

## 7 Zusammenfassung

Durch die Immunisierung von Mäusen mit renalen Bürstensaummembranen vom Schwein wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. H. Koepsell eine Reihe von monoklonalen Antikörpern generiert, die bereits ausführlich charakterisiert wurden. Das nierenspezifische Antigen des monoklonalen Antikörpers N4A4 wurde von den Autoren als gp400 bezeichnet. Klinisch konnte eine Eignung des monoklonalen Antikörpers N4A4 für die nichtinvasive Urindiagnostik nachgewiesen werden, da gp400 bereits unter physiologischen Bedingungen in den Urin ausgeschieden wird. Da gp400 auch in Nierenzellkarzinomen proximaltubulären Ursprungs exprimiert wird, wird derzeit untersucht, inwiefern der Antikörper in Diagnostik und Therapie dieser Tumoren eingesetzt werden kann.

Die Identität von gp400 ist bisher nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit hatte deshalb das Ziel, dieses Protein mit Hilfe von proteinchemischen und immunologischen Methoden aufzureinigen, um nachfolgend eine Sequenzierung zu ermöglichen.

Initial konnte mit einer Endosomenpräparation aus dem Nierencortex von Schweinen eine ca. zehnfache Anreicherung des gp400 erzielt werden. Diese Vesikelfraktion wurde als Ausgangsmaterial für die sich anschließenden Reinigungsschritte eingesetzt. Für die Solubilisierung von gp400 wurde nach einem Vergleich verschiedener Detergenzien das anionische Detergenz Cholat in einer Konzentration von 2 % (w/v) ausgewählt.

Die Lektinaffinitätsreinigung mit Concanavalin A konnte keine weitere Anreicherung des gp400 erzielen. Dies lag sehr wahrscheinlich an Wechselwirkungen zwischen Lektin und Detergenz. Die isoelektrische Fokussierung erbrachte zwar eine weitere Konzentrierung des gp400, kam jedoch aufgrund des hohen technischen und zeitlichen Aufwands nicht zum Einsatz. Der isoelektrische Punkt von gp400 wurde mit 6,14 bestimmt.

Zur Immunaффinitätschromatographie kam eine Protein G Säule mit kovalent gekoppelten monoklonalen Antikörpern zum Einsatz. Mit dem monoklonalen Antikörper N4A4 konnte gp400 nicht isoliert werden. Es wurde angenommen, daß die gleichzeitige Anwesenheit des Detergenzes Cholat eine Antigen-Antikörperbindung unterband. Unter Einsatz des monoklonalen Antikörpers L4D6 gelang die Isolierung von gp400. Da der monoklonale Antikörper N4A4 im Western Blot mit dem von der L4D6-Säule eluierten Protein positiv reagierte, konnte bewiesen werden, daß das Antigen beider Monoklonaler identisch ist. Die L4D6-Säule wurde deshalb für die Isolierung des gp400 eingesetzt. Ca. 125 pmol des gesuchten Proteins konnten somit gewonnen werden.

Das aufgereinigte Protein sollten nach Konzentrierung mittels Ultrafiltration und enzymatischem Verdau im Gel einer Aminosäuresequenzanalyse zugeführt werden. Obwohl hierbei vage eine Sequenz gelesen werden konnte, die eine 90 %ige Homologie zu einem nicht näher definierten humanen cDNA Klon besaß, muß angezweifelt werden, daß

diese Sequenzdaten dem gp400 zuzuordnen sind. Vermutlich ging der Großteil des aufgereinigten gp400 bereits bei der Ultrafiltration verloren.

## 8 Summary

Immunizing of mice with porcine renal brush border membranes by Prof. H. Koepsell and coworkers resulted in the generation of different monoclonal antibodies. These antibodies already have been characterized in detail. One of these monoclonal antibodies, N4A4, recognizes a kidney specific antigen named gp400 and can be used for noninvasive urinary diagnostics as gp400 is excreted into the urine under physiological conditions. As gp400 is expressed in renal cell carcinomas of proximal tubular origin a current study determines whether N4A4 can be used as a diagnostic tool or a therapeutic agent for these tumors.

Since the identity of gp400 is still not known, the goal of the here presented work was the purification of gp400 with biochemical and immunological methods to allow amino acid sequencing.

An approximate tenfold enrichment of gp400 could be initially achieved by vesicle preparation of porcine renal cortex. This vesicular fraction was used as starting material for further purification steps. After comparing different detergents, the anionic detergent cholic acid was used at a concentration of 2 % (w/v) to solubilize gp400.

Lectinaffinity purification with concanavalin A did not result in an enrichment of gp400, probably due to interactions between lectin and detergent. In contrast isoelectric focusing could be used to further concentrate gp400 and to determine its isoelectric point at 6,14, but was not practical for large-scale purification.

Therefore we tried Protein G with covalently coupled monoclonal antibodies as immuno affinity chromatography. GP400 could not be purified using N4A4 most likely due to interference between cholic acid and the antigen-antibody-binding. However, after using L4D6 isolation of gp400 was achieved. As N4A4 showed a positive reaction in western blotting of the protein eluted from the L4D6 column it was proven that the antigen of both monoclonals is identical. A total of 125 pmol of gp400 could be recovered.

After concentration by ultrafiltration and in gel digest an attempt was made to determine the amino acid sequence of gp400. Although some sequence data, which showed 90% homology to a protein encoded by a yet uncharacterized human cDNA clone could be obtained it should be doubted whether the sequence belongs to gp400. Presumably the biggest amount of purified gp400 was already lost during ultrafiltration.

## 9 Literatur

- AKERSTRÖM, B.; BRODIN, T.; REIS, K.; BJÖRCK, L. (1985): Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.* **135**, 2589-92
- ALTMANNBERGER, M.; BIRK, H. W.; WAGNER, F.; FITH, H.; OSBORN, M. (1988): Differenzierung in embryonalen Tumoren. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **72**, 150-63
- BACHINSKY, D. R.; ZHENG, G.; NILES, J. L.; LAUGHLIN, Mc, M.; ABBATE, M.; ANDRES, G.; BROWN, D.; CLUSKEY, Mc, R. T. (1993): Detection of two forms of gp330. Their role in Heymann Nephritis. *Am. J. Pathol* **143**, 598-611
- BAHR, U.; KARAS, M.; HILLENKAMP, F. (1994): Analysis of biopolymers by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. In: KELLNER, R.; LOTTSCHEICH, F.; MEYER, H. E. (Hrsg.): *Microcharacterization of proteins*. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 149-66
- BERNOTAT-DANIELOWSKI, S.; BIRK, H.-W.; JAQUES, G.; HAASE, W.; KOEPESELL, H. (1986): Monoklonale Antikörper gegen Proteine aus Bürstensaummembranen proximaler Tubuli von Schweinenieren. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* **15** (9), 383
- BERTRAN, J.; WERNER, A.; STANGE, G.; MARKOVICH, D.; BIBER, J.; TESTAR, X.; ZORZANO, A.; PALACIN, M.; MURER, H. (1992): Expression of Na<sup>+</sup>-independent amino acid transport in *Xenopus laevis* oocytes by injection of rabbit kidney cortex mRNA. *Biochem. J.* **281**, 717-23
- BIRK, H.-W. (1992): Analyse der Urinexkretion renaler Bürstensaumproteine mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Justus-Liebig-Universität Giessen, Habilitationsschrift
- BIRK, H. W.; KOEPESELL, H. (1987): Reaction of monoclonal antibodies with plasma membrane proteins after binding on nitrocellulose: renaturation of antigenic sites and reduction of nonspecific antibody binding. *Anal. Biochem.* **164**, 16-22
- BIRK, H. W.; OGIERMANN, M.; ALTMANNBERGER, M.; SCHÜTTERLE, G.; HAASE, W.; KOEPESELL, H. (1993): Monoclonal antibodies against luminal membranes of renal proximal tubules which are kidney-specific. *Biochim. Biophys. Acta* **1148**, 67-76
- BIRK, H. W.; PIBERHOFER, S.; SCHÜTTERLE, G.; HAASE, W.; KÖTTING, J.; KOEPESELL, H. (1991): Analysis of Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter and other renal brush border proteins in human urine. *Kidney Int.* **40**, 823-37

- BIRK, H.-W.; SCHOEPE, H.; SCHROYENS, W.; KOEPESELL, H.; SCHÜTTERLE, G. (1992): Charakterisierung der Urinexkretion renaler Tubuluszellproteine nach Cisplatinapplikation. *Nieren- u. Hochdruckkrankheiten* **21**, 363 (Abstr.)
- BIRK, H. W.; STÖRKEL, S.; OGIERMANN, M.; ALTMANNBERGER, M.; KOEPESELL, H.; SCHÜTTERLE, G.: unveröffentlichte Ergebnisse
- BJERRUM, O. J. (1977): Immunochemical investigation of membrane proteins. A methodological survey with emphasis placed on immunoprecipitation in gels. *Biochim. Biophys. Acta* **472**, 135-95
- BJÖRCK, L.; KRONVALL, G. (1984): Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J. Immunol.* **133**, 969-74
- BLAICHER, M. (1993): Reinigung von Membranproteinen. *BioTec* **4**, 38-43
- BOESKEN, W. H.; MAMIER, A. (1985): Molekulargewichtsbezogene Urinprotein-Elektrophorese in der Diagnostik von Nierenkrankheiten. *Labormedizin* **9**, 285-91
- BOLL, M.; HERGET, M.; WAGENER, M.; WEBER, W. M.; MARKOVICH, D.; BIBER, J.; CLAUSS, W.; MURER, H.; DANIEL, H. (1996): Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 284-9
- BORREBACK, C. A. K. (1989): Human mAbs produced by primary in-vitro immunization. *Immunol. Today* **9**, 355-9
- BRETSCHER, A.; OSBORN, M.; WEHLAND, J.; WEBER, K. (1981): Villin associates with specific microfilamentous structures as seen by immunofluorescence microscopy on tissue sections and cells microinjected with villin. *Exp. Cell Res.* **135**, 213-9
- BUCHSBAUM, D. J. (1995): Experimental approaches to increase radiolabeled antibody localization in tumors. *Cancer Res.* **55**, 5729s-32s
- BURNETTE, W. N. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203
- CALTON, G. J. (1984): Immunosorbent separations. *Meth. Enzymol.* **104**, 381-7
- CAVALLO, T. (1994): Membranous nephropathy: insights from Heymann nephritis. *Am. J. Pathol.* **144**, 651-8

- CHAPMAN, A. E.; GOLDSTEIN, L. J. (1995): Multiple drug resistance: biologic basis and clinical significance i renal-cell carcinoma. *Sem. Oncol.* **22**, 17-28
- CHOW, W. H.; GRIDLEY, G.; McLAUGHLIN, J.K.; MANDEL, J. S.; WACHOLDER, S.; BLOT, W. J.; NIWA, S.; FRAUMENI, J. F. (1994): Protein intake and risk of renal cell cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 1131-9
- CHRISTENSEN, E. I.; GLIEMANN, J.; MOESTRUP, S. K. (1992): Renal tubule gp330 is a calcium binding receptor for endocytotic uptake of protein. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1481-90
- CHRISTENSEN, E. I.; NIELSEN, S.; MOESTRUP, S. K.; BORRE, C.; MAUNSBACH, A. B.; HEER, de, E.; RONCO, P.; HAMMOND, T. G.; VERROUST, P. (1995): Segmental distribution of the endocytosis receptor gp330 in renal proximal tubules. *Europ. J. Cell Biol.* **66**, 349-64
- COOPER, T. G. (1980): Reinigung von Proteinen. In: COOPER, T. G. (Hrsg.): *Biochemische Arbeitsmethoden*. Walter de Gruyter Berlin, New York, 334-79
- DUBACH, U. C.; LEHIR, M. (1984): Critical evaluation of the diagnostic use of urinary enzymes. *Contr. Nephrol.* **42**, 74-80
- DUBACH, U. C.; LEHIR, M.; GANDHI, R. (1989): Use of urinary enzymes as markers of nephrotoxicity. *Toxicol. Letters* **46**, 193-6
- DUNBAR, B. S.; SKINNER, S. M. (1990): Preparation of monoclonal antibodies. *Methods in Enzymologie* **182**, 670-9
- ECKERSKORN, C.; LOTTSPEICH, F. (1989): Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by gel electrophoresis after tryptic digestion in polyacrylamide matrix. *Chromatographia* **28**, 92-4
- EDMAN, P. (1950): Method for determinatin of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.* **4**, 283-290
- EINARSSON, S.; JOSEFSSON, B.; MOELLER, P.; SANCHEZ, D. (1987): Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **282**, 609-18
- EISENBARTH, G. S. (1981): Application of monoclonal antibody techniques to biochemical research. *Anal. Biochem.* **111**, 1-16

- ELIASSON, M.; ANDERSSON, R.; OLSSON, A.; WIGZELL, H.; UHLEN, M. (1989): Differential IgG-binding characteristics of staphylococcal protein A, streptococcal protein G, and a chimeric protein AG. *J. Immunol.* **142**, 575-81
- FAHNESTOCK, S. R.; ALEXANDER, P.; NAGLE, J.; FILPULA, D. (1986): Gene for an immunoglobulin-binding protein from a group G streptococcus. *J. Bacteriol.* **167**, 870-80
- FALKENBERG, F. W.; MAI, U.; PUPPE, C.; RISSE, P.; HERRMANN, G.; HECKING, E.; BREMER, K.; MONDORF, A. W.; SHAPIRA, Z. (1986): Kidney-derived urinary antigens assayed with monoclonal antibodies for the detection of renal damage. *Clinica Chimica Acta* **160**, 171-82
- FAULMANN, E. L.; OTTEN, R. A.; BARRETT, D. J.; BOYLE, M. D. P. (1989): Immunological applications of type III Fc binding proteins. Comparison of different sources of protein G. *J. Immunol. Meth.* **123**, 269-81
- FIEDLER, K.; PARTON, R. G.; KELLNER, R.; ETZOLD, T.; SIMONS, K. (1994): Vip36, a novel component of glycolipid rafts and exocytotic carrier vesicles in epithelial cells. *EMBO J.* **13**, 1729-40
- FINNEY, R. (1973): The value of radiotherapy in the treatment of hypernephroma - a clinical trial. *Br. J. Urol.* **45**, 258-69
- GARFIN, D. E. (1990): Isoelectric focussing. *Meth. Enzymol.* **182**, 459-77
- GERSHONI, J. M.; PALADE, G. E. (1983): Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* **131**, 1-15
- GOLDENBERG, D. M. (1988): Targeting of cancer with radiolabeled antibodies: Prospects for imaging and therapy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **112**, 580-6
- GRAHAM, J. M. (1993): The isolation of mitochondria, mitochondrial membranes, lysosomes, peroxisomes, and golgi membranes from rat liver. In: GRAHAM, J. M.; HIGGINS, J. A. (Hrsg.): *Methods in molecular biology*, Vol. 19, Biomembrane protocols I. Isolation and analysis. Humana Press, Totowa, New Jersey, 29-40
- GREENWOOD, F. C.; HUNTER, W. M.; CLOVER, J. S. (1963): The preparation of <sup>131</sup>I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* **89**, 114-23
- GUDER, W. G.; ROSS, S. O. (1984): Enzyme distribution along the nephron. *Kidn. Int.* **26**, 101-11

- GUSS, B.; ELIASSEN, M.; OLSSON, A.; UHLEN, M.; FREJ, A.-K.; JÖRNVALL, H.; FLOCK, J.-I.; LINDBERG, M. (1986): Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *EMBO J.* **5**, 1567-75
- HAMMOND, T. G.; VERROUST, P. J.; MAJEWSKI, R. R.; MUSE, K. E.; OBERLEY, T. D. (1994): Heavy endosomes isolated from the rat renal cortex show attributes of intermicrovillar clefts. *Am. J. Physiol.* **267**, F516-F527
- HARTMANN, H. (1993): Expression und Freisetzung renaler Bürstensaumproteine: Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Charakterisierung der Wirkungsweise nephrotoxischer Substanzen. Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertationsschrift
- HELENIUS, A.; McCASLIN, D. R.; FRIES, E.; TANFORD, C. (1979): Properties of detergents. *Meth. Enzymol.* **56**, 734-49
- HELENIUS, A.; SIMONS, K. (1975): Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 29-79
- HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R. (1985): Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**, 103-12
- HEYMANN, W.; HACKEL, D. B.; HARWOOD, S.; WILSON, S. G. F.; HUNTER, J. L. P. (1959): Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **100**, 660-4
- HILLENKAMP, F.; KARAS, M.; BEAVIS, R. C.; CHAIT, B. T. (1991): Matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal. Chem.* **63** (24), 1193A-203A
- HJELMELAND, L. M. (1990): Solubilization of native membrane proteins. *Meth. Enzymol.* **182**, 253-65
- HJELMELAND, L. M.; CHRAMBACH, A. (1984): Solubilization of functional membrane proteins. *Meth. Enzymol.* **104**, 305-18
- HUBERT, J. J.; SCHENK, D. B.; SKELLY, H.; LEFFERT, H. L. (1986): Rat hepatic (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase:  $\alpha$ -subunit isolation by immunoaffinity chromatography and structural analysis by peptide mapping. *Biochemistry* **25**, 4156-63
- JANSON, J. C.; RYDEN, L. (1989): Protein purification. Principles, high resolution methods, applications. VCH, Weinheim
- KANALAS, J. J.; MAKKER, S. P. (1991): Identification of the rat Heymann nephritis autoantigen (gp330) as a receptor site for plasminogen. *J. Biol. Chem.* **266**, 10825-9

- KEARN, Mc., T. J. (1993): Radioimmunodetection of solid tumors. Future horizons and applications for radioimmunotherapy. *Cancer* **71**, 4302-13
- KELLNER, R. (1994): Chemical and enzymatic fragmentation of proteins. In: KELLNER, R.; LOTTSPEICH, F.; MEYER, H. E. (Hrsg.): *Microcharacterization of proteins*. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 11-27
- KELLNER, R.; MEYER, H. E.; LOTTSPEICH, F. (1994): Amino acid analysis. In: KELLNER, R.; LOTTSPEICH, F.; MEYER, H. E. (Hrsg.): *Microcharacterization of proteins*. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 93-113
- KENNEDY, S. M. E.; BURCHELL, B. (1983): Single-step purification of epoxide hydrolase from rat liver microsomes using monoclonal-antibody chromatography. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 2029-32
- KERJASCHKI, D.; FARQUHAR, M. G. (1982): The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5557-61
- KERJASCHKI, D.; FARQUHAR, M. G. (1983): Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (gp330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J. Exp. Med.* **157**, 667-86
- KERJASCHKI, D.; HORVAT, R.; BINDER, S.; SUSANI, M.; DEKAN, G.; OJHA, P. P.; HILLEMANN, P.; ULRICH, W.; DONINI, U. (1987): Identification of a 400-kd Protein in the Brush Borders of Human Kidney Tubules that is similar to gp330, the nephritogenic antigen of rat Heymann nephritis. *Am. J. Pathol* **129**, 183-91
- KERJASCHKI, D.; MIETTINEN, A.; FARQUHAR, M. G. (1987): Initial events in the formation of immune deposits in passive Heymann Nephritis. *J. Exp. Med.* **166**, 109-28
- KERJASCHKI, D.; NORONHA-BLOB, L.; SACKFOR, B.; FARQUHAR, M. G. (1984): Microdomains of distinctive glycoprotein composition in the kidney proximal tubule brush border. *J. Cell Biol.* **98**, 1505-13
- KITTELBERGER, R.; NEALE, T. J. (1990): Isolation and characterization of an unique kidney antigen of relevance in human renal disease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **172**, 439-45
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature London* **256**, 495-497

- KOUNNAS, M. Z.; ARGRAVES, W. S.; STRICKLAND, D. K. (1992): The 39-kDa receptor-associated protein interacts with two members of the low density lipoprotein receptor family,  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor and glycoprotein 330. *J. Biol. Chem.* **267**, 21162-6
- KRANENBORG, M. H.; BOERMAN, O. C.; OOSTERWIJK-WAKKA, J. C.; WEIJdsERT, de, M. C.; CORSTENS, F. H.; OOSTERWIJK, E. (1995): Development and characterization of anti-renal cell carcinoma x antichelate bispecific monoclonal antibodies for two-phase targeting of renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **55**, 5864S-7S
- KRANENBORG, M. H. G. C.; BOERMAN, O. C.; OOSTERWIJK-WAKKA, J. C.; WEIJERT, de, M. C.; CORSTENS, F. H.; OOSTERWIJK, E. (1998): Two-step radio-immunotargeting of renal-cell carcinoma xenografts in nude mice with anti-renal-cell-carcinoma x anti-DTPA bispecific monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* **75**, 74-80
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature London* **227**, 680-5
- LANGHAMMER, J.; BIRK, H.-W.; ZAHNER, H. (1997): Renal disease in lymphatic filariasis: evidence for tubular and glomerular disorders at various stages of the infection. *Trop. Med. Internat. Health* **2**, 875-84
- LINDER, M.; WENZEL, V.; LINDER, D.; STIRM, S. (1994): Structural elements in glycoprotein 70 from polytropic friend mink cell focus-inducing virus and glycoprotein 71 from ecotropic friend murine leukemia virus, as defined by disulfide-bonding pattern and limited proteolysis. *J. Virol.* **68**, 5133-41
- LINN, S. (1990): Strategies and considerations for protein purifications. *Meth. Enzymol.* **182**, 9-15
- LOTAN, R.; BEATTIE, G.; HUBBELL, W.; NICOLSON, G. L. (1977): Activities of lectins and their immobilized derivatives in detergent solutions. Implications on the use of lectin affinity chromatography for the purification of membrane glycoproteins. *Biochem.* **16**, 1787-94
- LOTSPEICH, F.; HOUTHAEVE, T.; KELLNER, R. (1994): The Edman Degradation. In: KELLNER, R.; LOTSPEICH, F.; MEYER, H. E. (Hrsg.): *Microcharacterization of proteins*. VCH Weinheim, 117-30
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-75
- LUITEN, R. M.; CONEY, L. R.; FLEUREN, G. J.; WARNAAR, S. O.; LITVINOV, S. V. (1996): Generation of chimeric bispecific G250/anti-CD3 monoclonal antibody, a tool to combat renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **74**, 735-44

- MAKKER, S. P. (1993): Analysis of glomeruli-eluted gp330 autoantibodies and of gp330 antigen of Heymann Nephritis. *J. Immunol.* **151**, 6500-8
- MARCH, S. C.; PARIKH, I.; CUATRECASAS, P. (1974): A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal. Biochem.* **60**, 149-52
- MARTENSSON, S.; BRUNMARK, C.; OHLSSON, L.; BAK-JENSEN, E.; BUTKOWSKI, R.; BOKETOFT, A.; WIESLANDER, J. (1995): Heterogeneity of renal cell carcinoma. *Nephrol. Dial. Transpl.* **10**, 1637-43
- MENDRICK, D. L.; CHUNG, D. C.; RENNKE, H. G. (1990): Heymann antigen gp330 demonstrates affinity for fibronectin, laminin, and type I collagen and mediates rat proximal tubule epithelial cell adherence to such matrices in vitro. *Exp. Cell Res.* **188**, 23-35
- MICKISCH, G. H.; KÖSSIG, J.; KEILHAUER, G.; SCHLICK, E.; TSCHADA, R. K.; ALKEN, P. M. (1990): Effects of calcium antagonists in multidrug resistant primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res.* **50**, 3670-4
- MILSTEIN, C. (1980): Monoklonale Antikörper. *Spektrum der Wissenschaft* **12**, 96-108
- MILSTEIN, C.; CUELLO, A. C. (1983): Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature London* **305**, 537-40
- MOESTRUP, S. K.; CHRISTENSEN, E. I.; NIELSEN, S.; JORGENSEN, K. E.; BJORN, S. E.; ROIGAARD, H.; GLIEMANN, J. (1994): Binding and endocytosis of proteins mediated by epithelial gp330. *Ann. NY Acad. Sci.* **737**, 20-38
- MOORE, S.; STEIN, W. H. (1963): Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Meth. Enzymol.* **6**, 819-31
- MOTZER, R. J.; BANDER, N. H.; NANUS, D. M. (1996): Renal-cell carcinoma. *New England J. Med.* **335**, 865-75
- MULDERS, P.; FIGLIN, R.; KERNION, de, J. B.; WILTROUT, R.; LINEHAN, M.; PARKINSON, D.; WOLF, de, W.; BELLDEGRUN, A. (1997): Renal cell carcinoma: progress and future directions. *Cancer Res.* **57**, 5189-95
- NASHAN, B.; MOORE, R.; AMLLOT, P.; SCHMIDT, A.-G.; ABEYWICKRAMA, K.; SOULILOU, J.-P. (1997): Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. *Lancet* **350**, 1193-8

- NEUBERGER, M. S.; WILLIAMS, G.T.; MITCHELL, E. B.; JOUHAL, S. S.; FLANAGAN, J. G.; RABBITTS, T. H. (1985): A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature London* **314**, 268-70
- NEUGEBAUER, J. M. (1990): Detergents: an overview. *Meth. Enzymol.* **182**, 239-53
- NEUMEIER, R. (1980): Isoelektrische Fokussierung. In: COOPER, T. G. (Hrsg.): *Biochemische Arbeitsmethoden*. Walter de Gruyter Berlin, New York, 196-200
- NG, L. T.; PASCAUD, A.; PACAUD, M. (1987): Hydrochloric acid hydrolysis of proteins and determination of tryptophan by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **167**, 47-52
- NOVICK, A. C. (1995): Partial nephrectomy for renal cell carcinoma. *Urol* **46**, 149-52
- OBERLING, C.; RIVIERE, M.; HAGUENAU, F. (1960): Ultrastructure of the clear cells in renal carcinomas and its importance for the demonstration of their renal origin. *Nature London* **186**, 402-3
- OHSAKO, S.; HAYASHI, Y.; BUNICK, D. (1994): Molecular cloning and sequencing of calnexin-t. *J. Biol. Chem.* **269**, 14140-8
- OOSTERWIJK, E.; BANDER, N. H.; DIVGI, C. R.; WELT, S.; WAKKA, J. C.; FINN, R. D.; CARSWELL, E. A.; LARSON, S. M.; WARNAAR, S. O.; FLEUREN, G. J.; OETTGEN, H. F.; OLD, L. J. (1993): Antibody localization in human renal cell carcinoma: a phase I study of monoclonal antibody G250. *J. Clin. Oncol.* **11**, 738-50
- OOSTERWIJK, E.; RUITER, D. J.; HOEDEMAEKER, P. J.; PAUWELS, E. K. J.; JONAS, U.; ZWARTENDUK, J.; WARNAAR, S. O. (1986): Monoclonal antibody G250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *Int. J. Cancer* **38**, 489-94
- OOSTERWIJK, E.; WEIJERT, de, M.; BOKHOVEN, van, A.; BRAKENHOFF, R. H.; PEELEN, W. P.; DEBRUYNE, F. M. (1996): Molecular characterization of the renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **37**, A3147
- OZOLS, J. (1990): Preparation of membrane fractions. *Meth. Enzymol.* **191**, 225-35
- PIBERHOFER, S. (1992): Charakterisierung der Harnexkretion renaler tubulärer Zellproteine mit Hilfe monoklonaler Antikörper bei gesunden Probanden und nach Gabe des Röntgenkontrastmittels IOPAMIDOL. Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertationsschrift

- PIERARD, D.; HERRMANN, G.; MAI, U.; HECKING, E.; MONDORF, A. W.;  
SCHERBERICH, J. E.; FALKENBERG, F. W. (1983): Sandwich enzyme-immunoassay  
for the quantification of kidney-derived antigens in urine using monoclonal antibodies.  
In: AVRAMEAS, S.; DRUET, P.; MASSEYEFF, R.; FELMANN, G. (Hrsg.):  
Immunoenzymatic Techniques. Elsevier Science Publishers BV, Basel, 333
- RAYCHOWDHURY, R.; NILES, J.; CLUSKEY, Mc, R. T.; SMITH, J. A. (1989): Autoimmune  
target in Heymann Nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL-receptor.  
*Science* **244**, 1163-5
- PRICE, R. G. (1982): Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. *Toxicology* **23**, 99-  
134
- RADOLA, B. J. (1984): High-resolution preparative isoelectric focusing. *Meth. Enzymol.* **104**,  
256-75
- REESE, J. H. (1992): Renal cell carcinoma. *Curr. Op. Oncol.* **4**, 427-34
- REEVES, H. C.; HEEREN, R.; MALLOY, P. (1981): Enzyme purification using antibody  
crosslinked to protein A agarose: application to *Escherichia coli* NADP-isocitrate  
dehydrogenase. *Anal. Biochem.* **115**, 194-6
- RENSWOUDE, van, J.; KEMPF, C. (1984): Purification of integral membrane proteins. *Meth.*  
*Enzymol.* **104**, 329-39
- RIETHMÜLLER, G.; SCHNEIDER-GÄDICKE, E.; JOHNSON, J. P. (1993): Monoclonal  
antibodies in cancer therapy. *Curr. Op. Immunol.* **5**, 732-9
- RITCHIE, A. W. S.; CHISHOLM, G. D. (1983): The natural history of renal carcinoma. *Semin.*  
*Oncol.* **10**, 390-400
- ROBSON, C. J.; CHURCHILL, B. M.; ANDERSON, W. (1969): The results of radical  
nephrectomy for renal cell carcinoma. *J. Urol.* **101**, 297-301
- RONCO, P.; BRUNISHOLZ, M.; GENITEAU-LEGENDRE, M.; CHATELET, F.; VERROUST,  
P.; RICHET, G. (1987): Physiopathologic aspects of Tamm-Horsfall protein: a  
phylogenetically conserved marker of the thick ascending limb of Henle's loop. *Adv.*  
*Nephrol.* **16**, 231-49
- ROSENFELD, J.; CAPDEVIELLE, J.; GUILLEMOT, J. C.; FERRARA, P. (1992): In-gel  
digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel  
electrophoresis. *Anal. Biochem.* **203**, 173-9

- SABOLIC, I.; BURCKHARDT, G. (1990): ATP-driven proton transport in vesicles from the kidney cortex. *Meth. Enzymol.* **101**, 505-20
- SAITO, A.; PIETROMONACO, S.; LOO, A.; FARQUHAR, M. G. (1994): Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9725-9
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-7
- SCHERBERICH, J. E.; BIRK, H. W.; SCHOEPPE, W. (1990): Tubule-derived membrane glycoproteins in the urine of patients (including those with AIDS) as analysed by radioimmunoblotting. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **28**, 31-35
- SCHMID, H.-P.; SZABO, J. (1997): Das Nierenzellkarzinom - eine aktuelle Übersicht. *PRAXIS: Schweizer. Rundsch. Medizin* **86**, 837-43
- SCHMIDT, U.; GUDER, W. G. (1976): Sites of enzyme activity along the nephron. *Kidn. Int.* **9**, 233-42
- SCHNEIDER, C.; NEWMAN, R. A.; SUTHERLAND, D. R.; ASSER, U.; GREAVES, M. F. (1982): A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J. Biol. Chem.* **257**, 10766-9
- SECHER, D. S.; BURKE, D. C. (1980): A monoclonal antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon. *Nature London* **285**, 446-50
- SERWE, M.; MEYER, H. E. (1994): Microseparation techniques I: High performance liquid chromatography. In: KELLNER, R.; LOTTSPEICH, F.; MEYER, H. E. (Hrsg.): *Microcharacterization of proteins*. VCH Weinheim, 29-45
- SIMONDS, W. F.; KOSKI, G.; STREATY, R. A.; HJELMELAND, L. M.; KLEE, W. A. (1980): Solubilization of active opiate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4623-7
- STEFFENS, M. G.; BOERMAN, O.; OOSTERWIJK-WAKKA, J. C.; OOSTERHOF, G. O. N.; WITJES, J. A.; KOENDERS, E. B.; OYEN, W. J. G.; BUIJS, W. C. A. M.; DEBRUYNE, F. M. J.; CORSTENS, F. H. M.; OOSTERWIJK, E. (1997): Targeting of renal cell carcinoma with iodine-131-labeled chimeric monoclonal antibody G250. *J. Clin. Oncol.* **15**, 1529-37

- SUROLIA, A.; BISHAYEE, S.; AHMAD, A.; BALASUBRAMANIAN, K. A.; THAMBI-DORAI, D.; PODDER, S. K.; BACHHAWAT, B. K. (1975): Studies on the interaction of concanavalin with glycoproteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **55**, 95-115
- THOENES, W.; RUMPELT, H. J.; STÖRKEL, S. (1990): Klassifikation der Nierenzellkarzinome/Tumoren und ihre Beziehung zum Nephron-Sammelrohrsystem. *Klin. Wochenschr.* **68**, 1102-11
- THOMAS, C. T.; McNAMEE, M. G. (1990): Purification of membrane proteins. *Meth. Enzymol.* **182**, 499-520ds
- TOLKOFF-RUBIN, N. E.; THOMPSON, R. E.; PIPER, D. J.; HANSEN, W. P.; BANDER, N. H.; CORDON-CARDO, C.; FINSTAD, C. J.; KLOTZ, L. H.; OLD, L. J.; RUBIN, R. H. (1987): Diagnosis of renal proximal tubular injury in renal transplant patients by a urinary assay for a proximal tubular antigen, the adenosine-deaminase-binding-protein. *Transplant.* **41**, 593-7
- TSUCHIDA, S.; SATO, K. (1983): Purification of detergent-solubilized form and membrane-binding domain of rat  $\gamma$ -glutamyltransferase by immuno-affinity and hydrophobic chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* **756**, 341-8
- TURNER, M. (1991): Moleküle, die Antigene erkennen. In: ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. K. (Hrsg.): *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 54-65
- TZAGOLOFF, A.; PENEFSKY, H. S. (1971): Extraction and purification of lipoprotein complexes from membranes. *Meth. Enzymol.* **XXII**, 219-30
- VEYHL, M.; SPANGENBERG, J.; PÜSCHEL, B.; POPPE, R.; DEKEL, C.; FRITZSCH, G.; HAASE, W.; KOEPESELL, H. (1993): Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter. *J. Biol. Chem.* **268**, 25041-53
- VOET, D.; VOET, J. G. (1992): Techniken der Proteinreinigung. In: VOET, D.; VOET, J. G. (Hrsg.): *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 72-105
- WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. (1993): *Rekombinierte DNA*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- WEBER, K.; OSBORN, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-12
- WERF-MESSING, Van der, B. (1973): Carcinoma of the kidney. *Cancer* **32**, 1056-61

- WESSEL, D.; FLÜGGE, U. I. (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141-3
- WESTERMANN, P. (1997): Enzym- und Proteinanalytik. In: GANTEN, D.; RUCKPAUL, K. (Hrsg.): *Handbuch der molekularen Medizin, Band 1, Molekular- und zellbiologische Grundlagen.* Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 109-44
- WILLNOW, T. E.; GOLDSTEIN, J. L.; ORTH, K.; BROWN, M. S.; HERZ, J. (1992): Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J. Biol. Chem.* **267**, 26172-80
- WINTER, G.; HARRIS, W. J. (1993): Humanized Antibodies. *Immunol. Today* **14**, 243-6
- WINTER, G.; MILSTEIN, C. (1991): Man-made antibodies. *Nature London* **349**, 293-9
- YAGODA, A.; ABI-RACHED, B.; PETRYLAK, D. (1995): Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma:1983-1993. *Sem. Oncol.* **22**, 42-60
- YOUNG, R. A.; DAVIS, R. W. (1983): Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1194-8
- YOUNG, R. C. (1998): Metastatic renal-cell carcinoma: what causes occasional dramatic regressions? *New Engl. J. Med.* **338**, 1305-6
- ZHENG, G.; BACHINSKY, D. R.; STAMENKOVIC, I.; STRICKLAND, D. I.; BROWN, D.; ANDRES, G.; McCLUSKEY, R. T. (1994): Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family. gp330 and LRP/ $\alpha$ 2MR, and the receptor-associated protein, (RAP). *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 531-42

## 10 Anhang

Fraktion	gp400 [SHE]			
	Präparation-1	Präparation-2	M	SD
AM	0,3333	0,2452	0,2826	0,0541
	0,3134	0,2195		
	0,3572	0,2271		
Ü1	1,2036	0,3045	0,7458	0,4272
	1,2401	0,3429		
	1,0648	0,3190		
Ü2	0,2445	0,3224	0,2895	0,0278
	0,2826	0,3007		
	0,2676	0,3191		
P3	1,3183	1,5823	1,4625	0,1332
	1,3633	1,4883		
	1,3440	1,6787		
P5	1,4034	1,3097	1,3897	0,1087
	1,4118	1,2101		
	1,5588	1,4446		
P6	2,0796	3,3519	2,6834	0,6554
	2,1881	3,0752		
	1,8762	3,5291		

Tab. 10.1 **Präparation von Endosomen des Schweinenierencortex: Bindung des N4A4-Antikörpers in den einzelnen Präparationsfraktionen**

Ausgehend vom Nierencortex der Schweineniere wurde eine Endosomenpräparation nach SABOLIC und BURCKHARDT (1990) durchgeführt. Von jeder weiterverarbeiteten Fraktion wurde ein Aliquot entnommen und mittels Festphasen-Radioimmunoassay hinsichtlich der Bindung des N4A4-Antikörpers untersucht. Die Meßergebnisse sind in SHE ausgedrückt. Eine SHE (Schweinenierencortex-Homogenat-Einheit) stellt hierbei jene Antigenmenge dar, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat enthalten ist. Es wurden drei Präparationen durchgeführt, wobei von jeder Präparation Tripelbestimmungen durchgeführt wurden.

Detergenz	Konzentration (w/v) [%]	Gp400 SHE	Proteinkonz. [µg/ml]	bereinigte SHE (bei theoretischer Proteinkonzentration von 30 µg/ml)
Cholat	5,00	0,4473	28,7	0,4675
	2,50	0,3529	22,8	0,4643
	1,00	0,2604	20,2	0,3867
	0,50	0,1900	20,8	0,2741
	0,25	0,0470	18,1	0,0778
	0,10	0,0308	17,1	0,0540

Tab. 10.2 **Solubilisierung des gp400 bei unterschiedlichen Cholatkonzentrationen: Meßergebnisse nach Festphasen-Radioimmunoassay**

Endosomen des Schweinenierencortex wurden mit unterschiedlichen Cholatkonzentrationen wie in Abschnitt 4.8 beschrieben solubilisiert. Die Zentrifugationsüberstände wurden anschließend im Festphasen-Radioimmunoassay hinsichtlich der Bindungsfähigkeit des N4A4-Antikörpers untersucht. Die Meßergebnisse sind ausgedrückt in SHE, wobei eine SHE (Schweinenierencortex-Homogenat-Einheit) derjenigen Antigenmenge entspricht, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex-Homogenat vorhanden ist.

Fraktion	pH-Wert	Volumen nach Dialyse [ml]	Proteinkon- zentration [mg/ml]	Gesamtprotein [mg]	N4A4 [SHE/5µg]	Gesamt N4A4 [SHE]
1	12,23	15,7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	12,23	16,3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3	11,71	15,3	0,0041	0,0627	0,0000	0,0000
4	10,88	14,4	0,0084	0,1210	0,0000	0,0000
5	10,43	13,9	0,0069	0,0959	0,0000	0,0000
6	10,12	14,2	0,0075	0,1065	0,0000	0,0000
7	9,79	13,0	0,0077	0,1001	0,0000	0,0000
8	9,53	12,7	0,0077	0,0978	0,0000	0,0000
9	9,28	11,6	0,0077	0,0893	0,0000	0,0000
10	9,00	10,5	0,0101	0,1061	0,0000	0,0000
11	8,64	10,1	0,0141	0,1424	0,0000	0,0000
12	8,25	10,0	0,0305	0,3050	0,0000	0,0000
13	7,93	10,1	0,0608	0,6141	0,0989	12,1465
14	7,16	9,7	0,0761	0,7382	0,2571	37,9567
15	6,88	7,5	0,0753	0,5648	0,0375	4,2356
16	6,41	8,6	0,0842	0,7241	0,0344	4,9790
17	6,14	8,1	0,1317	1,0668	1,0907	232,7052
18	5,60	8,0	0,0889	0,7112	0,1921	27,3286
19	4,93	7,3	0,0553	0,4037	0,1004	8,1021
20	4,57	8,2	0,0378	0,3100	0,7035	43,6083
21	4,37	7,1	0,0156	0,1108	0,1838	4,0711
22	4,20	7,0	0,0141	0,0987	1,4289	28,2065
23	4,07	7,1	0,0152	0,1079	0,5679	12,2582
24	3,69	6,9	0,0469	0,3236	0,9310	60,2581
25	3,25	6,1	0,0553	0,3373	0,0085	0,5755
26	2,36	5,2	0,0335	0,1742	0,0000	0,0000
27	2,05	4,8	0,0308	0,1478	0,0000	0,0000
28	1,98	4,6	0,0254	0,1168	0,0000	0,0000
29	1,95	5,5	0,0433	0,2382	0,0000	0,0000

Tab. 10.3 **Isoelektrische Fokussierung der solubilisierten Endosomenfraktion des Schweinenierencortex**

Die mit Cholat, 2 % (w/v), solubilierte Endosomenfraktion des Schweinenierencortex wurde einer präparativen isoelektrischen Fokussierung im Svensson-Rohr unterworfen. Nach der Fokussierungszeit von 16 h (2,0 kV, 15 W) wurden ca. 30 Fraktionen gesammelt. Der pH-Wert jeder Fraktion wurde bestimmt und das Volumen jeder Fraktion nach 24stündiger Dialyse gegen PBS-A gemessen. Die Proteinkonzentration wurde nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) bestimmt und die jeweilige Bindung des N4A4-Antikörpers mittels Festphasen-Radioimmunoassay ermittelt. Das Ergebnis ist in SHE (Schweinenierencortex-Homogenat-Einheiten) ausgedrückt, wobei eine SHE derjenigen Antigenmenge entspricht, die in einem Mikrogramm Schweinenierencortex enthalten ist.

## 11 Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. med. Horst-Walter Birk, Oberarzt an der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen, danke ich für die Überlassung des Themas und für die wertvolle Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Professor Dr. oec. troph. Hannelore Daniel vom Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie am Institut für Ernährungswissenschaft der Technischen Universität München danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. med. Sönke Jeßen, Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik II der Universitätsklinik Gießen, danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft im Verlauf der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr. med. Peter Presek vom Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie danke ich für die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der präparativen isoelektrischen Fokussierung im Svensson-Rohr.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Dr. rer. nat. Monica Linder und Herrn Dr. rer. nat. Dietmar Linder vom Biochemischen Institut der Universitätsklinik Gießen für ihren tatkräftigen Einsatz bei der Durchführung der Aminosäuresequenzanalyse.

Allen Mitarbeitern des Nephrologischen Labors der Medizinischen Klinik II am Universitätsklinikum Gießen danke ich sehr herzlich für die nette Zusammenarbeit.