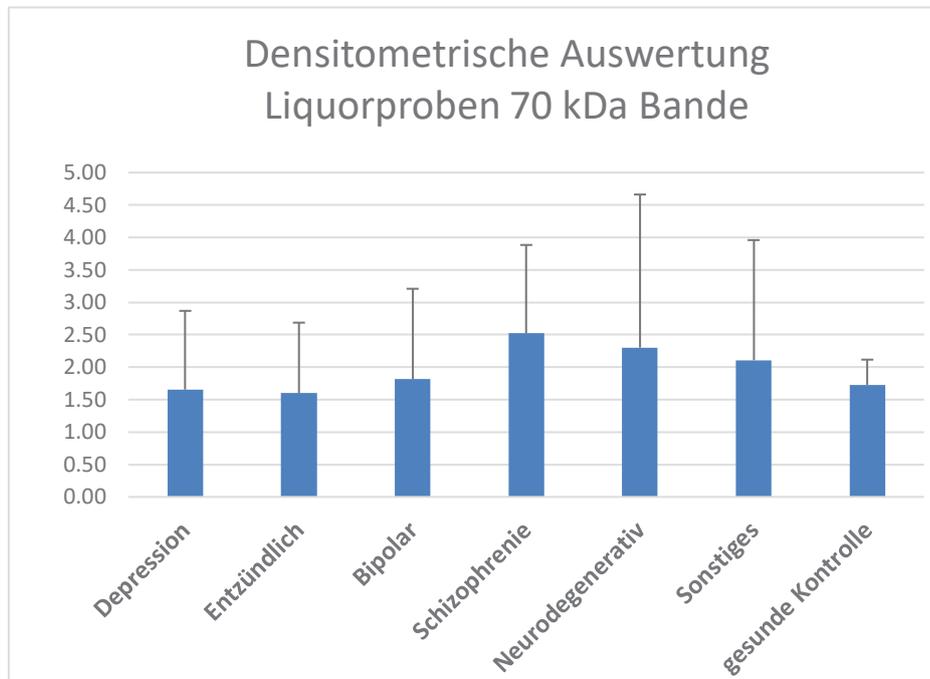
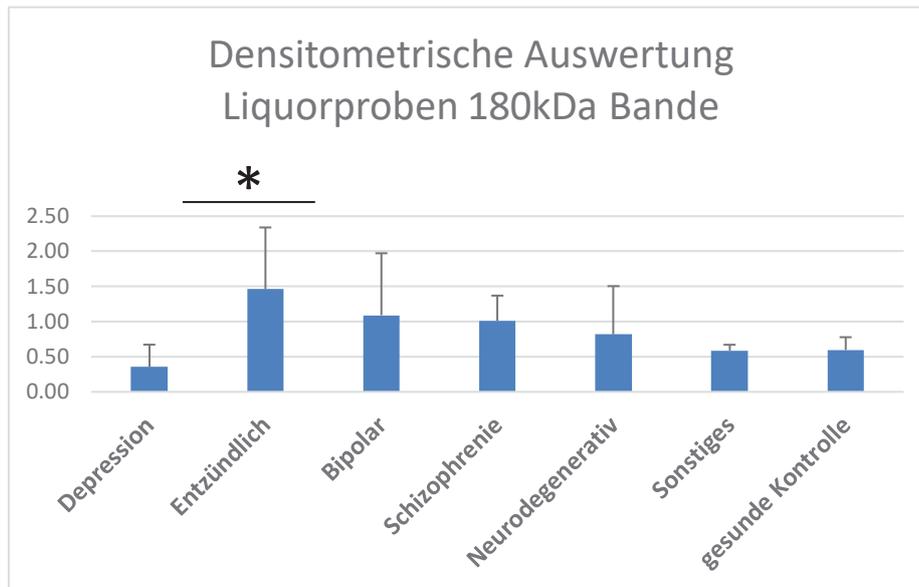


Abb. 3.25: Western- Blot Untersuchung von Liquorproben zum Vergleich des Reelingehaltes Teil C
Vergleich von Liquorproben von Patienten mit Depression, bipolarer Erkrankung, Schizophrenie, neurodegenerativen Erkrankung, entzündlichen Erkrankung, sonstige/neoplastisch im Vergleich zu Kontrollproben. Densitometrische Auswertung mittels Image J. Mit * sind die signifikanten Ergebnisse gekennzeichnet. Bei Auswertung des 180 kDa Fragments zeigt sich ein signifikant geringerer Gehalt bei Patienten mit Depression im Vergleich zu entzündlichen Erkrankungen ($p = 0,002$).

Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte nicht nachgewiesen werden. Von der Tendenz zeigte sich ein höherer Mittelwert bei den Patienten mit Schizophrenie, bipolarer Störung sowie entzündlicher Erkrankung (Schizophrenie: $M = 1,01$, Entzündlich: $M = 1,46$, bipolare Störung: $M = 1,09$, Kontrolle: $M = 0,59$). Depressive hatten einen leicht geringeren Mittelwert (Depression: $M = 0,35$, Kontrolle: $M = 0,59$).

Bei der Auswertung der 70 kDa Fragmente konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden; ANOVA: $F(6, 49) = 0,416$, $p = 0,865$.

Bei der Ladungskontrolle zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied in der Proteinmenge auf dem Blot. Daher wurde nach Bestimmung der Proteinmenge der einzelnen Liquorproben eine erneute Untersuchung mit Auftragung von jeweils 6,68 µg Gesamtprotein durchgeführt. Aufgrund der geringeren Proteinmenge zeigten sich trotz längerer Expression insgesamt nur schwache Banden. In der Auswertung des 180 kDa Fragments konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Depression, Bipolare Störung, Schizophrenie, Entzündlich, Neurodegenerativ, Sonstige/ Neoplastisch, Kontrolle) nachgewiesen werden; ANOVA: $F(6, 48) = 2,129$, $p = 0,067$.

Tendenziell haben Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen scheinbar eine geringe Menge des 180 kDa Reelinfragments im Vergleich zur Kontrollgruppe (Neurodegenerativ: $M = 0,097$, gesunde Kontrolle: $M = 0,439$)

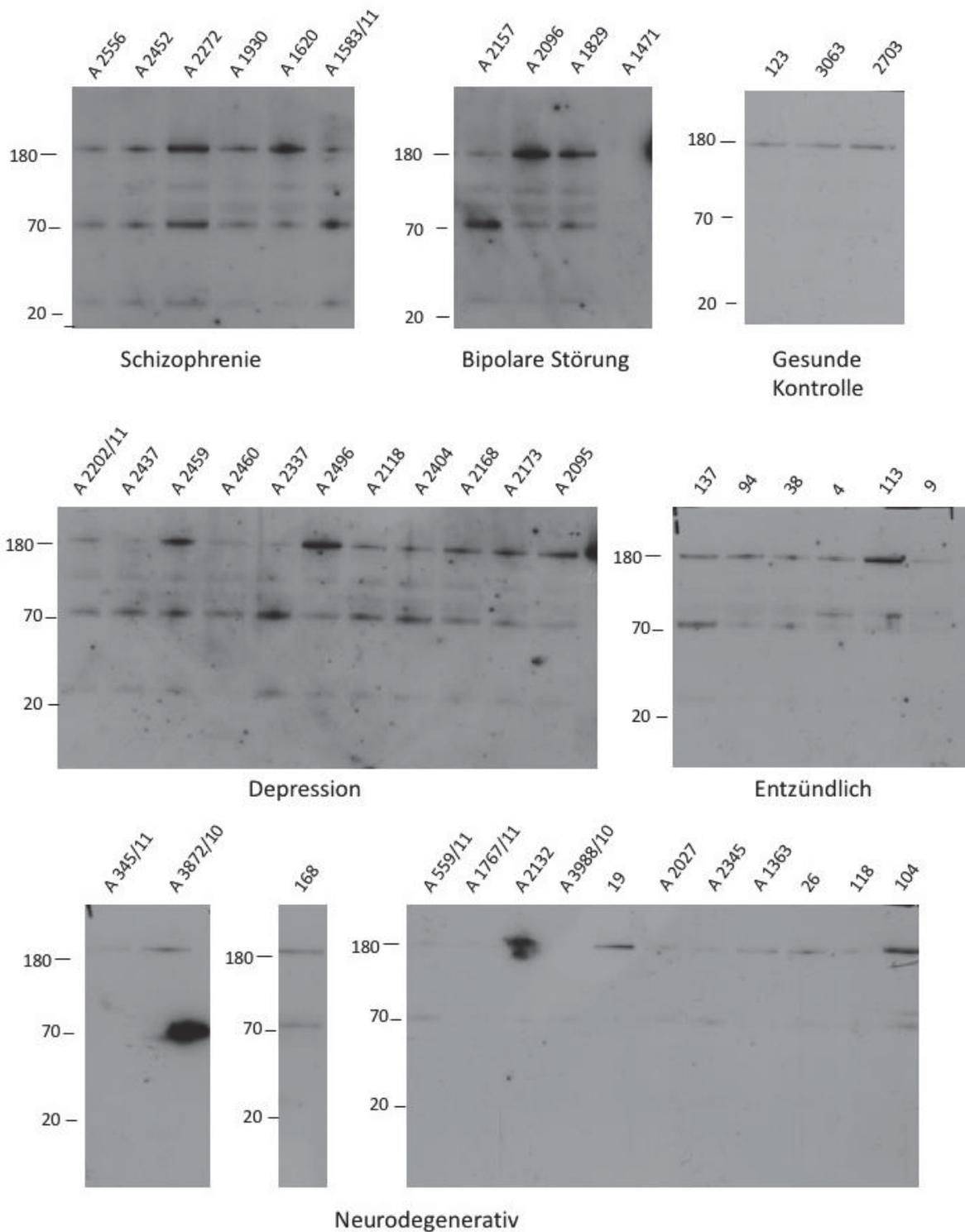


Abb. 3.26: Western- Blot Untersuchung von Liquorproben zum Vergleich des Reelingehaltes nach Proteinmengenanpassung Teil A
Vergleich von Liquorproben von Patienten mit Depression, bipolarer Erkrankung, Schizophrenie, neurodegenerativen Erkrankung, entzündlichen Erkrankung, sonstige/neoplastisch im Vergleich zu Kontrollproben.

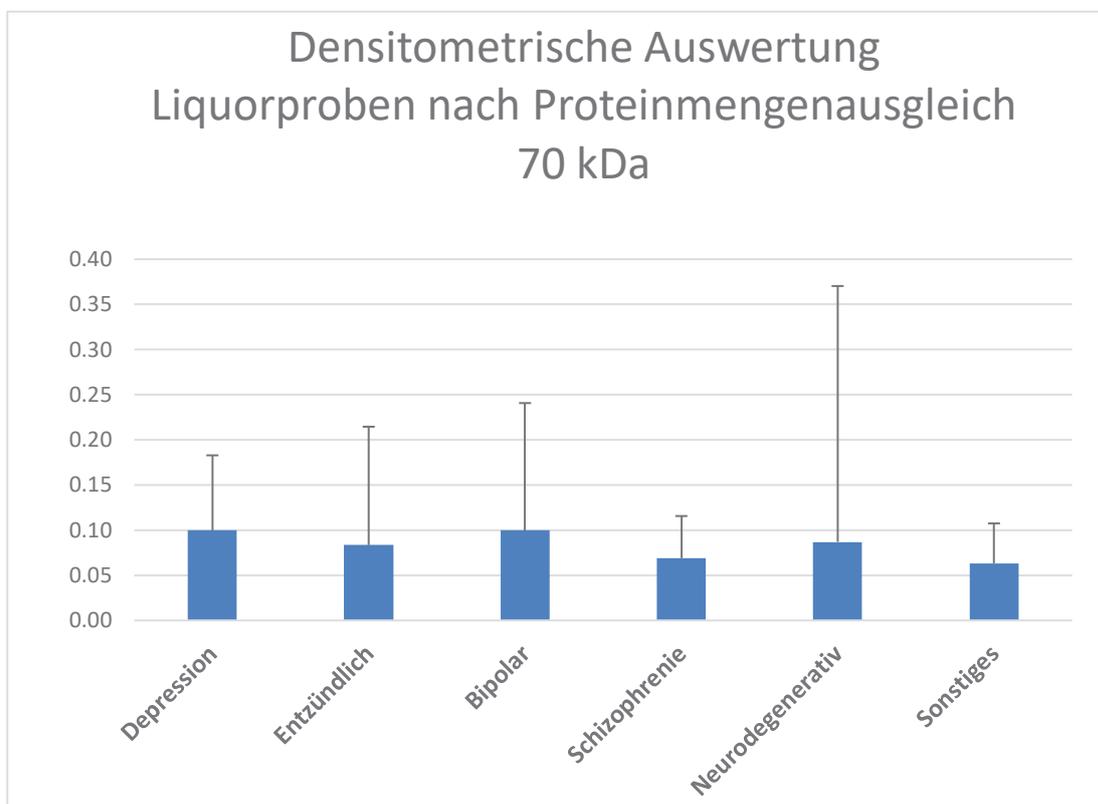
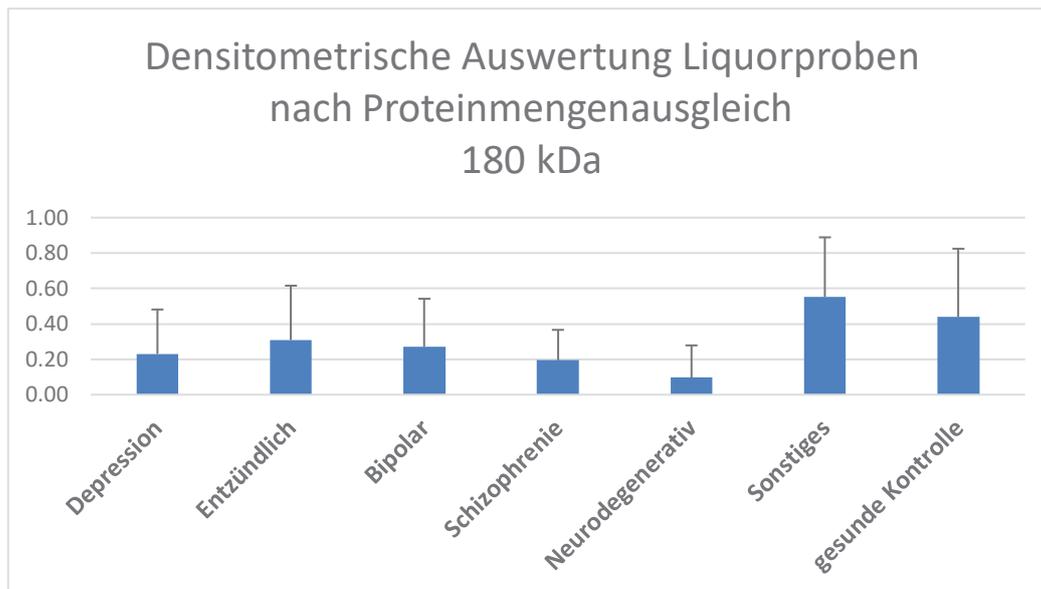


Abb. 3.26: Western- Blot Untersuchung von Liquorproben zum Vergleich des Reelingehaltes nach Proteinmengenanpassung Teil B

Vergleich von Liquorproben von Patienten mit Depression, bipolarer Erkrankung, Schizophrenie, neurodegenerativen Erkrankung, entzündlichen Erkrankung, sonstige/neoplastisch im Vergleich zu Kontrollproben. Densitometrisch Auswertung mittels Image J. Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

Das 70 kDa Fragment war nach Proteinmengenanpassung nur noch sehr schwach nachweisbar. Auch hier fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen; ANOVA: $F(6, 48) = 0,127, p = 0,992$.

Zusammenfassend konnte zunächst ein signifikant niedrigerer Reelin 180 kDa Gehalt in Patienten mit Depression im Vergleich zu Schizophrenen ($p = 0,001$) nachgewiesen werden. Nach Anpassung des Proteingehalts der einzelnen Proben konnte dieser Unterschied nicht mehr nachgewiesen werden.

3.6 Lymphozyten Blot

Zur Untersuchung des Reelingehaltes in Lymphozytenzellen von Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe kultivierte Lymphozyten lysiert und anschließend im Western-Blot untersucht.

Sowohl mit dem G10 Antikörper als auch mit 12G2 konnte zunächst keine spezifische Bande in der Western-Blot Analyse identifiziert werden.

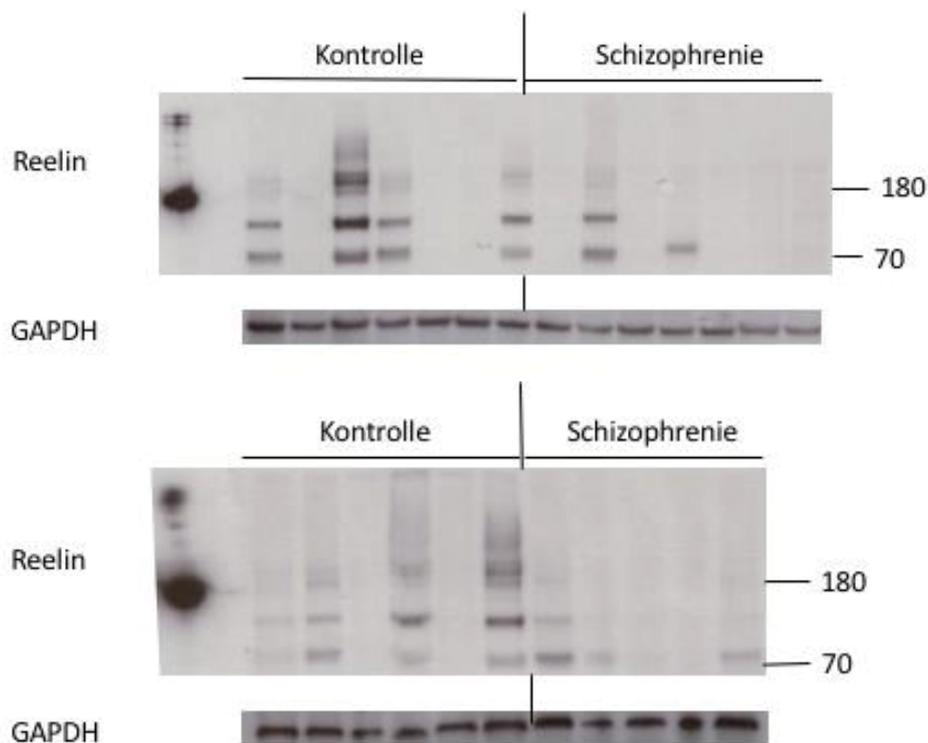


Abb 3.27: Westernblot Analyse des Reelingehaltes von Lymphozytenlysaten von Schizophrenen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe

170 kDa Bande Reelin identifiziert. 100 kDa und 80 kDa Bande unspezifisch da diese auch in der Kontrolle mit nur sekundärem Antikörper findet. GAPDH Kontrolle zum Vergleich der Probenmenge. Insgesamt ist der Reelingehalt sehr niedrig (schwache Banden) sowie sehr inhomogen in den einzelnen Gruppen.

Bei Inkubation mit 20E12 konnte eine schwache Bande bei 180 kDa identifiziert werden. Ebenfalls sind Banden bei 70 kDa und 100 kDa sichtbar (siehe Abb. 3.27), die jedoch bereits nach Inkubation mit nur dem sekundären Antikörper sichtbar und somit als unspezifisch zu werten sind.

In der densitometrischen Auswertung konnte ein erhöhter Median der 180 kDa Banden bei den Kontroll- Proben im Vergleich zu den Schizophrenie Proben (Kontrolle: $Mdn = 6627$, Schizophrenie: $Mdn = 1672$). Dieser Unterschied ist signifikant; $U = 35,000$ $z = -2,339$, $p = 0,019$. Bereits optisch fällt auf, dass der Reelingehalt trotz

gleicher Probenmenge (GAPDH Kontrolle) auch innerhalb der Gruppen stark schwankend ist (siehe Abb. 3.27).

Zusammenfassend konnte Reelin als ein 180 kDa großes Fragment im Lysat von immortalisierten Lymphozyten nachgewiesen werden. Jedoch war der Reelingehalt so gering und die Inhomogenität innerhalb der beiden Gruppen so groß, dass ein Unterschied zwischen Schizophrenen und der Kontrollgruppe nicht sicher nachgewiesen werden konnte.

3.7 Minireelin

Um eventuell eine kurze Version eines biologisch aktiven Reelinprotein zu erlangen klonierten wir das Aminosäurefragment 1949- 2662 mit einem GS-Linker in das bereits bestehende Konstrukt mit dem Reelin Fragment 24- 500 (siehe Abb. 3.28). Für den Fall, dass weiteres Einfügen von Reelin- Fragmente nötig sein würde, fügten wir noch weitere Schnittstellen ein.



Abb. 3.28 : Skizze der Klonierung des Minireelins
 AS 24- 500: Reelinfragment Aminosäure 24- 500, AS 1949- 2662: Reelinfragment Aminosäure 1949- 2662, Age und Nhe: Restriktionsstellen die eingefügt wurden, GS-Linker (6x):Glycin Serin Linker

Um die PCR Bedingungen optimal anzupassen, wurden unterschiedliche Bedingungen miteinander verglichen. Zum einen wurde eine Annealingtemperatur von 55 °C mit einer von 60 °C verglichen. Weiterhin wurden HF-Puffer mit GC-Puffer und Hinzufügen von DMSO verglichen.

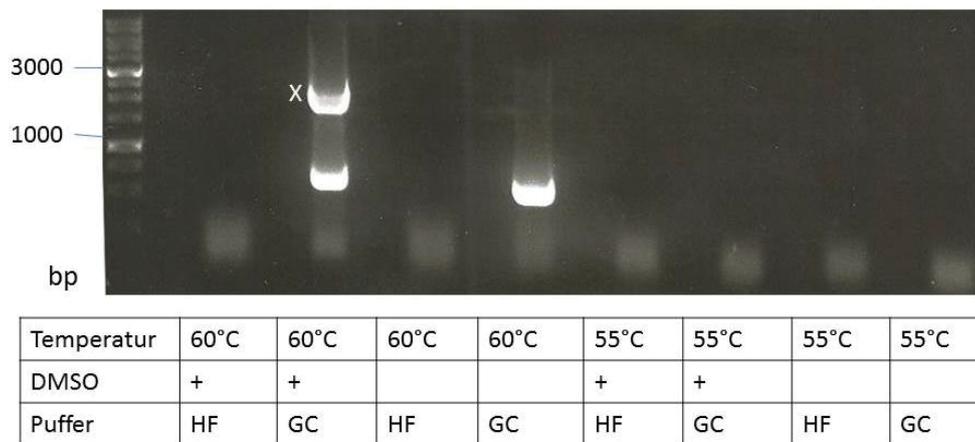


Abb. 3.29: PCR des Reelinfragments Aminosäure 1949-2662 zur Minireelin Klonierung, Bestimmung der optimalen Bedinungung
 Getestet wurden unterschiedliche Annealing Temperaturen (*Temperatur*), sowie zusätzlich DMSO versus kein DMSO und unterschiedliche Puffer (HF- Puffer: geringere Fehlerquote, GC- Puffer: bessere Eignung für lange oder schwierige Templates, wie zum Beispiel GC reiche oder komplexen Sekundärstrukturen). Die beste Bedingung war eine Annealing Temperatur von 60 °C, GC- Puffer mit DMSO. Mit X ist die aufgereinigte Bande gekennzeichnet.

Dabei war die beste PCR Bedingung bei 60 °C mit GC- Puffer und Hinzufügen von DMSO (siehe Abb. 3.29). Nach der Aufreinigung aus dem Gel erfolgte eine Restriktion mit Eag 1.

Da das Minireelin Konstrukt sehr groß war, konnte nur diese eine Schnittstelle zur Restriktion identifiziert und genutzt werden. Somit bestand bei der Ligation die Möglichkeit, dass das Insert sowohl richtig als auch falsch herum orientiert eingefügt werden konnte. Daher wurde eine Testrestriktion mit SacI durchgeführt. Bei richtiger Orientierung sollte das ausfallende Fragment 1,2 kb groß sein. Bei falscher Orientierung wurde ein Fragment von 3 kb erwartet.

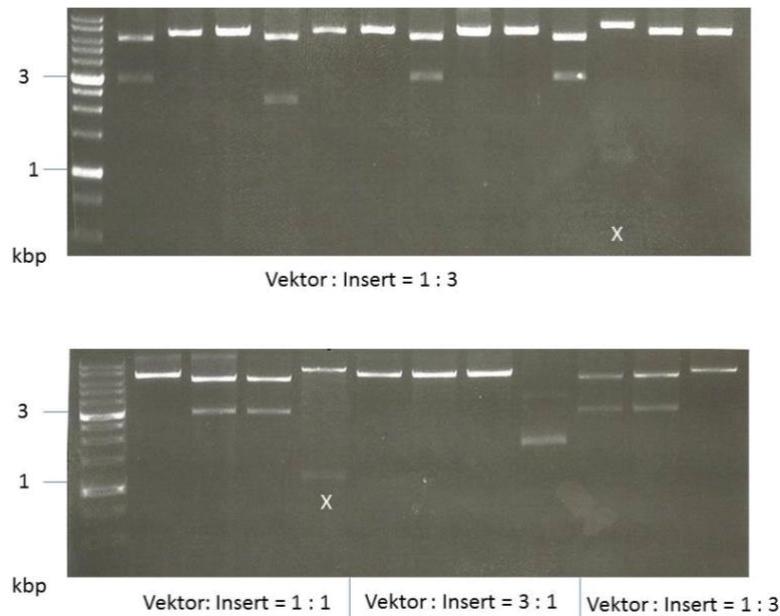


Abb. 3.30: Testrestriktion von Minireelin mit Sac 1 zur Identifikation der Insertorientierung
 Getestet wurden unterschiedliche Verhältnisse von Vektor zu Insert während der Ligation. Mit X sind die Klone mit einem Insert von 1,2 kbp und damit der richtigen Insertorientierung gekennzeichnet.

Zur Ligation wurden unterschiedliche Verhältnisse von Vektor zu Insert gewählt, um eine möglichst große Wahrscheinlichkeit zur richtigen Orientierung des Inserts zu erreichen. Es konnten nur 2 positive Klone identifiziert werden. Hierbei konnte beim Verhältnis Vektor: Insert = 3:1 kein einziger mit richtiger Orientierung identifiziert werden (siehe Abb. 3.30).

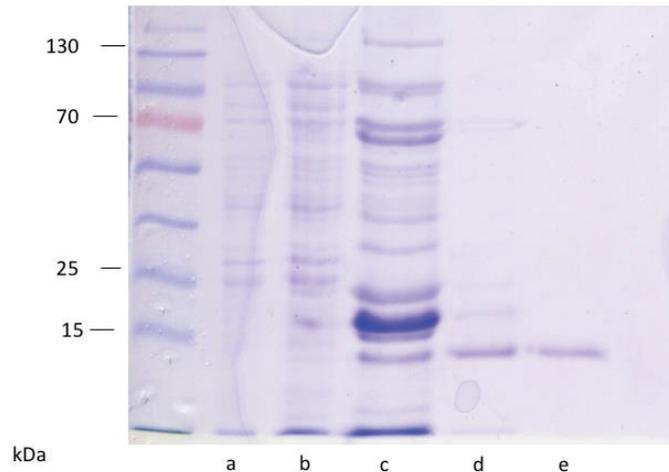


Abb. 3.31: SDS- PAGE mit Coomassie Färbung nach Aufreinigung der Minireelin Kultur
a=Probe vor IPTG Induktion, b= Probe nach IPTG Induktion, c-e= aufeinanderfolgende Eluate 1,2,3
(jeweils 1ml) über eine 2ml NiNTA Säule
 Nach Aufreinigung zeigen sich multiple Banden unterschiedlicher Höhe. Die erwartete Bande für das Minireelin (130 kDa) ist nur schwach im ersten Eluat sichtbar.

Nach der Protein Expression und Aufreinigung zeigten sich im SDS Phage mehrere Banden unterschiedlicher Größe. Die bei 130 kDa erwartete Bande des Minireelin der vollen Länge war nur gering ausgeprägt (siehe Abb 3.31). Zur Überprüfung ob diese multiplen Banden Fragmente des Minireelins oder unspezifische Proteine sind, die mit aufgereinigt worden sind, wurde eine Western-Blot Analyse durchgeführt.

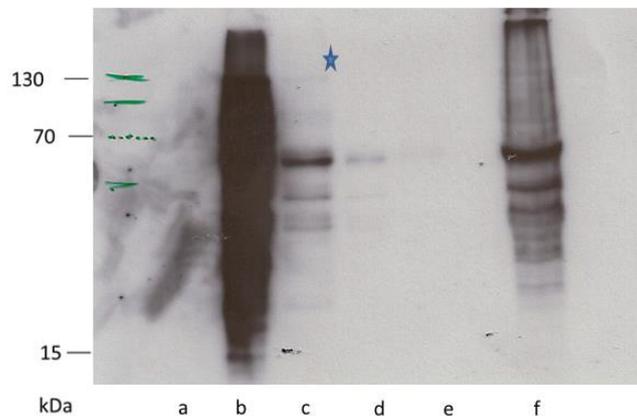


Abb. 3.32: Western Blot der Aufreinigungsprodukte Minireelin; Anti- Reelin 20E12.E5
a:Probe vor Induktion, b: Probe nach Induktion, c-e: Eluate, f: Flow Through
 Gewünschtes Produkt mit * gekennzeichnet (130 kDa). Im Flow Through zeigt sich viel Material, jedoch nicht das der gewünschten Größe. Nach Induktion kann jedoch eine Zunahme der Fragmente auch des vollständigen Minireelin (130 kDa) identifiziert werden.

Auch hier zeigen sich Banden unterschiedlicher Höhe, sodass hier mehrfache Fragmente des Minireelins vorlagen. Jedoch zeigte sich die Bande auf der erwarteten Größe von 130 kDa in der Probe nach Induktion intensiver als in den Eluaten als auch dem

Flow through (siehe Abb. 3.32). Daher reinigten wir, in der Vermutung eines unlöslichen Produktes die Proben erneut mit Urea auf.

Nach Aufreinigung der Zellpellets konnte eine höhere Menge des volle Länge Minireelins in den Proben identifiziert werden. Jedoch waren auch in diesen Proben viele Fragmente des Minireelins unterschiedlicher Größe (siehe Abb. 3.33). Auch nach Anpassung der Expressionsbedingungen, wie Temperatur und Länge der Expression konnte kein reines Minireelin aufgereinigt werden.

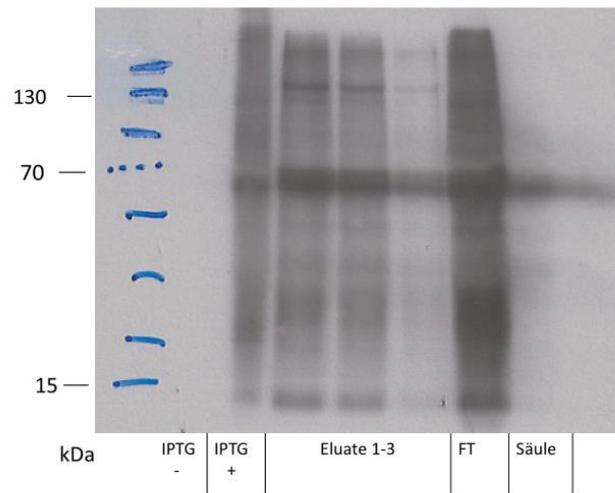


Abb. 3.33: Westernblot- Analyse des mit Urea aufgereinigten Minireelins, Anti- Reelin 20E12.E5
-IPTG: vor Induktion, + IPTG: nach Induktion, FT: Flow thorough, Säule: Probe der NiNTA Säule (2ml Volumen).
Gewünschte Bande deutlicher als in der löslichen Aufreinigung, jedoch weiterhin sind viele unterschiedliche Fragmente Fragmente, sodass von einer Restriktion ggfs. auch während der Expression.

3.8 Dab-Phosphoassay

Die Bindung von Reelin führt zu einer Phosphorylierung von DAB1. Um zu untersuchen ob die Hergestellten Reelinfragmente ebenfalls in der Lage sind zu einer Phosphorilierung zu führen, oder die identifizierten Antikörper in der Lage eben jene zu blockieren führten wir äquivalent zu Jossin et al, Journal of Neuroscience 2004 einen Dab-Phosphorylierungsassay durch.

3.8.1 Methodenverbesserung

Zunächst führten wir eine Inkubation der primären Neurone mit Reelin und GFP Proben gewonnen aus der Zellkultur für 10 min durch. Nach Durchführung der Immunpräzipitation und anschließendem Western-Blot mit 4G10 1:1000 (anti-Phospho Antikörper) waren jedoch zunächst keine Banden sichtbar. Daher plattierten wir die primären Neurone in 12-wells und führten die Inkubation in Anwesenheit von NB-Medium durch. Zudem entwickelten wir den Blot anschließend mit 4G10 1:500.

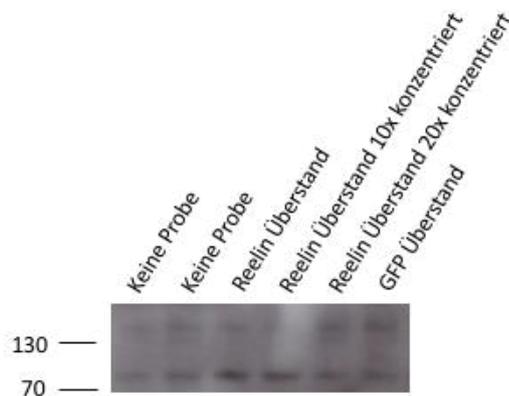


Abb. 3.34 Dab Phosphorylierungs Assay

Westernblot nach Immunpräzipitation mit einem Anti-Dab Antikörper, Staining 4G10 Anti-Phospho-AK. Keine Probe: keine zusätzliche Zugabe zu den primären Neuronen. Inkubation mit zusätzlich 500µl normalem, 10fach oder 20fach konzentriertem Reelin Überstand, oder mit 500 µL GFP Überstand. 80 kDa Bande intensiver mit Reelin Überstand und 10 fach konzentriertem Reelin Überstand. Reelin führt zu einer Dab Phosphorylierung

In diesem Experiment konnten wir die Dab-Phosphorylierung nach Inkubation der primären Neuronen in Anwesenheit von Reelin Überstand nachweisen (siehe Abb. 3.34).

Bei erhältlichem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes Dab 1 konnte im nächsten Durchgang auf die Immunpräzipitation verzichtet werden.

3.8.2 Ergebnis

In der Testung der Antikörper auf mögliche *in vitro* Funktionalität testeten wir diese in Kombination zu einer Reelin Inkubation. Eine nennenswerte Reduktion des Anteils an phosphoryliertem Dab1 konnte nicht nachgewiesen werden. Bei Inkubation mit dem Antikörper 11G11 fiel ein absolutes Fehlen der typischen 90 kDa Bande, also von Dab 1 sowohl phosphoryliert als auch nicht phosphoryliert auf (siehe Abb. 3.35). Fraglich zeigte sich eine geringere Phosphorylierung nach Inkubation mit dem kameliden Antikörper 24D6.

Nach densitometrischer Auswertung zeigte sich ein signifikanter Unterschied der einzelnen Gruppen untereinander; $X^2(8) = 20,614, p = 0,008$. Nach Bonferoni Korrektur ($0,05/8 = 0,006$) konnte im Einzelvergleich der Proben zur Kontrollprobe kein signifikantes Ergebnis nachgewiesen werden (24D6/ 24H10/ 1949E11/ PFHM/ 12G2 versus Kontrolle jeweils $p = 0,05$). Die Kontrolle mit PFHM Überstand zeigte ebenfalls ein deutlich erniedrigte Phosphorylierung, sodass die Maus Antikörper Wirkung weiter unklar verbleibt, und ein erneuter Versuch mit gegen DBS dialysierte Antikörper Proben durchgeführt wurde (siehe Abb.: 3.35).

Die kameliden Antikörper zeigten im Falle von 24D6 eine geringere mediane Phosphorylierung, bei 24H10 eine höhere Phosphorylierung. Bei der Untersuchung der c-terminalen kameliden Antikörper schwankten die einzelnen Messung im Vergleich zu den n-terminalen Antikörper.

Bei Fehlen von sowohl Dab als auch phosphoryliertem Dab bei Kultivierung in Anwesenheit von 11G11 führten wir einen erneuten Assay mit zwei unterschiedlichen Proben des 11G11 Antikörpers durch. Hierbei wurde primäre Neurone mit jeweils 71ng Antikörper zusätzlich zu Reelin Überstand versus GF Überstand inkubiert.

Reelin führte zu in der densitometrischen Auswertung nach Normalisierung der Proteinprobenmenge mittels β -Tubulin zu einer Zunahme des phosphoryliertem Dab 1. Dies war Abhängig vom Zeitintervall. Der Effekt trat nach 60 minütiger Inkubation der primären Neurone, mit Reelin Überstand versetzt, ein (Reelin 0,84, GFP 0,77), der größte Effekt jedoch zeigte sich nach 2 h Inkubation (Reelin 1,82, GFP 1,23). Der Effekt nach 2 h konnte in 3 von 4 Testungen nachgewiesen werden.

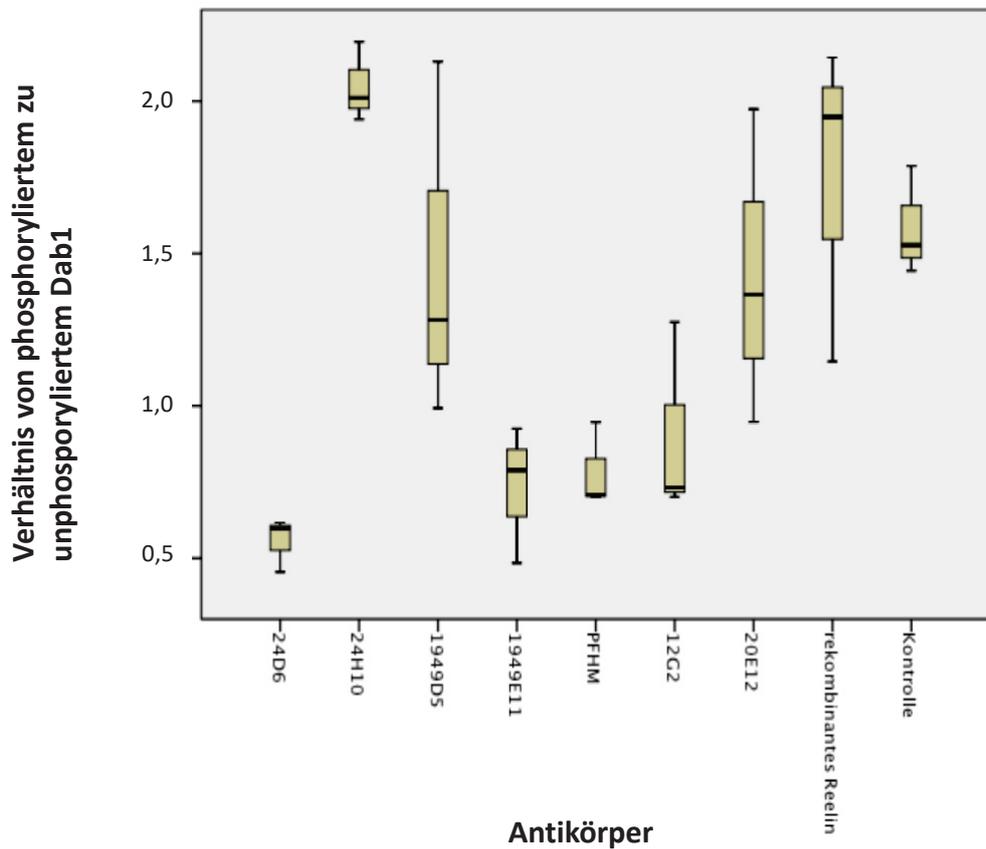
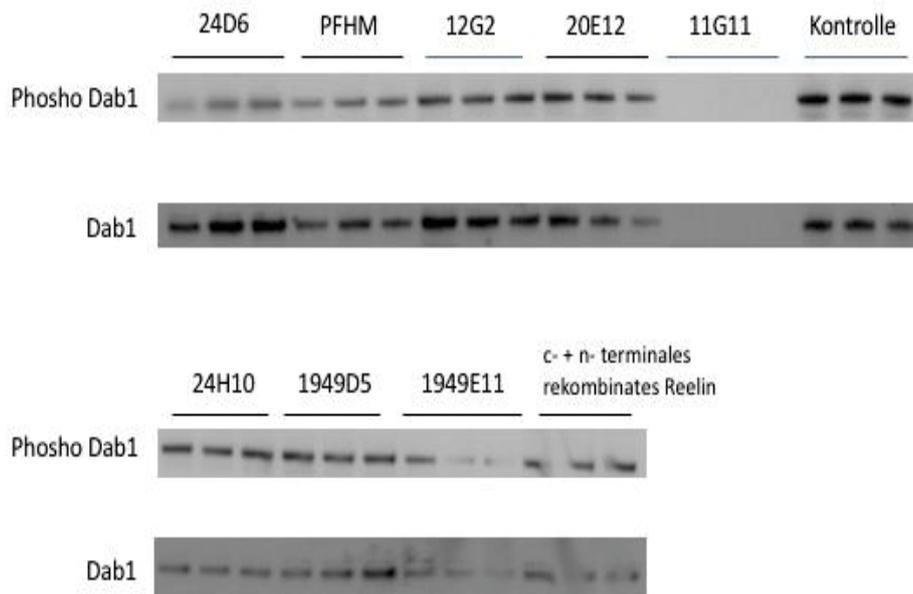


Abb. 3.35: Dab- Phosphorylierungsassay mit Testung der Antikörper auf in vitro Aktivität
 Western blot Analyse des Dab 1, sowie phosphoryliertem Dab 1 Gehalt nach Inkubation von primären Neuronen mit Antikörpern als auch rekombinantem Reelin
 Bei 11G11 fehlt die charakteristische 90 kDa Bande jedoch auch im nicht phosphoryliertem Dab.
 24D6 fragliche geringe Phosphorylierung war in der statistischen Auswertung nicht signifikant nach Bonferoni- Korrektur ($0,05/8=0,006$), $p = 0,05$.

Bei Inkubation mit dem Antikörper 11G11 konnte in einer Testung eine deutliche Reduktion des phosphorylierten Dab 1 nach 2 h sowohl mit Reelin Überstand als auch GFP Überstand nachgewiesen werden. Jedoch war dies in der Testung mit einer anderen Charge des 11G11 Antikörpers nicht nachweisbar.

Zusammenfassend konnten wir den Assay erfolgreich etablieren und die Methoden anpassen. Nach Applikation der unterschiedlichen Antikörper zeigte sich kein reproduzierbarer Effekt auf das Ausmaß der Dab Phosphorylierung für die konventionellen Antikörper. Bezüglich der kameliden Antikörper konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

3.9 Stripe assay

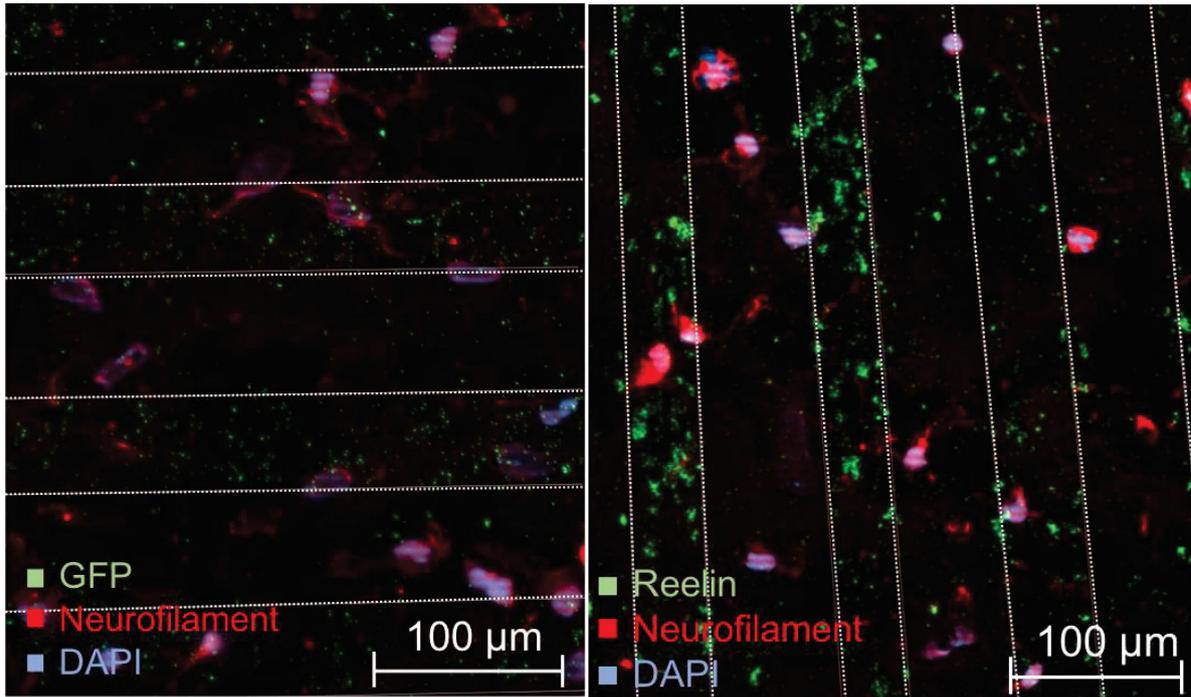
Zur Testung einer möglichen Bioaktivität der Antikörper führten wir analog zu (Methode) einen Stripe assay durch. Hierbei wurden Reelin Streifen, durch eine Mischung des Proteins mit fluoreszierenden Partikeln, auf Coverslips aufgetragen. Anschließend wurden die jeweiligen Testsubstanzen aufgetragen, sodass die jeweiligen Antikörper auf dem gesamten Coverslip, Reelin nur im Bereich der gefärbten Streifen zu finden war.

Nach einer immunhistochemischen Färbung der Neurone und Begutachtung unter dem Mikroskop, führten wir die Auswertung äquivalent zu Chai et al (2009) durch. Verglichen wurden die Anzahl der Neuronen, die Anzahl der auf dem Stripe befindlichen Neuronen, sowie die Menge der ausgebildeten Neuriten auf und außerhalb der Stripes.

Zunächst wurden Reelin Streifen gegen eine Negativkontrolle, GFP Streifen, getestet. Hierbei wuchsen die Neuriten nur im Reelin Streifen, wenn die dazugehörigen Neurone ebenfalls auf einem Reelin Streifen angewachsen waren. Insgesamt waren weniger Neuriten, die ebenfalls weniger verzweigt und kürzer waren, in den Reelin Streifen als in GFP Kontrollstreifen (Siehe Abb.: 3.36).

In der Negativkontrolle (GFP Streifen/ GFP) wuchsen zusätzlich Neuriten auch von Neuronen, die nicht auf den gefärbten Streifen angewachsen waren, in diese hinein. Somit konnte der obengenannte hemmende Effekt nicht durch die fluoreszenten Partikeln erklärt werden, sondern auf die Wirkung von Reelin zurückgeführt werden. Zusätzlich waren insgesamt weniger Neurone auf den Coverslips mit Reelin ($Mdn = 4$) als auf denen mit GFP ($Mdn = 13$).

A



B

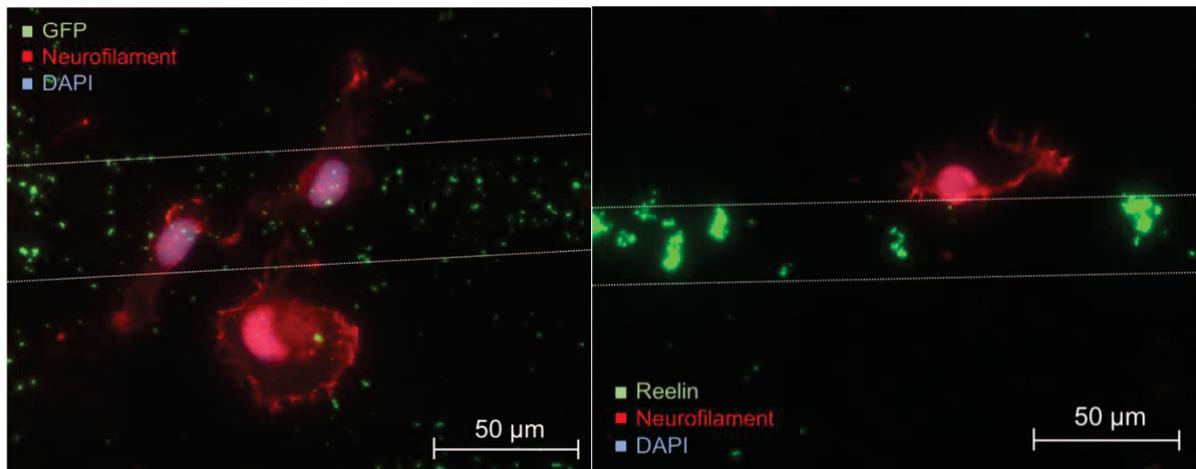
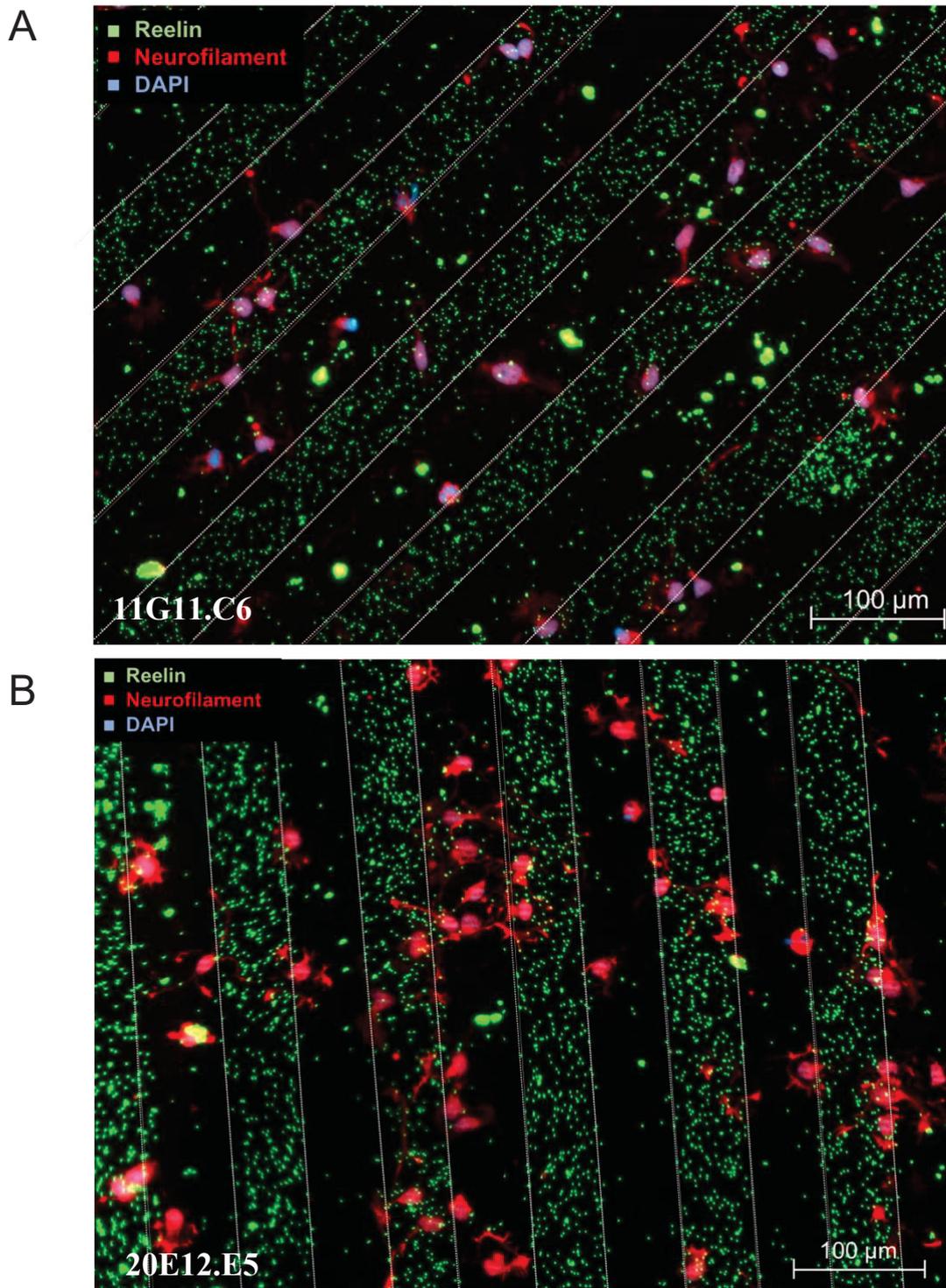


Abb. 3.36: Stripe Assay Testung Reelin vs. GFP mit GFP Negativkontrolle, repräsentative Auswahl
A: Übersichtsaufnahmen, B: Detailaufnahmen. In GFP/GFP zeigen sich insgesamt mehr Neurone mit ausgeprägten Neuriten die sich wie in B sichtbar auch innerhalb der grünen Streifen bilden und verzweigen. Gegensätzlich hierzu ist RLN/GFP (rechts) wo die Neuriten vor allem außerhalb der grünen Streifen wachsen. In B sieht man das bei Neuronen die an der Grenze zu den grünen Streifen liegen, die Neuriten von den Streifen weg wachsen.

Zur Testung der Maus Antikörper wurden grün fluoreszierende Partikel mit Reelin Überstand gemischt und anschließend als Streifen aufgetragen. Anschließend wurde der Coverslip mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert und primäre Neurone ausplattiert.

Hier wurde bei den beiden im Überstand und im Lysat positiven Maus Antikörper, 20E12.E2 sowie 11G11.C6 ein vermehrtes Neuritenwachstum in den grünen Reelin-

Streifen nachgewiesen (siehe Abb. 3.37). Das Wachstumsmuster zeigte ähnlich der GFP/GFP Kontrolle ebenfalls Neuriten im Reelin-Streifen, deren Zellkern auf dem Kontrollstreifen war. In beiden Fällen waren im Median mehr Neurone angewachsen als in der RLN/GFP Kontrolle (20E12.E5: $Mdn = 19,5$; 11G11.C6: $Mdn = 22$, RLN/GFP: $Mdn = 4$).



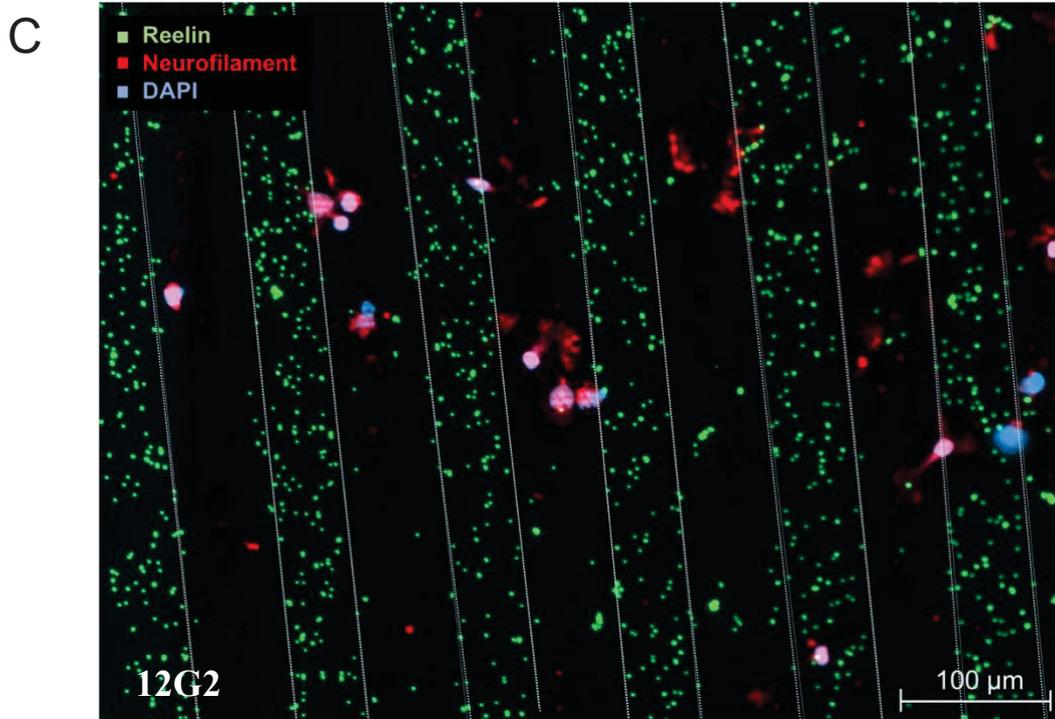


Abb. 3.37 Stripe Assay: Testung der konventionellen (murinen) Antikörper, repräsentative Auswahl Inkubation mit A: 11G11.C6; B: 20E12 ;C: 12G2 (murine anti-Reelin Antikörper)
Bei Zugabe von 11G11 sowie 20E12 zeigen sich vermehrte Neuriten innerhalb der Reelin Streifen, nicht bei 12G2.

Bei Inkubation mit 12G2 konnte sich der Reelin Effekt nicht inhibiert werden. So zeigte sich weiterhin vornehmlich ein Neuritenwachstum außerhalb der gefärbten Streifen. Im Vergleich von 12G2 zu den 20E12.E5 und 11G11.C6 waren im Median weniger Neurone angewachsen (12G2: *Mdn* = 14) im Vergleich zu der RLN/GFP Kontrolle jedoch mehr.

Die Testung der kameliden Antikörper erfolgte ähnlich zur Testung der konventionellen Antikörper. Nach Inkubation mit 3 ausgewählten kameliden Antikörpern zeigten sich bei einem N-terminalen (24H10) als auch bei einem C-terminalen (1949E11) Antikörper ein im Vergleich zur RLN/GFP Kontrolle vermehrtes Neuritenwachstum in den grünen Reelin- Streifen (siehe Abb. 3.38). Im Fall von 24D6 zeigte sich dieser Effekt nicht. Auch die Anzahl der angewachsen Neurone war bei allen 3 Antikörpern mehr als in der RLN/GFP Kontrolle (26D6: *Mdn* = 11, 24H10: *Mdn* = 22, 1949E11: *Mdn* = 25, RLN/GFP: *Mdn* = 4). Am wenigsten waren im Median bei Inkubation mit 24D6, am meisten bei Inkubation mit 1949E11 zu finden.

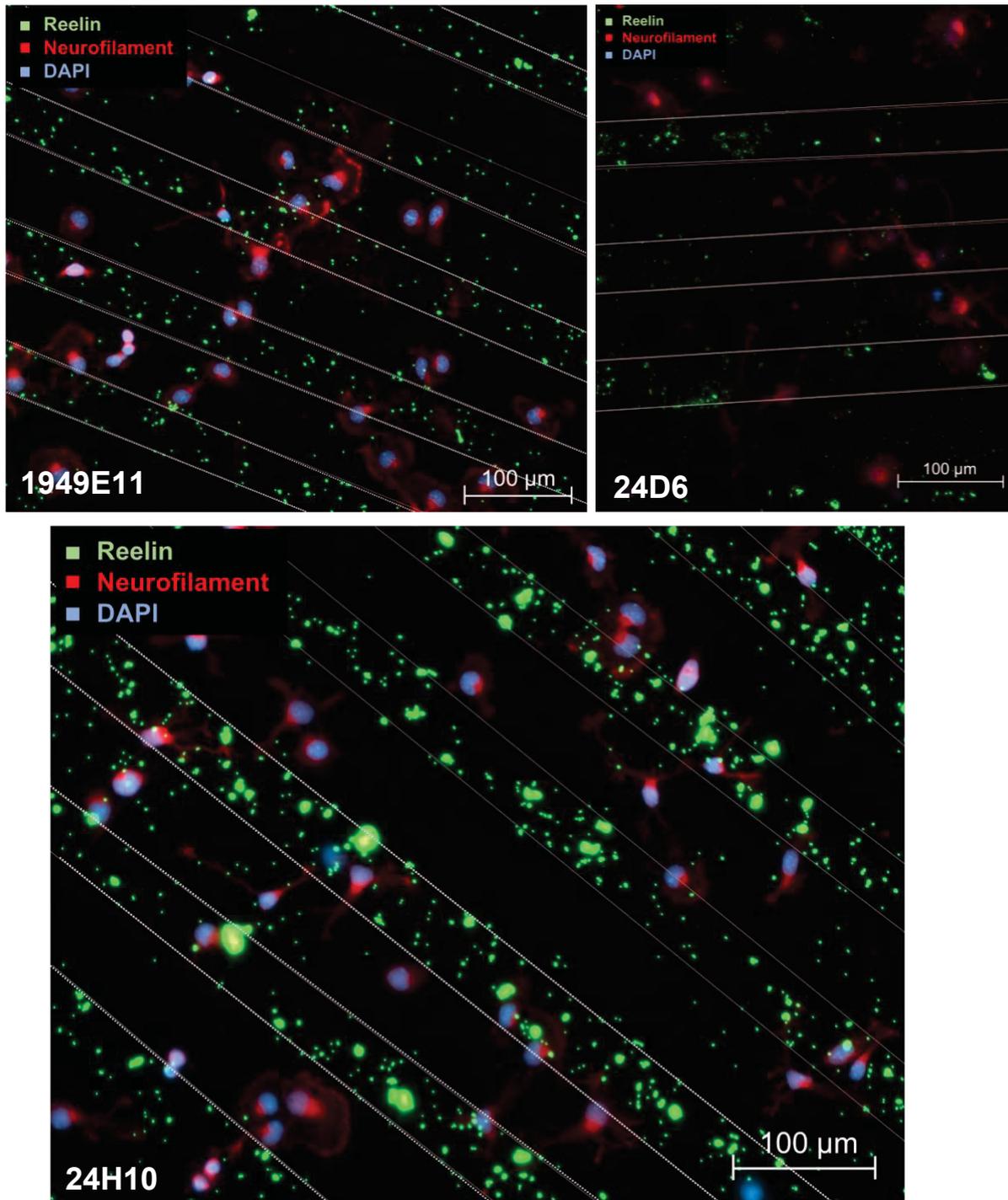


Abb. 3.38: Stripe Assay Testung der kameliden Antikörper, repräsentative Übersichtsaufnahmen Inkubation mit kamelide Antikörper 24D6; 1949E11; 24H10 .Bei Zugabe von 1949E11 und 24 H10 zeigte sich mehr Neuritenwachstum in den Reelin- Streifen, nicht bei 24D6

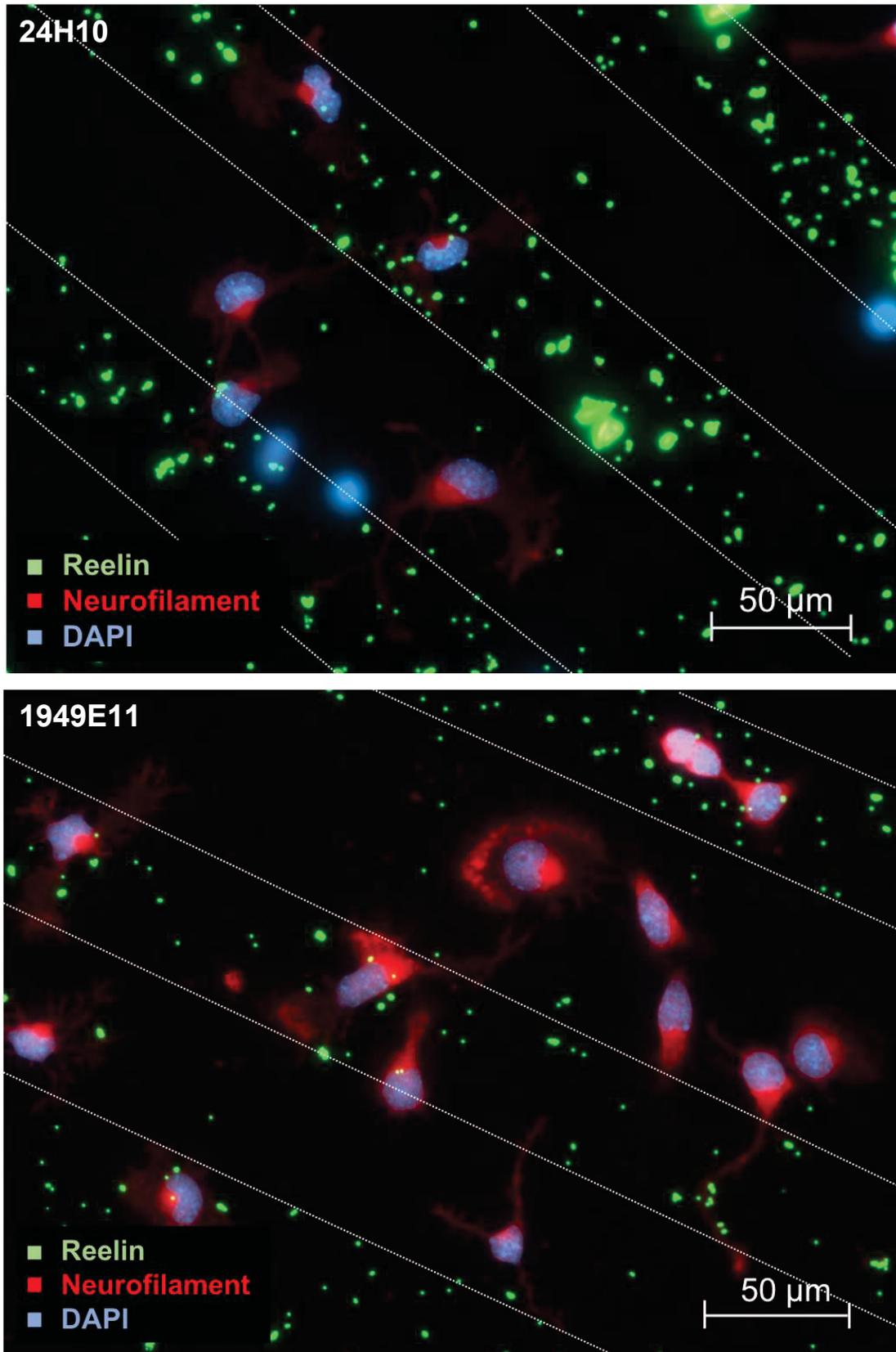


Abb. 3.39: Stripe Assay Testung der kameliden Antikörper, repräsentative Detailaufnahmen Inkubation mit kamelide Antikörper 1949E11; 24H10 . Bei Zugabe von beiden Antikörpern zeigte sich mehr Neuritenwachstum in den Reelin- Streifen.

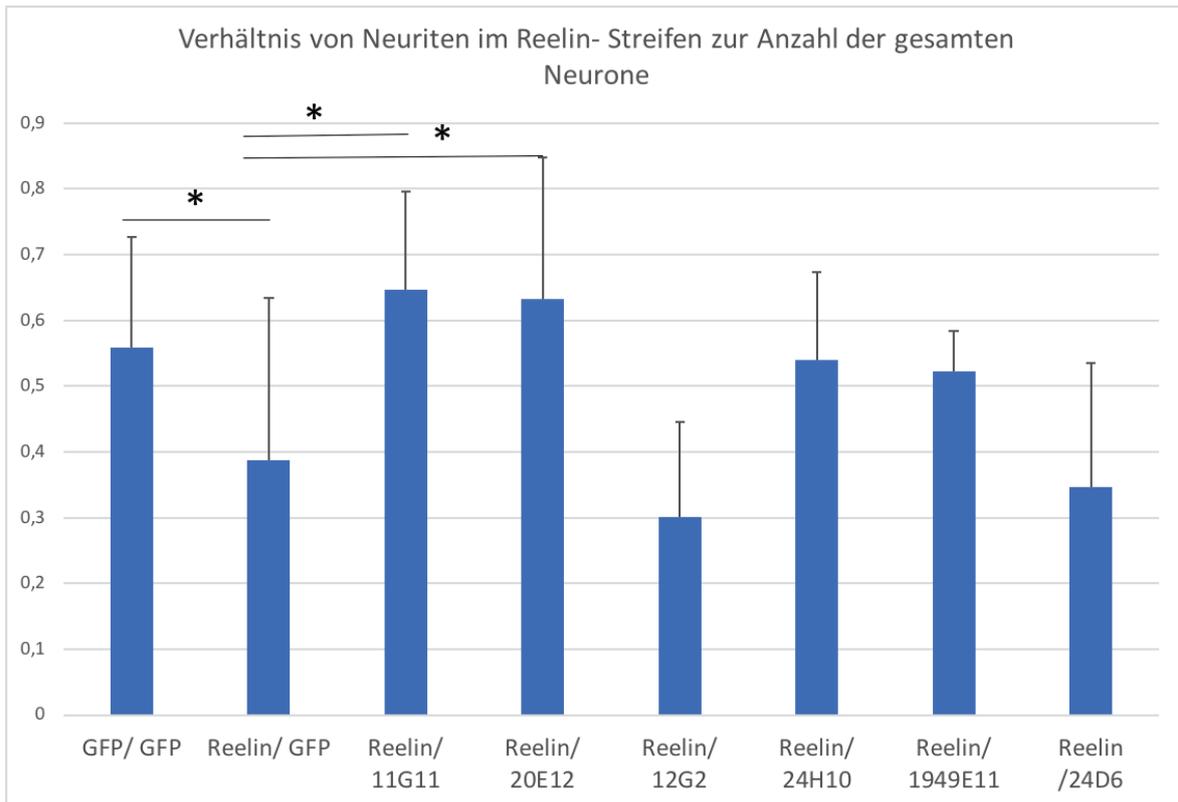


Abb. 3.40: Auswertung der Stripe Assays

Gezählt wurden die im grünen (Reelin) Streifen wachsenden Neuriten und im Verhältnis der Gesamtneurone im Bildausschnitt verglichen. Mit * sind die signifikanten Unterschiede gekennzeichnet, Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Mit Reelin in den Streifen (Reelin/GFP) zeigt sich eine signifikant geringere Menge als in GFP Streifen (GFP/GFP); $p = 0,002$. 11G11 und 20E12 konnten die Reelin Wirkung signifikant inhibieren; $p < 0,001$

Zur genaueren Auswertung zählten wir die jeweils im grünen Reelin Streifen gewachsenen Neuriten. Bei großen Schwankungen in der Anzahl der Neurone, wurde das Verhältnis von Neuriten zu Neuronen zur weiteren Berechnung genutzt. Im Vergleich der Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden; *ANOVA*: $F(7, 102) = 8,985$, $p < 0,001$. Post hoc Vergleiche auf einem korregiertem α -Fehlerniveau bestätigten das sowohl die Negativ- Kontrolle mit GFP Streifen, als auch die Antikörper 11G11. C6 und 20E12.E5 ein signifikant höheres Verhältnis von Neuriten im grünen Streifen zu Neuronen hatten im Vergleich zur Positiv- Kontrolle (Reelin- GFP); *Post hoc Vergleiche*: 1. Negativ- Kontrolle: $D = -0,2385$, $p = 0,002$, 2. 11G11.C6: $D = -3,192$, $p = 0,000009$, 3. 20E12.E5: $D = -0,3204$, $p = 0,000008$. 12G2 zeigte keinen Unterschied.

Für die kameliden Antikörper konnte keine Signifikanz im Vergleich zur Positiv- Kontrolle erreicht werden. Jedoch zeigten sowohl 1949E11 und 24H10 von der Tendenz ebenfalls ein erhöhtes Verhältnis (Reelin/ GFP: $M = 0,32$, 1949E11: $M = 0,524$, 24H10:

$M = 0,549$; *Post hoc Vergleiche*: 24H10: $D = -0,2207$, $p = 0,061$, 1949E11: $D = -0,1961$, $p = 0,092$). 24D6 zeigte keine Inhibierung der Reelinwirkung.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass das Wachstumsmuster mit und ohne Reelin sich signifikant unterscheidet. Nach Inkubation mit den entwickelten Maus Antikörper konnten wir ein Wachstumsmuster ähnlich dem ohne Reelin, im Fall von 11G11.C6 und 20E12.E5, nachweisen. Somit ist davon auszugehen, dass diese die Reelinwirkung inhibiert haben. 12G2 zeigte ein Wachstumsmuster ähnlich dem in Anwesenheit von Reelin.

Die Kameliden Antikörper 24H10 und 1949E11 zeigten ebenfalls ein Wachstumsmuster ähnlich des ohne Reelin und somit ebenfalls eine in- vitro Aktivität. 24D6 konnte ähnlich wie 12G2 die Reelinwirkung nicht inhibieren.

4. Diskussion

Reelin ist ein 388 kDa großes extrazelluläres Matrixprotein, das während der embryonalen Phase von Cajal Rezinus Zellen gebildet wird (D'Arcangelo, Miao et al. 1995, Ogawa, Miyata et al. 1995, Frotscher 1998). Bereits 1997 erfolgte die Immunisierung von Reeler Mäusen mit Wildtyp Maus Gehirnhomogenaten (Ogawa, Miyata et al. 1995).

Hierbei konnte ein Antikörper CR 50 identifiziert werden der den N-terminalen Teil von Reelin bindet (D'Arcangelo, Nakajima et al. 1997). Das zentrale Fragment (Domäne 3-6) bindet an ApoER2 sowie VLDLR und bedingt somit eine Dab1 Phosphorylierung (Jossin, Ignatova et al. 2004)

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es Reelinfragmente zu klonieren und bakteriell zu exprimieren. Diese wurden anschließend zur Immunisierung von Mäusen und Llamas genutzt. Wir charakterisierten die Antikörper und führten anschließend in vitro Versuch zur Testung der Wirksamkeit durch.

4.1 Klonierung und Expression von Reelinfragmenten

Bei bekannter Immunität des N- terminalen Anteils von Reelin (D'Arcangelo, Nakajima et al. 1997) klonierten und exprimierten wir dieses Fragment zu Nutzung der Immunisierung. Das zentrale Fragment (Domäne 3-6) bindet an ApoER2 sowie VLDLR und bedingt somit eine Dab1 Phosphorylierung (Jossin, Ignatova et al. 2004). Auch dieses Fragment wurde daher zur geplanten Immunisierung kloniert.

Da es zur Proteinklonierung in *Escheria coli* eine große Vielfalt an unterschiedlichen Vektoren gibt, sowie die Expression durch ein schnelles Wachstum und kostengünstige Expressionsbedingungen charakterisiert ist, ist dies eine gängige und häufig genutzte Methode zur Herstellung von rekombinanten Proteinen (Baneyx 1999). Daher entschieden wir uns ebenfalls für *E.coli*.

Da Reelin ein sekretiertes Protein ist (D'Arcangelo 1997) wählten wir als Vektor Pet22b+, da dieser eine PelB Leader Sequenz besaß. Diese PelB Sequenz führt zu einer Sekretion in den periplasmatischen Raum des *E. coli*s, und dort zu einer Proteolyse ähnlicher nach Sekretion im menschlichen Körper (Makrides 1996). Somit erhält man den wahren n-terminus (Makrides 1996). Das N- terminale Proteinfragment konnte hierbei in einer ausreichenden Menge auch mit einer ausreichenden Reinheit exprimiert und anschließend aufgereinigt werden.

Im Falle des größeren c-terminalen Anteils zeigte sich zusätzlich ein Fragment das 17 kDa groß war. In *E.coli* finden sich mehrere Proteasen die zu einer vorzeitigen Proteolyse führen könnten (Maurizi 1992, Makrides 1996). Unter einer niedrigeren Expressionstemperatur konnte der Anteil des kleineren Fragmentes reduziert werden. Die Proteolyse im periplasmatischen Raum ist bereits niedriger als bei einer cytoplasmatischen Expression (Talmadge and Gilbert 1982).

Eine weitere Möglichkeit der immer gleich großen Proteolyse ist eine Ähnlichkeit der PelB Leader Sequenz mit der C-terminalen Proteinsequenz.

Die multiplen Proteasen gestalteten ebenfalls die Expression des Minireelins schwierig. Hier konnte man jedoch im Vergleich zu dem C-terminalen Teil viele unterschiedlich große Fragmente des Reelin Proteins nachweisen. Der Gehalt an voller Länge Minireelin war vor allem im Unlöslichen Anteil der Expression zu finden. Ein Grund hierfür kann eine Überproduktion sein, die zu einer Fehlfaltung und im Anschluss einer Akkumulation in unlöslichen Aggregate (*inclusion bodies*) führen kann (Baneyx 1999). Um diese Rate zu verbessern wurde auch im Falle des Minireelins die Temperatur erniedrigt, als gängige Methode (Makrides 1996).

Je größer die Proteine und je komplexer diese gefaltet sind, vor allem mit vielen Disulfidbrücken, umso häufiger bilden sich unlösliche Aggregate (Baneyx and Mujacic 2004). Dies erklärt auch weshalb die Expression und Aufreinigung sich schwieriger gestaltete je größer die rekombinanten Reelin Fragmente wurden.

Die Refaltung nach Aufreinigung der unlöslichen Aggregate ist nicht häufig (Baneyx 1999). Dies war ebenfalls ein Grund sich für die periplasmatische Expression zu entscheiden, da hier durch ein anderes Milieu die richtige Faltung wahrscheinlicher wird (Missiakas and Raina 1997).

Trotz aller Anpassung war es nicht möglich ein Minireelin als kleinere Version des vollen Länge Proteins, bestehend aus dem zuvor klonierten N-terminalen und c-terminalen Anteils, herzustellen.

4.2 Generierung und Charakterisierung der konventionellen Antikörper

Eine gängige Methode zur Entwicklung einer Zelllinie die stabil Antikörper produzieren ist die 1975 entwickelte Hybridomen Methode (Kohler and Milstein 1975). Hierbei werden die Splenozyten mit immortalisierten Myelomazellen fusioniert (Kohler and Milstein 1975). Hierzu werden nicht antikörperproduzierende Myeloma Zellen genutzt (Kearney, Radbruch et al. 1979). Der Vorteil dieser Methode der Gewinnung monoklonaler Antikörper ist die hohe Variabilität der gewonnen Antikörper (Ackermann 1988).

Im Gegensatz zu der Generierung des bekannten CR 50 Antikörpers (Ogawa, Miyata et al. 1995) wurde um spezifischere Antikörper zu generieren, rekombinantes Reelin zur Immunisierung genutzt. Hierbei konnten nach Fusion und Selektionierung der Klone drei Gruppen von N-terminalen Antikörper identifiziert werden.

Wir fanden in der ersten Gruppe Antikörper die Reelin sowohl im Überstand der Zellkultur als auch im Zelllysate (mittels Urea) banden. Der 11G11 als auch der 20E12 zeigten ein gleiches Bindungsverhalten wie der bereits etablierte G10 anti- Reelin Antikörper, der das Epitop von Aminosäure 199- 244 (de Bergeyck, Nakajima et al. 1997). Ähnlich hierzu banden 11G11 und 20E12 ebenfalls zwischen Aminosäure 200- 300.

Zusätzlich hierzu konnten wir zwei weitere Gruppen identifizieren. In der zweiten Gruppe konnten wir Antikörper identifizieren die im Western- Blot zwar den Reelin Überstand nicht aber das Lysat erkannten. Exemplarisch erfolgte die weitere Untersuchung und auch Subklonierung von 12G2 um einen möglichen Mischklon als Ursache für das Ergebnis auszuschließen. Diese Gruppe an Antikörpern war durch ein Epitop zwischen Aminosäure 100- 200 charakterisiert. Durch die Lysierung der Zellen mittels Urea denaturieren Proteine, sodass diese in einer anderen Faltung als nativ vorliegen (Rossky 2008). Eine mögliche Erklärung ist daher, dass nach Urea die Epitope für die Antikörper nicht mehr zugänglich sind.

Die dritte Gruppe bildet eine inhomogene Gruppe von Antikörpern die im Western Blot weder Reelin im Überstand noch im Zelllysate erkennt. Hier konnten Epitope zwischen Aminosäure 100- 200, ähnlich denen in der zweiten Gruppe, als auch Aminosäure 300- 400 nachgewiesen werden. Auffällig war, dass kein Antikörper mit einem Epitop zwischen Aminosäure 300- 400 Reelin der vollen Länge binden konnte.

C-terminale Antikörper mit einem Epitop 3260 bis 3461 bzw. 3260 bis 3428 konnten 1998 identifiziert werden (de Bergeyck, Naerhuyzen et al. 1998). Einer der beiden Antikörper zeigte dabei nur ein Bindungsverhalten in der immunhistochemischen Färbung von Cajal Reelin Zellen (de Bergeyck, Naerhuyzen et al. 1998). Wir konnten keinen c-

terminalen Antikörper gegen Reelin 1949- 2662 identifizieren, der Reelin im Western Blot binden konnte. Eine immunhistochemische Untersuchung erfolgte jedoch nicht, sodass eine weitere Untersuchung sinnvoll erscheint.

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Westernblot Aktivität der c-terminalen Antikörper könnte eine mögliche Fehlfaltung des rekombinanten Reelinfragment (Baneyx and Mujacic 2004) sein.

4.3. Generierung und Charakterisierung der kameliden Antikörper

Die hypervariablen Regionen (CDR, complementarity region) sind in kameliden Antikörper deutlich größer (Nguyen, Hamers et al. 2000) Die gebildete Sekundärstruktur (Loops) der hypervariablen Regionen des Paratops der kameliden Antikörper führen zu einem größeren Antigenbindungs- Repertoire (Decanniere, Muyldermans et al. 2000). So können zum Beispiel aufgrund der Struktur sonst nicht zugängliche Epitope erkannt und gebunden werden (Nguyen, Hamers et al. 2000, Muyldermans 2001). Heavy chain Antikörper wurden bereits gegen unterschiedliche Proteine erfolgreich hergestellt, unter anderem Aβ im Bereich der Alzheimerforschung (Hellmert, Muller-Schiffmann et al. 2015). Daher entschlossen wir uns die rekombinanten Reelin Fragmente ebenfalls zur Immunisierung eines Llamas zur Gewinnung von kameliden Antikörper zu nutzen.

Nach Immunisierung und Isolation der Lymphozyten wurde entsprechend des Protokolls Tomlinson I+J und dem von Galanis 1999 (Galanis, Irving et al. 2001) eine Bakteriophagenbibliothek erfolgreich hergestellt. Diese hatte mit $6 \cdot 10^6$ eine annehmbare Komplexität. Nach mehreren Selektionsschritten konnten wir im ELISA insgesamt 18 positive N-terminale und 40 positive C-terminale Antikörper identifiziert. Diese wurden sequenziert und jeweils 2 unterschiedliche Antikörper zu weiteren Testung ausgewählt. Für die N-terminalen Antikörper waren es 24D6 sowie 24H10, im Falle der C-terminalen Antikörper 1949D5 und 1949E11.

24D6 als auch 1949D5 banden im ELIFA das volle Länge Reelin im Überstand. Aufgrund des fehlenden FC Teils der kameliden Antikörper (Muyldermans 2001), war neben dem primären und dem sekundären Antikörper eine Inkubation mit einem anti-myc Antikörper zusätzlich notwendig. Die Entwicklung des ELIFA mit 3 nach einander hinzugefügten Antikörper macht diesen anfälliger für Fehler.

4.4 Untersuchung unterschiedlicher humanen Proben

Zur Untersuchung von unterschiedlichen humanen Proben nutzten wir die zuvor beschriebenen n-terminalen Antikörper 11G11.C6 sowie 20E12.E5.

Reelin ist aktuell im Verdacht eine Rolle in mehreren neurodegenerativen als auch psychiatrische Erkrankungen zu spielen (Fatemi, Earle et al. 2000, Habl, Schmitt et al. 2012).

Wir konnten Reelin, vor allem das 180 kDa große Fragment, in Liquorproben von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen, psychiatrischen Erkrankungen sowie in der Kontrollgruppe nachweisen, äquivalent zu den vorherigen Untersuchungen (Saez-Valero, Costell et al. 2003). Die vorbeschriebene höhere Konzentration an Reelin in Liquorproben von Patienten mit frontotemporaler Demenz als auch Alzheimer Demenz (Saez-Valero, Costell et al. 2003), konnten wir nicht nachweisen.

Die Proben zeigten untereinander einen signifikanten Unterschied, jedoch nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Trotzdem fiel eine geringere Reelinmenge vor allem in Patienten mit Depression auf.

Die Untersuchung einer kleinen Population von Liquorproben bei schizophrenen Patienten konnte bisher keine Reelin Reduktion nachweisen (Ignatova, Sindic et al. 2004), auch in unserer Untersuchung von 6 Liquorproben zeigte sich von der Tendenz eher ein vermehrtes Vorkommen ohne Signifikanz.

Die Auswertung der Liquorproben folgte äquivalent zu Ignatova et al (2004) durch Auftragen einer definierten Menge des Liquors. Jedoch fiel auf, dass ein großer Unterschied in dem Proteingehalt der einzelnen Proben vorlag. Nach erneuter Untersuchung mit zuvor erfolgter Proteinmengenanpassung gelang es nicht mehr den zuvor beschriebenen Unterschied nachzuweisen.

Bei jedoch einer nur sehr kleinen Kontrollgruppe von nur 3 Liquorproben wäre eine weitere Untersuchung notwendig um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten.

Da Plasmazellen ebenfalls Reelin beinhalten (Underhill, George et al. 2003) und in eine höhere Plasmakonzentration von Reelin bei Patienten mit einer diagnostizierten Schizophrenie während des ersten halluzinatorischen Schubes festgestellt wurde (Hornig, Haas et al. 2015) untersuchten wir den Reelingehalt von immortalisierten Lymphoblasten von Patienten mit Schizophrenie. Hierbei konnten wir im Gegensatz zu der vorbeschriebenen nicht signifikanten Erhöhung der Plasmakonzentration (Hornig, Haas et al. 2015) eine signifikant geringere Reelinkonzentration in Lymphoblasten von Schizophrenen nachweisen; $p = 0,019$.

Passend hierzu wurden bereits in post-mortem Gehirnuntersuchungen zuvor eine geringe Konzentration im präfrontalen Kortex von Schizophrenen gefunden (Impagnatiello, Guidotti et al. 1998, Guidotti, Auta et al. 2000). Gängige antipsychotische Medikamente haben Einfluss auf die Promotermethylierung von Reelin und somit auf die Reelinkonzentration (Dong, Nelson et al. 2008).

Jedoch waren die Schwankungen innerhalb der Gruppe der Schizophrenen als auch der Kontrollgruppe bei der Untersuchung des Lymphoblasten Reelins recht hoch. Ähnliche Schwankungen wurden auch in der Untersuchung der Plasmakonzentration (Hornig, Haas et al. 2015) gefunden. Insgesamt erscheint es sinnvoll aufgrund der Schwankungen eine weitere Untersuchung größerer Gruppen durchzuführen.

4.5 Testung auf in-vitro Aktivität

Mittels eines Dab-Phosphorylierungs-Assay als auch einem Stripe Assay wurden die Antikörper auf eine mögliche in vitro Aktivität getestet.

Da durch Bindung von Reelin eine Tyrosin-phosphorylierung von Dab1 (*disabed 1*) bedingt wird (Howell, Herrick et al. 1999, Howell, Herrick et al. 2000, Keshvara, Benhayon et al. 2001), versuchten wir diese in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Reelin gewonnen in HEK- Zell Kulturen, in primären Zellkulturen nachzuweisen.

Wie bereits zuvor (Hiesberger, Trommsdorff et al. 1999, Mayer, Duit et al. 2006), konnten wir nach Anpassung der Methode eine Reelin abhängige Dab-Phosphorylierung nachweisen. Einen signifikante Minderung der Dab-Phosphorylierung nach Inkubation mit den gewonnen Antikörpern konnte nicht nachgewiesen werden. Als Hinweis auf eine mögliche Wirksamkeit war die Dab- Phosphorylierung, nach densitometrischer Auswertung, bei Inkubation mit den VHH Antikörpern 24D6 und 1949E11 niedriger als in der Reelin Kontrollgruppe. Bei einer nur kleinen Untersuchungsmenge (n=3) ist die statistische Auswertung fehleranfälliger, sodass eine erneute Untersuchung mit größerer Anzahl sinnvoll erscheint.

Ein verminderter Reelin Gehalt führt zu einer verminderten Ausbildung von dendritischen Spines (Liu, Pesold et al. 2001, Pappas, Kriho et al. 2001, Niu, Renfro et al. 2004) ebenso wie eine Minderung von Dab1 (Niu, Renfro et al. 2004, Dumanis, Cha et al. 2011). Mittels eines Stripe Assay unter Auftragen von Reelin-Streifen im Vergleich zu Kontroll-Streifen wurde entsprechend des Protokolls nach Knöll et al (Knoll, Weinl et al. 2007) zytoskeletale Änderungen beobachtet. In unserem Stripe Assay konnte ein

vermehrtes Neuritenwachstum mit vermehrter Bildung von Mikrospikes in den Kontrollstreifen im Gegensatz zu den Reelin-Streifen bestätigt werden (Chai, Forster et al. 2009).

Bei Inkubation mit 11G11.C6 und 20E12.E5 konnte die Reelinwirksamkeit inhibiert werden. Auch im Fall von den kameliden Antikörpern 24H10 und 1949E11 wurde die Reelinwirkung auf die Neuritenbildung in unterschiedlicher Stärke, jedoch nicht signifikant gemindert. Somit kann von einer Wirksamkeit der Antikörper im Stripe Assay ausgegangen werden. Bei jedoch geringer Testmenge, sowie schwer objektivierbarer Auswertung ist ein Bias nicht auszuschließen.

Zusammenfassend wurde die Zielsetzung der Doktorarbeit erfüllt. Es gelang 2 unterschiedliche rekombinante Reelinfragmente zu exprimieren. Wir konnten im Maus Modell unterschiedliche N-terminale Antikörper identifizieren, die auch im Western Blot Reelin zuverlässig identifizierten. Dieses gelang uns für die C-terminalen Antikörper nicht. Kamelide Antikörper gegen Reelin konnten ebenfalls generiert werden und jeweils ein auch im ELISA (volle Länge Reelin) positiven Klon sowohl N-terminal als auch C-terminal identifiziert werden. Eine in- vitro Aktivität konnte weder für die konventionellen noch für die kameliden Antikörper mit Sicherheit nachgewiesen werden, sodass dies bezüglich weitere Untersuchungen benötigt werden. Jedoch zeigten sich Hinweise auf eine mögliche Wirksamkeit von 11G11.C6, 20E12.E5 (N-terminal) als auch die kameliden Antikörper 1949E11 (C-terminal) und 24H10 (N-terminal).

11G11 und 20E12 als n-terminale Antikörper identifizierten ebenfalls zuverlässig Reelin in humanen Liquorproben als auch in Lysaten von immortalisierten Lymphoblasten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Proben konnte nur im Vergleich von Schizophrenen vs. Kontroll Lymphoblastenlysaten nachgewiesen werden.

5. Literaturverzeichnis

Abraham, H. and G. Meyer (2003). "Reelin-expressing neurons in the postnatal and adult human hippocampal formation." Hippocampus 13(6): 715-727.

Ackermann, R. (1988). "Monoclonal antibodies." Hum Cell 1(1): 46-53.

Alcantara, S., M. Ruiz, G. D'Arcangelo, F. Ezan, L. de Lecea, T. Curran, C. Sotelo and E. Soriano (1998). "Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse." J Neurosci 18(19): 7779-7799.

Arbabi Ghahroudi, M., A. Desmyter, L. Wyns, R. Hamers and S. Muyldermans (1997). "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies." FEBS Lett 414(3): 521-526.

Association, A. P. (2014). Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen - DSM-5, Hogrefe Verlag.

Baneyx, F. (1999). "Recombinant protein expression in Escherichia coli." Curr Opin Biotechnol 10(5): 411-421.

Baneyx, F. and M. Mujacic (2004). "Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli." Nat Biotechnol 22(11): 1399-1408.

Beffert, U., E. J. Weeber, A. Durudas, S. Qiu, I. Masiulis, J. D. Sweatt, W. P. Li, G. Adelman, M. Frotscher, R. E. Hammer and J. Herz (2005). "Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2." Neuron 47(4): 567-579.

Berry, M. J. and J. Davies (1992). "Use of antibody fragments in immunoaffinity chromatography. Comparison of FV fragments, VH fragments and paralog peptides." J Chromatogr 597(1-2): 239-245.

Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol 232(2): 331-356.

Botella-Lopez, A., E. de Madaria, R. Jover, R. Bataller, P. Sancho-Bru, A. Candela, A. Compan, M. Perez-Mateo, S. Martinez and J. Saez-Valero (2008). "Reelin is overexpressed in the liver and plasma of bile duct ligated rats and its levels and glycosylation are altered in plasma of humans with cirrhosis." Int J Biochem Cell Biol 40(4): 766-775.

Bradshaw, N. J., S. V. Trossbach, S. Kober, S. Walter, I. Prikulis, S. Weggen and C. Korth (2017). "Disrupted in Schizophrenia 1 regulates the processing of reelin in the perinatal cortex." Schizophr Res.

Braff, D., C. Stone, E. Callaway, M. Geyer, I. Glick and L. Bali (1978). "Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics." Psychophysiology 15(4): 339-343.

Brich, J., F. S. Shie, B. W. Howell, R. Li, K. Tus, E. K. Wakeland, L. W. Jin, M. Mumby, G. Churchill, J. Herz and J. A. Cooper (2003). "Genetic modulation of tau phosphorylation in the mouse." J Neurosci 23(1): 187-192.

Caviness, V. S., Jr. and P. Rakic (1978). "Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice." Annu Rev Neurosci 1: 297-326.

Caviness, V. S., Jr. and R. L. Sidman (1973). "Retrohippocampal, hippocampal and related structures of the forebrain in the reeler mutant mouse." J Comp Neurol 147(2): 235-254.

Caviness, V. S., Jr., D. K. So and R. L. Sidman (1972). "The hybrid reeler mouse." J Hered 63(5): 241-246.

Chai, X., E. Forster, S. Zhao, H. H. Bock and M. Frotscher (2009). "Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3." J Neurosci 29(1): 288-299.

Chameau, P., D. Inta, T. Vitalis, H. Monyer, W. J. Wadman and J. A. van Hooft (2009). "The N-terminal region of reelin regulates postnatal dendritic maturation of cortical pyramidal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A 106(17): 7227-7232.

Chang, B. S., F. Duzcan, S. Kim, M. Cinbis, A. Aggarwal, K. A. Apse, O. Ozdel, M. Atmaca, S. Zencir, H. Bagci and C. A. Walsh (2007). "The role of RELN in lissencephaly and neuropsychiatric disease." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144b(1): 58-63.

Chen, N., Y. Bao, Y. Xue, Y. Sun, D. Hu, S. Meng, L. Lu and J. Shi (2017). "Meta-analyses of RELN variants in neuropsychiatric disorders." Behav Brain Res 332: 110-119.
Chen, Y., U. Beffert, M. Ertunc, T. S. Tang, E. T. Kavalali, I. Bezprozvanny and J. Herz (2005). "Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons." J Neurosci 25(36): 8209-8216.

Chothia, C., J. Novotny, R. Brucoleri and M. Karplus (1985). "Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains." J Mol Biol 186(3): 651-663.

D'Arcangelo, G., G. G. Miao, S. C. Chen, H. D. Soares, J. I. Morgan and T. Curran (1995). "A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler." Nature 374(6524): 719-723.

D'Arcangelo, G., K. Nakajima, T. Miyata, M. Ogawa, K. Mikoshiba and T. Curran (1997). "Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody." J Neurosci 17(1): 23-31.

Davies, J. and L. Riechmann (1995). "Antibody VH domains as small recognition units." Biotechnology (N Y) 13(5): 475-479.

Dazzo, E., M. Fanciulli, E. Serioli, G. Minervini, P. Pulitano, S. Binelli, C. Di Bonaventura, C. Luisi, E. Pasini, S. Striano, P. Striano, G. Coppola, A. Chiavegato, S. Radovic, A. Spadotto, S. Uzzau, A. La Neve, A. T. Giallonardo, O. Mecarelli, S. C. Tosatto, R. Ottman, R. Michelucci and C. Nobile (2015). "Heterozygous reelin mutations cause autosomal-dominant lateral temporal epilepsy." Am J Hum Genet 96(6): 992-1000.

de Bergeyck, V., B. Naerhuyzen, A. M. Goffinet and C. Lambert de Rouvroit (1998). "A panel of monoclonal antibodies against reelin, the extracellular matrix protein defective in reeler mutant mice." J Neurosci Methods 82(1): 17-24.

de Bergeyck, V., K. Nakajima, C. Lambert de Rouvroit, B. Naerhuyzen, A. M. Goffinet, T. Miyata, M. Ogawa and K. Mikoshiba (1997). "A truncated Reelin protein is produced but not secreted in the 'Orleans' reeler mutation (Reln^{rl-Orl})." Brain Res Mol Brain Res 50(1-2): 85-90.

Decanniere, K., S. Muyltermans and L. Wyns (2000). "Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes?" J Mol Biol 300(1): 83-91.

DeSilva, U., G. D'Arcangelo, V. V. Braden, J. Chen, G. G. Miao, T. Curran and E. D. Green (1997). "The human reelin gene: isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7." Genome Res 7(2): 157-164.

Desmyter, A., T. R. Transue, M. A. Ghahroudi, M. H. Thi, F. Poortmans, R. Hamers, S. Muyltermans and L. Wyns (1996). "Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme." Nat Struct Biol 3(9): 803-811.

DGN, D. (2015, 2015). "Leitlinie Demenz." Retrieved 27.09.2017, from https://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2015/PDFs_Download/Demenz/REV_S3-leitlinie-demenzen.pdf.

DGPPN. (2006). "Leitlinie Schizophrenie Kurzversion." Retrieved 27.09.2017, 2017, from https://www.dgppn.de/Resources/Persistent/a6e04aa47e146de9e159fd2ca1e6987853a055d7/S3_Schizo_Kurzversion.pdf.

Doehner, J. and I. Knuesel (2010). "Reelin-mediated Signaling during Normal and Pathological Forms of Aging." Aging Dis 1(1): 12-29.

Doehner, J., A. Madhusudan, U. Konietzko, J. M. Fritschy and I. Knuesel (2010). "Co-localization of Reelin and proteolytic AbetaPP fragments in hippocampal plaques in aged wild-type mice." J Alzheimers Dis 19(4): 1339-1357.

Dong, E., M. Nelson, D. R. Grayson, E. Costa and A. Guidotti (2008). "Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation." Proc Natl Acad Sci U S A 105(36): 13614-13619.

Dumanis, S. B., H. J. Cha, J. M. Song, J. H. Trotter, M. Spitzer, J. Y. Lee, E. J. Weeber, R. S. Turner, D. T. Pak, G. W. Rebeck and H. S. Hoe (2011). "ApoE receptor 2 regulates synapse and dendritic spine formation." PLoS One 6(2): e17203.

Durakoglugil, M. S., Y. Chen, C. L. White, E. T. Kavalali and J. Herz (2009). "Reelin signaling antagonizes beta-amyloid at the synapse." Proc Natl Acad Sci U S A 106(37): 15938-15943.

Duveau, V., A. Madhusudan, M. Caleo, I. Knuesel and J. M. Fritschy (2011). "Impaired reelin processing and secretion by Cajal-Retzius cells contributes to granule cell dispersion in a mouse model of temporal lobe epilepsy." Hippocampus 21(9): 935-944.

Ewert, S., C. Cambillau, K. Conrath and A. Pluckthun (2002). "Biophysical properties of camelid V(HH) domains compared to those of human V(H)3 domains." Biochemistry 41(11): 3628-3636.

Falconer, D. S. (1951). "Two new mutants, 'trembler' and 'reeler', with neurological actions in the house mouse (*Mus musculus* L.)." J Genet 50(2): 192-201.

Fatemi, S. H., J. A. Earle and T. McMenemy (2000). "Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression." Mol Psychiatry 5(6): 654-663, 571.

Fatemi, S. H., A. V. Snow, J. M. Sary, M. Araghi-Niknam, T. J. Reutiman, S. Lee, A. I. Brooks and D. A. Pearce (2005). "Reelin signaling is impaired in autism." Biol Psychiatry 57(7): 777-787.

Fatemi, S. H., J. M. Sary, A. R. Halt and G. R. Realmuto (2001). "Dysregulation of Reelin and Bcl-2 proteins in autistic cerebellum." J Autism Dev Disord 31(6): 529-535.

Fisher, R. S., C. Acevedo, A. Arzimanoglou, A. Bogacz, J. H. Cross, C. E. Elger, J. Engel, Jr., L. Forsgren, J. A. French, M. Glynn, D. C. Hesdorffer, B. I. Lee, G. W. Mathern, S. L. Moshe, E. Perucca, I. E. Scheffer, T. Tomson, M. Watanabe and S. Wiebe (2014). "ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy." Epilepsia 55(4): 475-482.

Forster, E., Y. Jossin, S. Zhao, X. Chai, M. Frotscher and A. M. Goffinet (2006). "Recent progress in understanding the role of Reelin in radial neuronal migration, with specific emphasis on the dentate gyrus." Eur J Neurosci 23(4): 901-909.

Franklin, E. C. (1970). "Heavy-chain diseases." N Engl J Med 282(19): 1098-1099.

Frotscher, M. (1998). "Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers." Curr Opin Neurobiol 8(5): 570-575.

Frotscher, M., C. A. Haas and E. Forster (2003). "Reelin controls granule cell migration in the dentate gyrus by acting on the radial glial scaffold." Cereb Cortex 13(6): 634-640.

Galanis, M., R. A. Irving and P. J. Hudson (2001). Bacteriophage Library Construction and Selection of Recombinant Antibodies. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc.

Gaubner, B. (2017). ICD-10-GM 2017 Systematisches Verzeichnis Deutscher Ärzteverlag.

Giovanoli, S., L. Weber and U. Meyer (2014). "Single and combined effects of prenatal immune activation and peripubertal stress on parvalbumin and reelin expression in the hippocampal formation." Brain Behav Immun 40: 48-54.

Glennner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun 120(3): 885-890.

Golde, T. E., S. Estus, L. H. Younkin, D. J. Selkoe and S. G. Younkin (1992). "Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives." Science 255(5045): 728-730.

Goldman, E. R., G. P. Anderson, J. L. Liu, J. B. Delehanty, L. J. Sherwood, L. E. Osborn, L. B. Cummins and A. Hayhurst (2006). "Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library." Anal Chem 78(24): 8245-8255.

Gouras, G. K., J. Tsai, J. Naslund, B. Vincent, M. Edgar, F. Checler, J. P. Greenfield, V. Haroutunian, J. D. Buxbaum, H. Xu, P. Greengard and N. R. Relkin (2000). "Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain." Am J Pathol 156(1): 15-20.

Graham, F. K. (1975). "Presidential Address, 1974. The more or less startling effects of weak prestimulation." Psychophysiology 12(3): 238-248.

Grehl, H., Reinhardt, F. (2008). Checkliste Neurologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski and L. I. Binder (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." Proc Natl Acad Sci U S A 83(13): 4913-4917.

Grzimek, B. (2000). Grzimeks Tierleben Enzyklopädie des Tierreichs Band 13 Säugetiere. Augsburg, Bechtermünz.

Guedj, E., F. Bonini, M. Gavaret, A. Trebuchon, S. Aubert, M. Boucekine, L. Boyer, R. Carron, A. McGonigal and F. Bartolomei (2015). "18FDG-PET in different subtypes of temporal lobe epilepsy: SEEG validation and predictive value." Epilepsia 56(3): 414-421.

Guidotti, A., J. Auta, J. M. Davis, V. Di-Giorgi-Gerevini, Y. Dwivedi, D. R. Grayson, F. Impagnatiello, G. Pandey, C. Pesold, R. Sharma, D. Uzunov and E. Costa (2000). "Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study." Arch Gen Psychiatry 57(11): 1061-1069.

H., Z. (1987). Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press.

Haas, C. A., O. Dudeck, M. Kirsch, C. Huszka, G. Kann, S. Pollak, J. Zentner and M. Frotscher (2002). "Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy." J Neurosci 22(14): 5797-5802.

Haas, C. A. and M. Frotscher (2010). "Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy." Exp Brain Res 200(2): 141-149.

Haass, C., E. H. Koo, A. Mellon, A. Y. Hung and D. J. Selkoe (1992). "Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments." Nature 357(6378): 500-503.

Habl, G., A. Schmitt, M. Zink, M. von Wilmsdorff, P. Yeganeh-Doost, A. Jatzko, T. Schneider-Axmann, M. Bauer and P. Falkai (2012). "Decreased reelin expression in the left prefrontal cortex (BA9) in chronic schizophrenia patients." Neuropsychobiology 66(1): 57-62.

Hamburgh, M. (1963). "ANALYSIS OF THE POSTNATAL DEVELOPMENTAL EFFECTS OF "REELER," A NEUROLOGICAL MUTATION IN MICE. A STUDY IN DEVELOPMENTAL GENETICS." Dev Biol 8: 165-185.

Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman and R. Hamers (1993). "Naturally occurring antibodies devoid of light chains." Nature 363(6428): 446-448.

Harmsen, M. M., R. C. Ruuls, I. J. Nijman, T. A. Niewold, L. G. Frenken and B. de Geus (2000). "Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features." Mol Immunol 37(10): 579-590.

Heinrich, C., N. Nitta, A. Flubacher, M. Muller, A. Fahrner, M. Kirsch, T. Freiman, F. Suzuki, A. Depaulis, M. Frotscher and C. A. Haas (2006). "Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus." J Neurosci 26(17): 4701-4713.

Hellmert, M., A. Muller-Schiffmann, M. S. Peters, C. Korth and T. Schrader (2015). "Hybridization of an Aβ-specific antibody fragment with aminopyrazole-based beta-sheet ligands displays striking enhancement of target affinity." Org Biomol Chem 13(10): 2974-2979.

Herz, J. and Y. Chen (2006). "Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci 7(11): 850-859.

Hiesberger, T., M. Trommsdorff, B. W. Howell, A. Goffinet, M. C. Mumby, J. A. Cooper and J. Herz (1999). "Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation." Neuron 24(2): 481-489.

Hirotsune, S., T. Takahara, N. Sasaki, K. Hirose, A. Yoshiki, T. Ohashi, M. Kusakabe, Y. Murakami, M. Muramatsu, S. Watanabe and et al. (1995). "The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons." Nat Genet 10(1): 77-83.
Hof, H., Dörries, R. (2000, 2009). Medizinische Mikrobiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG.

Hong, S. E., Y. Y. Shugart, D. T. Huang, S. A. Shahwan, P. E. Grant, J. O. Hourihane, N. D. Martin and C. A. Walsh (2000). "Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations." Nat Genet 26(1): 93-96.

Hornig, T., C. Haas, L. Sturm, B. Fiebich and L. Tebartz van Elst (2015). "Increased Blood-Reelin-Levels in First Episode Schizophrenia." PLoS One 10(8): e0134671.

Hourihane, J. O., C. P. Bennett, R. Chaudhuri, S. A. Robb and N. D. Martin (1993). "A sibship with a neuronal migration defect, cerebellar hypoplasia and congenital lymphedema." Neuropediatrics 24(1): 43-46.

- Houser, C. R. (1990).** "Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy." Brain Res 535(2): 195-204.
- Howell, B. W., T. M. Herrick and J. A. Cooper (1999).** "Reelin-induced tyrosine [corrected] phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning." Genes Dev 13(6): 643-648.
- Howell, B. W., T. M. Herrick, J. D. Hildebrand, Y. Zhang and J. A. Cooper (2000).** "Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development." Curr Biol 10(15): 877-885.
- Ignatova, N., C. J. Sindic and A. M. Goffinet (2004).** "Characterization of the various forms of the Reelin protein in the cerebrospinal fluid of normal subjects and in neurological diseases." Neurobiol Dis 15(2): 326-330.
- IMGSAC (1998).** "A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium." Hum Mol Genet 7(3): 571-578.
- Impagnatiello, F., A. R. Guidotti, C. Pesold, Y. Dwivedi, H. Caruncho, M. G. Pisu, D. P. Uzunov, N. R. Smalheiser, J. M. Davis, G. N. Pandey, G. D. Pappas, P. Tueting, R. P. Sharma and E. Costa (1998).** "A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia." Proc Natl Acad Sci U S A 95(26): 15718-15723.
- Iwata, K., N. Izumo, H. Matsuzaki, T. Manabe, Y. Ishibashi, Y. Ichitani, K. Yamada, I. Thanseem, A. Anitha, M. M. Vasu, C. Shimmura, T. Wakuda, Y. Kameno, T. Takahashi, Y. Iwata, K. Suzuki, K. Nakamura and N. Mori (2012).** "Vldlr overexpression causes hyperactivity in rats." Mol Autism 3(1): 11.
- Jossin, Y., N. Ignatova, T. Hiesberger, J. Herz, C. Lambert de Rouvroit and A. M. Goffinet (2004).** "The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development." J Neurosci 24(2): 514-521.
- Kabat, E. A. and T. T. Wu (1991).** "Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites." J Immunol 147(5): 1709-1719.
- Kearney, J. F., A. Radbruch, B. Liesegang and K. Rajewsky (1979).** "A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines." J Immunol 123(4): 1548-1550.
- Keshvara, L., D. Benhayon, S. Magdaleno and T. Curran (2001).** "Identification of reelin-induced sites of tyrosyl phosphorylation on disabled 1." J Biol Chem 276(19): 16008-16014.
- Klar, A., M. Baldassare and T. M. Jessell (1992).** "F-spondin: a gene expressed at high levels in the floor plate encodes a secreted protein that promotes neural cell adhesion and neurite extension." Cell 69(1): 95-110.

- Knoll, B.**, C. Weigl, A. Nordheim and F. Bonhoeffer (2007). "Stripe assay to examine axonal guidance and cell migration." Nat Protoc 2(5): 1216-1224.
- Knuesel, I.**, M. Nyffeler, C. Mormede, M. Muhia, U. Meyer, S. Pietropaolo, B. K. Yee, C. R. Pryce, F. M. LaFerla, A. Marighetto and J. Feldon (2009). "Age-related accumulation of Reelin in amyloid-like deposits." Neurobiol Aging 30(5): 697-716.
- Kocherhans, S.**, A. Madhusudan, J. Doehner, K. S. Breu, R. M. Nitsch, J. M. Fritschy and I. Knuesel (2010). "Reduced Reelin expression accelerates amyloid-beta plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice." J Neurosci 30(27): 9228-9240.
- Kohler, G. and C. Milstein (1975).** "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature 256(5517): 495-497.
- Kramer, P. L.**, H. Xu, R. L. Woltjer, S. K. Westaway, D. Clark, D. Erten-Lyons, J. A. Kaye, K. A. Welsh-Bohmer, J. C. Troncoso, W. R. Markesbery, R. C. Petersen, R. S. Turner, W. A. Kukull, D. A. Bennett, D. Galasko, J. C. Morris and J. Ott (2011). "Alzheimer disease pathology in cognitively healthy elderly: a genome-wide study." Neurobiol Aging 32(12): 2113-2122.
- Krebs, M. O.**, C. Betancur, S. Leroy, M. C. Bourdel, C. Gillberg and M. Leboyer (2002). "Absence of association between a polymorphic GGC repeat in the 5' untranslated region of the reelin gene and autism." Mol Psychiatry 7(7): 801-804.
- Kubo, K.**, K. Mikoshiba and K. Nakajima (2002). "Secreted Reelin molecules form homodimers." Neurosci Res 43(4): 381-388.
- Lambert de Rouvroit, C.**, V. de Bergeyck, C. Cortvrindt, I. Bar, Y. Eeckhout and A. M. Goffinet (1999). "Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase." Exp Neurol 156(1): 214-217.
- Lammert, D. B. and B. W. Howell (2016).** "RELN Mutations in Autism Spectrum Disorder." Front Cell Neurosci 10: 84.
- Lauwereys, M.**, M. Arbabi Ghahroudi, A. Desmyter, J. Kinne, W. Holzer, E. De Genst, L. Wyns and S. Muyldermans (1998). "Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies." Embo j 17(13): 3512-3520.
- Li, J.**, J. Liu, L. Zhao, Y. Ma, M. Jia, T. Lu, Y. Ruan, Q. Li, W. Yue, D. Zhang and L. Wang (2013). "Association study between genes in Reelin signaling pathway and autism identifies DAB1 as a susceptibility gene in a Chinese Han population." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 44: 226-232.
- Liu, W. S.**, C. Pesold, M. A. Rodriguez, G. Carboni, J. Auta, P. Lacor, J. Larson, B. G. Condie, A. Guidotti and E. Costa (2001). "Down-regulation of dendritic spine and glutamic acid decarboxylase 67 expressions in the reelin haploinsufficient heterozygous reeler mouse." Proc Natl Acad Sci U S A 98(6): 3477-3482.
- Makrides, S. C. (1996).** "Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli." Microbiol Rev 60(3): 512-538.

- Manford, M.,** Y. M. Hart, J. W. Sander and S. D. Shorvon (1992). "National General Practice Study of Epilepsy (NGPSE): partial seizure patterns in a general population." Neurology 42(10): 1911-1917.
- Mariani, J.,** F. Crepel, K. Mikoshiba, J. P. Changeux and C. Sotelo (1977). "Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from Reeler mutant mouse." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 281(978): 1-28.
- Maurizi, M. R. (1992).** "Proteases and protein degradation in Escherichia coli." Experientia 48(2): 178-201.
- Mayer, H.,** S. Duit, C. Hauser, W. J. Schneider and J. Nimpf (2006). "Reconstitution of the Reelin signaling pathway in fibroblasts demonstrates that Dab1 phosphorylation is independent of receptor localization in lipid rafts." Mol Cell Biol 26(1): 19-27.
- Michelucci, R.,** P. Pulitano, C. Di Bonaventura, S. Binelli, C. Luisi, E. Pasini, S. Striano, P. Striano, G. Coppola, A. La Neve, A. T. Giallonardo, O. Mecarelli, E. Serioli, E. Dazzo, M. Fanciulli and C. Nobile (2017). "The clinical phenotype of autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy related to reelin mutations." Epilepsy Behav 68: 103-107.
- Miles, J. H. (2011).** "Autism spectrum disorders--a genetics review." Genet Med 13(4): 278-294.
- Millar, J. K.,** J. C. Wilson-Annan, S. Anderson, S. Christie, M. S. Taylor, C. A. Semple, R. S. Devon, D. M. St Clair, W. J. Muir, D. H. Blackwood and D. J. Porteous (2000). "Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia." Hum Mol Genet 9(9): 1415-1423.
- Missiakas, D. and S. Raina (1997).** "Protein folding in the bacterial periplasm." J Bacteriol 179(8): 2465-2471.
- Moy, S. S. and J. J. Nadler (2008).** "Advances in behavioral genetics: mouse models of autism." Mol Psychiatry 13(1): 4-26.
- Muyldermans, S. (2001).** "Single domain camel antibodies: current status." J Biotechnol 74(4): 277-302.
- Muyldermans, S.,** T. Atarhouch, J. Saldanha, J. A. Barbosa and R. Hamers (1994). "Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains." Protein Eng 7(9): 1129-1135.
- Muyldermans, S.,** T. N. Baral, V. C. Retamozzo, P. De Baetselier, E. De Genst, J. Kinne, H. Leonhardt, S. Magez, V. K. Nguyen, H. Revets, U. Rothbauer, B. Stijlemans, S. Tillib, U. Wernery, L. Wyns, G. Hassanzadeh-Ghassabeh and D. Saerens (2009). "Camelid immunoglobulins and nanobody technology." Vet Immunol Immunopathol 128(1-3): 178-183.

Neurologie, K. L. d. d. G. f. (30.04.2017, 30.04.2017). "Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Erster epileptischer Anfall und Epilepsien im Erwachsenenalter." Retrieved 06.07.2017, from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-0411_S1_Erster-epileptischer-Anfall_Epilepsien_2017-05.pdf.

Nguyen, V. K., R. Hamers, L. Wyns and S. Muyldermans (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(8): 515-524.

Nguyen, V. K., R. Hamers, L. Wyns and S. Muyldermans (2000). "Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire." *Embo j* 19(5): 921-930.

Niu, S., A. Renfro, C. C. Quattrocchi, M. Sheldon and G. D'Arcangelo (2004). "Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway." *Neuron* 41(1): 71-84.

Ogawa, M., T. Miyata, K. Nakajima, K. Yagyu, M. Seike, K. Ikenaka, H. Yamamoto and K. Mikoshiba (1995). "The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons." *Neuron* 14(5): 899-912.

Okamura, Y., S. Nomoto, M. Kanda, M. Hayashi, Y. Nishikawa, T. Fujii, H. Sugimoto, S. Takeda and A. Nakao (2011). "Reduced expression of reelin (RELN) gene is associated with high recurrence rate of hepatocellular carcinoma." *Ann Surg Oncol* 18(2): 572-579.

Orcinha, C., G. Munzner, J. Gerlach, A. Kiliyas, M. Follo, U. Egert and C. A. Haas (2016). "Seizure-Induced Motility of Differentiated Dentate Granule Cells Is Prevented by the Central Reelin Fragment." *Front Cell Neurosci* 10: 183.

Palladino, G., V. Nicolia, G. G. Kovacs, S. Canterini, V. Ciraci, A. Fusco, F. Mangia, S. Scarpa and M. T. Fiorenza (2017). "Sexually Dimorphic Expression of Reelin in the Brain of a Mouse Model of Alzheimer Disease." *J Mol Neurosci* 61(3): 359-367.

Pappas, G. D., V. Kriho and C. Pesold (2001). "Reelin in the extracellular matrix and dendritic spines of the cortex and hippocampus: a comparison between wild type and heterozygous reeler mice by immunoelectron microscopy." *J Neurocytol* 30(5): 413-425.

Perez, J. M., J. G. Renisio, J. J. Prompers, C. J. van Platerink, C. Cambillau, H. Darbon and L. G. Frenken (2001). "Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process." *Biochemistry* 40(1): 74-83.

Persico, A. M., L. D'Agruma, N. Maiorano, A. Totaro, R. Militerni, C. Bravaccio, T. H. Wassink, C. Schneider, R. Melmed, S. Trillo, F. Montecchi, M. Palermo, T. Pascucci, S. Puglisi-Allegra, K. L. Reichelt, M. Conciatori, R. Marino, C. C. Quattrocchi, A. Baldi, L. Zelante, P. Gasparini and F. Keller (2001). "Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder." *Mol Psychiatry* 6(2): 150-159.

Persico, A. M. and V. Napolioni (2013). "Autism genetics." *Behav Brain Res* 251: 95-112.

Pesold, C., F. Impagnatiello, M. G. Pisu, D. P. Uzunov, E. Costa, A. Guidotti and H. J. Caruncho (1998). "Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats." Proc Natl Acad Sci U S A 95(6): 3221-3226.

Peters, J. H. B., H. (1990). Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung. Heidelberg, Springer Verlag.

Pujadas, L., A. Gruart, C. Bosch, L. Delgado, C. M. Teixeira, D. Rossi, L. de Lecea, A. Martinez, J. M. Delgado-Garcia and E. Soriano (2010). "Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation." J Neurosci 30(13): 4636-4649.

Pujadas, L., D. Rossi, R. Andres, C. M. Teixeira, B. Serra-Vidal, A. Parcerisas, R. Maldonado, E. Giralt, N. Carulla and E. Soriano (2014). "Reelin delays amyloid-beta fibril formation and rescues cognitive deficits in a model of Alzheimer's disease." Nat Commun 5: 3443.

Rakic, P. (1972). "Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex." J Comp Neurol 145(1): 61-83.

Rakic, P. (1988). "Specification of cerebral cortical areas." Science 241(4862): 170-176.

Rakic, P. and V. S. Caviness, Jr. (1995). "Cortical development: view from neurological mutants two decades later." Neuron 14(6): 1101-1104.

Rossky, P. J. (2008). "Protein denaturation by urea: slash and bond." Proc Natl Acad Sci U S A 105(44): 16825-16826.

Saez-Valero, J., M. Costell, M. Sjogren, N. Andreasen, K. Blennow and J. M. Luque (2003). "Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease." J Neurosci Res 72(1): 132-136.

Schneider, F. (2017). Facharztwissen Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, Springer Verlag.

Seligmann, M., E. Mihaesco, J. L. Preud'homme, F. Danon and J. C. Brouet (1979). "Heavy chain diseases: current findings and concepts." Immunol Rev 48: 145-167.

Shen, Y., G. Xun, H. Guo, Y. He, J. Ou, H. Dong, K. Xia and J. Zhao (2016). "Association and gene-gene interactions study of reelin signaling pathway related genes with autism in the Han Chinese population." Autism Res 9(4): 436-442.

Stanfield, B. B. and W. M. Cowan (1979). "The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice." J Comp Neurol 185(3): 393-422.

Talmadge, K. and W. Gilbert (1982). "Cellular location affects protein stability in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A 79(6): 1830-1833.

Transue, T. R., E. De Genst, M. A. Ghahroudi, L. Wyns and S. Muyldermans (1998). "Camel single-domain antibody inhibits enzyme by mimicking carbohydrate substrate." Proteins 32(4): 515-522.

Trommsdorff, M., M. Gotthardt, T. Hiesberger, J. Shelton, W. Stockinger, J. Nimpf, R. E. Hammer, J. A. Richardson and J. Herz (1999). "Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2." Cell 97(6): 689-701.

Tseng, W. L., C. L. Huang, K. Y. Chong, C. H. Liao, A. Stern, J. C. Cheng and C. P. Tseng (2010). "Reelin is a platelet protein and functions as a positive regulator of platelet spreading on fibrinogen." Cell Mol Life Sci 67(4): 641-653.

Tueting, P., E. Costa, Y. Dwivedi, A. Guidotti, F. Impagnatiello, R. Manev and C. Pesold (1999). "The phenotypic characteristics of heterozygous reeler mouse." Neuroreport 10(6): 1329-1334.

Underhill, G. H., D. George, E. G. Bremer and G. S. Kansas (2003). "Gene expression profiling reveals a highly specialized genetic program of plasma cells." Blood 101(10): 4013-4021.

Utsunomiya-Tate, N., K. Kubo, S. Tate, M. Kainosho, E. Katayama, K. Nakajima and K. Mikoshiba (2000). "Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody." Proc Natl Acad Sci U S A 97(17): 9729-9734.

Vu, K. B., M. A. Ghahroudi, L. Wyns and S. Muyldermans (1997). "Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies." Mol Immunol 34(16-17): 1121-1131.

Wang, Z., Y. Hong, L. Zou, R. Zhong, B. Zhu, N. Shen, W. Chen, J. Lou, J. Ke, T. Zhang, W. Wang and X. Miao (2014). "Reelin gene variants and risk of autism spectrum disorders: an integrated meta-analysis." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 165b(2): 192-200.

Wasser, C. R. and J. Herz (2017). "Reelin: Neurodevelopmental Architect and Homeostatic Regulator of Excitatory Synapses." J Biol Chem 292(4): 1330-1338.

Weeber, E. J., U. Beffert, C. Jones, J. M. Christian, E. Forster, J. D. Sweatt and J. Herz (2002). "Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning." J Biol Chem 277(42): 39944-39952.

Woolven, B. P., L. G. Frenken, P. van der Logt and P. J. Nicholls (1999). "The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation." Immunogenetics 50(1-2): 98-101.

Wu, T. T., G. Johnson and E. A. Kabat (1993). "Length distribution of CDRH3 in antibodies." Proteins 16(1): 1-7.

Zhang, H., X. Liu, C. Zhang, E. Mundo, F. Macciardi, D. R. Grayson, A. R. Guidotti and J. J. Holden (2002). "Reelin gene alleles and susceptibility to autism spectrum disorders." Mol Psychiatry 7(9): 1012-1017.

Zola, H., A. P. Mohandas and D. Krumbiegel (2001). Monoclonal Antibodies: Diagnostic Uses. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.

Danksagung

Mein Dank gilt dem Graduiertenkolleg „1033; Molekulare Ziele von Alterungsprozessen und Ansatzpunkte der Alterungsprävention“ für die Förderung meines Dissertationsthemas. Des Weiteren möchte ich bei meinem Doktorvater Prof. Korth sowie der gesamten Arbeitsgruppe für die Unterstützung und Beratung auf dem Weg zur Vervollständigung meiner Dissertation danken.