

**Generierung von gefäß- und endothel-
spezifischen scFv-Antikörpern im Ratten-
modell (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769)**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
am Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Anna Schuster

Hamburg 2005

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. T. MEINERTZ
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 24. Juni 2005

Hamburg, den 04. Juni 2005



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Meinem Ehemann und meiner Oma in Liebe und Dankbarkeit

„Die Wissenschaft, richtig verstanden,
heilt den Menschen von seinem Stolz;
denn sie zeigt ihm seine Grenzen.“

Albert Schweitzer

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Mechanismen der Entstehung von Blutgefäßen	1
1.1.1	Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese	1
1.1.2	Positive und negative Aspekte des Gefäßwachstums	5
1.1.3	Mediatoren der Angiogenese und Arteriogenese	8
1.2	VEGF und VEGF-Rezeptoren	12
1.2.1	Bedeutung von VEGF für das kardiovaskuläre System	12
1.2.2	Funktion und Expressionsmuster der VEGF-Rezeptoren Flk-1/KDR und Flt-1	15
1.3	Rolle des Endotheliums in physiologischen und pathologischen Prozessen	18
1.3.1	Aufbau der Blutgefäße	18
1.3.2	Heterogenität der Endothelien	19
1.3.3	Stimulierung der Endothelzellaktivierung	21
1.4	Antikörper als Bestandteile der humoralen Immunantwort	24
1.4.1	Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente	24
1.4.2	„Phage display“	28
1.4.3	Expression löslicher Antikörperfragmente in bakteriellen Systemen	30
1.5	Zielsetzung der Arbeit	33
2	MATERIAL UND METHODEN	36
2.1	Material	36
2.1.1	Gewebeproben	36
2.1.2	Zelllinien	36
2.1.3	Bakterienstämme, Helferphagen und Phagen	37
2.1.4	Plasmide und Phagemide	38
2.1.5	Synthetische Oligonukleotide und Längenstandards	39
2.1.6	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	41
2.1.7	Medien, Puffer und Lösungen	43
2.1.8	Enzyme und Reaktionskits	47
2.1.9	Antikörper und enzymkonjugierte Nachweisantikörper	49
2.1.10	Laborgeräte, Apparaturen und sonstiges Zubehör	51

2.2	Zellkultur	54
2.2.1	Kultivierung von Hybridomazellen	54
2.2.2	Kultivierung von RHE-A/ neg.- und PAE-KDR-11-Endothelzelllinien	54
2.2.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	55
2.2.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	56
2.3	Molekularbiologische Methoden	56
2.3.1	Methoden zur RNA-Aufarbeitung	56
2.3.1.1	Isolierung von RNA aus Hybridomazellen	57
2.3.1.2	Reinigung und Konzentrationsbestimmung der RNA	58
2.3.1.3	Qualitätsnachweis der RNA mittels Gelelektrophorese	59
2.3.1.4	DNase-Verdau	59
2.3.1.5	cDNA-Synthese	60
2.3.2	Anzucht und Transformation von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen	61
2.3.2.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> und Herstellung von Stammkulturen	61
2.3.2.2	Herstellung Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	61
2.3.2.3	Hitzeschock-Transformation von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen	62
2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	63
2.3.3.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	63
2.3.3.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA	64
2.3.4	Reinigung, Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA	64
2.3.5	Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese von DNA	66
2.3.6	Elution von DNA aus Agarosegelen	67
2.3.7	DNA-Klonierungstechniken	67
2.3.7.1	Restriktion von DNA	67
2.3.7.2	DNA-Ligationsmethoden	68
2.3.8	Polymerase-Kettenverlängerungsreaktion (PCR)	69
2.3.8.1	PCR-Amplifikation von DNA- und cDNA-Fragmenten	69
2.3.8.2	PCR-basierte Analyse rekombinanter Bakterienklone	71
2.3.8.3	PCR-vermittelte Modifizierungen von DNA und Primer Design	71
2.3.9	Subklonieren von PCR-Produkten	72
2.3.10	Aufreinigung von PCR-Produkten	73
2.3.11	DNA-Sequenzierung	73

2.4	„Phage display“-Technik	74
2.4.1	Herstellung einer Phagenbibliothek	75
2.4.2	Isolierung der Phagen aus <i>Escherichia coli</i>	76
2.4.3	Titration der Phagen	76
2.4.4	Selektion und Anreicherung von antigenspezifischen Phagen	77
2.4.4.1	„Biopanning“ auf Gewebeschnitten von Kollateralarterien und Kontrollgefäßen	77
2.4.4.2	„Biopanning“ auf Endothelzelllinien	79
2.4.4.3	<i>In vivo</i> „Biopanning“	80
2.5	Proteinbiochemische Methoden	82
2.5.1	Expression rekombinanter scFv-Antikörperfragmente in <i>Escherichia coli</i>	82
2.5.2	Isolierung rekombinanter Proteine aus <i>Escherichia coli</i>	83
2.5.3	Dialyse von Proteinextrakten	84
2.5.4	Anreicherung und Reinigung von rekombinanten Antikörpern	84
2.5.4.1	Reinigung von E-tag gekoppelten scFv-Antikörpern	84
2.5.4.2	Reinigung von His ₆ -tag gekoppelten scFv-Antikörpern	85
2.5.5	Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration	86
2.5.6	Isolierung von CTA mittels Protein L-Säule	86
2.5.7	Proteinbestimmung nach Bradford	87
2.5.8	SDS-PAA-Gelelektrophorese	88
2.5.9	Färbungen von Polyacrylamidgelen	89
2.5.9.1	Coomassie-Färbung	89
2.5.9.2	Silberfärbung	89
2.5.10	Western Blot	90
2.5.11	Ponceaurotfärbung von Proteinen auf Blots	91
2.5.12	Immundetektion	91
2.6	Immunhistochemische Methoden	92
2.6.1	Anfertigung von Gefrierschnitten und Paraffinschnitten	92
2.6.2	Anfertigung von Zellpräparaten	93
2.6.3	Fixierung und Entparaffinierung von Gewebeschnitten	93

2.6.4	Fixierung von Zellen	94
2.6.5	Immunhistologische Nachweise mittels Peroxydase	94
2.6.6	Immunfluoreszenznachweise	96
3	ERGEBNISSE	98
3.1	Klonierung von gefäßspezifischen scFv-Antikörpern	98
3.1.1	Isolierung der RNA aus Hybridomazellen	98
3.1.2	cDNA-Synthese und Amplifikation von V _H - und V _L -Domänen	100
3.1.3	Herstellung von scFv-Antikörperfragmenten	101
3.1.4	Amplifikation von rekombinanten scFv in TOPO TA -Klonierungssystem	102
3.1.5	Ligation und Klonierung von scFv-Antikörpern im pCANTAB 5E- Phagemid-Vektor	104
3.1.6	Sequenzierung der positiven Klone	106
3.2	„Phage display“ mit CTA-spezifischen scFv-Antikörpern	107
3.2.1	Expression von rekombinanten scFv-Antikörpern auf der Oberfläche filamentöser M13-Bakteriophagen	107
3.2.2	Selektion der scFv-Phagenbibliothek auf Rattengefäßschnitten (<i>in situ</i>)	108
3.2.3	„Biopanning“ von gefäßspezifischen Phagen auf RHE-A/neg.-Endothelzellen	112
3.2.4	Untersuchung der Gefäßspezifität von scFv-Antikörperfragmenten mittels <i>in vivo</i> „Biopanning“	115
3.2.5	Analyse der Anreicherung von gefäßspezifischen CTA-scFv-Phagen	117
3.2.6	„Biopanning“ von CTA-spezifischen Phagen auf PAE-KDR-1-Endothelzellen	118
3.2.7	„Biopanning“ der CTA-spezifischen K555bB2- und K555aB4-Phagen auf Humangefäßschnitten (<i>in situ</i>)	118
3.3	Restriktions- und Sequenzanalysen der ausselektierten CTA-scFv- Antikörper	120

3.4	Immunhistochemische Nachweise der CTA-Antikörperspezifität	125
3.4.1	Lokalisierung der CTA-Expressionssignale in Rattengefäßendothelien mit Hilfe des CTA-157-Antikörpers	126
3.4.2	Immunhistochemische Nachweise der CSA-Expression auf Rattengefäß-schnitten unter Verwendung von CTA-spezifischen scFv-Phagen	127
3.4.2.1	Untersuchung der Bindung von CTA-scFv-Phagen an Rattengefäße <i>in situ</i>	128
3.4.2.2	Untersuchung der Bindung von CTA-scFv-Phagen an Rattengefäße <i>in vivo</i>	130
3.4.2.3	Untersuchung der Bindung von CTA-scFv-Phagen an Tumorgefäße	132
3.4.3	Lokalisierung der CSA-Expressionssignale in Humangefäßendothelien mit Hilfe des CTA-157-Antikörpers	133
3.4.4	Immunhistochemische Nachweise der CSA-Expression auf Humangefäß-schnitten unter Verwendung von CTA-spezifischen scFv-Phagen	136
3.4.5	Vergleich der CSA-Antigenexpressionsmuster auf Endothelien von Ratten- und Humangefäßen	137
3.5	Untersuchung der VEGFR-2-Antigenexpression auf Human- und Rattengefäßen mittels VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Phagen	138
3.5.1	„Biopanning“ und Anreicherung von VEGFR-2-spezifischen A7- scFv-Phagen auf Humangefäßen	138
3.5.2	Immunhistochemische Nachweise der VEGFR-2-Expression auf Humangefäßen unter Verwendung von A7-scFv-Phagen	139
3.5.3	„Biopanning“ und immunhistochemische Untersuchung der VEGFR-2-Expression auf Rattengefäßen unter Verwendung von A7-scFv-Phagen	142
3.6	Analyse der Bindungseigenschaften von CTA- sowie VEGFR-2-Einkettenantikörpern	142
3.6.1	Vergleich der Aminosäuresequenzen von CTA- und VEGFR-2-scFv	142
3.6.2	Vergleich der Verteilung von CTA- und VEGFR-2-scFv-Antikörpersignalen auf Humangefäßen	145
3.7	Untersuchung der Spezifität von löslichen scFv-Antikörpern auf Endothelien von Humangefäßen	146
3.7.1	Herstellung löslicher CTA- sowie VEGFR-2-scFv in <i>Escherichia coli</i>	146
3.7.2	Anreicherung von gefäßspezifischen, löslichen scFv-Antikörperfragmenten	149

3.7.3	Immunhistochemische Nachweise der Epitopspezifität löslicher Einzelkettenantikörper auf Humangefäßschnitten	150
3.7.4	Vergleich der Antigenbindungsaffinitäten zwischen den löslichen VEGFR-2-scFv-Antikörpern und den VEGFR-2-exprimierenden Phagen auf humanen Gefäßschnitten	152
4	DISKUSSION	153
4.1	Generierung von CTA-spezifischen scFv-Antikörpern	153
4.2	Selektion kollateralspezifischer scFv-Antikörperfragmente auf Gefäßschnitten bzw. Endothelzellen	156
4.2.1	Optimierung der Selektionsbedingungen für die CTA-scFv-Phagen	157
4.2.2	„Biopanning“-Experimente mit CTA-spezifischen Phagen auf Rattengefäßen und RHE-Zellen	159
4.2.3	Alternative Selektionsmethoden für antigenspezifische Einzelkettenantikörper	161
4.2.4	Vor- und Nachteile der „Phage display“-Technik	163
4.3	Nachweise der Heterogenität des Endothels verschiedenartiger, arterieller Gefäße	164
4.3.1	Lokalisierung der CTA-Antigensignale auf Ratten- und Humangefäßen	164
4.3.2	Verteilungsmuster der VEGFR-2-Antikörpersignale auf Humangefäßen	166
4.4	Affinitätsunterschiede zwischen gefäßspezifischen scFv-Antikörpern in diversen Spezies-Modellen	168
4.5	Expression von löslichen scFv in bakteriellen Expressionssystemen	170
4.5.1	Einfluss des Bakterienwachstums sowie einiger Expressionsparameter auf die Produktion löslicher scFv-Antikörperfragmente	170
4.5.2	Strukturelle Unterschiede zwischen den CTA- und VEGFR-2-scFv	172
4.6	Fazit und Ausblick	174
5	ZUSAMMENFASSUNG	175
6	LITERATUR	177
7	ANHANG	192
7.1	Abkürzungen	192
7.2	Danksagungen	196

1 EINLEITUNG

1.1 Mechanismen der Entstehung von Blutgefäßen

1.1.1 Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese

Das kardiovaskuläre System ist das erste funktionsfähige Organsystem des Körpers, welches im Rahmen der Embryogenese ausgebildet wird. In der frühen Embryonalentwicklung spielt das Blutgefäßsystem eine essentielle Rolle sowohl für die Nährstoffversorgung des Embryos, als auch für die Entstehung weiterer Organe. In der Entwicklung von Blutgefäßen werden drei grundsätzliche Prozesse voneinander unterschieden: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese. Vaskulogenese bezeichnet die Bildung von Blutgefäßen während der Embryogenese. Dieser Vorgang beginnt mit der Differenzierung des Mesenchyms zu Angioblasten und Stammzellen der Hämatopoese, die sich anschließend zu zellulären Aggregaten, den sogenannten Blutinseln, formen. Diese bilden Hohlräume (Lakunen) aus, die sich mit hämatopoetischen Zellen unterschiedlicher Reifungsstufen füllen und zu primitiven Gefäßen konfluieren. Die umliegenden Angioblasten ordnen sich um die Lakunen herum und differenzieren sich zu Endothelzellen. Durch die Verschmelzung von mehreren Endothelzellen wird ein kapilläres Netzwerk ausgebildet, welches sich letztendlich zu einem komplexen vaskulären System entwickelt (Abb. 1.1.1.A).

Der Umbau des primären Gefäßsystems erfolgt durch den Prozess der Blutgefäßneubildung aus bereits bestehenden Kapillaren und Venolen und wird als Angiogenese bezeichnet. Der Begriff der Angiogenese wurde schon 1935 von Hertig geprägt und 1989 vom Prozess der Vaskulogenese vollständig abgegrenzt (Noden, 1989). Wie bereits erwähnt, nimmt die Angiogenese ihren Ausgangspunkt von postkapillaren, durch die Vaskulogenese gebildeten Gefäßtypen. Die Wände dieser Gefäße sind aus Endothel, Basallamina und einigen Perizyten aufgebaut, doch es fehlt ihnen die glatte Muskulatur in der Tunica media (Mosimann und Kohler, 1990). Das Gefäßendothel besteht in der Regel aus ruhenden Zellen, die sich im G1-Stadium ihres Zellzyklus befinden. Weniger als 0,01% der Zellen sind mitotisch aktiv und ihre Teilungsrate beträgt somit mehrere Jahre (Folkman und Shing, 1992). Das Wachstum der Endothelzellen kann jedoch durch mehrere, verschiedene Faktoren stimuliert werden. Bei einer Induktion der Angiogenese sind diese Zellen imstande eine Verdopplungszeit von 24 bis 48 Stunden zu erreichen.

Die Angiogenese ist ein sehr komplexer Prozess und kann in mehrere Phasen unterteilt werden (Auerbach und Auerbach 1994; Folkman, 1985 und 1986). Im ersten, als Initiation bezeichneten Schritt der Angiogenese-Kaskade, werden vom Gewebe angiogene Faktoren

freigesetzt, die auf das Gefäßendothel einwirken. Diejenigen Endothelzellen, die einem Angiogenese-Stimulus ausgesetzt sind, beginnen daraufhin hohe Konzentrationen von Proteasen wie Plasminogen-Aktivatoren und Metalloproteinasen (wie z.B. Kollagenase) zu sezernieren (Gross *et al.*, 1983; Kalebic *et al.*, 1983; Moscatelli *et al.*, 1981). Die Sekretion von proteolytischen Enzymen führt zum enzymatischen Abbau der Basalmembran und somit zur lokalen Degradation der extrazellulären Matrix. Die im Bereich der degradierten Basalmembran liegenden Endothelzellen verlieren auf diese Weise ihren engen Zellkontakt, ändern ihre morphologische Form und migrieren in das angrenzende, perivaskuläre Stroma. Dabei bilden sie kleine Fortsätze, die in Richtung des angiogenen Stimulus entsandt werden. Der mittlere Abschnitt des auf diese Art entstehenden Gefäßsproßes ist mitotisch sehr aktiv. Die in dieser Region liegenden Endothelzellen proliferieren sehr stark, im Gegensatz zu den am äußeren Ende befindlichen, die unter dem Einfluss anderer Angiogenesestimulatoren eine weitere Migration des Sproßes fortführen. Anschließend wird die gesamte Zellteilungsrate gesenkt, die Zellen beginnen fester aneinander zu adhären und in einem kontinuierlichen oder fenestrierten Monolayer zu wachsen. Es folgt die Ausbildung einer längsgerichteten kapillarähnlichen Struktur, in deren Mitte ein zentrales Lumen entsteht. Durch die Fusion von zwei Sproßspitzen entsteht eine Kapillarschleife, in der ein gerichteter Blutfluss stattfindet (Ausprunk und Folkman, 1977; Folkman und Haudenschild, 1980). Die um das Lumen der neugebildeten Kapillare angeordneten Endothelzellen fangen nunmehr an, extrazelluläre Matrixkomponenten zu synthetisieren und somit eine neue Basalmembran aufzubauen. Die Reifung der jungen Gefäße wird durch die Apposition von Perizyten und glatten Muskelzellen abgeschlossen. Die im Rahmen der Angiogenese entstandenen Blutgefäße können durch Remodellierungsprozesse, die Fusion und Regression von Kapillaren sowie Änderungen im Lumendurchmesser und der Gefäßwanddicke umfassen, in größere Gefäße umgewandelt werden (Abb.1.1.1.B).

Neben der oben beschriebenen Angiogenese spielt der Prozess der Arteriogenese für die Entstehung von vaskulären Gefäßen eine vergleichbar wichtige Rolle. Arteriogenese bezeichnet das Wachstum von Kollateralarterien aus präexistierenden Verbindungen (Anastomosen). Während dieses Vorgangs werden aus kleinen Arteriolen, durch Proliferations- und Remodellierungsprozesse, funktionell bedeutsame Kollateralgefäße gebildet. Arteriogenese ist ein eigenständiger Vorgang, welcher unabhängig von der Angiogenese stattfindet (Herzog *et al.*, 2002) und einen aktiven Wachstumsprozess beinhaltet. Im Gegensatz zur Angiogenese, wird das Kollateralwachstum weder durch Hypoxie noch durch Ischämie ausgelöst (Deindl *et al.*, 2001; Helisch und Schaper, 2000).

Hauptstimuli der Kollateralbildung sind vielmehr hämodynamische und mechanische Parameter, die durch einen vermehrten Blutfluss erzeugt werden und lokal auf die Wände der Gefäße einwirken. Der bisher am häufigsten diskutierte Stimulator der Arteriogenese ist die Schubspannung. Dieses mechanische Signal wird über eine intrazelluläre Signalkaskade umgesetzt, die verschiedene Transkriptionsfaktoren anschaltet (z.B. *erg-1* und *carp*), welche wiederum zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen sowie zur Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf der Endotheloberfläche führen. Mit Hilfe der exprimierten Proteine werden aus dem vorbeiströmenden Blut Monozyten angelockt, die sich im Gefäßendothel zu Makrophagen differenzieren und Mediatoren freisetzen. Diese lösen wiederum starke Proliferation von Endothelzellen aus, die eine bis zu 20-fache Vergrößerung des Durchmessers der betroffenen Arteriole als Folge hat (Carmeliet, 2000).

Das Kollateralwachstum ist eindeutig ein biphasischer Prozess. Der proliferativen Phase, die in den meisten Fällen am dritten Tag nach der Okklusion ihr Maximum erreicht (Ito und Khmelevski, 2003), folgt ein extensiver Remodellierungsvorgang, der durch die Ausbildung von Neointima und die Zunahme des Wanddurchmessers gekennzeichnet ist (Abb. 1.1.1.C).

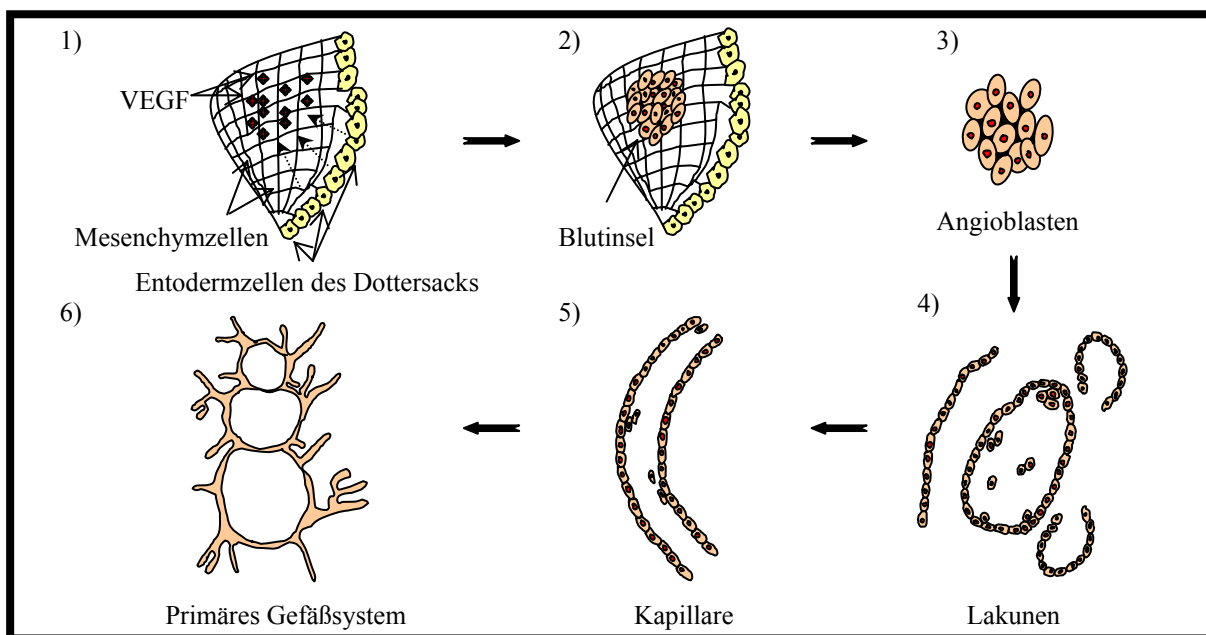


Abb.1.1.1.A: Schematische Darstellung der Vaskulogenese

1) Die Entodermzellen des Dottersacks sezernieren VEGF, welcher an den, von Mesenchymzellen exprimierten, VEGFR-2 (Flk-1/KDR) bindet. 2) und 3) Die Mesenchymzellen differenzieren sich und bilden Blutinseln aus hämatopoetischen Stammzellen und Angioblasten. 4) Die Blutinseln entwickeln sich zu Lakunen. 5) und 6) Mehrere Lakunen konfluieren zu Kapillaren und bilden ein primitives Gefäßsystem (Modifiziert nach Nawroth und Lasch, 1999).

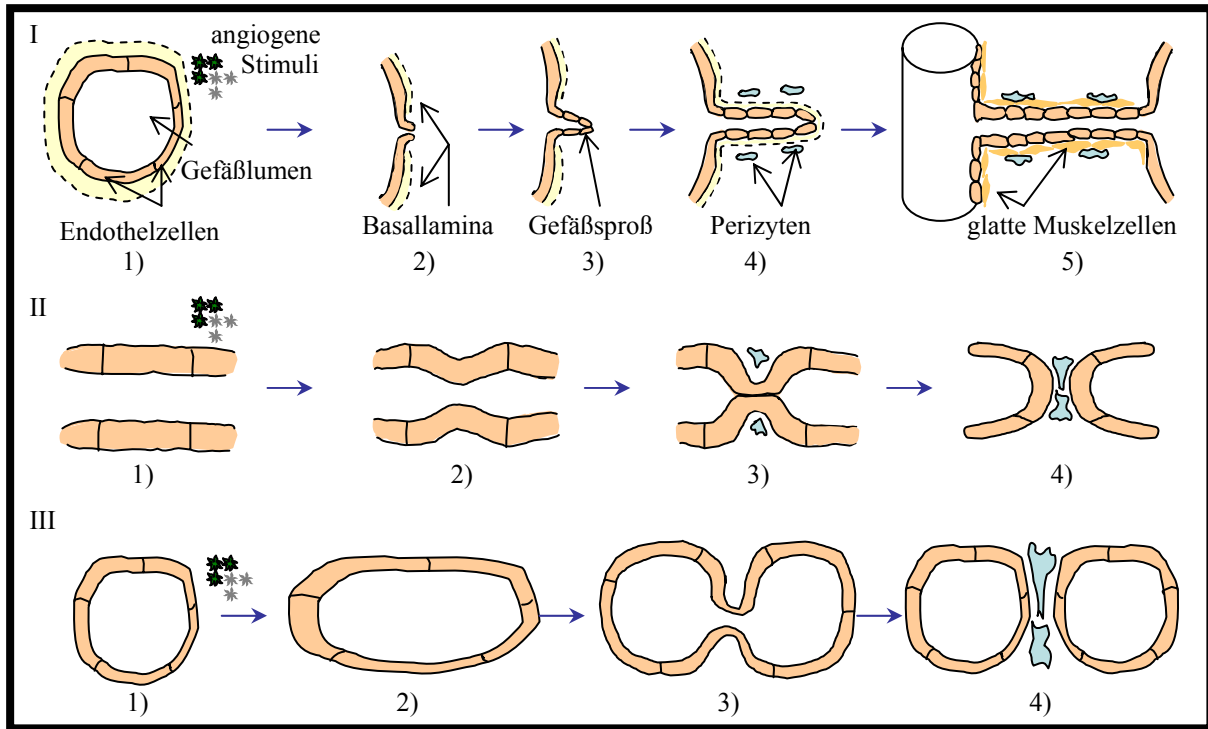


Abb. 1.1.1.B: Mechanismen der Angiogenese

I. Kapillarwachstum durch Sprossung. 1) und 2) In Antwort auf angiogene Stimuli kommt es zum raschen Abbau der Basalmembran. 3) und 4) Es folgt die Migration und Proliferation von Endothelzellen, die zur Ausbildung eines Gefäßsproßes führt. 5) Zwei Gefäßsprosse fusionieren zu einer neuen Kapillare, die in anschließenden Remodellierungsprozessen von einer neugebildeten Basalmembran, glatten Muskelzellen und Perizyten umgeben wird. **II. Kapillarwachstum durch Invagination von zwei gegenüberliegenden Endothelzellen.** **III. Längenwachstum von Kapillaren.** Angiogene Stimuli induzieren eine Dehnung der Gefäße in Richtung der Längsachse. Die Gefäßwand bildet Ausbuchtungen, die in das Lumen hineinragen und anschließend zur Abschnürung von zwei Tochterkapillaren führen.

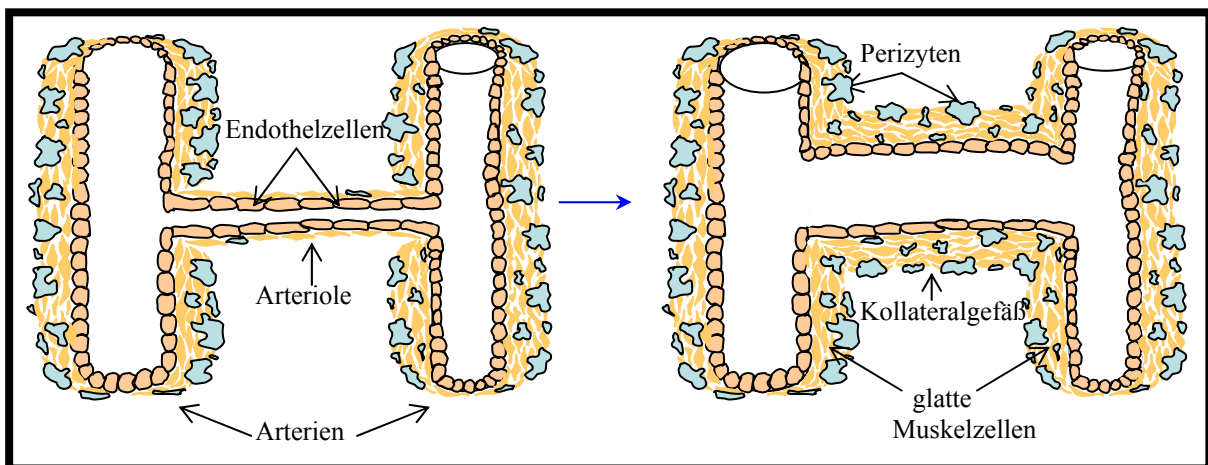


Abb. 1.1.1.C: Schematische Darstellung der Arteriogenese

Eine kleine Arteriole wird durch Proliferations- und Remodellierungsprozesse zu einer bedeutsamen Kollateralarterie umgebaut.

1.1.2 Positive und negative Aspekte des Gefäßwachstums

Die Entstehung des primären Blutgefäßsystems beginnt bereits in der zweiten Woche der Embryonalentwicklung und wird mit dem Ende der Organogenese (zweiter Monat) weitgehend abgeschlossen. Dieser, als Vaskulogenese bezeichnete Prozess ist jedoch nicht nur auf die Embryonalphase eingeschränkt. Unabhängige Untersuchungen von mehreren Arbeitsgruppen (Asahara *et al.*, 1997 und 1999; Lin *et al.*, 2000; Luttun *et al.*, 2002; Ribatti *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 1998) liefern heutzutage deutliche Hinweise auf eine postnatale Vaskularisierung, die sowohl während physiologischer Vorgänge (z.B. Bildung der Netzhaut), als auch im Verlauf einiger pathologischer Ereignisse (z.B. Aktivierung der Kapillarbildung in Tumoren) stattfindet.

Im Anschluss an die Vaskulogenese erfolgt, wie bereits erwähnt, ein Umbau des primären Gefäßsystems und eine weitere Vermehrung der Blutgefäße, welche durch den Prozess der Angiogenese gesteuert werden. Aufgrund der extrem niedrigen Teilungsraten von Endothelzellen, spielt dieser Vorgang im gesunden adulten Körper nur in Ausnahmefällen eine bedeutende Rolle. Natürliche angiogene Prozesse werden somit immer nur dann eingeleitet, wenn der Organismus unter besonderen Umständen ein vermehrtes Wachstum von Blutgefäßen benötigt. Dies ereignet sich beispielsweise in den weiblichen Reproduktionsorganen während der Follikelreifung, der Bildung des Corpus luteum, der Entwicklung der Placenta sowie in den Milchdrüsen im Verlauf der Gravidität (Folkman und Shing, 1992; Gospodarowicz und Thakral, 1978; Matsumoto *et al.*, 1992). Eine ebenfalls entscheidende Bedeutung hat die physiologische Angiogenese bei regenerativen Vorgängen, wie der Wundheilung (Fromer und Klinworth, 1975; Knighton *et al.*, 1982).

Die oben erwähnten Prozesse der Gefäßbildung unterliegen einer strengen Regulation durch Angiogenese-Stimulatoren und -Inhibitoren, die das Kapillarwachstum für eine bestimmte Zeitperiode initiieren und nach Beendigung der angiogenen Kaskade wieder zum Erliegen bringen (Folkman, 1985). Eine wichtige Funktion übernehmen dabei unter anderem die Perizyten, welche sich an die Endothelzellen anlagern und deren weitere Proliferation dadurch inhibieren (Orlidge und D'Amore, 1986 und 1987). Eine unkontrollierte Bildung von Blutgefäßen wird im Verlauf verschiedener pathologischer Prozesse induziert und ist im Gegensatz zu physiologischen Situationen nicht zeitlich begrenzt. Die retinale Neovaskularisation ist ein markantes Beispiel solcher pathologischer Angiogenese und gleichzeitig eine Hauptursache für den Verlust des Sehvermögens während der diabetischen Retinopathie.

Einen weiteren negativen Aspekt der Angiogenese schildert die übermäßige Gefäßbildung in einer Reihe von inflammatorischen Erkrankungen wie z.B. der Psoriasis oder der rheumatoiden Arthritis (Auerbach und Auerbach, 1994; Detmar *et al.*, 1994; Folkman, 1995a), in deren Verlauf Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und Blutplättchen aktiviert werden, die wiederum durch die Freisetzung von angiogenen Faktoren eine vermehrte Sprossung von Kapillaren induzieren. Die pathologische Form der Angiogenese ist ebenfalls für das Wachstum und die Metastasierung von soliden Tumoren und einigen Leukämieformen charakteristisch (Aguayo *et al.*, 2000; Folkman, 1971, 1990 und 1995). Maligne, entartete Zellen ernähren sich zunächst nur durch Substrate, die aus benachbarten Blutgefäßen in das Gewebe diffundieren (Folkman *et al.*, 1989). Das Wachstum dieser avaskulär vorliegenden Tumore ist unter solchen Bedingungen begrenzt. In diesem Stadium kann der Tumor maximal einen Durchmesser von 2-3 mm erreichen. Für die Fortsetzung seines Wachstums benötigt ein Tumor eine effizientere Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, die nur durch den Anschluss an ein ausgedehntes kapillares Netzwerk gewährleistet werden kann. Die Ursachen für die plötzlich auftretende Vaskularisierung von Tumorzellverbänden sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Einen der ersten Schritte stellt die Aktivierung von Endothelzellen durch die vom Tumor sezernierten Stimulatoren der Angiogenese dar (Folkman *et al.*, 1989; Senger *et al.*, 1996). Dabei kommt es zur Störung des Gleichgewichtes zwischen den negativen und positiven Angiogenesefaktoren, die letztendlich eine Abnahme von Inhibitoren (wie z.B. Thrombospondin) und gleichzeitige Zunahme von Stimulatoren (wie z.B. VEGF) als Folge hat. Die aktivierten Endothelzellen migrieren und proliferieren in Richtung der angiogenen Signale und führen somit zur vollständigen Neovaskularisierung und Blutperfusion des Tumorgewebes. Dank der ausreichenden Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, des Abtransportes von Stoffwechselprodukten sowie einer parakrinen Stimulation der Tumorzellen durch zahlreiche Wachstumsfaktoren aus dem Kapillarendothel, kann die Tumormasse ihren Durchmesser vergrößern und expandieren. Die Vaskularisierung bietet dem Tumor zusätzlich auch die Möglichkeit in den Blutkreislauf zu gelangen und somit in andere Organe und Gewebe des Körpers zu metastasieren (Abb.1.1.2.A). Die im Verlauf des Tumorwachstums neu gebildeten Gefäße unterscheiden sich jedoch von den in physiologischen Prozessen gebildeten Kapillaren. Sie weisen eine höhere Permeabilität auf, (Öffnungen in der Gefäßwand, endotheliale Fenster, transzelluläre Löcher, Vesikelbildung), verfügen über eine unvollständig synthetisierte Basalmembran und zeichnen sich durch eine im Vergleich zu gesunden Gefäßen gesteigerte Proliferationsrate aus (Hobson, 1984).

Ein weiterer pathologischer Zustand, der vermehrte Blutgefäßbildung induziert, ist die Gewebischämie. Im Gegenteil zu der oben beschriebenen Tumorprogression, übernimmt die Angiogenese im minderperfundierten Gewebe eine positive Funktion. Durch die Bildung von Kapillaren kann zwar das Fortschreiten von Ischämie nicht gestoppt werden, dennoch wird das hypoxische Gebiet zumindest im kleinen Maße mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, wodurch eine akute Nekrotisierung des betroffenen Gewebes verhindert werden kann.

Während die Angiogenese den Prozess der Neubildung von Kapillaren in physiologischen und pathologischen Situationen umfasst, stellt die Arteriogenese ein Kompensationsmechanismus dar, der nach einer Okklusion von Arterien stattfindet (Schaper und Buschmann, 1999). Die Folgen eines Gefäßverschlusses sind in der Regel Nährstoff- und Sauerstoffunterversorgung des betroffenen Bereiches sowie Anhäufung von Stoffwechselabbauprodukten, welche weitere Schäden im Gewebe auslösen und schließlich zu ischämischen Erkrankungen führen können. Die Bildung von Kollateralarterien spielt in diesem Zusammenhang eine sehr wichtige Rolle, da nur die größeren Gefäße (wie z.B. Arteriolen und Arterien) in der Lage sind, ausreichende Mengen an Blut zu transportieren, um die funktionell relevante Perfusionssteigerung eines Gewebes zu erreichen (Scholz *et al.*, 2001) und somit die Auswirkungen eines Gefäßverschlusses zu kompensieren (Abb. 1.1.2.B).

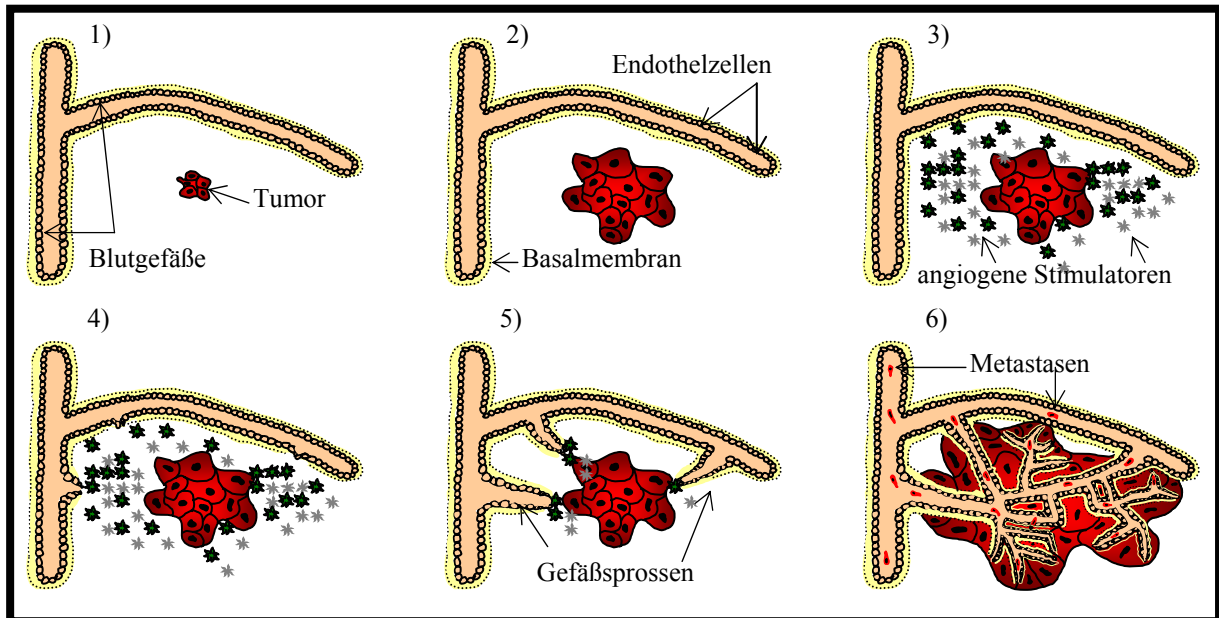


Abb. 1.1.2. A: Tumorangiogenese, negative Auswirkung von Gefäßwachstum

1) und 2) Avaskuläres Tumorwachstum. 3) Aktivierung und Freisetzung von Angiogenesefaktoren durch einen malignen Tumor. 4) Proteolytischer Abbau der Basalmembran. Migration und Proliferation von Endothelzellen in Richtung der angiogenen Signale. 5) Bildung von Gefäßsprossen. 6) Etablierung eines funktionellen Gefäßsystems im Tumorgewebe mit anschließender Expansion und Metastasierung des Tumors.

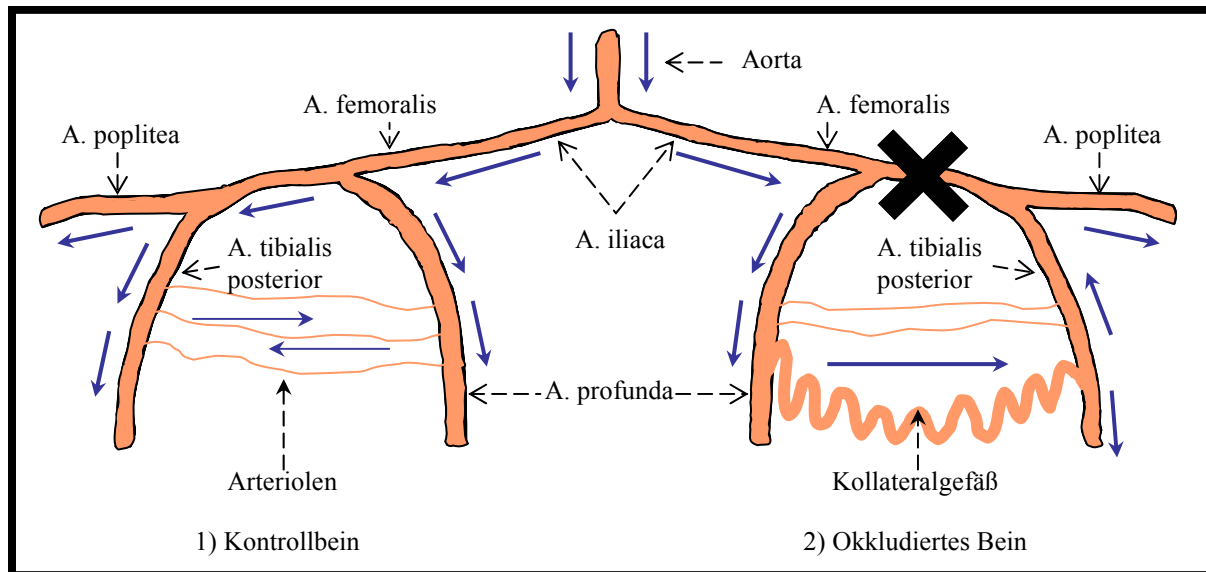


Abb. 1.1.2.B: Kollateralbildung nach einer Okklusion, positiver Aspekt des Gefäßwachstums

- 1) Schematische Darstellung der Blutzirkulation (blaue Pfeile) in einem gesunden Rattenbein.
- 2) Ausbildung eines Umgehungskreislaufes (Kollateralgefäß) nach Okklusion der A. femoralis im Rattenbein.

1.1.3 Mediatoren der Angiogenese und Arteriogenese

Die Prozesse der Angiogenese und der Arteriogenese werden durch ein Zusammenspiel von zahlreichen Aktivatoren und Inhibitoren koordiniert. Die Induktion des Gefäßwachstums ist in der Regel mit einer Änderung des Gleichgewichtes zwischen den stimulatorischen und inhibitorischen Faktoren assoziiert. Im Bezug auf die Angiogenese wird dieser Mechanismus als „angiogenic switch“ bezeichnet (Hanahan und Folkman, 1996). In den vergangenen Jahren wurde eine große Anzahl von pro- und antiangiogenen Substanzen identifiziert, charakterisiert und ihre Wirkung in mehreren *in vitro* sowie *in vivo* Modellen untersucht. Dabei ist die Erkenntnis gewonnen worden, dass nur ein Teil dieser Stoffe einen direkten Effekt auf die Endothelzellen ausübt (Folkman und Shing, 1992; Klagsbrun und D'Amore, 1991). Die indirekt wirkenden Angiogenesefaktoren benötigen andere Zellen (z.B. Makrophagen) zur Vermittlung ihrer stimulatorischen oder inhibitorischen Funktionen. Untersuchungen von Fajardo *et al.*, 1992 und Pepper *et al.*, 1993 haben bewiesen, dass manche Faktoren *in vivo* angiogen und *in vitro* antiangiogen wirken können, während andere in Abhängigkeit von ihrer Konzentration entgegengesetzte Wirkungen zeigen. Weiterhin gibt es eine Reihe von Angiogeneseregulatoren, die nur in Kooperation mit bestimmten Substanzen das Wachstum von Gefäßen aktivieren können (Risau, 1996).

Die direkten Stimulatoren der Angiogenese induzieren das Wachstum von Endothelzellen sowohl *in vivo*, als auch *in vitro*. Eine Schlüsselrolle spielen hierbei der Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und seine Rezeptoren, die in Kapitel 1.2 ausführlich beschrieben werden. Zu weiteren Vertretern dieser Gruppe gehören: Angiopoietine, FGF (Fibroblast Growth Factor) -Familie, PDGF (Platelet Derived Growth Factor) und TGF- α (Transforming Growth Factor- α) die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Die Angiopoietin-Familie besteht aus zwei Mitgliedern: Angiopoietin-1 (Ang-1) und Angiopoietin-2 (Ang-2), die an Tyrosin Kinase Rezeptor-2 (Tie-2) binden, der auf Endothelzellen exprimiert wird (Maisonpierre *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1995). Während Ang-1 im Verlauf der embryonalen Entwicklung im Myokard und im perivaskulären Mesenchym nachgewiesen wurde, kommt Ang-2 vorwiegend in glatten Muskelzellen vor (Davis *et al.*, 1996). Weiterhin fungiert Ang-2 als kompetitiver Inhibitor von Ang-1, indem er an Tie-2 bindet und somit Rezeptorstellen für Ang-1 blockiert. Hanahan (1997) und seine Mitarbeiter haben für die physiologische Angiogenese ein Zusammenspiel des VEGF-Systems mit dem Angiopoietin/Tie-2-System aufgezeigt. Demzufolge fördert die Aktivierung des Tie-2 Rezeptors durch Ang-1 die Stabilisierung und Reifung der ruhenden Blutgefäße, während die Blockierung desselben Rezeptors durch Ang-2 unter hypoxischen Bedingungen eine Auflockerung der Gefäßwand auslöst, den angiogenen Effekt des gleichzeitig induzierten VEGF verstärkt und somit die Sprossung und das Wachstum neuer Gefäße initiiert. Hingegen führt eine erhöhte Ang-2 Expression in normoxischen Situationen (z.B. in weiblichen Reproduktionsorganen während der Rückbildung des Gelbkörpers), in Abwesenheit von VEGF, zur Regression von Blutgefäßen.

Die FGF-Familie besteht aus 21 strukturell verwandten Heparin-bindenden Polypeptiden, wovon zwei: FGF-1 und FGF-2 als direkte Stimulatoren der Angiogenese gelten (Basilico und Moscatelli, 1992; Nishimura *et al.*, 2000). FGF-1 (acidic FGF oder aFGF) und FGF-2 (basic FGF oder bFGF) binden an die gleichen Rezeptoren: FGFR-1 (Flg) und FGFR-2 (Bek), die an der Oberfläche von Endothelzellen lokalisiert sind. Beide Wachstumsfaktoren fördern die Proliferation und Migration von Endothelzellen und induzieren Angiogenese in der Chorioallantoismembran sowie in der Cornea. Zusätzlich stimuliert FGF-2 die Endothelzellen zur Produktion und Freisetzung von Kollagenase und Plasminogenaktivatoren, die an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Basilico und Moscatelli, 1992; Montesano, 1986).

PDGF wird auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen sowie Fibroblasten exprimiert und kann seine angiogene Wirkung sowohl direkt, als auch indirekt vermitteln. Nicosia (1994) und seine Mitarbeiter haben anhand von Explantat-Kulturen aus der Rattenaorta nachgewiesen, dass PDGF eine Induktion der Angiogenese durch die Stimulation der Endothelzellproliferation auslösen kann. Ein Jahr später zeigte Moses (1995) in seinen experimentellen Arbeiten, dass derselbe Wachstumsfaktor ebenfalls auf indirektem Wege, und zwar durch die Erhöhung der Expression von VEGF und FGF-2 in glatten Muskelzellen, in der Lage ist, das Wachstum von Gefäßen zu stimulieren.

TGF- α wurde ursprünglich aus den Kulturüberständen transformierter Zellen als ein 50 Aminosäuren großes Peptid isoliert (De Larco und Todaro, 1978). Dieser Wachstumsfaktor zeigt strukturell größere Homologie mit dem EGF (Epidermal Growth Factor), als mit dem zur gleichen Familie gehörenden TGF- β . Darüber hinaus wirkt TGF- α proliferationsfördernd auf Endothelzellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* und löst die Bildung von Endothelzelltubuli zu Beginn der Angiogenese aus (Klagsbrun und D'Amore, 1991).

Eine Reihe von angiogenen Substanzen stimuliert das Wachstum und Migration von Endothelzellen über indirekte Mechanismen. Diese sogenannten indirekten Faktoren veranlassen andere Zellen (z.B. Thrombozyten, Fibroblasten oder Makrophagen) zu Freisetzung von Angiogenese-Stimulatoren oder aktivieren angiogene Moleküle (z.B. VEGF oder FGF) zur Induktion der Endothelproliferation. Zu dieser Gruppe gehören: EGF (Epidermal Growth Factor), GCSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor), PLGF (Placental Growth Factor), Angiogenin und Angiotropin (Risau, 1997).

Neben der Expression von Angiogenese-Aktivatoren, spielt die Anwesenheit von inhibitorischen Substanzen und deren korrespondierenden Signaltransduktoren in den physiologischen sowie pathologischen Prozessen des Gefäßwachstums eine entscheidende Rolle. Diese antiangiogenen Stoffe entstehen oft durch Umwandlung von im Körperkreislauf vorhandenen größeren Molekülen (z.B. Angiostatin, ein Bestandteil des Plasminogens, oder Endostatin, ein Fragment des Kollagen XVIII) und kommen im Rahmen einer zeitlich begrenzten Wundheilung zum Einsatz oder sind an der Suppression des pathologischen Endothelzellwachstums beteiligt. Ihre Wirkung beruht in der Regel auf der Hemmung der Proliferation und Migration von Endothelzellen, Unterdrückung der Expression von Wachstumsstimulatoren oder Induktion der Apoptose (Cao, 2001; Carmeliet und Jain, 2000). Desweiteren sind einige Angiogenese-Inhibitoren in der Lage, die Freisetzung von Matrix-Metalloproteasen (MMPs), die den Abbau der Basalmembran einleiten, zu verhindern und

damit das Eindringen der Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix und die Ausbildung von Kapillarsprossen zu unterbinden. Zu den bisher am besten untersuchten antiangiogenen Substanzen gehören: Angiostatin, Endostatin, Interferon- α , Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAIs), Plazenta Proliferin-verwandtes Protein, Plättchenfaktor 4, Prolaktin 16 Kd Fragment, Thrombospondine sowie Tissue Inhibitors of Metalloproteinases 1-3 (TIMPs 1-3).

Eine kleine Anzahl von Angiogenesefaktoren hat die Fähigkeit auf Endothelzellen situationsabhängig sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte auszuüben. Die zu dieser Gruppe gehörenden TGF- β (Transforming Growth Factor- β) und TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) hemmen beispielsweise die Proliferation und die Migration von Endothelzellen *in vitro* (Müller *et al.* 1987). *In vivo* dagegen wurde in mehreren unabhängigen Experimenten eine Stimulation der Angiogenese durch diese beiden Zytokine nachgewiesen (Falcone *et al.*, 1993; Madri *et al.*, 1988; Pintavom und Ballermann, 1997). Das paradoxe Verhalten von TGF- β und TNF- α kommt möglicherweise dadurch zustande, dass diese Mediatoren in der Lage sind, *in vivo* bestimmte Zellen (z.B. Makrophagen), die direkt wirkende Angiogenesefaktoren (z.B. FGF) auf der Oberfläche exprimieren, anzulocken und somit auf indirektem Wege die angiogene Kaskade zu aktivieren.

Nicht alle angiogenen Stimulatoren wirken fördernd bei Entstehung und Wachstum von Kollateralgefäßen. Es wird davon ausgegangen, dass die Kollateralbildung hauptsächlich durch erhöhte Wandschubspannung induziert wird, so dass das Zusammenwirken von strömungsregulierenden Genen an Relevanz gewinnt. Entsprechend dieser Vorstellung wird durch die Okklusion einer Hauptarterie die Blutströmung aus Nachbargebieten über erweiterte Kollateralarterien in das gefährdete Gewebe umgeleitet. Dies führt zur Erhöhung der Schubspannung in den Kollateralgefäßen und zur Aktivierung von FGFR-1, TGF- β und Tie-2 - System, die wiederum das Wachstum von Endothelzellen, Matrixbildung und die Stabilisierung von Kollateralarterien auslösen. Zusätzlich wird die Expression von PDGF induziert, die eine Rekrutierung von glatten Muskelzellen zur Verstärkung der Gefäßwände als Folge hat. Durch die gleichzeitige Aktivierung von Bcl-2 und METH-1 Genen wird sowohl die Apoptose, als auch die Kapillarsprossung inhibiert. Vermutlich führt die Änderung der Schubspannung auch zur Sekretion von MCP-1, ICAM-1 und VCAM-1, die für die Adhesion von Monozyten an das Endothelium und deren Akkumulation um die wachsenden Kollateralgefäße herum verantwortlich sind. Da das Kollateralwachstum im Gegensatz zur Angiogenese im sauerstoffreichen Milieu erfolgt, bleibt möglicherweise die verstärkte Expression von Hypoxie-induzierten Angiogenesefaktoren aus, bzw. deren stimulierende Wirkung (z.B. bei VEGF) entfällt (Schaper und Scholz, 2003).

1.2 VEGF und VEGF-Rezeptoren

1.2.1 Bedeutung von VEGF für das kardiovaskuläre System

Erkrankungen im Bereich des Herz-Kreislauf-Systems gehören heutzutage zu den häufigsten Todesursachen in den modernen Industrienationen. Sie manifestieren sich am Herzen in Form der koronaren Herzkrankheit mit Krankheitsbildern einer Angina pectoris, eines Myokardinfarktes oder einer Linksherzinsuffizienz. Beim Verschluss einer Hirnarterie kommt es meistens zur Senkung der Durchblutung bestimmter Hirnareale, was wiederum zu Schwindel, Bewusstlosigkeit bis hin zum Schlaganfall führen kann. Als ein weiterer kardiovaskulärer Defekt wird die periphere Verschlusskrankheit diskutiert, die vor allem die Becken- und Beinarterien betrifft und sich in einer Schaufensterkrankheit oder im fortgeschrittenen Stadium sogar im Absterben von Gewebe äußert. Für die meisten am kardiovaskulären System hervorgerufenen Schäden, sind arteriosklerotische Gefäßveränderungen verantwortlich. Zu den bekanntesten Risikofaktoren von Herz-Kreislaufferkrankungen gehören: Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Stress, Adipositas, mangelnde Bewegung, fortgeschrittenes Alter sowie genetische Prädispositionen (Kannel, 1997). Die Behandlung der Kreislaufstörungen zielt darauf hinaus, einerseits, durch sofortige Wiederherstellung der Durchblutung, mögliche Komplikationen und langfristige Schäden an Organen bzw. Geweben zu vermeiden und andererseits das Fortschreiten einer Gefäßverengung und den Eintritt einer Ischämie rechtzeitig zu verhindern.

In tierexperimentellen Studien wurden bereits Wachstumsfaktoren wie z.B. Fibroblast Growth Factor (FGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Insulin Growth Factor (IGF) für die Behandlung von Verschlüssen im Bereich der Herz- und Beinarterien erfolgreich eingesetzt (Boniece und Wagner, 1993; Htun *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001). Hierdurch konnte die Verzögerung der Infarktentwicklung, vermehrte Gefäßneubildung sowie Verbesserung der Herzfunktion der betroffenen Tiere erzielt werden. Der vom Endothel ausgehende Prozess der Neovaskularisation wird hauptsächlich durch den Endothelzell-Wachstumsfaktor VEGF stimuliert, welcher zu den wichtigsten Regulatoren der Endothelfunktion und der Angiogenese zählt. Das VEGF-Molekül wurde 1983 von Senger *et al.* entdeckt und als „vascular permeability factor“ (VPF) benannt. Sechs Jahre später haben zwei weitere Arbeitsgruppen: Ferrara und Henzel (1989) und Plouet *et al.* (1989) unabhängig voneinander ein endothelspezifisches Mitogen mit dem Namen VEGF bzw. Vasculotropin aufgereinigt und sequenziert. Die Untersuchungen von Keck *et al.* (1989) und Leung *et al.*

(1989) wiesen letztendlich nach, dass es sich bei den VPF und VEGF Proteinen um den gleichen, endothelspezifischen Angiogenesefaktor (VEGF oder auch VEGF-A genannt) handelt. VEGF-A ist ein basisches, Heparin-bindendes, homodimeres Glykoprotein mit einer Molekülmasse von ca. 46 kDa, deren Monomere über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Der kodierende Bereich des humanen VEGF-A-Gens besteht aus acht Exonen. Durch alternatives Spleißen der Primärtranskripte können sechs verschiedene VEGF-A-Isoformen entstehen, die nach der Länge ihrer resultierenden Aminosäureketten als VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉ und VEGF-A₂₀₆ bezeichnet werden und unterschiedliche Funktionen bei der Bildung der Blutgefäße übernehmen.

VEGF-A spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des vaskulären Systems während der Embryonalentwicklung. Im adulten Organismus wird dieses Molekül zyklisch im Rahmen der Gefäßneubildung in den Organen des weiblichen Reproduktionstraktes (Ravindranath *et al.*, 1992) sowie im Verlauf der Wundheilung exprimiert. Unter pathologischen Bedingungen wie z.B. bei Entzündungsprozessen, Gewebischämie oder Tumorprogression konnte ebenfalls verstärkte Vaskularisation und damit verbundene Zunahme der VEGF-A-Produktion nachgewiesen werden (Folkman, 1971; Isner und Losordo, 1999; Koch *et al.*, 1994). Für das kardiovaskuläre System ist VEGF-A durch die Induktion der Proliferation und Migration von Endothelzellen (Ferrara *et al.*, 1991; Senger *et al.*, 1983) sowie die Stimulierung der Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung von wichtiger Bedeutung. NO gehört zu den bekanntesten Vasodilatoren und übt somit einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation des Gefäßtonus. VEGF-A ist weiterhin in der Lage, die Permeabilität der Blutgefäße zu erhöhen und die Produktion der extrazellulären Matrix zu modulieren (Senger *et al.*, 1986). Darüber hinaus kann dieser Wachstumsfaktor monozytäre Zellen chemotaktisch aktivieren, die bei Gefäßumbauprozessen während der Arteriogenese eine bedeutsame Rolle spielen. Arras *et al.* 1998 zeigte, dass Monozyten durch VEGF-A angelockt werden und über die Expression von Wachstumsfaktoren die Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen induzieren können.

Seit 1991 sind auch weitere Proteine identifiziert worden, die starke Homologien mit der VEGF-Familie aufweisen und als VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E bezeichnet werden. VEGF-B liegt zellassoziiert vor und besitzt strukturelle Ähnlichkeiten mit VEGF-A. Dieser von Olofsson *et al.*, 1996 entdeckte Wachstumsfaktor wird in Herz, Skelettmuskel, Pankreas und Prostata exprimiert und hat eine wichtige Funktion in der Proliferation von Endothelzellen und in der Angiogenese. VEGF-C stimuliert Migration, Proliferation und Permeabilität von Endothelzellen *in vitro* und spielt eine große Rolle bei der Entwicklung des

venösen und lymphatischen Gefäßsystems (Koperlainen und Alitalo, 1998). Skobe *et al.* konnten 2001 nachweisen, dass dieses Molekül die Lymphangiogenese im Brusttumorgewebe induziert, was wiederum eine verstärkte Metastasierung zur Folge hat. VEGF-D verfügt über eine hohe Strukturanalogie zu VEGF-C und kann wie dieser die Bildung von Lymphgefäßen induzieren. Weiterhin fungiert VEGF-D als ein Mitogen, welches die Proliferation von Endothelzellen fördert (Achen *et al.*, 1998; Stacker *et al.*, 2001). Der als VEGF-E bezeichnete Wachstumsfaktor wird hauptsächlich von Orf-Viren exprimiert und ist in der Lage die Proliferation und die Permeabilität von Endothelzellen zu stimulieren (Meyer *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 1998).

Die Funktion der oben erwähnten VEGF-Varianten als Mediatoren der Angiogenese und deren Bedeutung bei der Regulation der Endothelfunktion führten letztendlich zum Einsatz dieser Moleküle in der „Therapeutischen Angiogenese“ und bei der Prävention der Restenosen. Der Begriff „Therapeutische Angiogenese“ wurde 1993 von Höckel *et al.* beschrieben und zuerst nur im Kontext der Wundheilung und der Gewebsregeneration verwendet. In folgenden Jahren sind im Rahmen der „Therapeutischen Angiogenese“ mehrere Studien durchgeführt worden, in denen VEGF zur Verbesserung der Perfusion verschiedener Organe im Tiermodell eingesetzt wurde. In Experimenten am ischämischen Herz und im ischämischen Bein konnte gezeigt werden, dass VEGF-A tatsächlich in der Lage ist, die Bildung von Blutgefäßen zu induzieren und dadurch eine verbesserte myokardiale Funktion, einen gesteigerten kollateralen Blutfluß und eine erhöhte Kapillardichte zu erzielen (Banai *et al.*, 1994; Harada *et al.*, 1996; Takeshita *et al.*, 1994). Experimentelle Untersuchungen am Herzen (Banai *et al.* 1994) haben weiterhin bewiesen, dass, durch die Behandlung mit VEGF-Peptiden, die Entwicklung von Kollateralgefäßen sowohl bei langsam fortschreitender Koronarokklusion als auch bei akuten Myokardinfarkten gefördert wird. Im tierexperimentellen Stenose/Restenose-Modell zeigten Laitinen *et al.*, 1997, dass unter Verwendung von VEGF-A eine beschleunigte Induktion der Reendothelialisierung stattfindet, was wiederum eine verminderte Neointimabildung und somit eine Hemmung der Restenose zur Folge hat (Pipp *et al.*, 2003).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die VEGF-Familie eine entscheidende Funktion bei der Induktion der Neubildung von Blutgefäßen im Rahmen ischämischer Erkrankungen erfüllt und aus diesem Grund künftig in der klinischen Medizin an Bedeutung gewinnen könnte, um koronare Herzkrankheiten sowie periphere, arterielle Gefäß-erkrankungen zu behandeln.

1.2.2 Funktion und Expressionsmuster der VEGF-Rezeptoren Flk-1/KDR und Flt-1

Die Vermittlung diverser VEGF-Signale in die Zielzellen erfolgt mittels VEGF-Rezeptoren. Die Existenz dieser Rezeptoren wurde erstmals 1990 von Plouet und Moukadiri sowie Vaisman *et al.* unabhängig voneinander beschrieben. Die drei bekannten VEGF-Rezeptoren: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) und VEGFR-3 (Flt-4) gehören zur Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (Receptor tyrosine kinases, RTKs) und werden hauptsächlich auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert. Wie auch andere Mitglieder der Rezeptortyrosinkinase-Familie setzen sich die VEGF-Rezeptoren aus einer glykosylierten, extrazellulären Domäne und einem zytoplasmatischen Anteil zusammen, die durch eine helikale Domäne, die in der Membran verankert ist, verbunden sind. Der extrazelluläre Bereich besteht aus sieben Immunoglobulin(Ig)-ähnlichen Domänen und ist für die Ligandenbindung verantwortlich (Matthews *et al.*, 1991; Pajouola *et al.*, 1992). Der zytoplasmatische Bereich wird durch drei verschiedene Abschnitte definiert: die Juxtamembranregion, die sich unmittelbar an die Transmembrandomäne anschließt, die Kinasedomäne und die carboxyterminale Region. Die ca. 250-300 Aminosäuren umfassende Kinasedomäne besitzt eine ATP-Bindungsstelle und ist damit in der Lage sowohl die Autophosphorylierung des Rezeptors als auch die Tyrosinphosphorylierung der Substrate zu katalysieren. Die Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste führt zur Regulierung der Tyrosinkinaseaktivität des jeweiligen Rezeptors. Die auf diese Weise aktivierten Rezeptoren können dann durch die Assoziation mit spezifischen Proteinen intrazelluläre Signalkaskaden einleiten und den externen Stimulus an zytoplasmatische oder im Zellkern lokalisierte Zielproteine weitergeben. Infolgedessen wird die Expression bestimmter Gene induziert, welche für die Proliferation, Migration oder Veränderungen in der Zellmorphologie von Endothelzellen verantwortlich sind. Der Ablauf solcher Signalkaskaden ist bei den drei VEGF-Rezeptortypen unterschiedlich (Waltenberger *et al.*, 1994) und variiert je nach Art und Vorkommen in den Endothelzellen sehr stark.

VEGF-Rezeptoren besitzen diverse Verhaltensweisen gegenüber ihren Liganden. VEGFR-1 bindet mit hoher Affinität ($K_d = 10-20$ pM) alle Isoformen von VEGF-A, PLGF ($K_d = 100-200$ pM) und VEGF-B (Ferrara, 1996a; Olofsson *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1994). Aufgrund der sehr geringen Signalaktivität dieses Rezeptors wird oft spekuliert, dass VEGFR-1 als ein negativer Regulator fungiert, welcher VEGF abfängt und somit den Signaltransduktionsweg von VEGFR-2 blockiert, dessen Bindungskonstante zu VEGF-A mit $K_d = 75-124$ pM viel niedriger ausfällt als die von VEGFR-1.

Als weitere Liganden von VEGFR-2 wurden VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E beschrieben (Achen *et al.*, 1998; Joukov *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1999; Terman *et al.*, 1992). Der ebenfalls zur Gruppe der VEGF-Rezeptoren gehörende VEGFR-3 ist nicht in der Lage VEGF-A zu binden, dafür aber VEGF-C und VEGF-D (Achen *et al.*, 1998; Joukov *et al.*, 1996).

Das Vorkommen, die Funktion und die Expressionsmuster der einzelnen VEGF-Rezeptoren wurden in der Vergangenheit im Rahmen verschiedener Projekte von mehreren Arbeitsgruppen ausführlich untersucht. Der als VEGFR-1 bezeichnete Rezeptor wurde 1990 von Shibuya *et al.* aus einer humanen Plazenta-cDNA-Bank kloniert, identifiziert und aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu den Rezeptoren der *fms*-Gruppe (PDGF-R α/β , CSF-1R, c-kit) als Flt-1 (*fms*-like tyrosine kinase) benannt. Neben dem zellgebundenen Rezeptor wurde 1996 von Kendall und seinen Mitarbeitern aus dem konditionierten Medium von humanen Nabelschnurendothelzellen eine lösliche Variante des VEGFR-1 isoliert und als sFlt-1 bezeichnet. Dieser alternativ gespleißten Form des Flt-1 fehlen sowohl die Transmembransequenz als auch die zytoplasmatische Domäne. Obwohl das ca. 110 kDa große Protein nur aus dem extrazellulären Teil des VEGFR-1 und weiteren 31 Aminosäuren besteht, weist es mit $K_d = 10$ pM eine sehr hohe Bindungsaffinität zu VEGF auf.

VEGFR-2 wurde unabhängig voneinander aus murinen (Matthews *et al.*, 1991) und humanen (Terman *et al.*, 1991) Zellen gewonnen und infolgedessen mit zwei verschiedenen Bezeichnungen versehen: Flk-1 und KDR. Während Flk-1 (fetal liver kinase -1) das aus einem fetalen, murinen Leberzellstamm geklonte Gen beschreibt, steht das Symbol KDR (kinase-insert domain containing receptor) für ein mit Hilfe der PCR-Reaktion aus Endothelzellen des Menschen amplifiziertes Gen.

Die Expression der VEGF-1- und -2-Rezeptoren wird durch VEGF, andere Zytokine sowie Hypoxie recht unterschiedlich reguliert. Beide Rezeptortypen werden mit wenigen Ausnahmen endothelspezifisch exprimiert, insbesondere auch im Endothel humaner Koronararterien (Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Waltenberger *et al.*, 1994). Weiterhin gibt es eine ganze Reihe von Zellen, die entweder den einen oder den anderen Rezeptor exprimieren. Auf Monozyten/Makrophagen wurde ausschließlich die Anwesenheit des Flt-1-Rezeptors beschrieben (Barleon *et al.*, 1996), während die hämatopoietischen Zellen einzig und allein den Flk-1/KDR-Rezeptor exprimieren (Katoh *et al.*, 1995). Die Expression von beiden VEGF-Rezeptoren wurde beispielsweise auf einigen Tumorzellen (z.B. Melanomzellen) nachgewiesen (Gitay-Goren *et al.*, 1993).

Experimentelle Untersuchungen von Flt-1 und Flk-1/KDR zeigen, dass beide Rezeptortypen wichtige, aber unterschiedliche Funktionen im Prozess der Angiogenese ausüben. VEGFR-2 induziert die Proliferation und Migration von Endothelzellen *in vitro* sowie die Aktin-Reorganisation, was zu Veränderungen in der Zellstruktur führt. Weiterhin vermittelt Flk-1/KDR die Expression von Tissue Factor, eNOS, iNOS sowie die Freisetzung von NO (Kroll und Waltenberger, 1998 und 1999). Im Gegensatz dazu ist VEGFR-1 nicht in der Lage, die Proliferation und die Chemotaxis von Endothelzellen zu induzieren. Stattdessen aktiviert Flt-1, nach der VEGF-A-Stimulation, die Migration von Monozyten (Claus *et al.*, 1996). Die Rolle der beiden VEGF-Rezeptoren während der Embryogenese ist ebenfalls äußerst unterschiedlich. Während Flk-1 sowohl für die Bildung von Endothelzellen als auch von hämatopoetischen Zellen im Verlauf der Vaskulogenese essentiell ist, führt eine Deletion des Flt-1-Rezeptors zu einer generellen Fehlorganisation der Endothelzellen, was eine gestörte Vaskulogenese und die Entstehung von dilatierten Blutgefäßen als Folge hat (Hiratsuka *et al.*, 1998). Der ebenfalls zur Gruppe der VEGF-Rezeptoren gehörende VEGFR-3 (Flt-4) wird zu Beginn der Embryogenese in allen Endothelzellen exprimiert. Während der weiteren Entwicklung geht jedoch die Expression des Flt-4 in den Blutgefäßen zurück und der Rezeptor wird ausschließlich im lymphatischen Endothel exprimiert. Das Fehlen von VEGFR-3 im Verlauf der Embryogenese kann erhebliche Defekte in der Entwicklung des kardiovaskulären Systems verursachen (Joukov *et al.*, 1996).

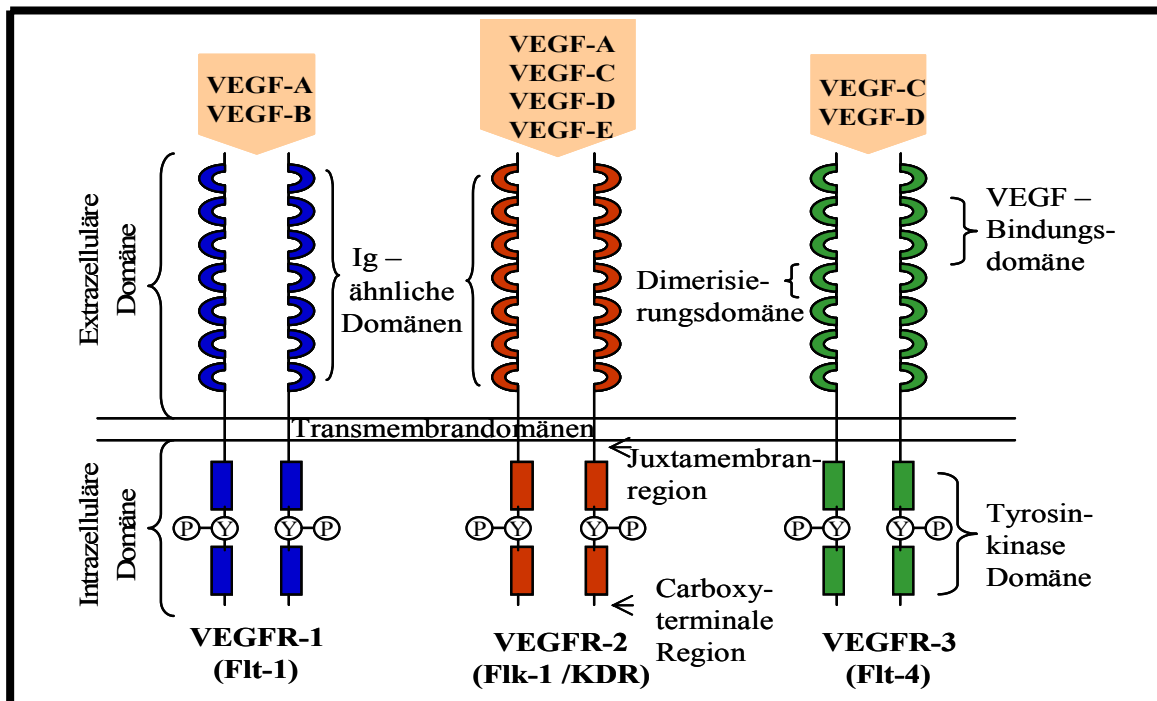


Abb. 1.2.2: Schematische Darstellung der Tyrosinkinase-Rezeptoren (Flt-1, Flk-1/KDR und Flt-4) und deren Liganden; ein VEGF-Dimer bindet an jeweils zwei Rezeptoren

1.3 Rolle des Endotheliums in physiologischen und pathologischen Prozessen

1.3.1 Aufbau der Blutgefäße

Die Wände aller größeren Blutgefäße weisen einen gemeinsamen Grundbauplan auf. Sie bestehen aus drei strukturell und funktionell unterschiedlichen Schichten: *Tunica intima* (Intima), *Tunica media* (Media) und *Tunica adventitia* (Adventitia). Die innere, der Blutseite zugekehrte Fläche eines Gefäßes kleidet die Intima aus. Sie besteht aus einem einschichtigen Endothelium, das abluminal von einer Basalmembran (*Membrana elastica interna*) sowie subendotheliale Bindegewebe umgeben ist und viele spezialisierte Funktionen erfüllt (siehe Kapitel 1.3.2.). Daran schließt sich die Media an, welche ringförmig verlaufende Lagen glatter Muskelzellen sowie kollagen- und elastinreiche Bindegewebefasern enthält. Der Aufbau der Media kann je nach Gefäßtyp variieren. In elastischen Arterien (z.B. Aorta) wurden beispielsweise konzentrische Lamellen von glatten Muskelzellen nachgewiesen, die in dichte Elastinfasern eingebunden sind (Windkesselfunktion). Muskuläre Arterientypen zeigen dagegen eine lockere Verteilung von glatten Muskelzellen in der extrazellulären Matrix (Moll und Moll, 1995). Die Funktion der Media äußert sich hauptsächlich in der Regulation der Wandkontraktion und des Druckausgleichs in den Blutgefäßen. Auf die Media folgt eine weitere Basalmembran - *Membrana elastica externa*, die eine vollständige Abgrenzung zu der sich anschließenden Adventitia herstellt. Die äußerste Schicht der Blutgefäße, die Adventitia, ist aus Bindegewebe, vegetativen Nervenfasern, Mastzellen sowie Blutgefäßen (*Vasa vasorum*) aufgebaut. Sie verbindet das Gefäß mit seiner Umgebung, reguliert den Gefäßtonus und versorgt die Gefäßwände mit Blut.

Trotz der großen Ähnlichkeiten im Grundaufbau weisen die einzelnen Gefäßarten (z.B. Arterien, Venen, Lymphgefäße) gravierende Unterschiede bezüglich der Zusammensetzung ihrer jeweiligen Gefäßwandschichten auf. Während die Arterien als Hochdruckgefäße über eine kräftige Media und eine gut ausgebildete *Membrana elastica interna* verfügen, sind die Venen als Niederdruckgefäße dünnwandig und zeigen eine weniger deutliche Schichtung. Sie besitzen in der Regel keine *Membrana elastica interna* und die locker gefügten Media und Adventitia gehen ineinander über. Bei den Lymphgefäßen enthalten die Wände ebenfalls keine *Membrana elastica interna* und die Schichtung der Wandstruktur fällt im Vergleich zu der der Venen noch weniger deutlich aus (Nawroth und Lasch, 1999).

1.3.2 Heterogenität der Endothelien

Das Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel, welches das Lumen der Blut- und Lymphgefäße sowie den gesamten Herzinnenraum auskleidet. Es bildet eine physikalische Permeabilitätsbarriere zwischen Blutstrom sowie solidem Gewebe und reguliert den Stoffaustausch zwischen den beiden Kompartimenten. Seine geschätzte Gesamtoberfläche beträgt beim Menschen ca. 6.000-8.000 m² und besteht aus ca. 1-6 x 10¹³ Endothelzellen (Nawroth und Lasch, 1999). Die Endothelzellen wachsen in einem kontinuierlichen Zellmonolayer und weisen Polarität auf. Die luminale (apikale) Seite der Endothelzellen steht im ständigen Kontakt mit dem Intravasalraum, während die abluminale (basolaterale) Grenzfläche von der interstitiellen Flüssigkeit umgeben ist. Zwischen den benachbarten Endothelzellen befinden sich spezialisierte, laterale Domänen der Plasmamembran, die als interzelluläre Junctionen (gap junctions und tight junctions) bezeichnet werden. Gap junctions sind für die elektrische und metabolische Kopplung der Zellen sowie die interzelluläre Passage von Ionen und kleinen Molekülen verantwortlich. Tight junctions dichten die interzellulären Räume ab und sorgen dadurch für eine strenge Kontrolle des parazellulären Molekültransportes. Die Polarität der Endothelzellen äußert sich hauptsächlich in unterschiedlicher Proteinzusammensetzung ihrer apikalen und basalen Zellmembran, diversen Expressions- und Sekretionsmustern von Molekülen auf der luminalen bzw. abluminalen Seite sowie in einem abluminal gerichteten Transport von Plasmaproteinen.

Der charakteristische Aufbau und die Feinstruktur der Endothelzellen verleihen dem Endothel die Funktion eines hochspezifischen Zellsystems, welches vielfältige physiologische Aufgaben erfüllt (Cines *et al.*, 1998; Toborek und Kaiser, 1999). Diese betreffen in erster Linie die Aufrechterhaltung der Diffusionsbarriere zwischen dem Blutstrom und dem umgebenden Gewebe, Stabilisierung der Gewebshomöostase (Ross, 1992), Metabolisierung vasoaktiver Substanzen, Regulation des vaskulären Tonus, Kontrolle der Aktivierung von glatten Muskelzellen sowie die Steuerung von Vaskularisierungsprozessen in normalen und neoplastischen Geweben. Eine ebenfalls wichtige Bedeutung haben die antithrombogenen und antiinflammatorischen Eigenschaften des Endothels sowie dessen Rolle bei der Aktivierung von Blutzellen und bei der Antigenpräsentation.

Die Endothelzellen bilden keine einheitliche Zellpopulation, sondern zeichnen sich, ihren vielfältigen Funktionen entsprechend, durch eine große Heterogenität aus. Die gravierenden, strukturellen Unterschiede zwischen dem arteriellen und venösen Endothel sind im wesentlichen auf dessen intrinsische Determinierung (embryonaler Ursprung), hämodynamische Faktoren sowie Zell-Zell-Interaktionen zurückzuführen (Boegehold, 1998).

Das arterielle Endothel besteht aus langgestreckten, dicken Zellen, die mit einer Vielzahl von Organellen (Vesikel, Weibel-Palade-Körper, Mitochondrien, Golgi-Komplexe und Lysosomen) ausgestattet sind und oft in direktem Kontakt mit glatten Muskelzellen stehen. Die Endothelzellen der Venen sind dagegen dünn, polygonal, enthalten nur eine geringe Menge von Organellen und ihre junctionalen Verbindungen sind nicht so stark ausgeprägt wie die der Arterien (Nawroth und Lasch, 1999). Die Endothelien der beiden großen Gefäßarten machen nur einen kleinen Teil der gesamten, endothelialen Oberfläche des Körpers aus. Die Aufgaben der arteriellen und venösen Endothelzellen bestehen hauptsächlich in der Kontrolle des Blutdruckes, der Modulation des Kontraktionszustandes der glatten Muskelzellen, der Anpassung des Gefäßdurchmessers an die hämodynamischen Gegebenheiten sowie der Expression und der Freisetzung vasodilatatorischer bzw. vaso-konstriktorischer Substanzen.

Die Endothelien der Kapillargefäße unterscheiden sich in mehrfacher Hinsicht von denen der Arterien bzw. der Venen. Sie zeichnen sich morphologisch durch extreme Flachheit, Organellenarmut sowie eine Vielzahl von Mikrovesikeln aus und nehmen mit ca. 90% den Hauptanteil der gesamten Endotheloberfläche ein. Das Kapillarendothel ist im wesentlichen am Stoffaustausch zwischen intra- und extravasalem Raum beteiligt sowie in die einzelnen Vorgänge der Angiogenese einbezogen. Die Permeabilität der Kapillargefäße kann jedoch in verschiedenen Geweben und Organen stark variieren. Nach der Ultrastruktur der Kapillarwand lassen sich drei verschiedene Grundtypen von Kapillarendothelien unterscheiden. Der kontinuierliche Kapillartyp kommt vorwiegend in der Skelettmuskulatur, den Lymphknoten, der Lunge und im zentralen Nervensystem vor und zeichnet sich durch hohe Selektivität aus. Er besteht aus Endothelzellen, die mit tight junctions dicht untereinander verbunden sind und einer darunterliegenden, kontinuierlichen Basalmembran. Die fenestrierten Kapillarendothelien sind aus funktionellen Porensystemen aufgebaut, die von sogenannten Diaphragmata verschlossen sind. Sie treten in sekretorischen Geweben (z.B. in endokrinen Drüsen oder im Nierenglomerulus) auf und sind für wasserlösliche Stoffe weitgehend permeabel. Beim diskontinuierlichen Endotheltyp handelt es sich um Kapillaren mit unterbrochener Endothelauskleidung, intrazellulären Lücken und fehlender oder unvollständiger Basalmembran. Solche Gefäße wurden hauptsächlich in Knochenmark, Milz und Leber nachgewiesen, wo sie bei der Hämatopoese, dem Blutzell-processing und Partikel-austausch eine wichtige Rolle spielen (Hees, 2000; Plendl, 1997).

Neben der gefäß-, gewebe- sowie organbedingten Heterogenität der Endothelzellen wurden ebenfalls speziesabhängige Endothelunterschiede im Bezug auf die Verteilung der

Endothelzellmarker, Expression von Rezeptoren, Reaktion auf Angiogenese-Faktoren sowie Lektinbindung beobachtet (Plendl *et al.*, 1992). Als Paradebeispiel hierfür dienen die pflanzlichen Lektine. Während das Weizenkeimagglutinin (WGA) und *Ulex europaeus* Agglutinin I (UEA I) selektiv an das humane Endothel binden, weist das *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA) eine höhere Spezifität zu Schweine- und Mausendothelien auf. Die Endothelzellen der Ratten können hingegen mit *Ricinus communis* Agglutinin (RCA) nachgewiesen werden (Nawroth und Lasch, 1999).

Trotz der oben beschriebenen morphologischen und funktionellen Unterschiede zwischen den einzelnen Endothelarten, sind die molekularen Mechanismen, die der Heterogenität von Endothelzellen zugrunde liegen, noch weitgehend unerforscht.

1.3.3 Stimulierung der Endothelzellaktivierung

Wie in den vergangenen Kapiteln bereits erwähnt wurde, sind die Endothelzellen in der Lage, auf bestimmte angiogene, hämodynamische, mechanische sowie pharmakologische Stimuli mit Veränderungen in ihrer morphologischen Struktur und Funktionalität zu reagieren. Dieser, als Endothelaktivierung bekannte, Prozess geht mit einer Vermehrung von Zellorganellen, verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen sowie mit erhöhter Permeabilität der Endothelzellen einher. Die Funktion der aktivierten Endothelzellen bei der Steuerung der Angiogenese und Arteriogenese wurde schon in Kapitel 1.1 ausführlich besprochen. Des Weiteren spielt die Endothelzellaktivierung ebenfalls in der Pathogenese von vielen Krankheiten (z.B. Thrombose, Entzündungen, Arteriosklerose, Transplantatabstoßung) eine sehr wichtige Rolle.

Unter physiologischen Bedingungen zeichnen sich die „ruhigen“ Endothelzellen durch Thromboresistenz aus (Müller-Berghaus, 1998). Sie bilden eine antithrombotische Oberfläche, welche die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten verhindert. Diese Eigenschaft beruht im wesentlichen auf der Modulierung des hämostatischen Systems durch konstitutive Synthese von prothrombotischen und antithrombotischen Substanzen sowie ständiger Kontrolle der Verfügbarkeit von Komponenten der Gerinnungskaskade durch die Regulation der Gefäßpermeabilität. Verlust oder Schädigung der Endothelschicht führen in der Regel zur Aggregation von Thrombozyten an der Verletzungsstelle und zur Bildung eines Thrombus, welcher letztendlich die Blutstillung gewährleistet. Die Entstehung, das Ausmaß und die Lokalisierung des Gerinnsels werden durch das Zusammenspiel von Thrombozyten, der Gerinnungsreaktion und des fibrinolytischen Systems kontrolliert (Nawroth und Lasch, 1999). Unter normalen Bedingungen existiert eine Balance zwischen der Sekretion von anti-

sowie prothrombotischen Faktoren durch das Endothel, welche die Ausbildung eines Thrombus nur auf die Verletzungsstelle des Gefäßes einschränkt. In pathologischen Situationen, wie beispielsweise im Fall einer Thrombose, kommt es zur Aktivierung der Endothelzellen durch Thrombin, proinflammatorische Mediatoren oder andere Streßfaktoren und somit zur Verschiebung des hämostatischen Gleichgewichtes der Thrombusbildung hin. Als Folge davon wird die Ausbildung einer prothrombotischen Endotheloberfläche induziert, welche die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel ermöglicht und schließlich zur Entstehung von Blutgerinnseln in intakten Gefäßen führt. Die Unterbrechung der Blutversorgung durch einen thrombotischen Verschuß von Blutgefäßen wird heutzutage als eine der Hauptursachen für Herzinfarkt, Lungenembolie sowie Gehirnschlag angesehen und ruft in den meisten Krankheitsfällen irreversible Organschädigungen hervor (Nawroth und Lasch, 1999).

Die Aktivierung des vaskulären Endothels spielt ebenfalls bei der Pathogenese von Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle. Eine Entzündungsreaktion wird in der Regel durch proinflammatorische Cytokine (z.B. TNF- α und IL-1) ausgelöst, welche die Endothelzellen zur Expression und Sekretion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen veranlassen. Die Chemokine (z.B. IL-8 und MCP-1) dienen hauptsächlich der Anlockung und Rekrutierung von diversen Leukozytenpopulationen (z.B. Neutrophile, Monozyten) aus dem Blutstrom und dem umgebenden Gewebe (Mantovani *et al.*, 1997). Die chemotaktisch angelockten, phagozytosefähigen Leukozyten wandern im Verlauf der Inflammation durch die Endothelzellbarriere hindurch zum Ort der Entzündung hin und vermitteln dort ihre zelluläre Immunabwehrfunktion. Voraussetzung für diese Extravasation und Transmigration von Leukozyten ist deren rezeptorgesteuerte Adhäsion am Gefäßendothel, an der sowohl endotheliale Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und E-Selektin, als auch die von Leukozyten exprimierten Integrine (z.B. LFA-1 und Mac-1) beteiligt sind (Springer, 1994).

Die Aktivierung von Endothelzellen während inflammatorischer Ereignisse kann weiterhin gewisse morphologische Veränderungen des Endothels verursachen. Als Beispiel dafür dient der rasante Anstieg der Gefäßpermeabilität während einiger Entzündungsreaktionen, welcher zu einem massiven Austritt von Flüssigkeit und Makromolekülen in den interstitiellen Raum führt und in kritischen Fällen sogar eine Ödembildung auslösen kann. Diese Veränderung der Endothelpermeabilität wird hauptsächlich durch Mediatoren wie Bradykinin, Histamin und Serotonin hervorgerufen, die eine fortschreitende Bildung von Lücken (gaps) zwischen den Endothelzellen bewirken (Nawroth und Lasch, 1999).

Eine weitere kardiovaskuläre Erkrankung, die auf Schädigung des Endothels und die daraus resultierende endotheliale Dysfunktion beruht, ist die Arteriosklerose. Sie wird durch lokale Aktivierung von Endothelzellen, Proliferation von glatten Muskelzellen sowie Infiltration von differenzierenden Makrophagen, aktivierten Lymphozyten und Plasmazellen initiiert. Die arteriosklerotischen Endothelveränderungen treten in der Regel im Bereich der Gefäßabzweigungen auf, wo nebeneinander sowohl turbulenter Blutfluß als auch eine Stase der Blutströmung herrschen, und werden hauptsächlich durch Toxine, Virusinfektionen, Chlamydien, oxidiertes LDL sowie freie Radikale verursacht (Cathcart *et al.*, 1985; Mahony und Coombes, 2001). Die Aktivierung des Endothels während der Arteriosklerose ruft eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität hervor und löst im weiteren Verlauf der Erkrankung Veränderungen im Expressionsmuster vasoaktiver Substanzen aus. Dabei wird die Synthese und die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) stark herabgesetzt, was zu einer gestörten Gefäßrelaxation, einer gesteigerten Leukozytenadhäsion und -migration sowie zu einer Thrombozytenadhäsion und -aggregation führt (Nawroth und Lasch, 1999).

Der Prozess der Endothelzellaktivierung tritt des weiteren im Rahmen einer Transplantatabstoßungsreaktion auf und führt hierbei zur Aufhebung der Barrierefunktion des Endothels. Während einer Abstoßungsreaktion kommt es zunächst zur Adhäsion von Leukozyten an die Endothelzellen und anschließend zu deren Migration in das Parenchym des Transplantates. Inflammation sowie Mikrozirkulationsstörungen führen letztendlich zum vollständigen Funktionsverlust des transplantierten Organs und zu dessen Abstoßung (Nawroth und Lasch, 1999).

Trotz des umfangreichen Wissenstandes über die vielfältigen und hochdifferenzierten Funktionen des Endothels in physiologischen sowie pathologischen Situationen, sind die komplexen intrazellulären Vorgänge, die an der Regulation der Endothelzellaktivierung und Endotheldysfunktion beteiligt sind, noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein wichtiger Ansatz hinsichtlich des Verständnisses von endothelialen Signaltransduktionsmechanismen besteht in der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern und rekombinanten Antikörperfragmenten, die mit Strukturproteinen, Adhäsionsmolekülen sowie Membrankomponenten der Endothelzellen spezifische Bindungen eingehen. Der Einsatz dieser einzigartigen Moleküle in experimentellen *in vivo* und *in vitro* Modellen kann im wesentlichen zur Aufklärung der Differenzierung verschiedener Endothelstrukturen und Charakterisierung weiterer Signalmoleküle sowie zur Entwicklung neuer Therapeutika gegen bestimmte kardiovaskuläre Erkrankungen beitragen.

1.4 Antikörper als Bestandteile der humoralen Immunantwort

1.4.1 Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente

Antikörper gehören zur Familie der Immunglobuline (Ig) und nehmen eine zentrale Stellung in der humoralen Immunantwort bei Vertebraten ein. Während bei der zellulären Immunantwort T-Lymphozyten aktiviert werden, erfolgt die Neutralisation eines Antigens im humoralen System durch B-Lymphozyten, die nach ihrer Aktivierung und Ausdifferenzierung in Plasmazellen antigenspezifische Antikörper sezernieren.

Das menschliche Immunsystem kann zwischen 10^9 und 10^{10} Antikörper unterschiedlicher Spezifität bilden. Die Vielfalt der Antikörper und die dadurch erreichbare Spezifität der Erkennungsreaktion werden in erster Linie während der Reifung der B-Lymphozyten durch somatische Rekombination erreicht (Tonegawa, 1983). Darunter versteht man die zufällige Verknüpfung von jeweils einem variablen Segment (V-Segment) und einem „joining“ Segment (J-Segment) mit einem konstanten Segment (C-Segment) bei der leichten Kette und von jeweils einem V-, einem J- und einem „diversity“ Segment (D-Segment) mit 3-4 C-Segmenten bei der schweren Kette. Dabei stehen für jede Kette eines murinen Antikörpers mehrere hundert V-, fünf J- und für die schwere Kette zusätzlich etwa zehn D-Segmente zur Verfügung. Dieser Vorgang läuft nur in somatischen Zellen ab und die Veränderungen werden dementsprechend nicht vererbt. Die Erhöhung der Bindungsaffinität von Antikörpern wird ebenfalls durch somatische Hypermutationen in den Genen für die variablen Antikörperdomänen hervorgerufen. Ein Beispiel hierfür liefern die Gedächtniszellen, für deren Entstehung nur diejenigen B-Lymphozyten ausgewählt werden, deren Antikörper durch die Mutationen eine verbesserte Affinität zu antigenpräsentierenden dendritischen Zellen besitzen. Diese Mutationen betreffen ebenfalls nur somatische Zellen und werden nicht über die Keimbahn vererbt.

Antikörper werden entsprechend ihrer Funktion und ihres Aufbaus in fünf verschiedene Isotypen eingeteilt: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM (Janeway und Travers, 1997). Dabei spielen im humoralen Immunsystem der Säugetiere die Klassen IgA und IgG die wichtigste Rolle. Die im Serum vorherrschende IgG-Klasse besteht aus jeweils zwei leichten und zwei schweren Ketten (L_2H_2) und gilt als die bisher am besten erforschte Antikörpergruppe. Die IgA-Antikörper [$(L_2H_2)_n$, $n=1, 2, 3$] kommen vorwiegend in äußeren Sekreten wie Speichel und Tränenflüssigkeit vor und dienen dort der Abwehr des Körpers gegen bakterielle und virale Antigene. Die IgE-Antikörpergruppe (L_2H_2) spielt eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Parasiten und ist aber gleichzeitig auch für

allergische Reaktionen verantwortlich. Das komplex gebaute IgM-Molekül $[(L_2H_2)_5]$ wird als erstes bei einer Immunreaktion in das Serum sezerniert und kann über die Bindung und Aktivierung des Komplementsystems die Zerstörung von Fremdzellen bewirken. Im Gegensatz zu den eben erwähnten Antikörperklassen ist die Funktion des IgD-Isotypes noch nicht aufgeklärt.

Die Struktur von Antikörpern wurde erstmals 1890 von Emil A. Behring beschrieben. Demnach besteht jeder intakter, bivalenter IgG-Antikörper aus je vier Untereinheiten, zwei identischen schweren (H-Ketten) und zwei identischen leichten (L-Ketten). Die vier Ketten sind durch inter- und intramolekulare Disulfidbrückenbindungen kovalent miteinander verbunden (Burton, 1987), so dass ein Y-förmiges Molekül entsteht (Abb.1.4.1). Die leichte Kette (ca. 25 kDa), die vom κ - oder λ -Typ sein kann, besteht aus einer C-terminalen konstanten (C_L) und einer N-terminalen variablen (V_L) Domäne. Die schwere Kette (ca. 50 kDa) vom γ -Typ ist aus drei C-terminalen konstanten (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) Regionen und einer N-terminalen variablen (V_H) Region zusammengesetzt. Zwischen C_{H1} und C_{H2} befindet sich eine Gelenkregion („hinge“-Region), die für Proteasen besonders gut zugänglich ist. Nach proteolytischer Spaltung mit Papain in der „hinge“-Region zerfällt das Antikörpermolekül in die beiden Arme, die als Fab-Fragmente (antigen binding) bezeichnet werden, und in den Stamm, der Fc-Fragment genannt wird. Während ein Fab-Fragment aus der leichten Kette (V_L - und C_L -Domäne) und aus dem Fd-Fragment (V_H - und C_{H1} -Domäne) zusammengesetzt ist, enthält das Fc-Fragment je zwei Kopien der C_{H2} - und der C_{H3} -Domäne. Die beiden variablen Domänen (V_H und V_L) bilden gemeinsam die Antigenbindungsstelle und werden als Fv-Fragment bezeichnet.

Die konstanten Domänen, besonders die Glykosylierungsstelle in der C_{H2} -Region der schweren Ketten, vermitteln die Effektorfunktion, die zur Aktivierung des Immunsystems führt (Abbas *et al.*, 1994). Die Spezifität der Antigenbindung wird von den hypervariablen Domänen bestimmt. In einer variablen Region sind jeweils drei Peptidabschnitte vorhanden, die eine Vielzahl unterschiedlicher Aminosäuresequenzen aufweisen und die Spezifität des Antikörpers bestimmen. Diese sogenannten CDR-Regionen („complementarity determining regions“) finden sich nach der abgeschlossenen Faltung des Proteins an der Außenseite zusammen und stellen die eigentliche Kontaktstelle zum Antigen dar. Die hypervariablen Domänen sind durch vier konservierte Proteinbereiche, die „framework“-Regionen, voneinander abgegrenzt, die einerseits für die korrekte Ausbildung der β -Faltblattstrukturen von V_H und V_L verantwortlich sind und andererseits die CDR-Regionen der Proteinketten in räumlicher Nähe zusammenbringen (Kabat *et al.*, 1990).

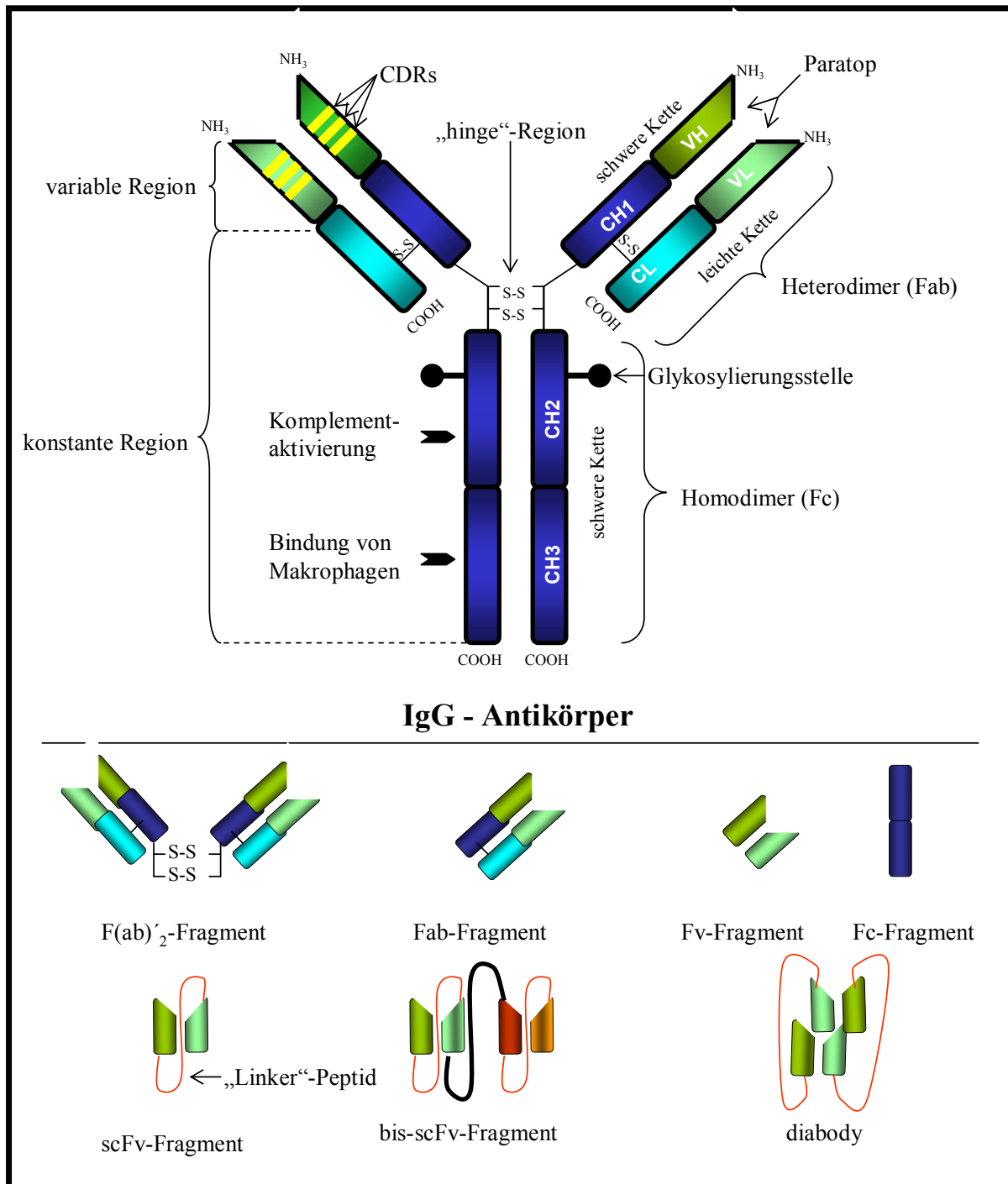


Abb. 1.4.1: Bivalenter IgG-Antikörper und abgeleitete Antikörperfragmente

CDR= hypervariable Domänen; C_H1-3= konstante Regionen 1-3 der schweren Kette; C_L= konstante Region der leichten Kette; diabody= aus zwei aggregierten scFv bestehendes bispezifisches Konstrukt; Fab= Fragment der Antigenbindungsstelle; F(ab)₂= Fab'-Dimer; Fc= Fragment der konstanten Region; Fv= Fragment der variablen Region; IgG= Immunglobulin G; scFv= Einzelkettenantikörper; bis-scFv= zwei scFv mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten; V_H= variable Region der schweren Kette; V_L= variable Region der leichten Kette.

Durch ihre Vielfalt, Stabilität und hohe Spezifität der Antigenbindung finden die Antikörper breite Anwendungsmöglichkeiten in Medizin, Biotechnologie und Forschung. Mit der Einführung der Hybridomatechnologie (Köhler und Milstein, 1975) wurde es möglich, gezielt größere Mengen monoklonaler Antikörper mit definierter Spezifität zu produzieren. Zu diesem Zweck werden z.B. Mäuse mit einem entsprechenden Antigen mehrmals immunisiert. Der Titer der Antikörper im Mäuseserum wird mittels „Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay“ (ELISA) bestimmt. Bei adäquatem Titer wird den Mäusen die Milz entnommen, die darin zahlreich enthaltenen B-Lymphozyten isoliert und mit Myelomzellen (Abkömmlinge eines Plasmazell-Tumors) fusioniert. Die resultierenden Hybridomazellen werden isoliert und vereinzelt. Die Abkömmlinge eines einzelnen Hybridomaklones produzieren Antikörper mit definierter Spezifität, die aus dem Überstand gewonnen und aufgereinigt werden können. Die auf diese Weise erhaltenen monoklonalen Antikörper können für immunhistochemische Nachweisverfahren eingesetzt werden.

Neben der Herstellung von monoklonalen Antikörpern gewinnt die Synthese von rekombinanten Antikörperfragmenten (Winter und Milstein, 1991) zunehmend an Bedeutung. Die zur Zeit bedeutsamsten dieser gentechnisch herstellbaren Antikörperfragmente sind die Einzelkettenantikörper (scFv). Sie sind aus den variablen Domänen der schweren und der leichten Kette zusammengesetzt, welche durch ein kurzes „Linke“-Peptid (10 bis 30 Aminosäuren) kovalent miteinander verbunden sind. Die Anwesenheit des „Linkers“ verhindert die Dissoziation der schweren und der leichten Kette und erlaubt gleichzeitig eine korrekte Faltung der variablen Regionen zu einem scFv, dessen Bindungseigenschaften im wesentlichen denen des Volllängen-Antikörpers entsprechen.

Die Einzelkettenantikörper bieten viele Vorteile gegenüber den Fab-Fragmenten sowie den Volllängen-Antikörpern. Ein scFv wird von einem einzigen Gen codiert, was genetische Manipulationen und die Expression in heterologen Systemen wie Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Insekten- und Säugerzellen erleichtert. Ein weiterer Vorteil liegt in der geringen Größe des scFv (etwa 30 kDa), wodurch eine bessere Penetration und Beweglichkeit in Geweberäumen ermöglicht wird. Diese Eigenschaften machen den stabilen scFv zu einem wertvollen Therapeutikum, welches einen guten *in vivo* Transport von Medikamenten, Hormonen, Toxinen und anderen Wirkstoffen erlaubt. Weiterhin können rekombinante Einzelkettenantikörper an diverse Genfären kovalent gebunden werden und zur Übertragung von fremden Genen oder Resistenzen beitragen. Dabei spielt die hohe Bindungsaffinität der scFv eine entscheidende Rolle, welche die Expression der Fremdgene nur an bestimmten, antikörperspezifischen Stellen des Wirtsorganismus erlaubt.

Einen weiteren wichtigen Zweig der Antikörperforschung repräsentiert die Herstellung von Fusionsproteinen wie z.B. bispezifischen und bifunktionellen Antikörperfragmenten oder Immunotoxinen (Gruber *et al.*, 1994; Hayden *et al.*, 1994; Lorimer *et al.*, 1996; Coloma *et al.*, 1997). Bispezifische scFv werden rekombinant durch die Fusion der V_H/V_L-Domänen zweier Spezifitäten hergestellt und vereinigen somit alle vier Bindungsdomänen auf einer einzigen Peptidkette (De Jong *et al.*, 1995; Kurucz *et al.*, 1995; Mack *et al.*, 1995). Die Verbindung der vier Domänen wird durch die Einführung von „Linker“-Peptiden erreicht, die die Zusammenlagerung der schweren und leichten Ketten ermöglichen. Die Produktion von funktionellen, löslichen bis-scFv kann sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Expressionssystemen durchgeführt werden. Der Vorteil von bispezifischen Antikörperfragmenten liegt darin, dass sie dem Immunsystem gleichzeitig zwei verschiedene Komponenten bieten: die humorale (Antikörper-basierte) und die zelluläre. Dies hat in der Tumorthherapie bei der Erkennung und Bekämpfung von Tumorzellen bisher die größte Anwendung gefunden (Zhu *et al.*, 1995; Bohlen *et al.*, 1993). Ebenfalls die von Brinkmann *et al.*, 1991 und 1995 und Francisco *et al.*, 1995 konstruierten Immunotoxine sind in der Lage, Tumorzellen zu erkennen und direkt zu zerstören. Weiterhin konnten durch die Bildung von chimären Maus/Mensch-Antikörpern (Jones *et al.*, 1986; Riechmann, 1988; Rader *et al.*, 1998) auch solche murine Antikörper in der Humanmedizin eingesetzt werden, die bisher wegen ihres Fremdcharakters Immunreaktionen hervorgerufen hatten (Miller *et al.*, 1983).

1.4.2 „Phage display“

Die „Phage display“-Methode stellt seit ihrer Einführung durch Smith (1985) eine schnelle und effiziente Technologie zur Herstellung und Selektion von rekombinanten Antikörpern mit spezifischen Bindungseigenschaften dar. Diese Technik basiert auf der Verwendung von filamentösen Bakteriophagen, die auf der Oberfläche die variablen V_H- und V_L-Domänen der schweren und leichten Immunglobulinketten präsentieren und dort für die Wechselwirkungen mit Liganden frei zugänglich sind.

Als Matrize zur Herstellung von rekombinanten scFv sowie scFv-Bibliotheken dient die poly(A)⁺ mRNA, die aus den Hybridomazellen isoliert und in einem weiteren Schritt in die cDNA umgeschrieben wird. Die variablen Antikörperdomänen werden mit Hilfe von domänenspezifischen Primern in multiplen PCR-Reaktionen amplifiziert, mit einem flexiblen „Linker“-Fragment (ca. 20-100 Aminosäuren) verbunden und in einen Phagemid-Vektor kloniert.

Ein Phagemid vereinigt die Eigenschaften eines Bakterienplasmides unter gleichzeitiger Verwendung als Phagenvektor und kann daher sowohl als doppelsträngiges als auch als einzelsträngiges Plasmid vermehrt werden. Es besitzt eine ca. 500 bp große Sequenz aus dem Phagengenom, die alle Signale für die Verpackung in die Phagenpartikel enthält. Zur Vermehrung der Phagemide in *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien ist jedoch die Anwesenheit eines Helferphagen, z.B. M13K07, notwendig, der die fehlenden Gene für eine Phagenvermehrung komplementiert. Aufgrund einer Deletion im Replikationsursprung (*ori*) sind M13K07-Helferphagen nicht in der Lage, sich selbständig in Bakterien zu vermehren.

Der als Trägersystem für die zu präsentierenden scFv-Fragmente fungierende, filamentöse M13-Bakteriophage besitzt eine Länge von 900 nm und einen Durchmesser von 6 nm. Seine Proteinhülle besteht aus ca. 2800 Kopien des Haupthüllproteins pVIII und drei bis fünf Kopien des Proteins pIII. Mit Hilfe der pIII-Proteine bindet der Bakteriophage an den F-Pilus von *E. coli* (Hill und Stockley, 1996) und injiziert sein einzelsträngiges Genom in das Bakterium. Die Vermehrung der M13-Phagen in *E. coli* erfolgt nach dem „rolling-circle“-Modell. Die infizierten Wirtsbakterien wachsen langsamer als die nicht infizierten und lassen sich oft anhand trüber Plaques identifizieren. Während eines Zellzyklus werden pro Bakterium ca. 100-200 Phagen freigesetzt, wobei es nicht zur Lyse der Bakterien kommt. An das Phagenoberflächenprotein pIII können fremde Peptidsequenzen integriert werden, ohne dessen Funktion stark zu beeinflussen (Parmley and Smith, 1989; Smith 1985). In den meisten Fällen ist bei einem Phagemid-Vektor zwischen den Fusionspartnern ein Amber-Stopcodon lokalisiert. Sobald ein rekombinanter scFv-Antikörper N-terminal an das pIII-Protein fusioniert wird, kommt es bei Verwendung eines *E. coli* TG1-Bakterienstammes durch Überlesen des Stopcodons, zur Präsentation der scFv-Antikörperfragmente auf der Phagenoberfläche. Beim Einsatz von einem *E. coli* HB2151-Bakterienstamm wird der Stopcodon sofort erkannt, die Proteinbiosynthese am Ende des scFv-Gens unterbrochen und die Synthese des scFv-pIII-Fusionsproteins verhindert. Stattdessen wird das scFv-Protein in löslicher Form in die periplasmatische Fraktion transportiert und entweder dort akkumuliert oder in den Kulturüberstand freigesetzt.

Im folgenden Schritt des „Phage display“, dem „Biopanning“, wird die Bindungsspezifität der scFv-exprimierenden Phagen in diversen *in vitro*, *in situ* oder *in vivo* Experimenten überprüft. Zu diesem Zweck werden die Phagen entweder auf Antigen-exprimierenden Gewebeschnitten und Zellen inkubiert oder direkt in bestimmte Gewebereiche des Körpers injiziert. Die hochaffinen, ligandenspezifischen Phagen werden anschließend eluiert und für weitere „Biopanning“-Runden eingesetzt. Auf diese Weise

können antigenspezifische Phagen erfolgreich selektiert und durch die Vermehrung in *E. coli*-Bakterien angereichert werden. Die unspezifisch gebundenen Phagen werden durch extensives Waschen entfernt.

Eine weitere Möglichkeit der scFv-Selektion bietet eine direkte Inkubation der Phagen-Antikörper mit dem entsprechenden Antigen. Neben der Immobilisierung an eine feste Phase, z.B. unter Verwendung von Chromatographiesäulen, Mikrotiterplatten oder Reaktionsgefäßen (z.B. „Immunotubes“), kann sich das Antigen auch in Lösung befinden (Winter *et al.*, 1994). Die selektierten und stark angereicherten Phagen werden durch Zugabe von entsprechenden Chemikalien oder konkurrierendem Antigen freigesetzt und anschließend zur Reinfektion von *E. coli* verwendet. Im weiteren Schritt werden die antigenspezifischen, rekombinanten scFv-Antikörper mit Hilfe verschiedener Techniken charakterisiert. Neben der Sequenzierung der scFv-Gene, Ermittlung der Unterschiede in den CDR-Regionen und der Aufklärung der dreidimensionalen Proteinstrukturen, können insbesondere die Bindungsspezifitäten und -affinitäten bestimmt werden (Burke *et al.*, 1996; Masecar *et al.*, 1996). Zur Affinitätsbestimmung stehen ELISA- und RIA-basierte Festphasenmethoden (Burton *et al.*, 1991; Friguet *et al.*, 1985; Goldberg und Djavadi, 1993), Fluoreszenz-Quenching-Titrationsmethoden (Clackson *et al.*, 1991; Foote und Milstein, 1991) und Biosensoren auf der Basis der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Liedberg *et al.*, 1983) zur Verfügung.

1.4.3 Expression löslicher Antikörperfragmente in bakteriellen Systemen

Für die Produktion löslicher scFv-Antikörperfragmente steht ein breites Spektrum von Expressionssystemen zur Auswahl, das sich von Prokaryonten (*E. coli*) über einfache Eukaryonten (Pilze) bis hin zu Pflanzen-, Insekten- oder Säugerzellkulturen erstreckt. Die Entscheidung für ein bestimmtes System wird abhängig von der Zielsetzung der Experimente und Verfügbarkeit bestimmter Technologien getroffen. Darüber hinaus können weitere Kriterien, wie beispielsweise die erwartete Expressionsrate, Herkunft, Eigenschaften und Komplexität des zu exprimierenden scFv sowie Zeit- und Kostenaufwand für die Herstellung und Reinigung von Antikörperfragmenten eine wichtige Rolle spielen.

Das gramnegative Bakterium *E. coli* stellt den wichtigsten bakteriellen Wirtsorganismus für die Expression von rekombinanten Antikörpern dar. Es ist bisher nicht gelungen, komplette IgG-Moleküle in Bakterien zu produzieren. Bereits beim Versuch die Fab-Fragmente in *E. coli* zu exprimieren, führt die Größe dieser Moleküle oft zu enormen Verlusten in der Ausbeute. Aus diesem Grund wird das bakterielle System hauptsächlich für

die Expression von scFv-Antikörperfragmenten eingesetzt. Abhängig von der Wahl des Expressionsvektors können rekombinante scFv löslich aus dem Zytoplasma, aus zytoplasmatischen oder periplasmatischen Einschlusskörpern, aus dem periplasmatischen Raum oder aus dem Kulturüberstand gewonnen werden. Die zytoplasmatische Expression (Buchner und Rudolph, 1991) ist für die Produktion von funktionellen Antikörperfragmenten nicht geeignet, da aufgrund des dort vorherrschenden reduzierenden Milieus eine erfolgreiche Ausbildung von Disulfidbrücken unterbunden wird. Darüber hinaus ist das Zytoplasma reich an Proteasen, so dass ein sehr hohes Expressionsniveau erreicht werden muss, um eine Degradation der heterologen Proteine kompensieren zu können. Die intrazelluläre Expression von löslichen scFv wird ferner dadurch erschwert, dass diese Fremdproteine häufig für die Bakterienzelle toxisch sind und in denaturierter Form als Einschlusskörper in der Zellwand angereichert werden können. Es besteht zwar eine Möglichkeit, diese Proteine durch Renaturierung in ihre aktive Form zu überführen, doch ist diese Prozedur mit großem Zeit- und Kostenaufwand verbunden und die Ausbeute an aktiven Antikörperfragmenten vergleichbar sehr gering (Bird *et al.*, 1988; Bird und Webb Walker; 1991).

Im Gegensatz zur Expression ins Zytoplasma weist die periplasmatische Sekretion der scFv bedeutende Vorteile auf. Das oxidierende Milieu des Periplasmas ermöglicht die Ausbildung von Disulfidbrücken und damit die korrekte Faltung der Antikörperfragmente. Außerdem ist der Gehalt an bakteriellen Proteinen im Periplasma viel niedriger als im Zytoplasma, was die spätere Reinigung der Fremdproteine wesentlich erleichtert (Lindner *et al.*, 1992). Der Transport von rekombinanten scFv durch die Zytoplasmamembran ins Periplasma wird durch die Fusion von Antikörperketten an ein N-terminales Signalpeptid ermöglicht. Bisher wurden die Signalsequenzen der Gene *pelB*, *ompA*, *ompF*, *EcPhoA* sowie *stII* eingesetzt, wobei keine nennenswerten Unterschiede in der Ausbeute der isolierten Antikörper beobachtet werden konnten (Somerville *et al.*, 1994). Neben der oben beschriebenen Sekretion der scFv ins Periplasma kann ein Teil der rekombinanten Antikörperfragmente in das umgebende Kulturmedium sezerniert werden. Dies erfolgt entweder durch einen direkten Transport des Exoproteins ins Medium, unter Beteiligung von C-terminalen Signalpeptiden, oder durch die Anreicherung der Fremdproteine im Periplasma und anschließende Sekretion ins Kulturmedium (Blight *et al.*, 1994). In beiden Fällen können aus dem Kulturüberstand funktionelle, lösliche Antikörper isoliert und im großen Maßstab produziert werden.

Die Produktion von rekombinanten scFv in *E. coli* bietet dadurch, dass es sich um einen genetisch und physiologisch gut verstandenen Mikroorganismus handelt, einen bedeutenden Vorteil gegenüber anderen Expressionssystemen. Zudem ermöglicht das schnelle Wachstum von *E. coli* zu hohen Zelldichten eine einfache und ökonomische Herstellung großer Mengen an rekombinanten Proteinen in einer verhältnismäßig kurzen Zeit. Allerdings weist das prokaryontische Expressionssystem auch einige Nachteile auf. Die größte Schwierigkeit bei der Produktion von scFv in *E. coli* liegt in der Faltung der Peptide zur korrekten Tertiärstruktur. So wurden einige „Schlüsselstellen“ in den *framework*-Bereichen aufgedeckt, die die Faltungseffizienz erheblich beeinflussen (Knappik und Plückthun, 1995). Dieses Problem kann bisher leider nur durch die Veränderung der Antikörpersequenz behoben werden.

Ferner kann die Fusion rekombinanter Antikörper mit Signalpeptiden in einigen Fällen zu einem schnellen Abbau der Proteine führen (Gentz *et al.*, 1988). Durch die Anwesenheit von positiv geladenen Aminosäuren in unmittelbarer Nähe zum Signalpeptid, wird die korrekte Abspaltung des Signalpeptides unterbunden, was zur Anhäufung von unlöslichen Antikörperfragmenten im Zytoplasma führt. Die Ansammlung von nicht exportierten scFv oder Vorläuferproteinen kann die Expression von Stressproteinen auslösen und somit den Abbau der produzierten Antikörperfragmente verstärken. Darüber hinaus ist es möglich, dass, bei Gegenwart von inhibitorischen Aminosäuresequenzen innerhalb eines Vorläuferproteins, die Translokation des rekombinanten Proteins über die Zytoplasmamembran ins Periplasma behindert wird (Little *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1989). Ein weiteres Problem bei der Produktion von scFv in *E. coli* ist die Bildung von Aggregaten. Dieses Phänomen tritt meistens bei einer Überexpression der Antikörperfragmente im periplasmatischen Raum auf und führt zum Verlust der Spezifität der Antigenerkennung.

Trotz der oben erwähnten Hindernisse hat die Expression von rekombinanten Antikörpern in *E. coli* vielfältige industrielle Anwendungen erreicht und wird dank der einfachen genetischen Manipulation des Mikroorganismus oft den anderen Expressionssystemen vorgezogen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Erkenntnisse über die Regulation des Gefäßwachstums im Rahmen der Angiogenese und Arteriogenese, mit dessen physiologischen sowie pathologischen Konsequenzen, haben eine wichtige Bedeutung für die Diagnostik und Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen. Im Mittelpunkt der angio- und arteriogenetischen Vorgänge stehen die Endothelzellen, welche die innere Auskleidung aller Gefäßtypen bilden und nach Aktivierung mit stimulatorischen Substanzen kaskadenartig die Phasen der Migration, Proliferation sowie Differenzierung durchlaufen (Folkman, 1984). Sie nehmen zudem eine Schlüsselstellung bei der Adhäsion, Aktivierung und Transmigration anderer Zellen insbesondere von Entzündungszellen ein. Die Akkumulation von Entzündungszellen wiederum spielt bei Gefäßveränderungen eine entscheidende Rolle. Zentral für die Steuerung, örtliche Begrenzung und Koordination der verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge ist die Heterogenität des Endothels. Die gefäß-, gewebe- sowie speziesabhängige Heterogenität der Endothelien spielt in physiologischen und pathologischen Prozessen des Gefäßwachstums, bei der Pathogenese von endothelialen Dysfunktionskrankheiten sowie in der Transplantationsmedizin eine zentrale Rolle. Man geht daher davon aus, dass die Heterogenität endothelialer Oberflächen die unterschiedlichen Zustände sowie verschiedene physiologische und pathophysiologische Vorgänge des Gefäßsystems abbildet. Peptid-Phagenexpressionssysteme sind in der Vergangenheit verwandt worden, um diese Heterogenität sichtbar und therapeutisch nutzbar zu machen (Pasqualini und Ruoslahti, 1996; Rajotte *et al.*, 1998).

In dieser primär biotechnologisch ausgerichteten Arbeit soll die Möglichkeit der Generierung und des Einsatzes spezifisch gegen angio- und arteriogenetische Endothelien gerichteter Einzelkettenantikörper überprüft werden. Damit sollen Instrumente entwickelt werden, die es erlauben, einerseits die verschiedenen Mechanismen der Angiogenese und der Arteriogenese zu untersuchen und andererseits spezifisch bestimmte vaskuläre Adaptationsprozesse darzustellen oder zu beeinflussen. Im Vergleich zu Peptiden versprechen Einzelkettenantikörper eine gezieltere und zugleich breiter gefasste Ansteuerung von Oberflächenstrukturen. Durch Einsatz dieser rekombinanten Moleküle könnte in künftigen Experimenten die körpereigene Immunantwort nachgeahmt und ins Reagenzglas übertragen werden.

Exemplarisch werden dieser Untersuchung zwei verschiedene Antikörpersysteme zu Grunde gelegt. Als Ausgangsmaterial dienen im ersten Teil der Arbeit Hybridomazellen, die durch Fusion von B-Lymphozyten aus Mäusen, welche zuvor mit Membranpräparaten aus

Ratten-Kollateralarterien immunisiert worden waren, mit Myelomzellen gewonnen wurden. In diesem Teil der Arbeit soll die Möglichkeit ausgelotet werden, Einzelkettenantikörper im Rahmen der Proteomanalyse von Kollateralarterien zur Identifikation und funktionellen Charakterisierung bisher nicht bekannter Oberflächenmoleküle, die an diesem Prozess beteiligt sind, einzusetzen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen Einzelkettenantikörper untersucht werden, die an einen Rezeptor binden, bei dem davon ausgegangen wird, dass er besonders stark auf angiogenetischen Endothelien exprimiert wird, dem sogenannten VEGFR-2. Unter angiogenetischen Stimulatoren spielen der endothelspezifische Wachstumsfaktor VEGF und seine Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 eine bedeutende Rolle. Die Funktion von VEGF und seiner Rezeptoren während der Arteriogenese ist hingegen bislang weitgehend ungeklärt.

In beiden Teilen der Arbeit sollen zunächst Einzelkettenantikörper-Phagen-Expressionsbibliotheken generiert und auf ihre Vollständigkeit überprüft werden. In einem zweiten Schritt sollen die entstandenen scFv-exprimierenden Phagen durch Exposition mit verschiedenen Zellkultursystemen und histologischen Präparaten, dem so genannten „Biopanning“, selektiert werden. Das Expressionsmuster der dabei selektierten Phagen gilt es im Folgenden mit dem Expressionsmuster zugrunde liegender, vollständiger Antikörper zu vergleichen. Hierbei ist ein Schwerpunkt insbesondere auf die Unterscheidung zwischen angiogenetischen und arteriogenetischen Gefäßen zu legen. In einem letzten Schritt ist zu versuchen, die Einzelkettenantikörper als lösliche Peptide zu produzieren und zu testen.

In der folgenden Darstellung sind die Ausgangssituation (1-3) sowie der experimentelle Ablauf der vorliegenden Doktorarbeit (4-10) noch einmal schematisch zusammengefasst:

1 Isolierung von Kollateralarterien aus Ratten, 12 h nach der Okklusion der Femoralarterie

2 Immunisierung von Mäusen mit Membranpräparaten aus Kollateralgefäßen

3 Herstellung von Hybridomazellen

4 Überprüfung der Spezifität des Hybridoma-Antikörper-Überstandes:

in situ
auf Schnitten von Kollateralarterien und Kontrollgefäßen

in vitro
auf Ratten-Herz-Endothelzellen

5 Generierung von rekombinanten scFv aus kollateralspezifischen Hybridomaklonen

6 Expression der Einzelkettenantikörper auf der Oberfläche von M13-Bakteriophagen

7 Analyse der Bindungsspezifität und Selektion von scFv-exprimierenden Phagen:

in vivo
durch direkte Injektion der scFv in die Femoralarterie der Ratten

in situ
auf Schnitten von Kollateralarterien und Kontrollgefäßen der Ratten

in vitro
auf Ratten-Herz-Endothelzellen

8 Untersuchung und Vergleich der Bindungsaffinität von CTA- und VEGFR-2-spezifischen Phagen:

auf Gefäßschnitten von Ratten:

- a) Ischämie-Modell
- b) Tumor-Modell
- c) Kontrollratte

auf humanen Gefäßschnitten:

- a) Patient mit akuter Ischämie
- b) Kontrollpatient

9 Herstellung von löslichen CTA- und VEGFR-2-spezifischen scFv-Antikörpern

10 Analyse der Bindungsaffinität von löslichen, gefäßspezifischen scFv-Antikörpern

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Gewebeproben

Rattengewebe:

- Kollateralarterien aus dem Probebein von Sprague-Dawley Ratten, 3 Tage nach der Okklusion der Femoralarterie (Herzog *et al.* 2002).
- Kollateralarterien aus dem Kontrollbein von Sprague-Dawley Ratten, 3 Tage nach der Ligation der Femoralarterie (Herzog *et al.* 2002).
- Gefäßschnitte aus einem hepatozellulären Karzinom von Sprague-Dawley Ratten; (Pathologisches Institut, UKE Hamburg)

Humangewebe:

- Kollateralarterie - Präparat vom 83 Jahre alten Patient mit akuter Ischämie (Entnommen 3 h nach dem Gefäßverschluss).
- Kollateralarterie - Präparat vom 94 Jahre alten Patient mit akuter Ischämie.
- Kollateralarterie - Präparat vom 72 Jahre alten Kontrollpatient - Gewebeprobe aus einem gesunden Gefäß.

Die oben aufgeführten Gewebeexemplare wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. E. Wahlberg (Karolinska Institut, Stockholm) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Zelllinien

Zur Generierung von monoklonalen, kollateralspezifischen scFv-Antikörpern diente eine Maus-Hybridomazelllinie, die im Rahmen der experimentellen Arbeiten von Dr. W. D. Ito in Bad Nauheim hergestellt wurde. Als Ausgangspunkt für die Erzeugung dieser Zelllinie fungierten Ratten, bei denen eine künstliche Ligation im Bereich der Femoralarterie vorgenommen wurde. Zwölf Stunden nach dem Gefäßverschluß wurden den Versuchstieren die Kollateralarterien entnommen und zu Membranpräparaten verarbeitet. Mit diesen Membranpräparaten wurden im folgenden Schritt Mäuse immunisiert. Aus der Milz der Mäuse wurden die B-Lymphozyten isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Die auf diese Weise entstandenen Hybridomazellen wurden auf ihre Spezifität auf Schnitten von Kollateralarterien überprüft und ausselektioniert.

Die „Biopanning“-Experimente *in vitro* und die immunhistochemischen Nachweise von kollateral- und endothelspezifischen Antikörpern erfolgten unter Einsatz der unten aufgeführten Zelllinien:

- RHE-A: Rattenherz-Endothelzellen; die Zelllinie A wurde in unserem Labor durch mehrmaliges Subklonen (Juliane Bergmann, Natalie Obermeyer) von der ursprünglichen RHE-Zelllinie (Derhaag *et al.*, 1996) ausdifferenziert und getrennt kultiviert. Die RHE-A Zellen weisen starke Migrationsfähigkeit auf (Obermeyer *et al.*, 2003).
- RHE-neg.: Durch das Subklonen der Parentalzelllinie (s.o.) wurden ebenfalls die negativen Rattenherz-Endothelzellen ausselektiert. Dieser Zelllinie fehlt die Fähigkeit zur Migration. Die RHE-neg. zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate aus (Obermeyer *et al.*, 2003).
- PAE-KDR-11: Endothelzelllinie aus Schweineaorten (AG H. Weich, Braunschweig), charakteristisch durch die Überexpression von humanem VEGFR-2 (Waltenberger *et al.*, 1994)

2.1.3 Bakterienstämme, Helferphagen und Phagen

Folgende *E. coli* Bakterienstämme wurden als Rezipienten für rekombinante DNA [R], zur Plasmidamplifikation [PA] und -isolierung [PI] sowie zur Protein- [PrE] und Phagenexpression [PhE] verwendet:

- BL21 (DE3): $F^- ompT hsdS_B(r_B^-, m_B^-) gal dcm$ (DE3); Invitrogen; [R, PA, PI, PrE]
- DH5 α : $F^- \phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^-, m_k^+) phoA supE44 \lambda thi-1 gyrA96 relA1$; Invitrogen; [R, PA, PI]
- HB2151: $K12 ara \Delta(lac-pro) thi/F' proA^+ B^+ lacI^q\Delta M15$; Amersham Pharmacia Biotech; [R, PA, PI, PrE]
- TG1: $K12 supE thi-1 \Delta(lac-proAB) \Delta(mcrB-hsdSM) 5(r_k^-, m_k^-) [F' traD36 proAB lacI^q\Delta M15]$; Amersham Pharmacia Biotech; [R, PA, PI, PhE]
- TOP10: $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 ara\Delta 139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$; Invitrogen; [R, PA, PI]
- XL1-Blue: $recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q\Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$; Stratagene; [PA, PI]

Für die Durchführung des „Phage Display“ wurde der Helferphage M13K07 (1×10^{11} pfu/ml; Invitrogen) eingesetzt.

Zur Expression von scFv-Antikörpern auf der Phagenoberfläche und darauf folgenden immunhistochemischen Nachweisen wurden folgende Phagen verwendet:

- A7: VEGFR-2-spezifische (Thomas Böldicke, Braunschweig) sowie kollateralspezifische Phagen (Biopanning auf Kollateralgefäßen im Rahmen dieser Arbeit)
- K555aB4: aus Hybridomazellen generierte, kollateralspezifische Phagen
- K555bB2: dito
- 1-40 VEGFR-2: aus VEGFR-2-Library (Thomas Böldicke; Braunschweig) selektierte, VEGFR-2- und kollateralspezifische Phagen

2.1.4 Plasmide und Phagemide

Im Rahmen dieser Arbeit kamen folgende Plasmide und Phagemide zum Einsatz:

- pCANTAB 5 E: (Amersham Pharmacia Biotech)
Phagemid Klonierungs- und Expressionsvektor mit einem bakteriellen und einem M13 Replikationsursprung, einem Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker, g3p-Fusionsprotein zur Präsentation von scFv auf der Oberfläche von M13-Phagen sowie E-tag-Peptidsequenz zur immunologischen Detektion von löslichen scFv-Expressionsprodukten.
- pCR 2.1-TOPO: (Invitrogen)
Plasmidvektor für eine direkte Klonierung von PCR-Produkten in *E. coli*; enthält Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgene als Selektionsmarker sowie lacZ α -Gen für blau/weiß Selektion von positiven Bakterienklonen.
- pET 15 b: (Novagen)
Klonierungs- und Expressionsplasmid mit Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker und His-tag-Peptid zur immunologischen Detektion von Proteinen; wurde zur Expression von löslichen scFv in *E. coli* eingesetzt.
- pUC 18 und pUC 19: (Invitrogen)
Die beiden Vektoren dienten hauptsächlich als Kontrollplasmide bei der Durchführung von diversen Klonierungen und Transformationen.

2.1.5 Synthetische Oligonukleotide und Längenstandards

Nukleotide:

- 10 mM dNTP Mix, MBI Fermentas
- Oligo (dT)₁₂₋₁₈ -Primer (500 ng/μl), Gibco BRL
- Oligo (dT)₃₀ -latex-Primer (Oligotex), Qiagen

Primer:

1. Kontrollprimer für die RT-PCR:

- HPRT-Primer (Hypoxantin-Guanin-Phospho-Ribosyl-Transferase), Gibco BRL

2. Primer für die Herstellung von scFv:

- Heavy Primers, Amersham Pharmacia
- Light Primer Mix, Amersham Pharmacia
- Linker Primer Mix, Amersham Pharmacia
- RS Primer Mix (Restriction Site Primer), Amersham Pharmacia

3. Primer für die Sequenzierung von scFv:

- S1-, S3-, S4- und S6-Primer, Amersham Pharmacia

4. Primer mit *Nde* I- bzw. *Xho* I -Restriktionsstellen-Adaptoren für die kollateralspezifischen K555aB4-Klone:

- V_H Nde I A; 5'- AGC CGG CCC ATA TGA TGG CCC A - 3'; 22-mer; T_m = 65,8°C
- V_H Nde I B; 5'- GGC CCA TAT GAT GGC CCA GGT GAA - 3'; 24-mer; T_m = 66,1°C
- V_L Xho I 1C; 5'- GCC GCC TCG AGC CGT TTC AGC T - 3'; 22-mer; T_m = 67,7°C

5. Sequenzierungsprimer für die kollateralspezifischen K555aB4/2A-Klone:

- Trx Forward Sequencing Primer, Invitrogen
- pBAD Reverse Sequencing Primer, Invitrogen

6. Sequenzierungsprimer für die kollateralspezifischen K555bB2-Klone:

- CTAVH; 5'- CGC AAT TCC TTT AGT TGT TCC T - 3'; 22-mer; T_m = 56,5°C
- CTAVL; 5'- CAA GTG GAG GCG GTT CA - 3'; 17-mer; T_m = 55,2°C
- CTA 1-F; 5'- TTC CAA CTT ACA CAC TGG C - 3'; 19-mer; T_m = 54,5°C
- CTA 2-F; 5'- AGT GGG TCT GGA ACA GG - 3'; 17-mer; T_m = 55,2°C
- CTA 1-R; 5'- TAT CCA ATG AAT TCC AGG CC - 3'; 20-mer; T_m = 55,3°C
- CTA 2-R; 5'- TCA GGC TTC TGC TTC ACC - 3'; 18-mer; T_m = 56,0°C
- K1; 5'- ACA TCT GAA GAT TCT GCA GTG - 3'; 21-mer; T_m = 55,9°C

- K2; 5'- TAC ATG CAG CTC AAC AGT C - 3'; 19-mer; $T_m = 54,5^\circ\text{C}$
- K3; 5'- AAC TTA CAC ACT GGC GGC - 3'; 18-mer; $T_m = 56,0^\circ\text{C}$
- K4; 5'- AAG CTG CAG GAG TCA GG - 3'; 17-mer; $T_m = 55,2^\circ\text{C}$
- Linker 1; 5'- CTG ACA TCT GAA GAT TCT GC - 3'; 20-mer; $T_m = 55,3^\circ\text{C}$
- Linker 2; 5'- GAC AAA TCT TCC AAC ACT GC - 3'; 20-mer; $T_m = 55,3^\circ\text{C}$
- Linker 3; 5'- ACA AGG CCA CAC TGA CTG - 3'; 18-mer; $T_m = 56,0^\circ\text{C}$

7. Primer mit *Sfi* I -Restriktionsstellen-Adaptoren für die VEGFR-2 -spezifischen A7-Klone:

- Sfi I F1; 5'- TTT CTA TGC GGC CCA GCC GGC CAT G - 3'; 25-mer; $T_m = 69,5^\circ\text{C}$
- Sfi I R1; 5'- CGC GGC CGG CTG GGC CCC GTT TCA - 3'; 24-mer; $T_m = 74,7^\circ\text{C}$
- Sfi I R2; 5'- CGC GGC CTA TTA GGC CCC GTT TCA - 3'; 24-mer; $T_m = 67,8^\circ\text{C}$

8. Sequenzierungsprimer für die VEGFR-2 -spezifischen A7-Klone:

- KDR 1-F; 5'- AGT GGC AGT GGA TCT GG - 3'; 17-mer; $T_m = 55,2^\circ\text{C}$
- KDR 2-F; 5'- AAT CAG CAG CAT GGA GGC - 3'; 18-mer; $T_m = 56,0^\circ\text{C}$
- KDR 1-R; 5'- CAT GGC TCT GCT TCT CC - 3'; 17-mer; $T_m = 55,2^\circ\text{C}$
- KDR 2-R; 5'- TAT CCA GAA GTC TTG CAG G - 3'; 19-mer; $T_m = 54,5^\circ\text{C}$
- A7F2; 5'- GAG GTA TTA ATC CTA ACA GTG G - 3'; 22-mer; $T_m = 56,5^\circ\text{C}$
- A7F3; 5'- AGT CTA TTA CTG TGC AAG AGG - 3'; 21-mer; $T_m = 55,9^\circ\text{C}$
- A7R1; 5'- ATC CAC TGC CAC TGA AGC G - 3'; 19-mer; $T_m = 58,8^\circ\text{C}$
- A7R2; 5'- TGG AGA TGC AGA CAT GAT TGC - 3'; 21-mer; $T_m = 57,9^\circ\text{C}$
- A7VHF1; 5'- ATT ACT GTG CAA GAG GAC TAT GG - 3'; 23-mer; $T_m = 58,9^\circ\text{C}$
- A7VHF2; 5'- TGG CTC TGG CGG TGG CGG ATC - 3'; 21-mer; $T_m = 67,6^\circ\text{C}$
- A7VLF3; 5'- GGT ACC AGC AGA AGT CAA GAC CC - 3'; 23-mer; $T_m = 64,2^\circ\text{C}$
- A7VLF4; 5'- AGC ATG GAG GCT GAA GAT GC - 3'; 20-mer; $T_m = 59,4^\circ\text{C}$
- A7VLR1; 5'- TGT GTC ATA AAT CCA GAG TTT GG - 3'; 23-mer; $T_m = 57,1^\circ\text{C}$
- A7VLR2; 5'- TGA ACC GCC TCC ACC TGA GG - 3'; 20-mer; $T_m = 63,5^\circ\text{C}$
- A7VHR3; 5'- TCT ACA GTC AAT GTG GCC TTG CC - 3'; 23-mer; $T_m = 62,4^\circ\text{C}$
- A7VHR4; 5'- GTA TCC AGA AGT CTT GCA GG - 3'; 20-mer; $T_m = 57,3^\circ\text{C}$

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Primer von der Firma MWG Biotech synthetisiert.

Längenstandards:

- SMART DNA Marker, Eurogentec
- Prestained Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad

2.1.6 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien	Hersteller	Chemikalien	Hersteller
Aceton	Merck	FCS	Gibco BRL
Acrylamid	Bio-Rad	Formaldehyd 37%	Merck
Agar	Becton Dickinson	Formamid, reinst	Merck
Agarose	Gibco BRL	Gelatine	Sigma
3-Amino-9-Ethyl-Carbazole (AEC)	Sigma	Glukose	Merck
Ammoniumchlorid	Merck	Glycerol, 87%, reinst	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma	Glycin	Roth
Ampicillin	Calbiochem	Ham's F 12 mit Glutamin	Sigma
Adenosin 5'-Triphosphat (ATP)	Amersham Pharmacia	Hefeextrakt	Becton Dickinson
Bio Safe Coomasie Reagenz	Bio-Rad	HEPES	Sigma
Borsäure	Sigma	Hoechst B 2883	Sigma
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galactosid (X-Gal)	Diagnostic Chemicals	Hyflo Super Cell	Fluka
Bromphenolblau	Sigma	Immersionsöl	Merck
BSA	Sigma	Isobutanol	Merck
Calciumchlorid	Merck	Isopropanol	Merck
Chloroform, reinst	Merck	Isopropyl-thiogalactosid (IPTG)	Bio Vectra
Citronensäure	Sigma	Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma
Citronensäuremonohydrat	Merck	Kaliumchlorid	Merck
4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma	Kanamycin	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma	Lithiumchlorid	Merck
Dimethylformamid (DMF)	Sigma	Magnesiumchlorid	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck	Magnesiumsulfat	Merck
DL-Dithiothreitol	Sigma	Mayers Hämalaunlösung	Merck
Dulbecco's Medium mit Glutamat	Gibco BRL	2-Mercaptoethanol	Sigma
Einbettungsmedium für Kryoschnitte	DAKO	Methanol	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma	Mineralöl	Bio-Rad
Essigsäure, 100%	Merck	3-[N-Morpholino]-propan-sulfonsäure (MOPS)	Sigma
Ethanol	Merck	Moviol	Calbiochem
Ethidiumbromid	Roth	Nalidixinsäure	ICN Biomedicals
		Natriumacetat	Merck
		Natriumazid	Sigma
		Natriumcarbonat	Merck
		Natriumchlorid, reinst	Merck

Natriumdesoxycholat	Merck	Silbernitrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	Saccharose	Sigma
Natriumhydroxid	Merck	TEMED	Sigma
Natriumthiosulfat	Sigma	Tetracyclin	Sigma
Ni-NTA Agarose	Qiagen	Thiaminhydrochlorid	Sigma
PBS Dulbecco's	Gibco BRL	Tissue-Tek	Sakura Finetek
Penicillin/Streptomycin	Roche	Tris	Sigma
Phenol	Gibco BRL	Triton X-100	Sigma
Phenol-Chloroform-Isoamyl- alkohol	Sigma	Trockenmilch	Bio-Rad
Phenylendiamin (PPD)	Merck	Trypsin-EDTA	Gibco BRL
Polyethylenglykol 3350 / 8000 (PEG 3350/8000)	Fluka	Trypton	Becton Dickinson
Ponceau S-Reagenz	Serva	Trypanblau	Serva
Propidiumjodid	Sigma	Tween 20	Sigma
Protease Inhibitor Coctail- Complete, Mini, EDTA-free	Roche	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck
RNase Inhibitor	Gibco BRL	Xylencyanol	Merck
Salzsäure, rauchend, 37%	Merck	Xylolersatz XEM-200	Vogel
Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Autoklavierband	Eppendorf	FACS-Röhrchen	Sarstedt
Bakterialschalen	Eppendorf	Faltenfilter	Schleicher & Schuell
Centricon-Röhrchen	Millipore	Färbekasten	Rudolf Franke
Chamber slides	Nunc	Filterpapier	Whatman
DAKO-Pen	DAKO	Geltrocknungsfolie + Rahmen	Promega
Deckgläser	Marienfeld	Glaszubehör	Schott
Dia-Filme, Ektachrome 64 T Profesional	Kodak	Handschuhe	Kimberly-Clark
Digital-Timer	Merck	Hi Trap Anti-E-tag Säule	Amersham Pharmacia
Dialyseschläuche	Serva	Impfösen	Greiner Bio One
Drehtisch	Schütt Labor- technik	Indikatorpapier	Merck
Drigalski-Spatel	Merck	Kodak Bio Max MR Filme	Sigma
Druckerpapier für Gelbilder: K65 HM-ce/KP65 HM-ce	Mitsubishi	Mikroskopische Präparate Kasten	Merck
Einwegsäulen	Biorad	Nagellack	diverse Firmen

Neubauer Zählkammer	Merck	Plastik Messküvetten	Rudolf Franke
Nitrocellulose Transfermembran	Schleicher & Schuell	Quarz Messküvette	Bio-Rad
Objektträger Super Frost Plus	Menzel-Gläser	Reaktionsgefäße: 0,5; 1,5 und 2,0 µl	Eppendorf
Objektträgerhalter	Merck	Reaktionsgefäße: 15; 50 ml	Falcon
Objektträger-Kasten	Neo Lab	Reaktionsgefäße: 50 ml	Nalgene
Parafilm	Merck	Reaktionsgefäße: 250 ml	Beckman
Pasteurpipetten	Eppendorf	Skalpel und -klingen	Bayha
PCR Reaktionsgefäße: 0,2 µl	Hybaid	Spatel	Merck
Pinzetten	Merck	Sterilfilter: 0,2 und 0,45 µm	Millipore
Pipetten: 0,5-1; 1-10; 10-100; 100-200 und 200-1000 µl	Gilson	Waschküvetten	Merck
Pipettenspitzen	Gilson, Eppendorf	Wägebepapier	Machery Nagel
Pipettierhilfe-Pipettus	Hirschmann Laborgeräte	Wägeschälchen	Machery Nagel
Plastik Pipetten: 2; 5; 10 und 25 ml	Falcon	Zellkulturflaschen	Falcon

2.1.7 Medien, Puffer und Lösungen

Medien:

- LB-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl; (w/v); pH 7,5
- LB-Agar: LB-Medium; 1,5% Agar (w/v)
- LB-Amp-Agar: LB-Agar; 100µg/ml Ampicillin
- LBG-Medium: LB-Medium; 20mM Glukose
- Medium für Hybridomazellen: Dulbecco's MEM Medium; 10% FCS; 0,2% Penicillin/Streptomycin(500x); (v/v); 30 mM HEPES Puffer
- Medium für PAE-KDR-11-Zellen: Ham's F12 mit Glutamin; 10% FCS; 0,2% Penicillin/Streptomycin; (v/v)
- Medium für RHE-Zellen: Dulbecco's Medium mit Glutamat; 10% FCS; 0,2% Penicillin/Streptomycin (500x); (v/v)
- Minimalagar: 0,6% Na₂HPO₄ (dibasic) (w/v); 0,3% KH₂PO₄ (monobasic) (w/v); 0,1% NH₄Cl (w/v); 1,5% Agar (w/v); 1mM MgCl₂ x 6H₂O; 1 mM CaCl₂ x 2H₂O; 1 mM Thiaminhydrochlorid; 0,1% Glukose; pH 7,4
- SB-Medium: 3,5% Trypton; 2% Hefeextrakt; 0,5% NaCl; (w/v); pH 7,5

- SB-AG-Medium: SB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin; 2% Glukose
- SB-AI-Medium: SB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin; 1mM IPTG
- SOBAG-Medium: 2% Trypton (w/v); 0,5% Hefeextrakt (w/v); 0,05% NaCl (w/v); 10 mM MgCl₂; 111 mM Glukose; 100 µg/ml Ampicillin
- SOBAG-Agar: SOBAG-Medium; 1,5% Agar (w/v)
- SOBAG-N-Agar: SOBAG-Agar; 100 µg/ml Nalidixinsäure
- SOC-Medium: 2% Trypton (w/v); 0,5% Hefeextrakt (w/v); 0,05% NaCl (w/v); 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM Glukose; pH 7,0
- 2 x YT-Medium: 1,7% Trypton; 1% Hefeextrakt; 0,5% NaCl; (w/v)
- 2 x YT-AG-Medium: 2 x YT-Medium; 100 µg/ml Ampicillin; 2% Glukose
- 2 x YT-AI-Medium: 2 x YT-Medium; 100 µg/ml Ampicillin; 1 mM IPTG
- 2 x YT-AK-Medium: 2 x YT-Medium; 100 µg/ml Ampicillin; 50 µg/ml Kanamycin
- 2 x YT-G-Medium: 2 x YT-Medium; 2% Glukose
- 2 x YT-N-Medium: 2 x YT-Medium; 100 µg/ml Nalidixinsäure

Puffer und Lösungen:

- AEC-Stock-Lösung: 1 Tablette AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazole) in 5 ml Dimethylformamid (DMF)
- Agarose für DNA-Gele: 0,7-2% Agarose (w/v); in 1 x TBE-Puffer
- Agarose für RNA-Gele: 0,7-2% Agarose (w/v); 10% 10 x MOPS, (v/v); 2% Formaldehyd; 0,01% Ethidiumbromid; (v/v); in DEPC H₂O
- Ampicillin-Stocklösung: 20 mg/ml Ampicillin
- 10 x Bindungspuffer für die Anti-E-Tag Säule: 1,38% NaH₂PO₄ x H₂O; 1,78% Na₂HPO₄ x 2H₂O; 0,05% NaN₃; (w/v); pH 7,0
- Blocking Puffer A: 1 x PBS; 10% fettfreie Trockenmilch (w/v)
- Blocking Puffer B: 3% BSA (w/v); in 1 x PBS
- Blocking Puffer C: 3% BSA (w/v); in 1 x TBS pH 7,5
- Blocking Puffer D: 5% Trockenmilch (w/v); in Waschpuffer A
- Blocking Puffer E: 5% BSA; 0,5% Glycin; (w/v) in 1 x PBS
- Blocking Puffer F: 1% BSA (w/v); in 1 x PBS
- 10 x Blotting-Lösung: 1,2% Tris; 5,6% Glycin; (w/v)
- Blotting-Puffer: 100 ml Blotting-Lösung; 200 ml Methanol; 700 ml H₂O
- Citrat-Puffer: 0,21% Citronensäuremonohydrat; pH 6,0

- Citronensäure-Lösung für die Silberfärbung: 2,3 M Citronensäure
- Denaturierungspuffer für RNA-Proben: 63,3% deionisiertes Formamid; 13,3% 10 x MOPS; 8,6% säurefreies Formaldehyd; (v/v)
- 10 x Elutionspuffer für die Anti-E-Tag Säule: 1 M Glycin; pH 3,0
- Elutionspuffer S: 250 mM Imidazol in 1 x PBS, pH 7,5
- Entwicklungslösung für die Silberfärbung: 6% Natriumcarbonat (12%-ige Stocklösung); (v/v)
6 mM Formaldehyd (37%)
- Ethanol-Fixans: 30 ml 50 mM Glycin; 70 ml Ethanol absolut; pH 2,0
- Färbelösung für die Immunhistochemie: 10 ml Natriumacetat (0,1 M, pH 4,8);
500 µl AEC-Stock-Lösung; 2 µl H₂O₂
- Färbelösung für die Silberfärbung: 0,2% Silbernitrat (10 %-ige Stocklösung); (v/v)
1 mM Formaldehyd (37%)
- Fixierungslösung A für die Silberfärbung: 50% Methanol; 10% Essigsäure; (v/v)
- Fixierungslösung B für die Silberfärbung: 5% Methanol; 7,5% Essigsäure; (v/v)
- Gelatinelösung für die Immunhistochemie: 1% Gelatine in 1 x PBS
- Kanamycin-Stocklösung: 25 mg/ml Kanamycin
- Ladepuffer für DNA-Proben: 1% Bromphenolblau; 1% Xylencyanol; 50% Glycerin;
in 1 x TBE-Puffer
- 2 x Ladepuffer für Protein-Proben (nicht reduziert): 23,8% 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 19% Glycerol; (v/v);
14,5% SDS; 0,09% Bromphenolblau; (v/v)
- 2 x Ladepuffer für Protein-Proben (reduziert): 23,8% 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 19% Glycerol; (v/v);
14,5% SDS; 0,09% β-Mercaptoethanol;
0,09% Bromphenolblau; (v/v)
- Ladepuffer für RNA-Proben: 0,2% Denaturierungspuffer; 0,02% Proben-Puffer (PP);
(v/v); in DEPC H₂O
- Laufpuffer für PAA-Gele: 1,5 M Tris; pH 8,8
- Lösung A für die Immunhistochemie: 10% 10 x PBS; 2% Gelatinelösung; 0,05% Tween 20;
(v/v);
- 10 x MOPS-Puffer: 40 mM MOPS; 10 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA
- Natriumcarbonat-Stocklösung: 12% Natriumcarbonat (w/v)
- 1 x Neutralisationspuffer für die Anti-E Tag Säule: 1 M Tris-Base; 0,05% NaN₃ (w/v); pH 8,2
- PAA-Sammelgele (4%-ig): 0,630 ml Stocking-Puffer; 0,250 ml Acrylamid (40%-ig);
25 µl SDS (10%-ig); 12,5 µl APS (10%-ig); 2,5 µl TEMED; 1,6 ml H₂O

- PAA-Trenngele (12%-ig): 2,5 ml Laufpuffer; 3 ml Acrylamid (40%-ig); 100 µl SDS (10%-ig); 50 µl APS (10%-ig); 5 µl TEMED
4,3 ml H₂O
- PAA-Trenngele (15%-ig): 2,5 ml Laufpuffer; 3,6 ml Acrylamid (40%-ig); 100 µl SDS (10%-ig); 50 µl APS (10%-ig); 5 µl TEMED
3,75 ml H₂O
- PAA-Trenngele (20%-ig): 2,5 ml Laufpuffer; 5 ml Acrylamid (40%-ig); 100 µl SDS (10%-ig); 50 µl APS (10%-ig); 5 µl TEMED
2,35 ml H₂O
- 10 x PBS: 8% NaCl; 0,2% KCl; 0,2% KH₂PO₄; 0,76% Na₂HPO₄ x H₂O; (w/v); pH 7,4
- PEG/NaCl: 20% PEG 8000; 14,6% NaCl; (w/v)
- RNA-Proben-Puffer (PP): gesättigtes Bromphenolblau; 50% Glycerin (v/v); in DEPC H₂O
- Sensitivierungslösung für die Silberfärbung: 0,02% Natriumthiosulfat
- Silbernitrat-Stocklösung: 10% Silbernitrat (w/v)
- Stocking-Puffer für PAA-Gele: 0,5 M Tris; pH 6,6
- 10 x TBE-Puffer: 10,8% Tris-Base (w/v); 5,5% Borsäure (w/v); 20 mM EDTA, pH 8,0
- TBS-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl
- TBS-Tween-Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05% Tween 20; (v/v)
- TBS-Tween/Triton-Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05% Tween 20 (v/v); 0,2% Triton X-100 (v/v)
- TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0
- TELT Lysis-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 62,5 mM EDTA; 2,5 M LiCl; 0,4% Triton X-100
- 1 x TES-Puffer: 0,2 M Tris-HCl (pH 8,0); 0,5 mM EDTA; 0,5 M Saccharose
- TSS-Puffer: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl; 10% PEG 3350; (w/v); 5% DMSO (v/v); 50 mM MgCl₂; pH 6,5
- 1 x Waschpuffer A für Chemilumineszenz: 10 mM Tris-Cl; 0,5% NaCl, (w/v); 0,1 % Tween 20
- 1 x Waschpuffer B für Chemilumineszenz: 0,25% Natriumdesoxycholat; 0,1% SDS; (w/v); in 1 x Waschpuffer A
- Waschpuffer IF für Immunfluoreszenzhistochemie: 0,5% Glycin (w/v); in 1 x PBS

- Waschpuffer für die RHE Zellen: 2% FCS (v/v); in 1 x PBS (Dulbecco's)
- Waschpuffer S für die löslichen scFv: 20 mM Imidazol in 1 x PBS, pH 7,5

Alle oben erwähnten Medien, Puffer und Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert (20 min./121°C/1 bar). Thermolabile Komponenten wurden durch einen 0,2 bzw. 0,45 µm Filter sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf 50°C zugegeben. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde, wenn nicht anders vermerkt, 1M HCl oder 1M NaOH verwendet.

2.1.8 Enzyme und Reaktionskits

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Enzyme und Reaktionskits verwendet:

Enzyme:

- Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Roche, Mannheim)
- Deoxyribonuclease I, Amplification Grade; 1 U/ µl (Gibco BRL, Eggenstein)
- Lysozym (USB Corporation, USA)
- *Nde* I ; 10 U/µl (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- *Not* I , 10 U/µl (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- *Sfi* I ; 10 U/µl (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- *Xho* I ; 10 U/µl (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Platinum *Pfx* DNA Polymerase; 2,5 U/µl (Invitrogen, Karlsruhe)
- Platinum *Taq*PCRx DNA Polymerase; 5 U/µl (Invitrogen, Karlsruhe)
- RNase A (Sigma-Aldrich, Seelze)
- SUPERScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase; 200 U/µl (Gibco BRL, Eggenstein)
- T4 DNA Ligase (USB Corporation, USA)
- *Taq* DNA Polymerase; 5 U/µl (Invitrogen, Karlsruhe)

Alle verwendeten Enzyme wurden mit den entsprechenden Puffern, gegebenenfalls anderen benötigten Zusätzen, geliefert und nach Herstellerangaben eingesetzt.

Reaktionskits:

- ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim)
- Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München)

-
- Bio Safe Coomassie-Stain (Bio-Rad, München)
 - BrdU Kit (Roche, Mannheim)
 - ECL Western blotting detection reagents and analysis system (Amersham Biosciences, Freiburg)
 - Expression Module/ Recombinant Phage Antibody System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
 - E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II (PeqLab, Erlangen)
 - ImmunoPure (L) Immunoglobulin Purification Kit (Pierce, Bonn)
 - Mouse ScFv Module/ Recombinant Phage Antibody System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
 - Oligotex mRNA Kit (Qiagen, Hilden)
 - pBAD/TOPO ThioFusion Expression System (Invitrogen, Karlsruhe)
 - peqGOLD RNAPure™ (PeqLab, Erlangen)
 - QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden)
 - QIAprep Spin M13 Kit (Qiagen, Hilden)
 - QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
 - QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden)
 - QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
 - Rapid DNA Ligation Kit (Roche, Mannheim)
 - Re-Blot Plus Strang Stripping Solution (Chemicon International, Hofheim)
 - RPAS Purification Module (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
 - TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.9 Antikörper und enzymkonjugierte Nachweisantikörper

Tabellarische Zusammenstellung der verwendeten primären Antikörper:

BEZEICHNUNG DES ANTI-KÖRPERS	WIRT	SPEZIFITÄT	VERWENDETE VERDÜNNUNG	HERSTELLER
1. α sm Actin	Maus	glatte Muskelzellen von verschiedenen Spezies	1:100 (IF)	Dianova
2. CD 31 (PECAM 1)	Hamster	Maus CD 31	1:100 (IH)	Endogen
3. CD 31 (PECAM 1)	Maus	Ratten-CD 31	1:100 (IH)	Serotec
4. CTA-157 (Hybridoma -Überstand)	Maus	kollateralspezifisch	1:5 (IH) 1:3 (IH-Zellen) 1:50; 1:100 (IF)	Laboreigener Antikörper
5. CTA-157 aufgereinigtes Extrakt 0,05 mg/ml	Maus	kollateralspezifisch	Pur auf humanen Gewebeschnitten. 1:2; 1:5 (IH-Ratte)	Laboreigener Antikörper
6. Anti E-tag	Maus	C-terminales E-tag- Peptid von rekombinanten scFv	1:200 (IH)	Amersham Pharmacia Biotech
7. Anti E-tag Hrp	Maus	C-terminales E-tag- Peptid von rekombinanten scFv	1:1000 (WB)	Amersham Pharmacia Biotech

8. Anti-His (C-terminal) -Hrp	Maus	C-terminale Poly- histidin-(6 x His) Aminosäuresequenz	1:1000 (WB)	Invitrogen
9. Ki-67	Kaninchen	Human-Ki-67	1:50; 1:100 (IH)	Santa Cruz
10. Anti- M13	Maus	M13-Phagen	1:50 (IH-Human) 1:300 (IH-Ratte) 1:200 (IH-Zellen) 1:300 (IF)	Amersham Pharmacia Biotech
11. PCNA	Maus	Maus-, Ratten-, Human-, Insekten- PCNA vom p36 Protein	1:100 (IH)	Santa Cruz

Tabellarische Zusammenstellung der verwendeten sekundären bzw. tertiären Antikörper:

BEZEICHNUNG DES ANTI-KÖRPERS	WIRT	SPEZIFITÄT	VERWENDETE VERDÜNNUNG	HERSTELLER
1. DAG-PO	Esel	Ziege	1:500 (IH)	Dianova
2. DAM-PO	Esel	Maus	1:300 (IH-Human)	Dianova
3. DAR-Bio	Esel	Kaninchen	1:100 (IH)	Dianova
4. DAR-PO	Esel	Kaninchen	1:300; 1:500 (IH)	Dianova
5. GAH-Bio	Ziege	Hamster	1:150 (IH)	Dianova
6. GAH-PO	Ziege	Hamster	1:100 (IH)	Dianova

7. GAM-Bio	Ziege	Maus	1:200 (IH) 1:100 (IH-Zellen)	Dianova
8. GAM-Cy ₂	Ziege	Maus	1:200 (IF) 1:100 (IF)	Dianova
9. GAM-PO	Ziege	Maus	1:500 (IH) 1:5000 (WB)	Dianova
10. Anti-Hamster Bio		Hamster	1:150 (IH)	Vector
11. Streptavidin - FITC	-----	-----	1:100 (IF)	Dianova
12. Streptavidin - Peroxidase	-----	-----	1:100 (IH-Zellen) 1:500 (IH)	Dianova
13. Streptavidin - Rhodamin	-----	-----	1:100 (IF)	Dianova

IH: Immunhistochemie; IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot

2.1.10 Laborgeräte, Apparaturen und sonstiges Zubehör

- Analysewaagen:
 - Sartorius Analytic A 200 S (Sartorius GmbH, Göttingen)
 - Kern 572 (Gottl. Kern & Sohn GmbH, Albstadt)
- Autoklav:
 - Tuttnauer Systec 2540 ELV (Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg)
- Brutschränke:
 - B 5060 EK/CO₂ Begasungsbrutschrank (Heraeus Instruments, Hanau)
 - Sanyo CO₂ Inkubator, MCO – 17 AIC (Sanyo Electric Co., Ltd., Japan)
- DNA-Sequenzierer und Zubehör:
 - Abi Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Elektroblotting-Apparaturen und Zubehör:
 - Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Power Pack 300 (Bio-Rad, München)
- Folienschweissgerät:
 - Polystar-Tischschweissgerät 243 (Rische + Herfurth GmbH, Hamburg)
- Fotodokumentationssystem:
 - Photo-Print Video-Geldokumentationssystem Modell P 115-SD Vilber Lourmat (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

- Gelelektrophorese-Apparaturen und Zubehör:
 - Agagel Mini und Maxi, Standard Power Pack (Biometra, Göttingen)
- Kryostat:
 - 2800 Frigocut N (Reichert-Jung, Cambridge Instruments GmbH, Nussloch)
- Kühltruhen:
 - Liebherr Premium; +4°C, -20°C (Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen)
 - Kryotec; -80°C (Hans-S. Schröder GmbH, Hamburg)
- Magnetrührer mit Heizplatte:
 - IKA RH basic (IKA Labor Technik, Staufen)
- Mikroskope:
 - Fluoreszenzmikroskop – Axiovert 100, (Zeiss, Jena)
 - Olympus BH2 (OM System, Japan)
 - Binokular – Olympus CK 2 (OM System, Japan)
- Mikrotom:
 - RM 2125 RT (Leica, Bensheim)
- Mikrowelle:
 - Gourmet 2210 (Bosch, Dizingen)
- PCR-Thermocycler:
 - Tpersonal-Profi-Cycler (Biometra, Göttingen)
- Peristaltische Pumpe:
 - Peristaltische Pumpe P1 (Amersham Bioscience, Freiburg)
- pH-Meter:
 - Mikroprozessor pH-Meter, pH 537, (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Wilhelm)
- Photometer:
 - Smart Spec 3000 Spectrophotometer (Bio-Rad, München)
- Polytron:
 - PCU Kinematika (Luzern, Schweiz)
- Proteingel-Apparaturen und Zubehör:
 - Mini- Protean 3 Cell (Bio-Rad, München)
- Rotator:
 - RF-60-Rotator (Rudolph Franke Labor Technik, Hamburg)
- Saugpumpe mit Zubehör:
 - Vacuubrand BVC 21 (Vacuubrand GmbH + Co., Wertheim)

- Scanner:
 - Epson Stylus Perfection 1240 U (Epson, Düsseldorf)
- Schüttler:
 - KS-15 Edmund Bühler (Johanna Otto GmbH, Hechingen)
 - Coulter Mixer (Coulter Electronics Limited)
 - Heidolph Polymax 2040 (Heidolph Elektro GmbH & Co KG, Kelheim)
 - Mini Rocker MR-1 Mini Wippschüttler (Rudolph Franke Labortechnik, Hamburg)
- Sterilbänke:
 - Hera safe (Heraeus Instruments, Hanau)
 - Holten Lamin Air HVR 2448 (Heraeus Instruments, Hanau)
- Thermomixer:
 - Thermomixer Comfort Eppendorf (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)
- Trockenschrank:
 - Function line (Heraeus Instruments, Hanau)
- Vortexer:
 - IKA-Werk VF2 (IKA Labortechnik, Staufen)
 - Genie 2 Vortex (Scientific Industries, Bohemia, USA)
- Wasserbad:
 - GFL 1083 (Burgwedel)
- Wasserdeionierungsanlage:
 - SG Reinstwasser-System clear (SG Wasseraufbereitung, Barsbüttel)
- Zentrifugen:
 - Eppendor fzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)
 - Rotina 35 R (Hettich, Tuttlingen); Rotore: 1714 (Max. 15.000 rpm), 1724 (Max. 5.000 rpm)
 - Beckman J2-HC Centrifuge (Beckman Instruments GmbH, München); Rotore: JA-20 (Max. 20.000 rpm), JA-14 (Max. 14.000 rpm), JS-4.3 (Max. 4.300 rpm)
 - Biofuge pico, Heraeus 3325 B (Kendro Laboratory Products, Osterode); Rotor: Max. 1.300 rpm
 - Function Line Laborfuge 400 R (Heraeus Instruments, Hanau); Rotor: Max. 5.000 rpm

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung von Hybridomazellen

Die Kultivierung von Hybridomazellen erfolgte in Dulbecco's MEM Medium unter Zugabe von 10% FCS (v/v), 0,2% Penicillin/Streptomycin (v/v) und 30 mM HEPES Puffer im CO₂ Inkubator (5% CO₂) bei 37°C. Die Anzahl der pro Zellkulturflasche (80 cm²) ausgesäten Zellen betrug in der Regel zwischen 4×10^5 und 1×10^6 auf 30 ml Medium. Zur Gewährleistung einer effizienten Vermehrungsrate wurde das Kulturmedium im Rhythmus von 2 Tagen erneuert. Nach dem Erreichen eines Konfluenzstadiums wurden die Hybridomazellen durch „Abschlagen“ von der Oberfläche der Kulturflasche im Medium suspendiert. Jeweils ein Fünftel der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und zur weiteren Kultivierung mit frischem Medium versorgt.

Zur RNA-Isolierung (siehe 2.3.1.1) wurden die Hybridomazellen (jeweils ca. 5×10^6 Zellen) zunächst für 10 min in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 1.500 rpm (400 x g) pelletiert. Nach dem Entfernen der Kulturüberstände wurden die Sedimente im sterilen 0,9%-igen NaCl aufgenommen (4 ml) und zweimal gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurden die Hybridomazellen in Kryoröhrchen (1,5 ml) überführt, mit 1 ml 0,9%-igen NaCl versetzt und 5 min bei 1.500 rpm und 4°C sedimentiert. Anschließend wurden die Überstände dekantiert und die Zellpellets entweder direkt für die RNA-Isolierung eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und über längere Zeit bei -80°C gelagert.

Für die Gewinnung von CTA (siehe 2.1.9) wurden die Zellüberstände der Hybridomakulturen verwendet. Zu diesem Zweck wurden mehrere Zellsuspensionen in einem Becherglas vereinigt, mit einem gehäuften Esslöffel von Hyflo Super Cel (Fluka) versetzt und durch einen 0,22 µm Filter mit Membranfiltereinsatz sterilfiltriert. Die auf diese Weise erhaltenen, zellfreien Überstände wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.2 Kultivierung von RHE-A/neg.- und PAE-KDR-11- Endothelzelllinien

Die Anzucht von RHE-A/neg.-Endothelzellen erfolgte in Dulbecco's Medium mit Glutamat unter Zugabe von 10% FCS (v/v) und 0,2% Penicillin/Streptomycin im CO₂ Inkubator (5% CO₂) bei 37°C. Für die Kultivierung von PAE-KDR-11-Zelllinien (ebenfalls bei 37°C und 5% CO₂) wurde ein glutaminreiches Ham's F12 Medium mit 10% FCS (v/v) und 0,2% Penicillin/Streptomycin (v/v) verwendet. Zur Vorbeugung einer bakteriellen sowie pilzlichen Kontamination der Zellen wurde dem Medium alle 3 Wochen 300 µg/ml G418 (Geneticin) zugesetzt. Beide Zelllinien wurden mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Zellkulturflasche ausgesät und alle 2 bis 3 Tage in Verhältnissen von 1:4 bis 1:6 gesplittet.

Die RHE-A/neg.- und die PAE-KDR-11-Endothelzellen zeichnen sich durch eine hohe Adhärenz aus und wurden nach dem Erreichen der Subkonfluenz vom Boden der Zellkulturflasche durch ein enzymatisches Verfahren abgelöst. Zu diesem Zweck wurde zunächst das Kulturmedium samt allen nicht adhären (toten) Zellen mittels einer Vakuumsaugpumpe entfernt. Die Zellen wurden in 10-15 ml PBS gewaschen, mit 4-8 ml Trypsin-Lösung (0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA*4Na) überschichtet und für 2 min bei 37°C inkubiert. Das hierfür verwendete Enzym Trypsin ist eine Protease, die eine Spaltung von Peptidbindungen auf der Carboxylseite von Lysin- und Argininresten verursacht und dadurch eine Ablösung der Zellen sowohl vom Flaschenboden als auch voneinander hervorruft. Zur Komplexierung der im Restmedium enthaltenen Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen, die die Wirkung von Trypsin stark beeinträchtigen können, diente EDTA, welches als eine Komponente der Trypsinlösung vorhanden ist.

Die Trypsinierung wurde anschließend durch die Zugabe von frischem Zellkulturmedium mit 10% FCS abgestoppt. Dazu wurden die Zellen zunächst vom Flaschenboden abgeklopft, lichtmikroskopisch verifiziert und dann mit 4-8 ml Medium versetzt. Weiterhin wurden die Zellen in saubere Reagenzröhrchen überführt und für 3 min bei 4°C und 1.000 rpm (170 x g) pelletiert. Die Kulturüberstände wurden vorsichtig abgesaugt und die Pellets zuerst in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert und später mit 10-15 ml frischem Kulturmedium versetzt. Nach der Ermittlung der Lebendzellzahl (siehe 2.2.3) wurden die Zellen entweder zur weiteren Kultivierung auf mehrere Kulturflaschen verteilt oder zur Langzeitlagerung entsprechend präpariert (siehe 2.2.4) und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mittels einer Zählkammer nach Neubauer. Zur optischen Unterscheidung zwischen den lebenden und toten Zellen wurde eine Anfärbung der Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung (Verdünnung 1:10 mit PBS) vorgenommen. Dazu wurde 100 µl der Zellkultur mit 100 µl Trypanblau in einer Mikrotiterplatte gemischt und ein Tropfen der Suspension in die Zählkammer pipettiert. Da Trypanblau tote Zellen dunkelblau anfärbt, konnte somit der Titer der lebenden, transparenten Zellen problemlos ermittelt werden. Zur prozentuellen Bestimmung des Zelltiters wurden jeweils vier Großquadrate ausgezählt. Um auf die Bezugsgröße von 1 ml (1 cm^3) gelangen zu können wurde die erhaltene Zellzahl mit dem Kammerfaktor 1×10^4 sowie dem entsprechenden Verdünnungs-

faktor (1:2) multipliziert. Auf diese Weise ergab sich die Formel: $(Z/4) \times 2 \times 10^4$, mit welcher die Anzahl der lebenden Zellen (Z) pro 1 ml der Zellsuspension festgelegt werden konnte.

2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden in Kryoröhrchen ca. 2×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (Gibco BRL) aufgenommen und in einen Behälter mit Isopropanol überführt, der ein langsames Absinken der Temperatur gewährleistet. Dieser Behälter wurde einen Tag bei -80°C aufbewahrt. Nach dem verzögerten Einfrieren bei -80°C wurden die Zellen in Kryoröhrchen in einen Flüssigstickstoffbehälter überführt und dort bis zum weiteren Einsatz bei -196°C (Flüssigphase vom Stickstoff) oder bei -155°C (Gasphase vom flüssigen Stickstoff) gelagert.

Das im Einfriermedium enthaltene Gefrierschutzmittel DMSO gewährleistet zwar einen effektiven Schutz vor Bildung der Eiskristalle während der Gefrierphase, musste jedoch aufgrund seiner hohen Zelltoxizität unmittelbar nach dem Auftauen der Zellen durch Waschen entfernt werden. Das Auftauen von Zellen erfolgte durch langsames Schwenken der Kryoröhrchen in einem auf 37°C vortemperierten Wasserbad. Unmittelbar nach der Verflüssigung wurden die Zellen in 10 ml warmes Kulturmedium überführt und 3 min bei 1.000 rpm (170 x g) und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und auf zwei Zellkulturflaschen verteilt. Zur Rekultivierung wurden die Kulturflaschen mit jeweils 7,5-12,5 ml Medium aufgefüllt und wie bereits in 2.2.2 beschrieben inkubiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Methoden zur RNA-Aufarbeitung

Das Arbeiten mit RNA erfordert sterile Bedingungen, da schon eine geringe RNase-Kontamination zu einer schnellen Degradation dieser Nukleinsäure führen kann. RNasen sind sehr stabil, benötigen keine Cofaktoren für ihre Aktivität und können durch Autoklavieren nicht vollständig inaktiviert werden. Um Verunreinigungen mit RNasen zu vermeiden, wurden während der Experimente Handschuhe getragen und ausschließlich RNase-freie Lösungen und Geräte verwendet. Vorhandene RNasen wurden durch die Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) inaktiviert. Dazu wurden die Lösungen mit 0,2% DEPC versetzt, kräftig geschüttelt und für 12 h bei 37°C inkubiert. Das überschüssige DEPC wurde

anschließend durch Autoklavieren entfernt. Glasgefäße wurden mit DEPC-haltigem H₂O ausgeschüttelt, autoklaviert und mehrere Stunden bei 180°C getrocknet.

DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikationen vor allem des Histidinrestes im aktiven Zentrum. Ein Überschuss von DEPC führt zu RNA-Modifikationen wie z.B. Carbethoxylierung der Adenine oder Guanine. Beim Erhitzen und Autoklavieren zerfällt das DEPC in Ethanol und Kohlendioxid und wird auf diese Weise aus den Lösungen entfernt. Zur Inaktivierung geringer RNase-Mengen, z.B. bei einem DNase-Verdau oder der cDNA-Synthese, wurde der RNase-Inhibitor verwendet. Dieses saure Protein verhindert die RNase-Aktivität indem es mit dem Enzym einen nichtkovalenten Komplex bildet.

2.3.1.1 Isolierung von RNA aus Hybridomazellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Hybridomazellen erfolgte nach dem peqGOLD RNA PureTM Protokoll der Firma PeqLab. Die Methode basiert auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation. Das verwendete Reagenz (peqGOLD RNA PureTM) enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung. Nach der Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf, wobei sich die RNA in der wässrigen Phase befindet.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden ca. 5×10^6 Zellen/ml eingesetzt. Die tiefgefrorenen bzw. frisch geernteten Hybridomazellen wurden zunächst mit 1 ml des oben erwähnten Reagenzes versetzt und mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators (Polytron) aufgeschlossen. Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten, wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform. Die Reaktionsgefäße wurden 15 sec kräftig geschüttelt und anschließend 3 min bei RT stehengelassen. Eine darauffolgende Zentrifugation für 15 min bei $12.000 \times g$ und 4°C führte zur Trennung der Proben in drei Phasen. Während die obere, farblose, wässrige Phase zum größten Teil RNA enthielt, waren die untere, gelbe Phenol-Chloroform-Phase und die dazwischenliegende Interphase überwiegend mit DNA und Proteinen angereichert. Nachdem die wässrige Phase in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt wurde, konnte die Fällung der RNA mit Isopropanol durchgeführt werden. Dazu wurden die Proben mit 0,5 ml Isopropanol versetzt, leicht geschwenkt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei $12.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Isopropanolüberstand wurde entfernt, das Sediment in 0,5 ml 4 M LiCl resuspendiert und dann 10 min bei $3.000 \times g$ und 4°C gefällt. Die LiCl-Fällung diente der Beseitigung von restlichen DNA-Verunreinigungen, die bei dieser Reaktion an das Salz binden und somit gut ausgewaschen werden können. Die

Überstände wurden mit einer Gilson-Pipette abgenommen, das RNA-Präzipitat zweimal mit 1 ml 70% Ethanol versetzt und durch Vortexen und anschließendes Zentrifugieren (10 min, 12.000 x g, 4°C) gewaschen. Das gewaschene RNA-Pellet wurde dann 5 min an der Luft getrocknet und in RNase-freiem Wasser gelöst. Durch Erhitzen der RNA-Probe in einem Inkubations-Thermoblock auf 55-60°C wurde ihre Lösbarkeit verbessert. Weiterhin wurde die wässrige Nukleinsäurelösung mit 1 µl RNase-Inhibitor versetzt und für die späteren Analysen bei -80°C gelagert.

2.3.1.2 Reinigung und Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur weiteren Reinigung und Aufkonzentrierung von RNA wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. In Gegenwart monovalenter Kationen bildet die RNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugieren isoliert werden kann. Für die Fällung wurde ein definiertes Volumen der untersuchten RNA-Probe zunächst durch die Zugabe von 1 M NaCl-Lösung auf eine Salzkonzentration von 0,1 M NaCl eingestellt und mit zwei Volumen eiskaltem 96%-igen Ethanol versetzt. Der Reaktionsansatz wurde kräftig gevortext und über Nacht bei -20°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Probe 15 min bei 15.000 rpm (23.640 x g) und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die RNA durch zweimaliges Überschichten mit gekühltem, 70%-igem Ethanol gewaschen (10 min, 15.000 rpm, 4°C). Da das mitgefällte NaCl in 70%-igem Ethanol gut löslich ist, konnte es auf diese Weise aus dem RNA-Sediment größtenteils entfernt werden. Anschließend wurde das RNA-Pellet kurz getrocknet und in DEPC-H₂O gelöst.

Die Konzentration der RNA wurde durch photometrische Messung bei Wellenlängen von 260 und 280 nm ermittelt. Zu diesem Zweck wurden Quarzküvetten verwendet, da diese das UV-Licht nicht absorbieren. Eine Lösung, die 33 µg/ml RNA enthält, besitzt einen Absorptionswert von 1 (Optische Dichte = OD). Diese OD-Einheit dient zur Bestimmung der Konzentration der unbekanntenen Proben. Das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren liegt bei 260 und das der Proteine bei 280 nm. Durch die Bestimmung des Verhältnisses beider Absorptionen zueinander lässt sich die Reinheit der analysierten RNA-Lösung abschätzen. Eine saubere RNA-Probe besitzt einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert von 2,0. Im Fall einer Kontamination mit Proteinen oder Phenolresten ist der Wert signifikant kleiner. Für die Konzentrationsmessung wurde jeweils 1 µl Nukleinsäurelösung im Verhältnis 1:100 in RNase-freiem H₂O verdünnt und wie oben beschrieben photometriert. Als Nullkontrolle diente DEPC-H₂O. Die Messungen sind jeweils zweimal wiederholt worden.

2.3.1.3 Qualitätsnachweis der RNA mittels Gelelektrophorese

Zur Untersuchung der RNA-Qualität wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung der analysierten Proben vorgenommen. RNA bildet durch intra- und intermolekulare Basenpaarung Sekundärstrukturen und Aggregate aus, deren Laufverhalten im Gel sehr unterschiedlich ist. Um reproduzierbare RNA-Analysen zu erzielen, wurde ein denaturierendes Gel angefertigt, da hier die verschiedenen Wasserstoffbrückenbindungen aufgehoben werden. Als Denaturierungsmittel diente Formaldehyd. Die denaturierende Wirkung von Formaldehyd beruht darauf, dass die Aldehydgruppe mit den Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin Schiffsche Basen bildet. Die Aminogruppen dieser Basen können somit keine Wasserstoffbrückenbindungen mehr eingehen, wodurch die Entstehung von Sekundärstrukturen und Aggregaten verhindert wird.

Die Herstellung eines Formaldehydgels erfolgte unter RNase-freien Bedingungen. Für die Präparation eines kleinen Gels (50 ml) wurde zuerst 0,5 g Agarose in 36 ml H₂O in einer Mikrowelle aufgekocht und anschließend auf 60-65°C abgekühlt. Dazu wurden 5 ml 10 x MOPS-Puffer und 9 ml 37%-igen Formaldehyd gegeben (Zusammensetzung siehe 2.1.7), vorsichtig gemischt und in eine Horizontalelektrophorese-Kammer gegossen. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS-Puffer. Vor dem Auftrag in die Geltaschen wurden die RNA-Proben mit 25 µl Ladepuffer versetzt (siehe 2.1.7) und 15 min bei 60°C denaturiert. Das im Ladepuffer vorhandene Formamid zerstört die Basenpaarung der RNA und ermöglicht dadurch eine Reaktion der Basen mit Formaldehyd. Um die ungelösten Komponenten zu beseitigen, wurden die RNA-Proben für 2 min abzentrifugiert und bis zur Gelbeladung auf Eis gelagert. Die Elektrophorese erfolgte für 2-4 h bei einer Spannung von 50-70 V unter ständigem Rühren des Laufpuffers. Nach der Auftrennung wurde die RNA im Ethidiumbromidbad (5 µg/ml) spezifisch angefärbt, auf einem UV-Tisch beleuchtet und anschließend fotografiert. Bei einer gut durchgeführten RNA-Präparation sollten die 28S- und 18S-rRNA-Moleküle in zwei scharfen, definierten Banden laufen und möglichst keine Degradation aufweisen.

2.3.1.4 DNase-Verdau

Mit Hilfe eines DNase-Verdau wurden die untersuchten RNA-Proben von eventuellen DNA-Kontaminationen befreit. Das eingesetzte Enzym (DNase I, siehe 2.1.8) hat eine Endonuklease-Aktivität und baut sowohl doppel- als auch einzelsträngige DNA durch hydrolytische Spaltung innerer Phosphodiester-Bindungen ab. In Gegenwart von Magnesium-Salzen wird jeder DNA-Strang an verteilten Stellen gespalten, wodurch ein Gemisch aus Mononucleotiden und Oligonucleotiden mit Phosphat-Resten an den 5'-Enden entsteht.

Für die Reaktion wurde zunächst 1 µg RNA mit 1 µl 10 x DNase-Puffer (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 20 mM MgCl₂; 500 mM KCl), 1 µl DNase I und 1 µl RNase-Inhibitor in einem Eppendorf-Gefäß zusammengemischt. Der Ansatz wurde dann mit RNase-freiem H₂O auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht und 15 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und 10-minütige Denaturierung der Proben bei 65°C wurde die DNase inaktiviert. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt und für die Synthese der cDNA verwendet.

2.3.1.5 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird die RNA in die komplementäre DNA umgeschrieben (Reverse Transkription). Als Schlüssel zur Erzeugung von cDNA fungiert die Reverse Transkriptase. Dieses Enzym verwendet mRNA als Matrize für die Herstellung eines DNA-Stranges. Die Reaktion verläuft in Anwesenheit von Oligo (dT) Startermolekülen (Primern). Diese Primer bestehen aus zwölf bis zwanzig Desoxythymidinbausteinen, besitzen eine freie 3'-OH-Gruppe und sind somit in der Lage, mit den Poly (A)-Sequenzen der mRNA-Moleküle zu hybridisieren. Die Fortsetzung der cDNA-Strang-Synthese erfolgt mit Hilfe von vier Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTPs), die in der verwendeten Reaktionsmischung vorhanden sind. Die auf diese Weise entstandene DNA wird weiterhin als Matrize von der Taq Polymerase verwendet und in Gegenwart von spezifischen oder degenerierten Primern amplifiziert.

Die Synthese von cDNA erfolgte nach einem Protokoll der Firma Gibco BRL. Dazu wurden zunächst 11 µl der DNase verdauten RNA (ca. 500 ng -1 µg) mit 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈-Primer (500 µg/ml) versetzt, für 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt. Nach der, während der Abkühlung erfolgten, Primer-Bindung (Primer-Annealing) konnte den Reaktionslösungen die folgende Mischung hinzugefügt werden:

- 4 µl 5 x Erststrang-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂)
- 2 µl 0,1 M DTT (Dithiotreitol)
- 1 µl 10 mM dNTPs
- 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl)

Daran schloss sich eine 2-minütige Inkubation der Proben bei 42°C an. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl SUPERSCRIPT™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (200 U/µl). Die Ansätze wurden vorsichtig mit einer Gilson-Pipette gemischt und für 50 min bei 42°C erneut inkubiert. Die Reaktion endete mit einer weiteren Denaturierung der Proben für 15 min bei 70°C und anschließender Abkühlung auf Eis.

Zur Vorbeugung eventueller Kontaminationen der RNA-Proben mit DNA, wurde bei jeder cDNA-Synthese eine Negativkontrolle mitgeführt. Dabei handelte es sich um einen Reaktionsansatz, bei dem die RNA durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt wurde. Die gesamte cDNA-Synthese wurde in einem zyklischen Thermoblock der Firma Biometra durchgeführt. Die auf diese Weise hergestellte cDNA wurde im weiteren Verlauf der Experimente für die Generierung von V_L- und V_H- Antikörperketten (siehe 3.1.2) eingesetzt.

2.3.2 Anzucht und Transformation von *Escherichia coli* -Stämmen

2.3.2.1 Anzucht von *Escherichia coli* und Herstellung von Stammkulturen

Die Anzucht von *E. coli* -Stämmen erfolgte in der Regel in 10 ml LB- oder 2 x YT-Flüssigmedium. Dazu wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, im Kulturmedium resuspendiert und über Nacht (üN) bei 37°C unter ständigem Schütteln (250 rpm) inkubiert. Alternativ wurde das Nährmedium mit 10 µl Bakteriensuspension aus einer Glycerinstammkultur inokuliert und wie oben beschrieben angezogen. Das Wachstum von einigen *E. coli*-Stämmen (z.B. TG1 oder HB2151) wurde zusätzlich auf Minimalnährboden (Minimalagar) getestet. Rekombinante Bakterienstämme mit Selektionsplasmiden wurden zunächst in Medien mit Antibiotika-Zusätzen (z.B. Ampicillin oder Kanamycin) kultiviert, zur weiteren Selektion auf LB- bzw. SOBAG-Agarplatten (1,5% Agar, w/v) mit entsprechenden Antibiotika (siehe 2.1.7) ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C üN inkubiert. Zur kurzzeitigen Lagerung von Bakterienklonen (bis zu 2 Wochen) wurden ebenfalls die oben erwähnten Agarplatten präpariert und nach ausreichendem Bakterienwachstum im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt. *E. coli* -Stammkulturen wurden durch Mischen von 800 µl einer stationären üN-Kultur mit 200 µl sterilem, 80%-igen Glycerol hergestellt und bei -80°C gelagert.

2.3.2.2 Herstellung Hitzeschock-kompetenter *Escherichia coli* -Zellen

E. coli -Bakterien sind unter bestimmten Wachstumsbedingungen in der Lage freie DNA, wie z.B. Plasmid-DNA, aus einem sie umgebenden Kulturmedium aufzunehmen. Diese Fähigkeit wird als Kompetenz bezeichnet und kann mittels diverser Techniken (z.B. Calciumchlorid-, Rubidiumchlorid- oder TSS-Methode) induziert werden. Für die Herstellung von kompetenten Zellen wurde in dieser Arbeit der *E. coli*-Stamm TG1 verwendet. Dazu wurden die Bakterien zunächst vom Glycerolstock mit einer sterilen Impföse auf eine Minimalagarplatte übertragen und im Brutschrank bei 37°C üN inkubiert.

Am folgenden Tag wurde eine gut ausgewachsene Einzelkolonie gepickt und in 10 ml 2 x YT-Medium unter ständigem Schütteln (250 rpm) bei 37°C üN kultiviert. 1 ml der üN-Bakterienkultur diente weiterhin zur Inokulation von 100 ml 2 x YT-Flüssigmediumkultur, die bis zu einer OD_{600 nm} von 0,4-0,5 auf einem Schüttler (250 rpm, 37°C) herangezogen wurde. Anschließend wurden die Bakterien 15 min bei 4°C und 2.500 x g sedimentiert, das Pellet in eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert und bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt (maximal 2-3 h).

2.3.2.3 Hitzeschock-Transformation von *Escherichia coli* -Stämmen

Für die Übertragung von Plasmid-DNA wurden je nach Aufgabenstellung diverse *E. coli*-Stämme verwendet und in Abhängigkeit vom eingesetzten Bakterienstamm unterschiedliche Transformationsprotokolle durchgeführt.

Zur Hitzeschock-Transformation von TG1-Bakterien wurde 1 ml der kompetenten *E. coli* -Zellen in vorgekühlte Falconröhrchen überführt, mit 50 µl Ligationsansatz (insgesamt 400 ng DNA) bzw. 1 ng Kontrollvektor vorsichtig gemischt und 45 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation erfolgte die Anlagerung der Plasmid-DNA an die Bakterienwand. Nach einem darauf folgenden, kurzen Hitzeschock (2 min bei 42°C) und der daraus resultierenden Transformation wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt. Zur Ausprägung des plasmidvermittelten Phänotyps wurde 100 µl des Transformationsansatzes mit 900 µl LBG-Medium versetzt und in einem Thermoschüttler (250 rpm) 1 h bei 37°C kultiviert. Anschließend erfolgte die Ausplattierung von 50-200 µl der transformierten Bakterien auf SOBAG - Selektionsagarplatten und eine üN-Inkubation im Brutschrank bei 30°C.

Die von Invitrogen bezogenen und hauptsächlich für die Subklonierung von scFv-Fragmenten verwendeten chemisch-kompetenten DH5α sowie TOP10 *E. coli*-Stämme wurden nach dem Hersteller-Protokoll transformiert. Dazu wurden jeweils 50 µl kompetenter Zellen mit 2 µl Klonierungsansatz (siehe 2.3.7) vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Transformationsansätze wurden weiterhin 30 sec bei 42°C inkubiert und unmittelbar danach auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37°C und 250 rpm regeneriert und anschließend auf LB-Agarplatten mit Antibiotikazusätzen üN bei 37°C herangezogen. Bei Anwesenheit eines lacZ-Gens in der Klonierungsstelle des ausgewählten Vektors wurden die Agarplatten zusätzlich mit IPTG und X-Gal beschichtet. Das lacZ-Gen kodiert für das N-terminale α-Fragment der β-Galactosidase und diente somit zur weiteren Selektion von Transformanden (blau-weiß Selektion). Bakterienkolonien, in denen das lacZ-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragmentes

unterbrochen wurde, blieben nach Inkubation mit X-Gal und IPTG weiß, während diejenigen Klone die keinen Insert enthielten, das α -Fragment exprimierten und sich somit blau gefärbt haben.

2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

2.3.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Analyse einer größeren Anzahl von Transformanden wurde eine Minipräparation von Plasmid-DNA nach dem E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit II-Protokoll der Firma PeqLab durchgeführt. Diese Methode kombiniert eine modifizierte alkalische Lyse von Bakterien mit den selektiven und reversiblen DNA-Bindungseigenschaften von HiBind[®]-Silikamembranen.

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden einzelne Bakterienkolonien in 10-25 ml LB-Amp.-Medium üN bei 37°C angezogen (bis zu 16 h) und am folgenden Tag für 10 min bei 5.000 x g pelletiert. Durch Zugabe zweier Lösungen (Lösung I und II) wurde die bakterielle Zellmembran lysiert und die enthaltene RNA mittels RNase A hydrolysiert. Das alkalische Lysat wurde zur Neutralisation mit Lösung III versetzt, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und das entstandene Präzipitat 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Chromosomale DNA, welche an den Zellwänden gehaftet hat, sowie sämtliche Zellbruchstücke, die im Lysat vorhanden waren, wurden hierbei sedimentiert und anschließend entfernt. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde auf eine HiBind[®]-Miniprep-Säule geladen und durch kurzes Abzentrifugieren (1 min bei 10.000 x g) an die Silikamembran gebunden. Nach mehrmaligen Waschschritten wurde die DNA von Proteinkontaminationen sowie Enzyminhibitoren befreit und anschließend durch ein einminütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 x g) vollständig getrocknet. Zur Elution der an die Matrix gebundenen Plasmid-DNA wurde 50-100 µl TE-Puffer bzw. steriles H₂O in die Mitte der Säule pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und anschließend 1 min bei 10.000 x g abzentrifugiert. Die Ausbeute, der auf diese Weise eluierten Plasmid-DNA, wurde photometrisch oder mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt (siehe 2.3.5). Zur genaueren Untersuchung der rekombinanten DNA-Proben wurden Kontrollrestriktionen, PCR-Analysen sowie gelelektrophoretische Auftrennungen durchgeführt.

2.3.3.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA (z.B. für Klonierungen oder Sequenzierungen) wurde das Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Die DNA-Präparation erfolgte hierbei aus 100 ml (für High Copy Plasmide) bzw. 500 ml (für Low Copy Plasmide) Bakterienhauptkultur. Für die Herstellung der Hauptkultur wurde eine 5 ml LB-Vorkultur (mit Antibiotika-Zusatz) mit einer Einzelkolonie von der LB-Selektionsplatte angeimpft und unter ständigem Schütteln bis zu 8 h bei 37°C angezogen. Mit 100-500 µl Vorkultur wurde anschließend die selektive LB-Hauptkultur inokuliert und üN bei 37°C und 250 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch 15-minütige Zentrifugation bei 6.000 x g und 4°C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml P1 Puffer vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml P2 Puffer wurde der Ansatz durch Invertieren vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde mit 10 ml eiskaltem P3 Puffer versetzt, erneut vorsichtig gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung von genomischer DNA, Proteinen sowie Zelltrümmern wurde der Ansatz für 30 min bei 4°C und 20.000 x g pelletiert. In der Zwischenzeit wurde eine Qiagen-tip 500 Säule mit 10 ml QBT Puffer equilibriert. Daraufhin wurde der nach der Zentrifugation gewonnene, plasmidhaltige Überstand auf die Säule geladen. Der Durchfluß der Säule wurde verworfen und die an die Matrix gebundene DNA zweimal mit jeweils 30 ml QC Puffer gewaschen. Im Folgenden wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml QF Puffer von der Säule eluiert, mit 10,5 ml Isopropanol gefällt, mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und für 10 min unter einer Sterilbank getrocknet. Die auf diese Weise präparierte Plasmid-DNA wurde anschließend in TE bzw. H₂O gelöst und bis zum weiteren Einsatz bei -20°C gelagert.

2.3.4 Reinigung, Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Reinigung aller DNA-Proben von Proteinen sowie anderen Kontaminationen erfolgte mittels einer Phenol-Chloroform Extraktion. Zu diesem Zweck wurde eine DNA-haltige Lösung mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1; v/v/v) versetzt, kräftig ausgeschüttelt und zur Phasentrennung für 10 min bei 13.000 x g und RT zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die hierbei entstandenen zwei Phasen wurden durch erneute Zentrifugation (siehe oben) vollständig voneinander abgetrennt. Die obere, DNA-haltige Phase wurde wiederholt in ein neues Gefäß überführt und, zur Aufkonzentrierung sowie zur Entfernung von verbliebenen Chloroformresten, mit Alkohol gefällt.

Die Fällung der DNA wurde, je nach Menge der Nukleinsäure, mit Ethanol oder Isopropanol durchgeführt. Zur Anreicherung von DNA aus stark verdünnten Lösungen wurde in der Regel die Methode der Ethanolfällung gewählt. Dazu wurden die Ansätze mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,4) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol gemischt, 20 min bei RT inkubiert und anschließend 45 min bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde weiterhin mit einem Volumen 70%-igen Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (15 min bei 4°C und 13.000 x g). Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in einem für die weitere Verwendung adäquaten Volumen TE-Puffer bzw. H₂O aufgenommen. Zur Fällung von größeren DNA-Volumina wurde hauptsächlich Isopropanol verwendet. Dazu wurden die Proben mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend 30 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Sedimente wurden, wie bereits beschrieben, mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE Puffer bzw. H₂O gelöst.

Die daran anschließende Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte mittels spektralphotometrischer Messungen sowie analytischer Agarosegelelektrophoresen. Spektralphotometrisch wurde die Konzentration von Nukleinsäuren im UV-Bereich bei Wellenlängen von 260 und 280 nm bestimmt. Die OD_{260 nm} ist dabei ein Maß für die Konzentration an Nukleotiden, während die Absorptionsmessung bei 280 nm einen Aufschluss über die Verunreinigung der Proben mit Proteinen liefert. Beim Erreichen eines Quotienten $A_{260/280}$ von 1,8 für dsDNA bzw. 1,9 für ssDNA entspricht eine Absorptionsänderung von 1 bei $A_{260 nm}$ einer Konzentration von ca. 50 µg/ml für dsDNA und 33 µg/ml für ssDNA. Zur Ermittlung der DNA-Konzentration wurden die Proben im Verhältnis von 1:100 bzw. 1:50 mit H₂O verdünnt, in Quarzküvetten überführt und anschließend im Spektralphotometer (siehe 2.1.10) gemessen.

Bei der Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Auftrennung in Ethidiumbromidhaltigen, 1-1,5%-igen Agarosegelen wurde zunächst die Fluoreszenzintensität der Probenbanden mit den Banden eines DNA-Längenstandards bekannter Konzentration (siehe 2.1.5) verglichen und die Konzentration der DNA-Proben auf diese Weise abgeschätzt. Anschließend wurde die abgeschätzte DNA-Menge auf das eingesetzte Probenvolumen bezogen und die Konzentration der Nukleinsäure in µg/ml errechnet.

2.3.5 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Gelelektrophorese basiert darauf, dass Nukleinsäuren bei einem neutralen pH-Wert polyanionisch sind, das heißt an ihren Phosphatgruppen im Phosphodiesterückgrad viele negative Ladungen tragen. Deshalb wandern die Moleküle im elektrischen Feld auf die positive Elektrode (Anode) zu. Im Agarosegel ist die Geschwindigkeit der Migration von einer Reihe von Faktoren wie Agarose-Konzentration, Spannung, Ionenstärke, Molekulargewicht und Konformation der DNA abhängig. Kleine, kompakte Moleküle können die Matrix schneller passieren als große, sperrige.

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in der Regel unter Verwendung von 1,5%-igen TBE-Agarosegelen (w/v) in Horizontalelektrophoresekammern der Firma Biometra. Die analytische Agarosegelelektrophorese wurde, wie schon oben erwähnt, zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben sowie zur Überprüfung von Insert- und Vektorgrößen nach PCR-Reaktionen und DNA-Restriktionen durchgeführt. Dazu wurde die Agarose zunächst in 1 x TBE Puffer in einer Mikrowelle kurz aufgekocht und dann unter fließendem Wasser auf ca. 60°C abgekühlt. Anschließend wurde das Agarosegel in den dafür vorgesehenen Gelträger einer Elektrophoresekammer gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Agarosegel mit dem als Laufpuffer fungierenden 1 x TBE Puffer überschichtet. Für die analytischen Zwecke wurden in der Regel kleine Probenvolumina (5-20 µl) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer im Verhältnis 1:8 (Puffer/DNA) versetzt und nach kurzem Durchmischen in die Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte je nach Gel- und DNA-Größe bei einer konstanten Spannung von 60-120 V innerhalb von 1-2 h. Danach wurde das Gel für 10 min im Ethidiumbromidbad (5 µg/ml Ethidiumbromid in H₂O) unter leichtem Schwenken gefärbt. Die Nukleinsäurebanden wurden anschließend mit Hilfe eines UV-Transluminators analysiert und nach Bedarf mit dem entsprechenden System der Firma PeqLab fotodokumentiert.

Die präparative Agarosegelelektrophorese wurde angewendet, um einzelne DNA-Fragmente nach einer PCR-Amplifikation bzw. einer Restriktion möglichst rein aus dem jeweiligen Reaktionsansatz zu isolieren und anschließend für weitere Experimente (z.B. Ligationen oder PCR's) einsetzen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Probetaschen mittels breiterer Kämmen angefertigt und für die DNA-Auftrennung größere Probenvolumina (20-100 µl) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte unter den bereits beschriebenen Bedingungen. Die ausgewählten DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Licht mit einem Skalpel aus dem Gel herauspräpariert, in ein Eppendorfgefäß überführt und entweder direkt weiterverarbeitet (siehe 2.3.6.) oder bei -20°C gelagert.

2.3.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde nach dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die aus dem Agarosegel ausgeschnittenen DNA-Fragmente (siehe 2.3.5) wurden zunächst in Eppendorfgläsern gewogen. Nachdem die Gelvolumina ermittelt wurden (1g = 1 ml), erfolgte die Solubilisierung und Bindung von DNA an ein chaotrophes Salz. Dazu wurden die rauspräparierten Gelstücke mit dreifachem Volumen an QG Puffer überschichtet und unter ständigem Schütteln (150 rpm) für 10 min bei 50°C inkubiert. Die aufgelösten DNA-Proben wurden weiterhin mit einem Volumen Isopropanol versetzt, auf eine QIAquick Säule geladen und 1 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Nach Bindung der DNA an die in der Säule vorhandene Silica-Gel-Membran wurden die Proben zweimal mit PE Puffer gewaschen und durch anschließendes Zentrifugieren (1 min bei 13.000 x g) getrocknet. Um die gebundene DNA von der Matrix zu eluieren, wurden die Säulen mit geeignetem Volumen (30-50 µl) H₂O versetzt und 1 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Die eluierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.7 DNA-Klonierungstechniken

2.3.7.1 Restriktion von DNA

DNA-Restriktionen wurden nach Angaben des Enzymherstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer sowie Einhaltung der für das jeweilige Enzym vorgegebenen Inkubationszeiten und Temperaturoptima durchgeführt. Zur Verstärkung der Pufferwirkung wurden für einige Restriktionsenzyme Reaktionszusätze wie 0,1 mg/ml BSA, 9 mM NaCl oder 0,1 % TX-100 (z.B. für *Not* I) empfohlen. Die DNA-Restriktionen wurden in der Regel in möglichst kleinen Volumina (20-50 µl) angesetzt. Vor jedem Restriktionsverdau wurde eine DNase-Inaktivierung der Proben vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden die Reaktionsansätze mit 1/10 Volumen Reaktionspuffer (gegebenenfalls anderen Zusätzen, s.o.) versetzt, für 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend 10 min bei RT abgekühlt. Daraufhin erfolgte die Zugabe vom entsprechenden Restriktionsenzym und eine 4-12 stündige Inkubation der Proben bei einer vom Hersteller vorgeschriebenen Temperatur. Bei Standardklonierungen von DNA-Fragmenten reichten oft 3U Enzym pro 1 µg DNA für einen vollständigen Verdau aus. Für die Klonierung von scFv wurde dagegen die 10-fache Menge des jeweiligen Enzyms eingesetzt, um eine effiziente DNA-Restriktion zu gewährleisten. Im Anschluss an jede Hydrolyse folgte eine Inaktivierung des Enzyms, die strikt nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

Im Fall einer Restriktion mit zwei Enzymen wurde auf kompatible Puffer- und Temperaturbedingungen geachtet. Bei der Verwendung von zwei Endonukleasen, die das gleiche Puffersystem und Temperaturoptimum benötigten, wurden die Restriktionen gleichzeitig in einem Ansatz (Doppelverdau) durchgeführt. Waren die Reaktionsbedingungen der Enzyme nicht kompatibel, wurde die DNA in zwei Schritten nacheinander geschnitten. Hierfür wurde das erste Enzym nach dem Verdau zunächst inaktiviert. Die DNA-Probe wurde im Folgenden mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gereinigt, mit Ethanol gefällt, in H₂O resuspendiert und mit dem zweiten Enzym restringiert. Die geschnittene DNA wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und verifiziert.

2.3.7.2 DNA-Ligationsmethoden

Restringierte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4 DNA Ligase (siehe 2.1.8) verknüpft. Dieses ATP-abhängige Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden von zwei doppelsträngigen DNA-Fragmenten. Obwohl die T4 DNA Ligase am effektivsten Brüche in Fragmenten schließt, die von klebrigen Enden (kohäsive Enden = sticky ends) zusammengehalten werden, verknüpft sie unter bestimmten Bedingungen auch glatte DNA-Enden (blunt ends). Das Enzym arbeitet am ergiebigsten bei 37°C. Es wird jedoch in der Regel bei 4°-16°C eingesetzt, um die kurzen Bereiche der doppelsträngigen DNA, welche die einzelnen Fragmente kohäsiv zusammenhalten, thermisch nicht zu denaturieren.

Die Standard-Ligationen wurden mit jeweils 30-60 ng Vektor-DNA und einem drei- bis fünffachen molaren Überschuss an Insert-DNA unter Verwendung von 1 U T4 DNA Ligase im mitgelieferten Ligasepuffer durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug in der Regel 10 µl. Zur Kontrolle wurde stets eine Ligation ohne Insert eingesetzt. Die Ligrationsreaktion erfolgte meistens üN (12-18 h) bei 16°C.

Für die Ligation von scFv-Fragmenten in den pCANTAB 5 E -Phagemid-Vektor (siehe 3.1.6) wurde 250 ng Vektor-DNA und 7 U T4 DNA Ligase verwendet. Das Insert wurde in dreifach molarem Überschuss zur Vektormenge eingesetzt. Zur Überprüfung der Ligrationsbedingungen wurde parallel eine Religation der Vektor-DNA durchgeführt. Die Ligation erfolgte im Gesamtvolumen von 50 µl für 1 h bei 16°C. Anschließend fand eine 10-minütige Inaktivierung des Enzyms bei 70°C und daraufhin eine 5-minütige Abkühlung auf Eis statt. Nach Beendigung jeder Ligrationsreaktion wurden alle eingesetzten Plasmidkonstrukte entweder direkt in *E. coli*-Bakterien transformiert oder bei -20°C gelagert.

2.3.8 Polymerase-Kettenverlängerungsreaktion (PCR)

2.3.8.1 PCR-Amplifikation von DNA- und cDNA-Fragmenten

Die Polymerase-Kettenverlängerungsreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1985) diente zur *in vitro* Amplifikation von DNA- und cDNA-Fragmenten. Der zu amplifizierende DNA-Bereich wurde hierbei durch zwei Primer-Oligonukleotide festgelegt, die zu Sequenzen der Matrizen-DNA komplementär waren und diese beidseitig flankierten. Mittels einer DNA-Polymerase und in Anwesenheit von dNTP's konnten diese Oligomere verlängert und das definierte DNA-Fragment im Verlauf von drei sich ständig wiederholenden Reaktionszyklen (DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung, Ketten-Verlängerung) exponentiell vermehrt werden. Neben der hitzestabilen Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA Polymerase) wurde in dieser Arbeit die Platinum *Pfx* DNA Polymerase verwendet (siehe 2.1.8), welche eine „*proofreading*“-Funktion besitzt und somit geringere Fehlerraten garantiert. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml Eppendorfgefäßen nach folgendem Grundschema in Reaktionsvolumen von 50 µl angesetzt:

Matrizen-DNA	10-30 ng
5'-Primer	10 pmol
3'-Primer	10 pmol
W1-Detergenz	0,05% (v/v)
MgCl ₂	1,5 mM
PCR-Puffer	1 x
dNTP's	0,125 mM
DNA-Polymerase	2,5 U
Destilliertes Wasser	ad 50 µl

Jede Reaktion wurde mittels einer Negativkontrolle auf eventuelle Kontaminationen überprüft. Dazu wurde die Matrizen-DNA durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt und zusammen mit den zu untersuchenden Proben in einem Thermocycler (siehe 2.1.10) amplifiziert. Um die Ausbeute an vervielfältigter DNA zu erhöhen und gleichzeitig die Entstehung von unspezifischen PCR-Produkten zu vermeiden, wurden die meisten Amplifikationen als sogenannte „*hot start*“-Reaktionen durchgeführt. Hierfür sind die DNA-Ansätze zunächst durch 5-minütige Inkubation bei 95°C vollständig denaturiert worden. Daraufhin erfolgte die Zugabe von DNA-Polymerase und der Start der Synthesereaktion.

Die Standard-PCR's wurden in der Regel nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1 Zyklus:

95°C	5 min	Initiale Denaturierung
94°C	Pause	Zugabe von Enzym

1 Zyklus:

94°C	3 min	Denaturierung
50°-70°C	3 min	Primeranlagerung
72°C	5 min	Kettenverlängerung

34 Zyklen:

94°C	30 sec	Denaturierung
50°-70°C	30 sec	Primeranlagerung
72°C	1 min	Kettenverlängerung

1 Zyklus:

72°C	10 min	Finale Verlängerung
20°C	30 sec	Abkühlung der Reaktion
4°C	30 sec	Abkühlung der Reaktion

Die verwendete Annealing Temperatur lag im Bereich zwischen 50°-70°C und wurde für jedes Primerpaar separat ermittelt (siehe 2.3.8.3). Für spezielle Anwendungen (wie z.B. Amplifikation von scFv) ist das PCR-Programm folgendermaßen modifiziert worden:

1 Zyklus:

95°C	5 min	Initiale Denaturierung
95°C	Pause	Zugabe von Enzym

35 Zyklen:

94°C	1 min	Denaturierung
55°C	2 min	Primeranlagerung
72°C	2 min	Kettenverlängerung

1 Zyklus:

72°C	10 min	Finale Verlängerung
4°C	30 sec	Abkühlung der Reaktion

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde jeweils ein Aliquot des Reaktionsansatzes in einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Gelang die Amplifikation vom gewünschten PCR-Fragment, so wurde dieses, wie unter 2.3.10 beschrieben, aufgereinigt und stand danach für weitere Arbeiten zur Verfügung. Im Fall einer Verunreinigung mit verschiedenen unspezifischen PCR-Produkten mussten die Proben zusätzlich in einer präparativen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Die erwarteten DNA-Banden wurden dann aus dem Gel geschnitten und wie bereits beschrieben (siehe 2.3.6) eluiert.

2.3.8.2 PCR-basierte Analyse rekombinanter Bakterienklone

Um eine große Anzahl von Transformanten auf das Vorhandensein von Insert direkt zu testen, ist in dieser Arbeit eine nach Jesnowski *et al.*, 1995, modifizierte Kolonie-PCR Methode angewandt worden. Dazu wurden die nach einer Transformation auf LB-Selektionsplatten üN gewachsenen Bakterienklone zunächst mit sterilen Pipettenspitzen vorsichtig gepickt. Ein Teil der Bakterienkolonie wurde direkt auf eine sogenannte „Master Platte“ ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Das an der Pipettenspitze haftende Zellmaterial wurde in vorbereiteten PCR-Ansätzen resuspendiert und zum Aufschluss der Bakterienzellwände sowie zur Freisetzung von Plasmid-DNA zunächst für 5 min bei 95°C lysiert. Anschließend erfolgte eine DNA-Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern nach dem bereits beschriebenen Standard-PCR-Protokoll (siehe 2.3.8.1). Zur Identifizierung rekombinanter Bakterienklone wurde nach Beendigung der PCR-Reaktion jeweils 10 µl Probe in einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Die positiven Transformanten wurden von der „Master Platte“ entnommen und für eine Plasmid Maxi-Präparation üN bei 37°C und 250 rpm kultiviert.

2.3.8.3 PCR-vermittelte Modifizierungen von DNA und Primer Design

Mit Hilfe der PCR-Reaktion wurde neben der schon erwähnten Vervielfältigung von DNA-Fragmenten, ebenfalls die Amplifikation von V_H- und V_L- Domänen, Klonierung von Insert-DNA in einen Plasmid-Vektor, gezieltes Einfügen neuer Restriktionsschnittstellen sowie DNA-Sequenzierung durchgeführt. Für alle oben angesprochenen Anwendungen mussten zunächst sequenzspezifische Primer konstruiert werden. Zu diesem Zweck wurde mittels des „Blast Search“-Computerprogramms eine Analyse der untersuchten Gene bzw. DNA-Fragmente vorgenommen und daraufhin die Auswahl der geeigneten Primersequenzen getroffen. Bei der Konstruktion dieser Primer wurden folgende Regeln beachtet:

- Länge der Primer = 17-48 Nukleotide
- Ausgeglichener G/C - zu A/T -Gehalt
- Möglichst gleicher Schmelzpunkt für beide Primer
- Schmelztemperatur zwischen 50° und 80°C
- Keine Haarnadelstruktur (besonders am 3`-Ende)
- Keine Dimer-Bildung: weder mit sich selbst noch mit dem zweiten Primer
- Möglichst keine G/C -Nukleotide am 3`-Ende
- Keine ungewöhnlichen Basenabfolgen wie poly-A- oder lange G/C-Abschnitte (verändert nach Lottspeich und Zorbas, 1998)

Die Berechnung der Schmelztemperatur der Primer erfolgte nach Lottspeich und Zorbas (1998), wobei für jedes A oder T ein Schmelzpunkt von 2°C und für jedes G bzw. C ein Schmelzpunkt von 4°C festgelegt wurde. Von dem errechneten Schmelzwert wurde anschließend 5°C subtrahiert und somit die Annealing-Temperatur der Startermoleküle abgeschätzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von den Firmen MWG bzw. Amersham Pharmacia (siehe 2.1.5) bezogen.

2.3.9 Subklonieren von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Produkten in einen ausgewählten Vektor, wurden an den 5'-Enden der beiden verwendeten Primer definierte Restriktionsschnittstellen angebracht (siehe Ergebnisse). Nach erfolgreicher Amplifikation und anschließender Reinigung der Reaktionsprodukte folgte in der Regel eine Restriktion der Vektor- sowie der Insert-DNA und anschließend die Klonierung des DNA-Fragments in den vorgegebenen Vektor (z.B. ein Expressionsvektor). Die Schwierigkeit bei der Durchführung derartiger Klonierungsexperimente bestand oft darin, dass einige Endonukleasen die Insert-DNA unvollständig geschnitten haben, wodurch deren Ligation in einen Vektor unterbunden wurde. Es ist mittlerweile beschrieben worden, dass viele Restriktionsenzyme besser in der Mitte eines DNA-Fragmentes als an seinen Enden schneiden, weil sie für ihre volle Aktivität eine gewisse Zahl von Basen links und rechts von der Schnittstelle benötigen (Mülhardt, 2003). Um bei den Klonierungen von PCR-Produkten eine vollständige Restriktion von Insert-DNA zu gewährleisten und somit den Anteil an positiven Klonen (Klone mit Insert) zu erhöhen, wurde die amplifizierte Insert-DNA mit hinzugefügten Restriktionsschnittstellen in einen PCR-Klonierungsvektor (pCR 2.1-TOPO Vektor) subkloniert. Diese als TA-Klonierung bezeichnete Methode basiert auf der Entdeckung, dass die *Taq* Polymerase in den meisten Fällen einen unspezifischen Überhang von einer Base (Adenosin) produziert. Durch die Verwendung eines Vektors mit Thymidin-Überhang lassen sich PCR-Fragmente leichter klonieren (Mühlhardt, 2003). Bei dem von der Firma Invitrogen verwendeten TOPO TA Cloning Kit wurde statt einer Ligase, ein mit Vaccinia Topoisomerase I aktivierter TA-Vektor eingesetzt. Die Topoisomerase schneidet bekanntlich die DNA an der Erkennungssequenz (C/T)CCTT und bleibt allerdings über eine 3'-Phosphotyrosyl-Bindung an dem Vektor kovalent gebunden. Da die beiden Schnittstellen des TOPO-Vektors durch die Topoisomerase blockiert sind, kann auf diese Weise eine Selbstligation des Vektors erfolgreich verhindert werden.

Für die Klonierung in den pCR 2.1-TOPO Vektor wurde jeweils 2,5 µl vom frischen, ungeschnittenen PCR-Produkt mit 1 µl Vektor und 1 µl der vom Hersteller empfohlenen Salzlösung zusammengemischt, mit H₂O auf 6 µl aufgefüllt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 2 µl der Klonierungsreaktion in chemisch kompetente TOP 10 *E. coli* -Bakterien transformiert (siehe 2.3.2.3) und auf LB-Selektionsplatten üN bei 37°C inkubiert. Nach erfolgreicher Klonierung wurden die positiven Transformanten für eine Plasmid Maxi Präparation kultiviert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde dann mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und die jetzt vollständig ausgeschnittene Insert-DNA nach entsprechender Reinigung (siehe 2.3.4) in einen Expressionsvektor erfolgreich ligiert.

2.3.10 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte nach dem QIAquick PCR Purification Kit - Protokoll der Firma Qiagen. Mit Hilfe der vom Hersteller zur Verfügung gestellten QIAquick-Säulen konnten die Nukleinsäuren von sämtlichen Salz-, Primer-, Polymerase- und Restriktionsenzym-Resten befreit werden. Zu diesem Zweck wurden die PCR-Ansätze zunächst mit dem 5-fachen Volumen vom PB-Puffer versetzt und durch kurzes Vortexen gemischt. Daraufhin erfolgte das Auftragen der DNA-Proben in die in 2 ml Eppendorf-Gefäßen platzierten Säulen. Nach der Bindung der Nukleinsäuren an das Säulenmaterial ist die übriggebliebene Flüssigkeit durch eine Zentrifugation (30-60 sec bei 10.000 x g) in den oben erwähnten Reaktionsgefäßen aufgefangen und anschließend entfernt worden. Durch die Zugabe von 0,75 ml des PE-Puffers und zweimaliges Zentrifugieren (1 min bei 10.000 x g) wurde die an der Säule haftende DNA gewaschen. Zur DNA-Elution ist die Säule mit 30 µl H₂O versetzt, für 1 min bei RT inkubiert und anschließend 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert worden. Die im Wasser gelösten PCR-Produkte waren somit von störenden Komponenten befreit und für die darauf folgenden Experimente (z.B. Ligation oder Sequenzierung) geeignet.

2.3.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse aller untersuchten DNA-Fragmente wurde nach der von Sanger *et al.*, 1977 beschriebenen Didesoxy-Kettenabbruchmethode mit Hilfe eines automatischen DNA-Sequenzierers (siehe 2.1.10) im Servicelabor der „DNA/Peptid-Analytik“-Gruppe unter der Leitung von Dr. Friedrich Buck am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verwendung von Fluorescein-endmarkierten Didesoxy-Nukleotidtriphosphaten (ddNTP's), welche über ihre 5'-Triphosphatgruppen in eine wachsende DNA-Kette ein-

gebaut werden, aber selbst keine Phosphodiesterbrücken mit den nächsten anzuhängenden Desoxynukleosidtriphosphaten bilden und somit die DNA-Matrize an den ddATP-, ddCTP-, ddGTP- sowie ddTTP-Enden terminieren. Da die eingesetzten ddNTP's mit vier unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind, kann die gesamte Reaktion in einem einzigen Eppendorf-Gefäß durchgeführt werden. Die entstandenen PCR-Abbruchprodukte werden im Verlauf einer Kapillarelektrophorese mit einem Laser angeregt und ihre Absorptionsspektren gemessen und analysiert.

Für die Durchführung der Sequenzierungsreaktionen wurde das Abi Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit eingesetzt. Die zu untersuchende DNA (0,5 µg PCR-Produkt oder 0,7 µg Plasmid-DNA) ist zunächst mit 1 µl Primer (15 pmol) und 6 µl Puffer Mischung versetzt und mit H₂O auf 18 µl aufgefüllt worden. Anschließend wurde 2 µl vom Big Dye Polymerase Mix hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die Reaktion fand in einem PCR-Gerät unter folgenden Bedingungen statt:

25 Zyklen:

96°C	30 sec	Denaturierung
50°C	30 sec	Primeranlagerung
60°C	4 min	Kettenverlängerung

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Ansätze auf 4°C abgekühlt, mit destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt, mit Ethanol (wie unter 2.3.4 beschrieben) gefällt und für die Sequenzanalyse an das bereits erwähnte Servicelabor weitergeleitet. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden anschließend mit dem „Blast Search“-Computerprogramm ausgewertet.

2.4 „Phage display“-Technik

Die Generierung von Antikörperspezifitäten mittels „Phage Display“-Technik bietet schon seit Beginn der neunziger Jahre eine Alternative zu konventionellen Methoden der Hybridom-technologie (Barbas *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991). Dieses Verfahren ermöglicht eine gezielte Selektion von Antikörperfragmenten (scFv) für ein breites Spektrum von Antigenen. Dabei werden die untersuchten scFv auf der Oberfläche von filamentösen M13- Phagen exprimiert und können auf diese Weise im Verlauf von diversen *in vitro*, *in vivo* sowie *in situ* Selektionsschritten (siehe 2.4.4) spezifisch angereichert werden.

2.4.1 Herstellung einer Phagenbibliothek

Zur Herstellung einer kombinatorischen Phagenbibliothek wurde zunächst die aus Hybridomazellen (siehe 2.1.2) isolierte RNA unter Verwendung der RT-PCR-Technik (siehe 2.3.1.5) in die cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe domänenspezifischer Primer (siehe 2.1.5.2) wurden dann die V-Regionen der schweren und leichten Immunglobulinketten amplifiziert und im weiteren PCR-Schritt über eine Linkerpeptidsequenz zum vollständigen scFv verbunden. Die auf diese Weise entstandenen Antikörperfragmente sind anschließend in den pCANTAB 5 E -Phagemid-Vektor hineinkloniert und in TG1 *E. coli*- Bakterien transformiert worden (siehe 2.3.2.3). Obwohl das verwendete pCANTAB 5 E -Phagemid sowohl über die Eigenschaften eines Phagen- als auch über die eines Bakterien-Vektors verfügte, fehlten ihm jedoch einige wichtige Gene, die zur Replikation und Verpackung der einzelsträngigen Phagemid-DNA in M13-Phagenpartikel essentiell waren. Aus diesem Grund mussten zur Herstellung einer Phagenbibliothek die rekombinanten Bakterienklone mit sogenannten Helferphagen infiziert werden, welche die zur Produktion vollständiger Phagen notwendigen Gene enthielten. Vor der Infektion sind zunächst die auf SOBAG-Agarplatten (siehe 2.1.7) gewachsenen Transformanten mittels Restriktionsanalysen sowie Sequenzierungen auf das Vorhandensein von scFv überprüft worden. Die positiven Bakterienklone wurden daraufhin in 10 ml 2 x YT-AG-Medium üN bei 30°C unter ständigem Schütteln (250 rpm) angezogen. Am folgenden Tag wurde jeweils 900 µl der über Nacht gewachsenen Bakterienkultur im 9,1 ml 2 x YT-G-Medium aufgenommen und unter Schütteln (s.o.) vorerst für 1 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben mit 50 µl (20 mg/ml) Ampicillin und 400 µl (4×10^{10} pfu/ml) M13KO7-Helferphagen versetzt und erneut für 1 h bei 37°C kultiviert. Die infizierten Bakterienzellen wurden anschließend abzentrifugiert (10 min bei 1.000 x g), die Sedimente in jeweils 10 ml 2 x YT-AK-Medium resuspendiert und für 16-18 h (üN) unter Schütteln (250 rpm) bei 37°C inkubiert. Als negative Phagen-Kontrolle dienten die TG1 *E. coli*-Bakterien, welche ebenfalls mit 400 µl Helferphagen (s.o.) infiziert und in 2 x YT-Medium ohne Ampicillin-Zusatz unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert wurden. Nach anschließender Zentrifugation (s.o.) wurden die Kontrollbakterien in 2 x YT-K-Medium überführt und üN (16-18 h) bei 37°C geschüttelt (250 rpm).

2.4.2 Isolierung der Phagen aus *Escherichia coli*

Die über Nacht gewachsenen Bakterienkulturen sind am folgenden Tag zunächst abzentrifugiert worden (20 min bei 1.000 x g). Die phagenhaltigen Überstände wurden vorsichtig in saubere Beckman-Röhrchen überführt, mit jeweils 2 ml PEG/NaCl (siehe 2.1.7) versetzt, kräftig gevortext und für 60 min auf Eis inkubiert. Nach diesem Fällungsschritt sind die Proben für 20 min bei 4°C und 10.000 x g sedimentiert worden. Die entstandenen Phagenpellets wurden für ca. 20-30 min bei RT getrocknet und dann in 250-500 µl 2 x YT-Medium aufgenommen. Zur Beseitigung von bakteriellen Kontaminationen sowie restlichen Zelltrümmern sind die Phagensuspensionen anschließend durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert worden. Frisch präparierte Phagen wurden entweder direkt für „Biopanning“-Experimente eingesetzt oder (bis zu einer Woche) bei 4°C gelagert.

Die auf diese Weise hergestellte kombinatorische Antikörperbibliothek bestand aus einer Vielzahl von M13-Phagenpartikeln, die verschiedene Kombinationen leichter und schwerer Ketten als funktionelle Antikörperfragmente auf deren Oberfläche präsentierten.

2.4.3 Titration der Phagen

Um die Konzentration der Phagenbibliothek vor und nach jeder einzelnen „Biopanning“-Runde genau zu ermitteln, wurde eine Titerbestimmung („colony forming units“, cfu) der jeweils eingesetzten Bakteriophagensuspension durchgeführt. Dazu wurden zunächst 10 ml 2 x YT-Medium mit 100 µl einer über Nacht gewachsenen *E. coli* TG1-Bakterienkultur inokuliert und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5$) bei 37°C unter ständigem Schütteln angezogen. Während dieser Zeitperiode wurde eine Bakteriophagen-Verdünnungsreihe in 1/100 Schritten von 10^{-2} bis 10^{-12} in 2 x YT-Medium hergestellt. 900 µl der logarithmischen TG1-Bakterienkultur wurden folgend in ein sauberes Falcon-Röhrchen überführt, mit 100 µl der verdünnten Phagensuspension infiziert und für 30 min bei 37°C (250 rpm) inkubiert. Jeweils 100 µl der infizierten *E. coli*-Kulturen wurden anschließend auf SOBAG-Agarplatten ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Parallel dazu wurde eine Negativkontrolle, die aus nicht infizierten TG1-Bakterien bestand, unter den oben beschriebenen Bedingungen angezogen und ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen, ampizillinresistenten Bakterienkolonien ausgezählt und der Phagentiter unter Berücksichtigung der gewählten Verdünnungsstufe pro 1 ml Phagenlösung errechnet. Da es sich bei dem verwendeten pCANTAB 5 E -Vektor um ein Phagemid handelte, welches sowohl die Eigenschaften eines bakteriellen Plasmids als auch die eines Phagen besaß (Vieira und Messing, 1987), konnte die Zahl der auf SOBAG-Agarplatten ermittelten

TG1-Kolonien in direktem Zusammenhang mit der Anzahl der eingesetzten, infektiösen Phagen gebracht werden (eine Bakterienkolonie = eine Phageneinheit).

2.4.4 Selektion und Anreicherung von antigenspezifischen Phagen

Die Selektion und Anreicherung von antigenspezifischen Phagen aus einer Phagenbibliothek erfolgte mittels eines *in situ*, *in vitro* sowie *in vivo* „Biopanning“s“. Diese Methode basiert auf einer künstlich eingeleiteten Antigen-Antikörper-Auslese, welche zu derjenigen analog ist, die in einem Säugetier-Immunsystem stattfindet. Das Repertoire scFv-präsentierender M13-Phagen wird hierbei mit einem Antigen inkubiert, gegen das die gewünschte Spezifität gerichtet werden soll. Während dieses Inkubationsvorgangs binden die antigenspezifischen Phagen an die vorgesehenen Epitope und bringen auf diese Weise Phagen-Antigen-Komplexe hervor. Unspezifisch gebundene Phagen werden in folgenden Schritten durch stringentes Waschen entfernt. Die an Antigen-Antikörperbindungsstellen assoziierten, spezifischen Phagen werden durch eine Reinfektion mit TG1 *E. coli*-Bakterien vom Epitop eluiert und in Bakterienzellen klonal vermehrt. Durch dreimalige Wiederholung jedes einzelnen „Biopanning“-Experimentes kann eine erfolgreiche Phagen-Selektion erreicht und eine maximale Anreicherung der spezifischen Antikörperfragmente gewährleistet werden.

2.4.4.1 „Biopanning“ auf Gewebeschnitten von Kollateralarterien und Kontrollgefäßen

Die in dieser Arbeit untersuchten Antigene (CTA und VEGFR-2) werden hauptsächlich auf verschiedenen Kompartimenten der Blutgefäße und diversen Endothelzelllinien exprimiert. Für die erste Selektions- und Anreicherungsrunde spezifisch bindender Phagen wurden Ratten- sowie Humangewebeschnitte von Kollateralarterien und Kontrollgefäßen angefertigt. Geschnittene Rattengefäße wurden auf Objektträgern positioniert (jeweils 2 Schnitte pro Objektträger) und sowohl im nativen als auch im acetontfixierten Zustand für das „Biopanning“ verwendet. Humane Gefäßproben wurden hingegen formalinfixiert und in Paraffinblöcke eingebettet (siehe 2.6.1). Vor jedem „Biopanning“-Experiment mussten die acetontfixierten Schnitte für 20 min in 1 x PBS-Lösung rehydriert und die Paraffinschnitte mittels einer sogenannten „alkoholischen Reihe“ (siehe 2.6.3) entparaffiniert werden. Die auf diese Weise vorbereiteten Proben wurden dann in eine „befeuchtete Präparat-Kammer“ übertragen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT mit Blocking Puffer A (siehe 2.1.7) inkubiert. Nach der Blockierung sind die Objektträger in eine Waschküvette transferiert worden, wo sie 3 x 5 min mit 1 x PBS-Puffer gewaschen wurden. Während des Waschvorgangs wurde die zu untersuchende, scFv-präsentierende Phagenbibliothek in einem Reagenzgefäß mit Blocking Puffer A (1:10), Natrium Azid

(Endkonzentration: 0,01% v/v) und Triton X-100 (Endkonzentration: 0,1%) versetzt und in einem Überkopfschüttler (siehe 2.1.10) für 15 min bei RT geblockt. Die in der Zwischenzeit gewaschenen Gefäßproben wurden erneut in die oben erwähnte Kammer überführt, mit jeweils 100 µl der geblockten Phagensuspension (10^{12} Phagen/ml) pro Schnitt überschichtet und für 2 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin folgte stringentes Waschen der Gefäßschnitte (20 x 5 min mit 1 x PBS-Puffer und 20 x 5 min mit 1 x PBS/0,1% Tween 20-Puffer), infolgedessen die unspezifischen Phagen zum größten Teil entfernt werden konnten.

Für die Elution und Anreicherung von antigenspezifischen Phagen wurden mehrere Falcon-Röhrchen zunächst mit 10 ml 2 x YT-Medium gefüllt, dann mit jeweils 100 µl einer über Nacht gewachsenen TG1-Bakterienkultur angeimpft und unter Schütteln (250 rpm) bis zur $OD_{600} = 0,3-0,4$ bei 37°C kultiviert. Danach wurden die bereits gewaschenen Gefäßschnitte unter sterilen Bedingungen in die Röhrchen mit logarithmisch gewachsenen Bakteriensuspensionen überführt und dort waagrecht für 1 h bei 37°C (150 rpm) inkubiert. Anschließend wurden alle Objektträger entfernt, die reinfizierten Bakterien schonend sedimentiert (5 min bei RT und 3.000 x g) und in 1 ml 2 x YT-Medium aufgenommen.

Zur Selektion wurden jeweils 50-100 µl der Bakterienkulturen auf SOBAG-Agarplatten ausgestrichen und üN bei 30°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die ampicillinresistenten Bakterienklone mit jeweils 1 ml 2 x YT-AG-Medium von den Agarplatten abgelöst und entweder direkt für eine weitere Selektionsrunde eingesetzt oder kryokonserviert. Für eine erfolgreiche Anreicherung von scFv wurden in der Regel drei nacheinander folgende „Biopanning“-Experimente durchgeführt. Die nach der dritten „Biopanning“-Runde angereicherten Bakterienkolonien wurden mittels Kolonie-PCR, Restriktionsanalysen und Sequenzierungen auf das Vorhandensein von scFv überprüft und anschließend für die Selektion auf Endothelzellen sowie *in vivo* -Versuche verwendet. Für alle „Biopanning“-Experimente sind jeweils 2 Negativkontrollen präpariert worden. Zur Kontrolle des Prozentsatzes an unspezifischen Phagen, die im Verlauf des „Biopanning“s“ trotz des stringenten Waschens angereichert wurden, dienten Gefäßschnitte, die mit einer reinen M13-Phagenpopulation inkubiert wurden, welche definitiv keine Antikörperfragmente auf der Oberfläche präsentierte. Die Überprüfung einer eventuellen bakteriellen sowie pilzlichen Kontamination erfolgte mittels Gefäßproben, die während des Antigen-Antikörper-Inkubationsschrittes anstelle von Phagen mit 1 x PBS-Puffer überschichtet wurden. Beide Kontrollproben sind im Verlauf der Selektion nach dem oben beschriebenen „Biopanning“-Schema behandelt worden.

2.4.4.2 „Biopanning“ auf Endothelzelllinien

Die auf Gefäßschnitten ausselektierten Phagenpopulationen wurden weiterhin für „Biopanning“-Experimente auf RHE-A/neg.- und PAE-KDR-11-Zellen (siehe 2.1.2) eingesetzt. Dazu wurden diese Endothelzelllinien in vorgegebenen Kulturmedien (siehe 2.1.7) bis zum Erreichen des Subkonfluenzstadiums angezogen (siehe 2.2.2) und unmittelbar vor Beginn jedes „Biopanning“-Experimentes 3 x mit 10 ml 1 x PBS-Puffer gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen mit 10 ml Blocking Puffer A überschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. Daraufhin folgte dreimaliges Waschen der Zellkulturen mit sterilem 1 x PBS-Puffer. Die zu verwendende, antikörperspezifische Phagensuspension (10^{12} Phagen/ml) wurde in der Zwischenzeit mit Blocking Puffer A versetzt und in einem Überkopfschüttler für 15 min bei RT geblockt. Für das „Biopanning“ wurden die bereits gewaschenen Zellen zunächst mit jeweils 10 ml Kulturmedium überschichtet, dann mit 1 ml der vorbereiteten Phagensuspension versetzt und anschließend für 2 h bei 37°C in einem CO₂ Inkubator (siehe 2.1.10) inkubiert. Daraufhin folgte stringentes Waschen der Zellkulturen (20 x 10 ml 1 x PBS-Puffer und 20 x 10 ml 1 x PBS/0,1% Tween 20-Puffer), was zur Beseitigung ungebundener Phagen führte. Die antikörperspezifischen Phagen wurden folgend mittels TG1 *E. coli*-Bakterien von den Endothelzellen eluiert. Dazu wurden die Zellkulturen mit jeweils 10 ml logarithmisch gewachsener Bakteriensuspension (OD₆₀₀ = 0,3-0,4) inokuliert und für 1 h bei 37°C unter Schütteln (150 rpm) inkubiert. Die Bakterien wurden danach in Falcon-Röhrchen überführt, 5 min bei RT und 3.000 x g sedimentiert und anschließend in 1 ml 2 x YT-Medium resuspendiert. Zur Selektion wurden jeweils 50-100 µl der reinfizierten Bakterienkulturen auf SOBAG-Agar ausplattiert und üN bei 30°C kultiviert. Die am folgenden Tag gewachsenen, ampicillinresistenten Bakterienklone wurden mit jeweils 1 ml 2 x YT-Medium von den Agarplatten abgelöst und entweder für eine weitere Selektionsrunde eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Für alle Untersuchungen an Endothelzelllinien sind jeweils 2 Negativkontrollen nach dem im Kapitel 2.4.4.1 beschriebenen Schema präpariert worden. Nach jedem dritten „Biopanning“-Experiment erfolgte eine Überprüfung der angereicherten Bakterienkolonien auf die Anwesenheit von scFv mittels Restriktionsanalysen und Sequenzierungen. Antigen-spezifische Bakterienklone wurden dann mit Helferphagen infiziert und in Form von scFv-präsentierenden Phagenpopulationen für *in vivo* „Biopanning“-Experimente weiterverwendet.

2.4.4.3 *In vivo* „Biopanning“

Für die Selektion und Anreicherung antigenspezifischer Phagen in einem *in vivo*-Modell sind Sprague-Dawley Ratten verwendet worden. Zu diesem Zweck wurde bei den Versuchstieren zunächst die Okklusion einer ihrer Femoralarterien vorgenommen. Bereits 3 Tage nach dem künstlich eingeleiteten Arterienverschluß wurde den Ratten intravasal jeweils 1 ml der zuvor geblockten, scFv-präsentierenden Phagensuspension (10^{12} Phagen im Blocking Puffer A) injiziert. Nach 10-minütiger Zirkulation der Phagen im Gefäßsystem wurden die Tiere getötet und deren Kollaterall- sowie Kontrollgefäße herauspräpariert. Die auf diese Weise gewonnenen Gefäßproben wurden folgend in Falcon-Röhrchen mit logarithmisch gewachsenen TG1-Bakterienkulturen ($OD_{600} = 0,3-0,4$) überführt und unter Schütteln (150 rpm) für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden alle Gefäßpräparate entfernt, die Bakterienkulturen für 5 min bei RT sowie 3.000 x g sedimentiert und in 1 ml 2 x YT-Medium aufgenommen. Die reinfizierten Bakterien wurden dann auf SOBAG-Agarplatten ausselektiert und die positiven, ampicillinresistenten Kolonien mittels Restriktionsanalysen und Sequenzierungen auf das Vorhandensein von scFv analysiert. Antikörperspezifische Klone wurden im weiteren Verlauf der Experimente für die Herstellung und Expression von löslichen scFv eingesetzt.

Die auf Seite 81 präsentierte Abbildung 2.4 stellt eine schematische Zusammenfassung der in dieser Arbeit angewandten „Phage display“-Technik dar.

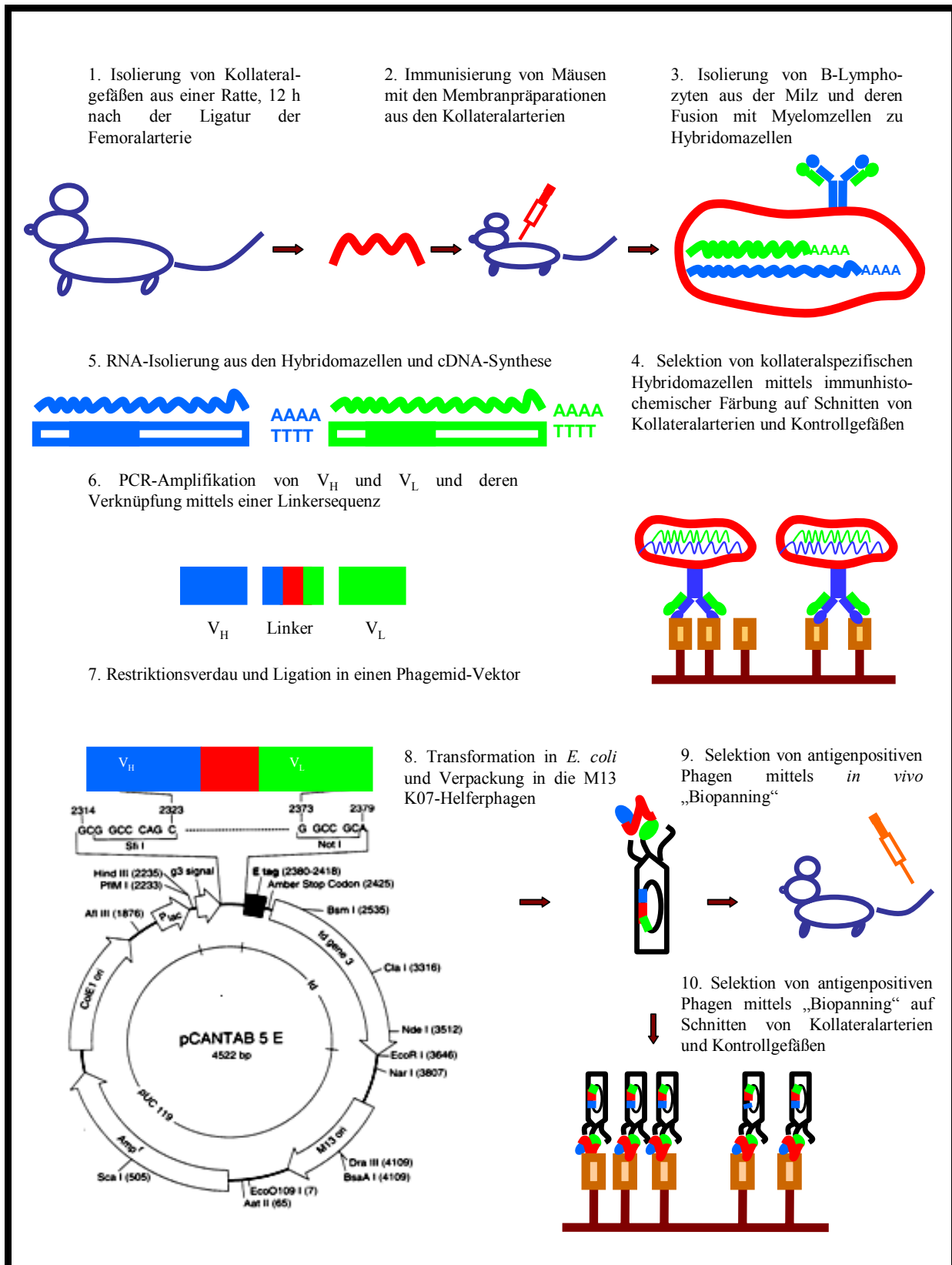


Abb. 2.4: „Phage display“-Technologie zur Herstellung von antigenspezifischen, rekombinanten Antikörpern; Darstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Strategie

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Expression rekombinanter scFv-Antikörperfragmente in *Escherichia coli*

Die Herstellung von löslichen scFv-Proteinen erfolgte in bakteriellen *E. coli*-Expressionssystemen. Hierzu wurden zwei verschiedene Vektorkonstrukte (aus pCANTAB 5 E- und pET15b-Vektoren) mit unterschiedlichen Bakterienstämmen (BL21[DE3] und HB2151) ausgetestet.

Die im pCANTAB 5 E -Vektor ligierten Antikörperfragmente wurden in der Regel zunächst in den TG1 *E. coli*-Bakterien vermehrt, dann über „Biopanning“ von scFv-präsentierenden Phagen ausselektiert und anschließend im HB2151-Bakterienstamm als lösliche Proteine exprimiert. Für die Produktion der löslichen scFv mussten die HB2151-Bakterien zuvor mit antigenspezifischen Phagen infiziert werden. Dazu wurden jeweils 100 µl einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur in 10 ml 2 x YT-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,3-0,5$) angezogen, mit 1 ml der zu untersuchenden Phagensuspension (10^{12} Phagen/ml) infiziert und für 2 h bei 37°C unter ständigem Schütteln (150 rpm) inkubiert. Jeweils ein Aliquot (100 ml) der infizierten Bakterienkultur wurde daraufhin auf SOBAG-N-Agarplatten (siehe 2.1.7) ausgestrichen und üN bei 30°C kultiviert. Als Negativkontrollen dienten reine HB2151-Bakterien, die auf Minimalagar ausplattiert und unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert wurden. Die frisch gewachsenen Bakterienkolonien (nicht älter als 1 Woche) wurden dann gepickt, in 100 ml 2 x YT-AG-Medium (rekombinante Klone) oder 2 x YT-G-Medium (Negativkontrollen) überführt und unter Schütteln (250 rpm) üN bei 30°C angezogen. Für die Expressionsexperimente im Großmaßstab (1 Liter) wurden jeweils 225 ml 2 x YT-AG-Medium (oder für die Negativkontrollen 2 x YT-G-Medium) in vier Erlenmeyerkolben vorgelegt, mit 25 ml der üN-Kulturen pro Kolben inokuliert und zunächst für 1 h bei 30°C (250 rpm) inkubiert. Die Bakterien sind danach in Beckman-Flaschen überführt und für 20 min bei RT sowie 1.500 x g zentrifugiert worden. Die Überstände wurden vorsichtig entfernt und die Sedimente in 250 ml 2 x YT-A-Medium (bzw. 2 x YT-Medium für die Negativkontrollen) resuspendiert. Zur Induktion der Proteinexpression sind alle Proben mit 1 mM IPTG versetzt und für weitere 4, 8, 14 oder 20 h bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert worden.

Die Expression der im pET 15 b -Vektor klonierten Antikörperfragmente erfolgte ausschließlich in *E. coli* BL21(DE3)-Bakterien. Vor Beginn der Expressionsexperimente wurde dieser Bakterienstamm zunächst mit den durch „Biopanning“ ausselektierten scFv-Vektoren transformiert und auf LB-Amp.- (rekombinante Bakterienklone) bzw. Minimal-

agarplatten (Negativkontrollen) angezogen. Ampicillinresistente, positive Klone wurden dann gepickt und üN in 100 ml 2 x YT-AG-Medium (bzw. 2 x YT-G-Medium, Negativkontrolle) bei 37°C (250 rpm) vermehrt. Am folgenden Tag wurden jeweils 25 ml Aliquots der üN-Kulturen in 250 ml 2 x YT-AG-Medium (bzw. 2 x YT-G-Medium, Negativkontrolle) bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6-0,8$) bei 37°C (250 rpm) kultiviert und dann zur Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG versetzt. Die Ansätze wurden anschließend für weitere 4, 8, 14 oder 20 h unter Schütteln (250 rpm) bei 30°C inkubiert.

2.5.2 Isolierung rekombinanter Proteine aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung löslicher scFv aus HB2151 *E. coli*-Stämmen wurden sowohl Kulturüberstände, als auch die periplasmatischen sowie zytosolischen Fraktionen der Zellextrakte verwendet. Nach Induktion der Proteinexpression sind die Bakterienzellen zunächst durch Zentrifugieren (20 min bei RT und 1.500 x g) geerntet worden. Die Kulturüberstände wurden vorsichtig abgenommen, durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert, mit einem Protease-Inhibitor (siehe 2.1.6) versetzt und bis zur weiteren Verarbeitung (siehe 2.5.4.1) bei -20°C gelagert. Für die Untersuchung der periplasmatischen Proteine wurden die Bakterienpellets zunächst in 5 ml eiskaltem 1 x TES-Puffer resuspendiert, dann mit 8,5 ml ebenfalls eiskaltem 1/5 x TES Puffer für 30 min auf Eis extrahiert und anschließend in 50 ml Beckmannröhrchen überführt und für 20 min bei 10.000 x g sowie 4°C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die proteinhaltigen Überstände miteinander vereinigt, durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert, mit einem Protease-Inhibitor versetzt und bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert. Für die Präparation zytosolischer Proteine sind die Bakterienpellets zunächst in 5 ml 1 x PBS Puffer resuspendiert, dann für 5 min aufgekocht und anschließend für 20 min bei 10.000 x g sowie 4°C zentrifugiert worden. Die Sedimente wurden entfernt und die proteinhaltigen Überstände wie bereits beschrieben behandelt.

Zur Gewinnung von löslichen Antikörperfragmenten aus dem BL21(DE3) *E. coli*-Stamm sind ausschließlich periplasmatische Zellextrakte verwendet worden. Hierfür wurden die mit IPTG induzierten Bakterienkulturen zunächst für 10 min bei 3.000 x g und 4°C sedimentiert. Die Überstände wurden verworfen und die pelletierten Bakterien mit jeweils 2,5 ml Periplasma-Aufschlusspuffer (PPP Puffer, siehe 2.1.7) auf Eis resuspendiert. Daraufhin folgte die Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 1 mM und eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden jeweils zwei ursprungsgleiche Periplasmaextrakte in einem 50 ml Nalgene-Röhrchen miteinander vereinigt und für 15 min bei 3.000 x g sowie

4°C zentrifugiert. Die proteinhaltigen Überstände wurden in sterile Reagenzröhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Sedimente wurden in 10 ml 5 mM MgSO₄ aufgenommen, mit EDTA bis zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt, für weitere 15 min auf Eis inkubiert und anschließend wie bereits beschrieben zentrifugiert. Nach dem wiederholten Extraktionsvorgang wurden die beiden Überstände miteinander vereinigt und zur Beseitigung von eventuellen Zelltrümmern nochmals für 25 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die auf diese Weise gewonnenen Periplasmaextrakte wurden anschließend durch einen 0,45 µm Filter steriltfiltriert, mit einem Protease- Inhibitor versetzt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

2.5.3 Dialyse von Proteinextrakten

Zur Entfernung von Salzen, niedrigmolekularen Reagenzien sowie zur Umpufferung sind einige Proteinextrakte (siehe 2.5.4.2) dialysiert worden. Die zu diesem Zweck verwendeten Dialyseschläuche (Schlauchdurchmesser: 29 mm, Porengröße: 25Å, Moleküldurchlässigkeit: 12-14 kDa) wurden unmittelbar vor ihrem Einsatz, zur Vorbeugung vor möglichen Schwermetall-, Protease- sowie Nuklease-Kontaminationen, eine halbe Stunde in einem Becherglas mit 50 mM EDTA-Lösung gekocht. Danach wurde die Lösung abdekantiert und die Prozedur mit ddH₂O anstelle von EDTA achtmal wiederholt (Cooper, 1981). Nach dieser Behandlung wurden die Dialyseschläuche an einem Ende abgeklemmt, mit den zu untersuchenden Proteinextrakten gefüllt und zuletzt unter Einschluss einer Luftblase am anderen Ende ebenfalls verschlossen. Die auf diese Weise präparierten Proben sind dann in Bechergläser mit 2 Liter 1 x PBS-Puffer überführt und unter Rühren mit dreimaligem Pufferwechsel zunächst 3 x 2 h und anschließend üN bei 4°C dialysiert worden. Die dialysierten Proteinextrakte wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

2.5.4 Anreicherung und Reinigung von rekombinanten Antikörpern

2.5.4.1 Reinigung von E-tag gekoppelten scFv-Antikörpern

Die Aufreinigung von E-tag gekoppelten scFv-Antikörpern aus Kulturüberständen sowie periplasmatischen und zytosolischen Extrakten erfolgte mittels einer HiTrap Anti-E-tag Säule (siehe 2.1.6). Die in den zu untersuchenden Fraktionen gelösten Antikörperfragmente trugen auf ihrem C-terminalen Ende eine aus 13 Aminosäuren bestehende E-tag-Sequenz. Dieses Peptid konnte durch einen Anti-E-tag-Antikörper erkannt werden, welcher an die Matrix der Säule kovalent gebunden war. Die Bindung der scFv an die Anti-E-tag Säule erfolgte bei

einem neutralen pH-Wert. Durch die anschließende Absenkung des pH-Wertes auf 3,0 konnten die Antikörperfragmente aus der Säule erfolgreich eluiert werden.

Die in dieser Arbeit verwendete Anti-E-tag Säule wurde mittels einer peristaltischen Pumpe (siehe 2.1.10) betrieben. Vor Experimentbeginn mussten alle Gummischläuche zunächst mit ddH₂O und dann mit Bindungspuffer (siehe 2.1.7) durchgespült werden. Daraufhin wurde die Säule mit 30 ml Elutionspuffer bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 ml/min regeneriert und anschließend mit 50 ml Bindungspuffer äquilibriert. Danach erfolgte die Bindung der zu untersuchenden Proteinlösungen an die Säulenmatrix bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Um die Konzentration an gebundenen scFv zu erhöhen, ist dieser Vorgang jeweils dreimal wiederholt worden. Zur Entfernung von überschüssigen, unspezifischen *E. coli*-Proteinen wurde die Säule bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 ml/min mit 50 ml Bindungspuffer gewaschen. Darauf folgte die Elution der an die Anti-E-tag-Matrix gebundenen scFv mit 15 ml Elutionspuffer, bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 ml/min, in 3 Falcon-Röhrchen. Die 4 ml Eluat des ersten Röhrchens enthielten in der Regel keine löslichen Proteine und konnten verworfen werden. Die zweite, proteinhaltige Fraktion (6 ml) wurde zur pH-Wert Stabilisierung mit 600 µl Neutralisationspuffer versetzt, dann mit Protease-Inhibitor komplettiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C aufbewahrt. Das dritte Eluat (5 ml) enthielt gewöhnlich keine funktionellen scFv und wurde in den meisten Fällen ebenfalls verworfen. Die Anti-E-tag Säule wurde anschließend mit 50 ml Bindungspuffer reäquilibriert, mit 0,05% NaN₃ versetzt und bis zum weiteren Einsatz bei 4°C gelagert.

2.5.4.2 Reinigung von His₆-tag gekoppelten scFv-Antikörpern

Die aus Periplasmaextrakten isolierten, His₆-tag markierten scFv-Antikörper sind nach der Dialyse (siehe 2.5.3) über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt worden. Zu diesem Zweck mussten die untersuchten Antikörperfragmente, über ihre N- bzw. C-terminal gekoppelten Oligo-Histidin-Peptide, an eine mit Ni-Ionen beladene NTA-Agarose-Matrix (siehe 2.1.6) gebunden werden. Mehrmaliges Reinigen der Proteinlösungen über die mit Ni-NTA-Agarose gefüllte Säule führte letztlich zu hoher Anreicherung der rekombinanten Proteine. Die angereicherten scFv wurden anschließend durch kompetitive Verdrängung mittels Imidazol aus der Matrix eluiert.

Für die Reinigung von löslichen Antikörperfragmenten wurde zunächst eine 10 ml „Gravity-flow-type“-Einwegsäule (siehe 2.1.6) mit 500 µl Ni-NTA-Agarose (Bindekapazität: 5-10 mg/ml Protein) gefüllt und dann mit 20 ml 1 x PBS-Puffer äquilibriert. Daraufhin wurde

die dialysierte Probe insgesamt dreimal auf die Säule aufgetragen. Die unspezifischen Proteine wurden folgend mit 20 ml Waschpuffer S (siehe 2.1.7) von der Säulenmatrix abgelöst und ausgewaschen. Die Zielproteine sind anschließend durch viermalige Applikation von jeweils 2 ml Elutionspuffer S (siehe 2.1.7) von der Säule eluiert worden. Zur Entfernung des im Elutionspuffer S vorhandenen Imidazols mussten die Proben vor einem weiteren Einsatz (z.B für die Proteinbestimmung oder Western Blot) dialysiert werden (siehe 2.5.3). Die aufgereinigten Proteinlösungen wurden anschließend mit Protease-Inhibitor versetzt und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert.

2.5.5 Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration

Die Aufkonzentrierung von gereinigten scFv-Lösungen erfolgte mittels einer Ultrafiltration, die unter Verwendung von Centrikon YM-10-Zentrifugalkonzentratoren (siehe 2.1.6) durchgeführt wurde. Hierzu sind 2 ml der zu untersuchenden Proteinlösung in ein Centrikon-Röhrchen pipettiert und für 1 h in einem Festwinkel-Rotor (JA-20, siehe 2.1.10.) bei 5.000 x g sowie 4°C zentrifugiert worden. Da die verwendeten Konzentratoreinheiten über eine Ausschlussgrenze von 10 kDa verfügten, konnten während des Zentrifugierens alle niedrigmolekularen Proteine herausfiltriert und die Zielproteine unter gleichzeitiger Verringerung des Probenvolumens aufkonzentriert werden. Die ursprungsgleichen scFv-Proben wurden anschließend miteinander vereinigt und entweder direkt für die Proteinbestimmung eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.5.6 Isolierung von CTA mittels Protein L-Säule

Zur Isolierung von CTA-157-2 (collateral targeting antibody) aus den Überständen von Hybridomazellen wurden Protein L-Säulen (siehe 2.1.8) verwendet. Protein L ist ein immunoglobulinbindendes Molekül, welches ursprünglich aus dem anaeroben Bakterium *Peptostreptococcus magnus* isoliert wurde (Bjorck, 1988). Es bindet an die κ - leichte Kette von Antikörpern, scFv- sowie Fab-Fragmenten ohne deren Antigenbindungsstellen zu blockieren.

Für die Gewinnung von CTA-157-2 aus ca. 250 ml Kulturüberständen wurden in der Regel gleichzeitig mehrere Protein L-Säulen (5-10 Säulen) eingesetzt. Vor dem Experimentbeginn musste zunächst der in den Säulen vorhandene Lagerungspuffer entleert werden. Daraufhin wurden die Säulen mit jeweils 10 ml Bindungspuffer äquilibriert. Der Hybridomaüberstand wurde dann im Verhältnis von 1:2 mit demselben Bindungspuffer verdünnt und für die CTA-Isolierung portionsweise (jeweils 5 ml) auf die bereits äquilibrierten Säulen verteilt. Zur Entfernung von ungebundenen Proteinen sind die Säulen anschließend mit jeweils 25 ml

Bindungspuffer gewaschen worden. Die Elution des gebundenen Antikörpers erfolgte mit jeweils 6 ml Elutionspuffer pro Säule. Das Eluat wurde hierbei in mehreren 1 ml Fraktionen aufgefangen und im Verhältnis von 1:10 mit Neutralisationspuffer versetzt. Darauf folgte die Proteinkonzentrationsbestimmung der einzelnen Eluate mittels photometrischer Messung bei einer Absorption von 280 nm. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden anschließend miteinander vereinigt, mit einem Protease-Inhibitor versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentration gereinigter Proteinlösungen wurde nach Bradford (1976) unter Verwendung von Bio-Rad Protein Assay ermittelt. Diese Methode beruht auf einer Komplexbildung zwischen dem blauen Säurefarbstoff Coomassie-Brillantblau G-250 mit Proteinen. Bei der Bindung von Coomassie-Brillantblau G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (mit Protein). Die Zunahme der Absorption auf 595 nm stellt hierbei ein Maß für die Proteinkonzentration in einer Probenlösung dar (Rehm, 2000).

Vor Beginn der Proteinbestimmung wurde das Bradford-Reagenz zunächst mit ddH₂O im Verhältnis von 1:5 verdünnt und dann zur Beseitigung von eventuell präzipitierten Farbstoffpartikeln durch einen Whatman-Filter filtriert. Die untersuchten Proteinproben sind für die Konzentrationsbestimmung zunächst mit 0,9%-iger NaCl-Lösung im Verhältnis von 1:10, 1:50 oder 1:100 verdünnt worden. Jeweils 100 µl der verdünnten Proteinlösungen wurden dann im Reagenzröhrchen mit 1 ml Farbstofflösung sorgfältig gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Proteinproben bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Um die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung zu erhöhen, wurden für jede Proteinmessung Dreifachansätze präpariert. Als Leerwert diente hierbei die zur Verdünnung der Proben verwendete, proteinfreie NaCl-Lösung, welche zuvor im Verhältnis von 1:10, 1:50 oder 1:100 mit dem entsprechenden Elutions- bzw. Dialysepuffer versetzt und dann mit 1 ml Farbstoffreagenz, wie bereits erwähnt, inkubiert wurde. Zur Quantifizierung des Proteingehaltes ist eine Standardreihe mit Rinderserum-Albumin (BSA) in Konzentrationen von 0,09; 0,19; 0,375; 0,75; und 1,5 µg/µl wie oben beschrieben angefertigt worden. Anhand der im Photometer gemessenen Extinktionswerte wurde anschließend eine Standardkurve erstellt und die Proteinkonzentration der Proben daraus ermittelt.

2.5.8 SDS-PAA-Gelelektrophorese

Der Nachweis sowie die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgten mittels einer denaturierenden und diskontinuierlichen SDS-PAA-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Bei diesem Verfahren werden die Proteine durch die Bindung an das Detergenz SDS in einem konstanten Ladung zu Masse-Verhältnis negativ geladen und ihre Tertiär- sowie Sekundärstrukturen werden durch das Aufspalten von Wasserstoffbrücken sowie die Streckung der Moleküle aufgehoben. In einem elektrischen Feld wandern die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe zur positiven Elektrode (Anode) und werden dabei durch den Siebeffekt der porösen Polyacrylamidgelmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Mit Hilfe von Längenstandards (siehe 2.1.5), die zusammen mit den untersuchten Proben das Polyacrylamidgel durchwandern, können im Anschluss an die Elektrophorese die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die SDS-PAA-Gelelektrophorese 12%-, 15%- bzw. 20%-ige Trenngelle und 4%-ige Sammelgelle (siehe 2.1.7) in einem Mini-Protean 3 Cell Proteingel-System (Bio-Rad) angefertigt. Hierzu wurden zunächst seitlich zwischen zwei gereinigte Glasplatten zwei Abstandshalter (Tiefe: 1 mm) positioniert. Diese Vorrichtung wurde dann in einem Gelträger fixiert und zum Gießen des Gels in eine dafür vorgesehene Gießhalterung eingespannt. Daraufhin wurde Trenngel bis zu 3/4 der Höhe der Glasplatten eingefüllt. Das frisch gegossene Trenngel wurde zum Glätten sowie zum Ausschluss von Luftblasen mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels (ca. 30 min) wurde die Isopropanolschicht vorsichtig abgegossen, die Gelkante mit ddH₂O ausgespült und mit Filterpapierstreifen getrocknet. Auf das Trenngel wurde im Folgenden bis zur Oberkante der Glasplatten das Sammelgel gegossen, in welches anschließend ein Kamm mit 10 Taschen eingesetzt wurde. Nach der Polymerisation des Sammelgels (ca. 15 min) wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die entstandenen Taschen wurden zur Beseitigung von restlichen Gelstücken mit dem Elektrophorese-Laufpuffer (siehe 2.1.7) ausgespült. Die Gelplatte ist dann zusammen mit einer zusätzlichen Glasplatte in die Elektrophoresehalterung eingespannt worden. Der Raum zwischen den beiden Platten wurde mit dem PAA-Laufpuffer gefüllt und die gesamte Vorrichtung anschließend in die SDS-Gelelektrophoresekammer eingesetzt. Nachdem die Elektrophoresekammer ebenfalls mit dem Laufpuffer gefüllt wurde (ca. 1/3 der Kammer), konnten die zu untersuchenden Proben sowie der Längenstandard in die Taschen des Gels aufgetragen werden. Die Proteinproben wurden zuvor im Verhältnis von 1:2 mit Ladepuffer (siehe 2.1.7) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Sollten bei den zu untersuchenden Proteinen Disulfidbrücken reduziert werden, so wurde der verwendete

Ladepuffer noch zusätzlich mit 1%-igem β -Mercaptoethanol versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 Volt gestartet. Nachdem die Lauffront der Proben das Trenngel erreicht hat (ca. 30-40 min), wurde die Spannung auf 160 Volt erhöht. Nach vollständiger Auftrennung der Proteine ist das Gel von der Glasplatte gelöst und zur Visualisierung der Proteinbanden für Färbungen (siehe 2.5.9) oder Western Blot (siehe (2.5.10) eingesetzt worden.

2.5.9 Färbungen von Polyacrylamidgelen

2.5.9.1 Coomassie-Färbung

Mit Hilfe der Coomassie-Färbung wurden nach der Elektrophorese alle Proteine im PAA-Gel fixiert und unspezifisch angefärbt. Aufgrund einer geringen Empfindlichkeit konnten mit dieser Färbungsmethode ausschließlich Proteinmengen oberhalb der Nachweisgrenze von 200-400 ng Protein/Bande visualisiert werden.

Vor der Anfärbung wurde das PAA-Gel zunächst in eine gereinigte Plastikschaale überführt und auf einem Schüttler (siehe 2.1.10) unter leichtem Schwenken mit jeweils 200 ml ddH₂O 3 x 5 min gewaschen. Darauf folgte die Färbungsreaktion mit 50 ml Coomassie-Lösung unter leichtem Schwenken bei RT. Bereits nach 20 min konnten die ersten Proteinbanden erkannt werden. Mit Erreichen der maximalen Farbintensität (nach ca. 1 h) wurde die Reaktion beendet. Das Gel wurde dann 30 min unter Schwenken mit ddH₂O gewaschen und für die Dokumentation im Computer eingescannt. Anschließend wurde das Gel zwischen zwei Cellophanfolien gelegt, in eine aus zwei Rahmen bestehende Vorrichtung eingespannt und üN bei RT luftgetrocknet. Das getrocknete Gel konnte so über einen längeren Zeitraum lichtgeschützt aufbewahrt werden.

2.5.9.2 Silberfärbung

Zum Nachweis von Proteinen, die durch Coomassie-Färbung nicht visualisiert werden konnten, wurde die Silberfärbung durchgeführt. Diese Färbungsmethode ist deutlich empfindlicher als die vorgenannte und erreicht Nachweisgrenzen von 5-30 ng Protein/Bande. Hierbei binden die Silber-Ionen an Glu-, Asp- und Cys-Reste der aufgetrennten Proteine, was zur Entstehung von Ag⁺-Protein-Komplexen führt. Die Silber-Ionen dieser Komplexe werden anschließend durch starke Reduktionsmittel (z.B. Formaldehyd) zu metallischem Silber reduziert, welches wiederum eine Art Schwärzung und somit Anfärbung von Proteinbanden im Gel verursacht.

Die Färbung der PAA-Gele wurde in mehreren Plastikschaalen auf einem Schüttler (siehe 2.1.10) durchgeführt. Die Proteine wurden zunächst durch 30-minütige Inkubation in 100 ml Fixierungslösung A (siehe 2.1.7) und dann durch 10-minütige Inkubation in 100 ml Fixierungslösung B im Gel fixiert. Danach ist das Gel mit 100 ml ddH₂O 2 x 10 min gewaschen und zur Erhöhung der Sensitivität für 1 min in 100 ml 0,02%-iger Natriumthiosulfatlösung inkubiert worden. Das Gel wurde anschließend mit ddH₂O 2 x 1 min gewaschen und zum Färben für 30 min in 100 ml Färbelösung (siehe 2.1.7) inkubiert. Nach erneutem Waschen (2 x 1 min mit ddH₂O) ist das Gel in eine Schale mit 100 ml Entwicklungslösung überführt und bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden entwickelt worden. Nachdem die maximale Farbintensität der Proben erreicht wurde, konnte die Reaktion, durch Überschichten des Gels mit 5 ml 2,3 M Citronensäure, abgestoppt werden. Das Proteingel wurde daraufhin 15 min mit ddH₂O gewaschen und wie im Kapitel 2.5.9.1 bereits beschrieben dokumentiert sowie luftgetrocknet.

2.5.10 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis der im SDS-PAA-Gel aufgetrennten Proteine wurden diese zunächst in einem Western Blot Verfahren unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (siehe unten) und dann mittels spezifisch bindender, enzymkonjugierter Antikörper detektiert (siehe 2.5.12).

Der Proteintransfer erfolgte unter Verwendung der „Mini Trans-Blot“-Apparatur von der Firma Bio-Rad (siehe 2.1.10). Hierzu wurden zunächst zwei Filterpapierstücke sowie eine Nitrocellulose-Membran in der Größe des untersuchten PAA-Gels zugeschnitten und anschließend zusammen mit zwei Blotting-Schwämmen für 5 min im Blotting-Puffer (siehe 2.1.7) eingeweicht. Das zu untersuchende Gel wurde unmittelbar nach der Elektrophorese (siehe 2.5.8) von den Glasplatten abgelöst und ebenfalls in den Blotting-Puffer überführt. Folgend wurde eine Blotting-Gitterkassette nach dem „Sandwich“-Prinzip mit einem Schwamm, einem Filterpapier, dem Gel, der Membran, dem zweiten Filterpapier und dem zweiten Schwamm nacheinander, luftblasenfrei bestückt und nach kräftigem Zusammendrücken der aufeinander liegenden Schichten verschlossen und senkrecht in die Blotting-Einheit eingehängt. Da die im Gel vorhandenen Proteine durch SDS negativ geladenen waren, musste die Gitterkassette für einen erfolgreichen Proteintransfer mit der Gelseite zur Kathode und mit der Membranseite zur Anode ausgerichtet werden. Die Blotting-Einheit wurde dann zusammen mit einem Kühlaggregat in eine Blotting-Kammer überführt und diese bis zum Rand mit Blotting-Puffer aufgefüllt. Der Proteintransfer erfolgte für 1 h bei 110 Volt.

Anschließend wurde das Gel verworfen und die Nitrocellulose-Membran für die Detektion von Proteinen weiterverwendet (siehe 2.5.11 und 2.5.12).

2.5.11 Ponceaurotfärbung von Proteinen auf Blots

Zur Verifizierung des Proteintransfers auf einer Nitrocellulose-Membran wurde diese unmittelbar nach dem Western Blot mit dem wasserlöslichen Farbstoffreagenz namens Ponceau S (siehe 2.1.6) unspezifisch angefärbt. Diese als Ponceaurotfärbung bezeichnete Färbemethode erreicht eine Nachweisgrenze von 50-150 ng Protein/Bande und ist somit sensitiver als die Coomassie-Färbung eines Gels.

Zum Anfärben von geblotteten Proteinen wurde die Nitrocellulose-Membran in eine Schale mit 50 ml Ponceau S-Lösung überführt und unter leichtem Schwenken für 5 min bei RT inkubiert. Nach dem Abgießen des Farbstoffes ist die Membran zur Beseitigung von unspezifischer Hintergrundfärbung für 1 min mit ddH₂O gewaschen und anschließend für die Dokumentation der Proteinbanden im Computer eingescannt worden. Die dokumentierte Ponceaurotfärbung wurde letztlich durch erneutes Waschen (3 x 10 min) mit Waschpuffer A vollständig entfernt und die Membran für die darauf folgende Immundetektion weiterverwendet.

2.5.12 Immundetektion

Mittels Immundetektion konnten die geblotteten Proteine unter Verwendung von enzymkonjugierten Antikörpern und einem ECL-Detektionssystem (siehe 2.1.8) sensitiv und spezifisch auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Das Prinzip dieser Nachweismethode beruht auf einer Oxidationsreaktion, die von peroxydasemarkierten Sekundärantikörpern katalysiert wird. Hierbei wird durch die Oxidation des im ECL-Reagenz vorhandenen Luminols eine Chemilumineszenz ausgelöst, die mit Hilfe von Autoradiographie in Form von Proteinbanden auf einem Film festgehalten werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Immunreaktion nach zwei unterschiedlichen Versuchsprotokollen durchgeführt worden. Zur Detektion von E-tag-markierten scFv-Antikörpern wurde die Membran zunächst 1 x 10 min mit Waschpuffer A (siehe 2.1.7) gewaschen, dann in eine Schale mit Blocking Puffer D (siehe 2.1.7) überführt und unter leichtem Schwenken in N bei 4°C geblockt. Nachdem die freien Proteinbindungsstellen der Blotmembran abgesättigt waren, wurde diese in mehreren Schritten gewaschen (1 x 10 min mit Waschpuffer A; 2 x 10 min mit Waschpuffer B; 1 x 10 min mit Waschpuffer A). Daran schloss sich eine Inkubation des Blots mit dem Primärantikörper (Anti-E-tag) für 1 h bei RT unter Schwenken an. Ungebundener Antikörper wurde anschließend durch erneutes

Waschen (s.o.) entfernt und die Membran mit einem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper (GAM-PO), wie bereits beschrieben, inkubiert. Nach weiterem Waschen (s.o.) wurde der Blot zur Visualisierung der antikörpermarkierten Proteinbanden für 1 min mit 6 ml ECL-Lösung (1 Vol. Reagenz 1 + 1 Vol. Reagenz 2) inkubiert und dann auf einem Röntgenfilm (5 sec bis 5 min) exponiert. Der Film wurde anschließend entwickelt und zum Dokumentieren im Computer eingescannt.

Für die Immunfärbung von His₆-tag gekoppelten scFv-Antikörpern ist die Membran unmittelbar nach dem Blot zunächst für 10 min mit 1 x TBS-Puffer gewaschen und dann zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen mit Blocking Puffer C üN bei 4°C unter Schwenken inkubiert worden. Durch die darauf folgenden Waschschritte (2 x 10 min mit 1 x TBS/Tween-Puffer und 2 x 10 min mit 1 x TBS/Tween/Triton-Puffer) wurde der Blocking Puffer entfernt und die Membran mit dem Primärantikörper (His₆-tag) für 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Nach der Inkubation wurde restlicher, ungebundener Antikörper ausgewaschen (s.o.), die Membran mit einem Sekundärantikörper (GAM-PO) überschichtet und, wie schon oben erwähnt, inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde durch anschließendes Waschen entfernt (s.o.) und die Immunfärbung der Proteine wie bereits beschrieben detektiert.

Sollte dieselbe Membran ein weiteres Mal verwendet werden, so mussten die gebundenen Antikörper durch 15-minütige Inkubation in einer 1:10 verdünnten, wässrigen Re-Blot-Plus-Strang-Lösung (siehe 2.1.8) entfernt werden. Das Reagenz wurde anschließend verworfen, die Membran mit entsprechendem Waschpuffer ausgespült (s.o.) und nach dem darauf folgenden Blocken (s.o.) für eine neue Immunfärbung eingesetzt.

2.6 Immunhistochemische Methoden

2.6.1 Anfertigung von Gefrierschnitten und Paraffinschnitten

Für die immunhistochemischen Untersuchungen von Rattengefäßen wurden mit Hilfe eines Kryostaten (siehe 2.1.10) Gefrierschnitte angefertigt. Die frisch herauspräparierten Rattengefäße wurden unmittelbar nach der Entnahme zunächst mit einem Skalpel in fünf kleine Abschnitte aufgeteilt (stem, midzone 1-3, reentry), dann mit Tissue-Tek (siehe 2.1.6) auf den dafür zugeschnittenen Korkplatten befestigt, in ein Falcon-Röhrchen mit kaltem n-Hexan überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Proben konnten bis zum weiteren Einsatz bei -80°C gelagert werden. Zur Anfertigung von Schnittpräparaten wurden die Gefäße zunächst mit einem Skalpel von den Korkplatten

abgelöst, dann mit Tissue-Tek auf einem vorgekühlten Kryostempel befestigt und anschließend im Kryostaten bei -26°C in mehrere $7\ \mu\text{m}$ dicke Scheiben geschnitten. Die frisch hergestellten Gefrierschnitte wurden dann auf die Superfrost-Objektträger platziert und für ca. 5-10 min bei RT getrocknet. Die fertigen Gefäßpräparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die immunhistochemischen Analysen von humanen Gefäßproben wurden Paraffinschnitte angefertigt. Die zur Verfügung gestellten, formalinfixierten Patientengefäße (siehe 2.1.1) wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau K. Miete (UKE Hamburg, Institut für Anatomie I, Arbeitsgruppe von Herrn Dr. S. Ergün) zunächst in Paraffinblöcke eingebettet und anschließend unter Verwendung eines Mikrotoms (siehe 2.1.10) geschnitten.

2.6.2 Anfertigung von Zellpräparaten

Zur Herstellung von Zellpräparaten wurden die zu untersuchenden Endothelzellen (siehe 2.1.2) zunächst in Zellkulturflaschen angezogen (siehe 2.2.2) und dann, nach Erreichen des Subkonfluenzstadiums, in sogenannte Chamber slides überimpft. Die hierfür verwendeten Chamber slides bestanden in der Regel aus 8 Kammern mit einer Kulturoberfläche von $0,7\ \text{cm}^2/\text{Kammer}$.

Die geernteten Zellen wurden zunächst in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 8 ml des entsprechenden Kulturmediums (siehe 2.1.7) aufgenommen und sorgfältig gemischt. Danach sind jeweils 0,4 ml Aliquots einer Zellsuspension in die einzelnen Kammern der Chamber slides pipettiert und für 1,5 Tage (ca. 32-36 h) in einem CO_2 -Inkubator ($5\% \text{CO}_2$) bei 37°C kultiviert worden. Das Kulturmedium wurde anschließend entfernt und die Zellen 2 mal mit 1 x PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Polystyrol-Aufsätze der Chamber slides abgenommen und die fertigen Zellpräparate entweder sofort fixiert (siehe 2.6.4) oder für 30 min luftgetrocknet und dann für immunhistochemische Färbungen weiterverwendet.

2.6.3 Fixierung und Entparaffinierung von Gewebeschnitten

Die immunhistologischen Nachweise mittels Peroxydase erfolgten unter Verwendung von unfixierten, acetonfixierten sowie paraffinfixierten Gewebeschnitten. Bei der Acetonfixierung wurden die Gefäßpräparate zunächst für 5 min in einer mit 50 ml eiskaltem Aceton gefüllten Waschküvette bei -20°C inkubiert, dann für 30 min bei RT getrocknet und anschließend für Färbungsexperimente weiterverwendet. Die in Paraffinblöcke eingebetteten Gefäßproben sind vor jeder Immunfärbung zunächst in einer sogenannten absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert worden. Um das Paraffin aus dem Gewebe vollständig herauszulösen, wurden die Schnitte zunächst 4×5 min in einer Xylolersatzlösung (siehe 2.1.6) inkubiert. Danach

wurden die Gefäßpräparate nacheinander für jeweils 2 x 5 min mit 100%-igem Isopropanol, 96%-igem Ethanol sowie 70%-igem Ethanol rehydriert und anschließend mit ddH₂O, 1 x PBS-Puffer sowie Lösung A (jeweils 2 x 5 min) gewaschen. Alle Entparaffinierungsschritte sind in Waschküvetten (50 ml) durchgeführt worden. Die entparaffinierten Gefäßproben konnten im Folgenden für immunhistochemische Färbungen eingesetzt werden.

Die Immunfluoreszenzanalysen wurden in der Regel unter Verwendung von paraffin(s.o.) sowie ethanolfixierten Gefäßpräparaten durchgeführt. Für die Ethanolfixierung wurden die Gewebeschnitte zunächst für 20 min in einer Waschküvette mit eiskaltem Ethanol-Fixans (siehe 2.1.7) bei -20°C inkubiert und dann für 30 min bei RT getrocknet. Die fixierten Gefäßproben wurden entweder direkt für eine Immunfärbung eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.6.4 Fixierung von Zellen

Für die immunhistochemischen Analysen wurden die zu untersuchenden Zellpräparate einer sogenannten langsamen Acetonfixierung unterzogen. Alle Fixierungsschritte erfolgten hierbei ebenfalls (s.o.) unter Verwendung von 50 ml Waschküvetten. Die frisch gewaschenen Zellen (siehe 2.6.2) sind für die Fixierung zunächst in einer Aceton/PBS-Lösung (1:2) für 1,5 min inkubiert worden. Daraufhin wurden die Präparate für weitere 1,5 min bei RT mit reinem Aceton und anschließend für 3 min bei -20°C mit eiskaltem Aceton inkubiert. Die auf diese Weise hergestellten Zellpräparate wurden jeweils unmittelbar nach dem Fixierungsvorgang für die Immunfärbungen eingesetzt.

2.6.5 Immunhistologische Nachweise mittels Peroxydase

Die immunhistologischen Färbungen mit dem Markerenzym Peroxydase wurden unter Anwendung der indirekten oder der ABC-Nachweismethode durchgeführt.

Bei der Technik der indirekten Immunfärbung werden die zu untersuchenden Proben zunächst mit einem kommerziell erhältlichen, unkonjugierten Primärantikörper inkubiert. Während der Inkubation kommt es zur spezifischen Bindung zwischen dem verwendeten primären Antikörper und dem entsprechenden Antigen der Probe. Die ungebundenen Antikörperreste werden anschließend durch mehrmaliges Waschen entfernt und die Präparate im Folgenden mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist in der Regel gegen die Tierspezies gerichtet, aus der der Primärantikörper isoliert wurde. Des Weiteren ist der Sekundärantikörper mit einem Markerenzym konjugiert, welches gegen ein Farbstoffkomplex gerichtet ist, das ebenfalls das gleiche Markerenzym trägt. Während der Inkubation der Proben mit dem Sekundärantikörper wird infolge einer Enzym-Substrat-

Reaktion ein farbiges Endprodukt gebildet, welches anschließend durch lichtmikroskopische Vergleiche der angefärbten Präparate mit einer Negativkontrolle (Probe, die anstelle des Primärantikörpers mit Waschpuffer inkubiert wurde) als immunhistologischer Nachweis verifiziert werden kann.

Die für den Nachweis von einigen Antikörpern (siehe Ergebnisteil) eingesetzte ABC-Färbungsmethode (Avidin-Biotin-Komplex) macht sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000). Hierbei wird als sekundärer Antikörper ein sogenannter Brückenantikörper verwendet, welcher mit Biotin markiert (biotinyliert) ist. Dieser bindet mit hoher Affinität an ein aus Streptavidin bestehendes ABC-Komplex, das mit einem Enzym (z.B. Peroxydase) gekoppelt ist. Bei der darauf folgenden Enzym-Substrat-Reaktion entsteht ein farbiges Endprodukt, welches, wie bereits beschrieben (s.o.), lichtmikroskopisch ausgewertet wird. Diese Nachweisteknik zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität aus und wurde für diejenigen immunhistochemischen Experimente angewandt, bei denen das Immunsignal eine Farbverstärkung benötigte.

Für die Durchführung der immunhistologischen Nachweise wurden Färbekästen sowie Waschküvetten verwendet. Zur Vorbeugung vor Austrocknung der Proben mussten die Färbekästen zuvor mit ddH₂O angefeuchtet werden. Vor jedem Experimentbeginn sind die fixierten Gewebe- bzw. Zellproben zunächst für 15 min in Lösung A (siehe 2.1.7) bzw. 1 x PBS-Puffer (für die Phagenfärbung) rehydriert worden. Im Anschluss daran wurden einige Präparate zur Absättigung von freien Bindungsstellen mit Blocking Puffer F (Zellpräparate) bzw. mit Blocking Puffer D (Proben für die Phagenfärbung) μ N bei 4°C inkubiert. Die Proben sind dann 3 x 5 min mit Lösung A gewaschen und anschließend mit 100-200 μ l des in Lösung A verdünnten Primärantikörpers (siehe 2.1.9) für 2 h bei RT (bzw. 2 h bei 37°C für die Phagenfärbung) inkubiert worden. Der überschüssige Antikörper wurde folgend durch dreimaliges Waschen (s.o.) entfernt und die Präparate für 1 h bei RT mit dem ebenfalls in Lösung A verdünnten Sekundärantikörper (100-200 μ l) inkubiert. Nach erneutem Waschen (s.o.) sind die Proben entweder mit einem weiteren, tertiären Antikörper inkubiert (ABC-Methode) oder direkt für eine Farbreaktion eingesetzt worden (indirekte Methode). Die Farbreaktion erfolgte unter Verwendung des Chromogens AEC (siehe 2.1.6). Dazu wurden die Präparate zunächst für 5 min in einer 0,1 M Natriumacetat-Lösung umgepuffert und dann mit 100-200 μ l der frisch angesetzten Färbelösung (siehe 2.1.7) unter Lichtabschluss für 5-10 min angefärbt. Die Reaktion wurde anschließend durch 5-minütige Inkubation in 10 mM EDTA-Lösung abgestoppt. Die Proben sind dann 5 min in Lösung A gewaschen und zur Gegenfärbung der Zellkerne für 30 sec in wässriger Mayers Hemalaun-Lösung (1:2) inkubiert

worden. Die überschüssigen Farbstoffreste wurden dann unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen und die angefärbten Präparate unter Verwendung eines DAKO-Einbettungsmediums mit entsprechenden Deckgläsern (siehe 2.1.6) luftdicht verschlossen. Die Proben wurden anschließend am Lichtmikroskop ausgewertet, fotografiert und für die Langzeitlagerung in abgedunkelten Präparatkästen bei RT aufbewahrt.

2.6.6 Immunfluoreszenznachweise

Die Immunfluoreszenznachweise sind unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern durchgeführt worden. Die in dieser Arbeit eingesetzten sekundären Antikörper waren in der Regel mit grün fluoreszierenden FITC-(Fluoresceinisothiocyanat) sowie Cy₂-Fluorochromen (Carbocyanin) konjugiert. Die Auswertung der Färbungsexperimente erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Hierbei wurden die fluorochromgekoppelten Antikörper durch die Absorption energiereicher Strahlen angeregt, was zu deren Lichtemission (Fluoreszenz) führte. Mit Hilfe entsprechender Emissionsfilter, die das Anregungslicht zurückhalten und nur das Emissionslicht durchlassen, konnte das Farbsignal im Präparat sichtbar gemacht werden. Die Spezifität des Farbsignals wurde anschließend durch den Vergleich mit einer Negativkontrolle überprüft, welche wie bereits beschrieben (siehe 2.6.5) präpariert wurde.

Die Immunfluoreszenzfärbungen sind abhängig von der Fixierungsart der zu untersuchenden Präparate unter verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführt worden. Die ethanolfixierten Gefäßproben wurden zum Rehydrieren zunächst mit 1 x PBS-Puffer (3 x 5 min) und dann mit Waschpuffer IF (für 5 min) in Waschküvetten inkubiert. Die rehydrierten Präparate wurden dann in feuchte Färbekästen überführt und dort mit 100-200 µl Blocking Puffer E für 30 min bei 37°C geblockt. Der Blocking Puffer wurde anschließend durch dreimaliges Waschen (in Waschküvetten, für jeweils 5 min) mit Waschpuffer IF entfernt und die Präparate mit 100-200 µl des verdünnten Primärantikörpers (verdünnt in 1%BSA/PBS/0,5% Glycin-Lösung) für 1 h in feuchten Färbekästen bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die überschüssigen Antikörperreste ausgewaschen (s.o.) und die Proben mit 100-200 µl des verdünnten (s.o.), fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpers wie bereits erwähnt (s.o.) inkubiert. Die ungebundenen Antikörpermoleküle wurden schließlich durch erneutes Waschen (3 x 5 min mit 1 x PBS Puffer) entfernt und die Präparate zur Gegenfärbung der Zellkerne mit einem ausgewählten Kernfarbstoff (DAPI, Propidiumjodid oder Hoechst B 2883) inkubiert. Bei der Gegenfärbung mit DAPI (siehe 2.1.6) sind die Präparate mit 100 µl der verdünnten Farbstofflösung (Verdünnung 1:60 in 1 x PBS) für 4 min

unter Lichtausschluss bei RT inkubiert worden. Für die Propidiumjoditfärbung wurde die 0,1%-ige Farbstofflösung (siehe 2.1.6) zunächst im Verhältnis von 1:100 mit 1 x PBS Puffer verdünnt, dann in 100 µl Aliquots auf die Proben gegeben und für 15 min bei 37°C (unter Lichtausschluss) inkubiert. Die Kernfärbung mit Hoechst B 2883 (Verdünnung 1:1000 mit 1 x PBS-Puffer) erfolgte ebenfalls unter Lichtausschluss für 5 min bei RT. Nach der Kernfärbung sind alle Präparate 2 x 5 min mit 1 x PBS-Puffer gewaschen und unter Verwendung von PPD/Moviol (siehe 2.1.6) mit Deckgläsern luftdicht verschlossen worden. Die Objektträger wurden anschließend für 10 min bei 4°C getrocknet und dann an den Rändern der Deckgläser mit Nagellack abgedichtet. Die fertigen Präparate konnten nun am Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

Die aceton- sowie paraffinfixierten Präparate sind für die Immunfluoreszenznachweise in 1 x PBS Puffer rehydriert worden (3 x 5 min). Zum Blocken dieser Proben wurde in der Regel Blocking Puffer F (30 min bei 37°C) und zum Waschen 1 x PBS Puffer (3 x 5 min) verwendet. Die primären und die sekundären Antikörper sind vor jedem Einsatz in Blocking Puffer F verdünnt worden. Die restlichen Schritte des Färbungsprotokolls wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (s.o.).

3 ERGEBNISSE

3.1 Klonierung von gefäßspezifischen scFv-Antikörpern

Die Generierung gefäßspezifischer scFv erfolgte unter Verwendung der von Dr. W.D. Ito hergestellten und in unserer Arbeitsgruppe ausselektierten Hybridomazellen (siehe 2.1.2). Als Ausgangsmaterial (siehe 1.5) für die Herstellung dieser Zellen fungierten zunächst Ratten, denen 12 h nach künstlicher Ligation der Femoralarterie die Kollateralarterien entnommen wurden. Mit den Membranpräparaten aus den Kollateralgefäßen sind anschließend Mäuse immunisiert worden. Einige Wochen nach der Immunisierung wurden die Tiere getötet und deren Milz herauspräpariert. Die in der Milz zahlreich vorhandenen B-Lymphozyten wurden isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Als Resultat dieser Fusion entstanden Hybridomazellen, welche einerseits den jeweiligen Antikörper des B-Lymphozyten-Partners produzierten und andererseits die Unsterblichkeit der Myelomzellen besaßen, so dass sie damit zur Produktion einer großen Anzahl von monoklonalen Antikörpern geeignet waren. Diese Hybridomazellen wurden mittels immunhistochemischer Färbungen auf Ratten-Herz-Endothelzellen sowie auf Schnitten von Kollateralarterien auf die Spezifität der von ihnen sezernierten, monoklonalen Antikörper überprüft. Die kollateralspezifischen Hybridomaklone wurden anschließend in Einzelwells ausselektiert und vermehrt. Die ausselektierten, positiven Hybridomazellen sind im Rahmen dieser Arbeit zur Herstellung von gefäßspezifischen scFv-Antikörpern eingesetzt worden.

3.1.1 Isolierung der RNA aus Hybridomazellen

Für die Herstellung von kollateralspezifischen Einzelkettenantikörpern wurde zunächst aus den positiven Hybridomazellen die Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.3.1.1). Zu diesem Zweck sind sowohl frisch geerntete, als auch tiefgefrorene Hybridomazellen verwendet worden. Die Menge der isolierten RNA wurde spektralphotometrisch ermittelt (siehe 2.3.1.2). Dabei lag die Ausbeute an Gesamt-RNA aus frisch geernteten Hybridomazellen mit den Werten von ca. 300-400 µg pro 5×10^6 eingesetzten Zellen im Durchschnitt erheblich höher als die Menge der aus tiefgefrorenen Hybridomazellen präparierten Ribonukleinsäure (ca. 100-200 µg/ 5×10^6 Zellen). Zum Qualitätsnachweis der isolierten Gesamt-RNA-Proben wurden diese unter RNase-freien Bedingungen in einem Formaldehydgel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Da die cytoplasmatische RNA aller Eukaryonten bis zu ca. 95% aus ribosomaler RNA besteht (Lottspeich und Zorbas, 1998), konnten bei einer gut durchgeführten RNA-Präparation, die 28S- und 18S- (Svedberg Einheiten) rRNA-Moleküle als zwei scharfe Banden auf einem

Gelelektrophorese-Foto erkannt werden (siehe Abb. 3.1.1). Aufgrund von intakten rRNA Banden sowie der Abwesenheit von Signalen im niedermolekularem Bereich konnte bei allen RNA-Proben, die aus tiefgefrorenen Hybridomazellen gewonnen wurden (Proben 4-8), eine Degradation der Ribonukleinsäure weitgehend ausgeschlossen werden. Im Gegenteil dazu ist bei den RNA-Isolaten aus frisch geernteten Hybridomakulturen keine saubere Auftrennung der 28S- sowie 18S-rRNA detektiert worden. Des Weiteren waren insbesondere bei den in den Spuren 1 und 3 aufgetragenen Proben (siehe Abb. 3.1.1) starke RNA-Signale im niedermolekularen Bereich vorhanden, was auf eine Degradation der isolierten Ribonukleinsäure hindeutete (besonders deutlich bei Probe 3). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die aus tiefgefrorenen Hybridomazellen gewonnene Gesamt-RNA (Proben 4-8) zwar eine niedrigere Quantität im Vergleich zu den frisch präparierten RNA-Isolaten 1-3 ergab, jedoch keine Degradationsspuren aufwies und sich somit durch eine viel höhere Qualität, im Gegensatz zu den frisch präparierten Proben, auszeichnete. Da für die Amplifikation von variablen Regionen der schweren und leichten Antikörperketten eine intakte Gesamt-RNA essentiell ist, wurde im nachfolgenden Experimentteil, für die cDNA-Erststrangsynthese, die RNA der Proben 5-8 als Matrize eingesetzt (siehe Abb. 3.1.1).

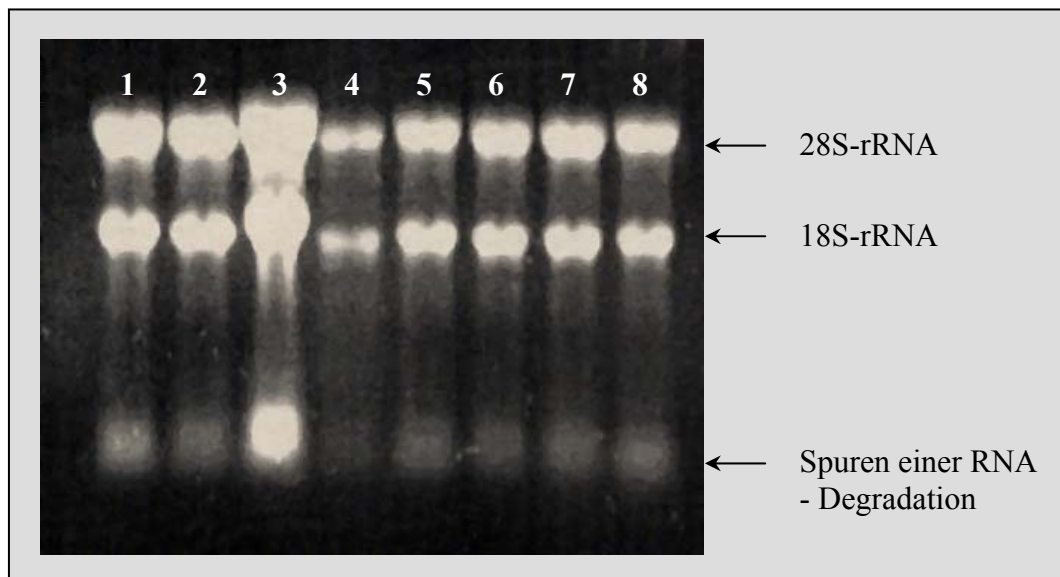


Abb. 3.1.1: Gelelektrophoretische Auftrennung der aus Hybridomazellen isolierten Gesamt-RNA-Proben

Spuren 1-3: Aus frisch geernteten Hybridomazellen isolierte RNA-Proben. Spuren 4-8: RNA-Isolate aus tiefgefrorenen Hybridomazellen.

3.1.2 cDNA-Synthese und Amplifikation von V_H- und V_L-Domänen

Zur Amplifikation von V_H- und V_L-Domänen wurde die aus Hybridomazellen isolierte RNA zunächst in die cDNA umgeschrieben. Um eventuelle Kontaminationen der cDNA mit genomischer DNA zu vermeiden, ist vor jeder Erststrangsynthese-Reaktion ein DNase-Verdau der verwendeten RNA-Proben durchgeführt worden (siehe 2.3.1.4). Die cDNA-Synthese erfolgte nach dem im Kapitel 2.3.1.5 beschriebenen Protokoll der Firma Gibco BRL unter Verwendung von Oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Primern. Unmittelbar nach der Synthesereaktion wurden jeweils 15 µl der frisch hergestellten cDNA für die Klonierung von V_H- und V_L-Antikörperdomänen eingesetzt. Die Amplifikation der variablen Regionen der schweren und leichten Ketten erfolgte in zwei separaten PCR-Reaktionen mit jeweils acht cDNA-Ansätzen pro Domäne (V_H: Probe 1-8; V_L: Probe 1-8). Zur Herstellung von V_H-Fragmenten sind die im Kapitel 2.1.5 erwähnten murinen Heavy Primer 1 und 2 eingesetzt worden. Die Klonierung der V_L-Regionen wurde mit Hilfe von einem ebenfalls mausspezifischen Light Primer Mix durchgeführt (siehe 2.1.5). Die klonierten V_H- und V_L-Fragmente wurden anschließend in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Der Erfolg der cDNA-Synthese sowie V_H- und V_L-Amplifikation konnte, durch das Auftreten von PCR-Produkten mit der erwarteten Größe von 340 bp (für V_H-Domäne) bzw. 325 bp (für V_L-Domäne), eindeutig bestätigt werden (siehe Abb. 3.1.2). Für die nachfolgende Klonierung von Einzelkettenantikörpern sind die aufgetrennten V_H- und V_L-Banden zunächst aus dem Agarosegel herausgeschnitten und eluiert worden. Um bei der späteren Amplifikation des vollständigen scFv-Antikörperfragmentes eine höhere Anzahl von Kombinationen zwischen den schweren und leichten Ketten zu erzielen, wurden die einzelnen Eluate der V_H- (Probe 1-8) sowie V_L-Domänen (Probe 1-8) in zwei Eppendorfgefäßen miteinander vereinigt. Da zur Herstellung der scFv-Fragmente äquimolare Mengen an V_H- und V_L-DNA notwendig sind, wurde vor jeder Klonierung die Konzentration der eluierten Nukleinsäurebanden sowohl spektral-photometrisch, als auch mittels gelelektrophoretischer Analyse genau ermittelt. Für die Generierung von scFv-Antikörperfragmenten sind in der Regel jeweils 50 ng der eluierten V_H- bzw. V_L-PCR-Produkte eingesetzt worden.

Die auf Seite 101 präsentierte Abbildung 3.1.2 stellt exemplarisch die gelelektrophoretische Auftrennung von amplifizierten, variablen Domänen der schweren (H1-H4) sowie der leichten (L1-L4) Antikörperketten dar. Es wurde jeweils 5 µl des entsprechenden PCR-Produktes in die Geltaschen aufgetragen. Zur Konzentrationsbestimmung sowie zur Ermittlung der genauen Länge der aufgetrennten V_H- sowie V_L-Banden diente die, von der

Firma Amersham Bioscience bezogene, 370 bp Große V_H -Kontrolle (K), welche in einer Konzentration von 50 ng DNA pro 5 μ l Gesamtansatz zusammen mit den amplifizierten V_H - und V_L -Fragmenten im Agarosegel aufgetrennt wurde. Als DNA-Längenstandard fungierte der bereits im Kapitel 2.1.5 erwähnte SMART DNA Marker.

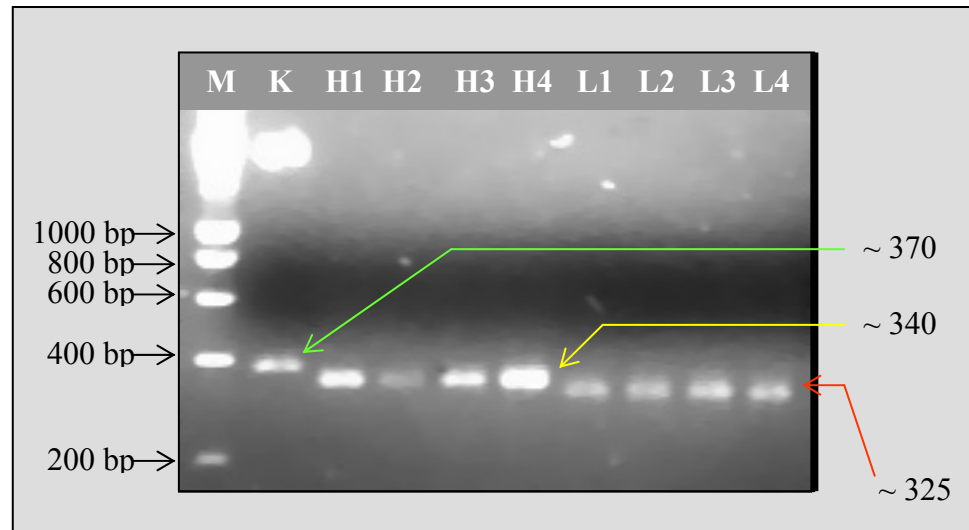


Abb. 3.1.2: Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten V_H - bzw. V_L -Antikörperdomänen

M: SMART DNA Marker. K: positive V_H -Kontrolle. H1-H4: variable Regionen der schweren Antikörperketten. L1-L4: variable Domänen der leichten Antikörperketten.

3.1.3 Herstellung von scFv-Antikörperfragmenten

Im weiteren Verlauf der Experimente wurden die aufgereinigten V_H - und V_L -Domänen mit Hilfe einer 99 bp langen „Linker“-Sequenz (Amersham Bioscience) zu vollständigen scFv-Antikörperfragmenten zusammengesetzt. Dies erfolgte in einer PCR-Reaktion unter Verwendung von dem im Kapitel 2.1.5 erwähnten, murinen Linker Primer Mix. Um die amplifizierten Einzelkettenantikörper für die nachfolgende Generierung der scFv-Phagenbibliothek sowie anschließende Expressionsexperimente verwenden zu können, mussten diese zuvor in einen Phagemid-Vektor (pCANTAB 5 E) ligiert werden. Dazu wurden an den Enden der scFv-Antikörperfragmente, in einer PCR-Reaktion unter Verwendung von sogenannten RS-Primern (Restriction Site Primers, siehe 2.1.5), vektorkompatible Restriktionsschnittstellen *Sfi*I (am 5' Ende von V_H) und *Not*I (am 3' Ende von V_L) hinzugefügt. Die, als Resultat der beiden PCR-Reaktion, entstandenen scFv-Produkte wurden in einem Agarosegel verifiziert und die erwarteten, ca. 760 bp großen DNA-Banden (siehe Abb. 3.1.3) ausgeschnitten. Nach der Elution und einer darauf folgenden Konzentrationsbestimmung der ausgeschnittenen PCR-Produkte, wurden diese mit den Restriktionsenzymen *Sfi*I und *Not*I

verdaut und anschließend über QIAquick-Säulen (siehe 2.3.10) aufgereinigt. Aufgrund von erheblichen DNA-Konzentrationsverlusten, die sich während der oben erwähnten Reinigung ergeben haben, mussten die scFv-Fragmente vor einer Ligation in den pCANTAB 5 E Phagemid-Vektor zunächst erneut reamplifiziert werden. Da eine Vervielfältigung der scFv-Antikörper mit den oben erwähnten RS-Primern, wegen der bereits restringierten *SfiI*- und *NotI*-Enden, nicht mehr möglich war, wurde eine Amplifikation der rekombinanten scFv mit Hilfe des TOPO TA -Klonierungssystems vorgenommen (siehe 3.1.4).

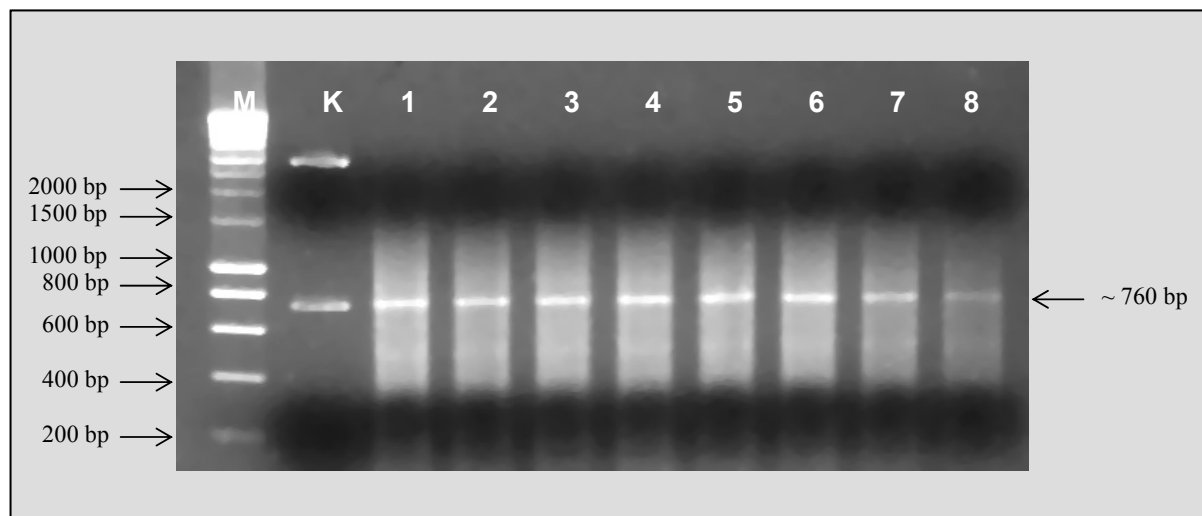


Abb. 3.1.3: Gelelektrophoretische Auftrennung von generierten scFv-Antikörperfragmenten

M: SMART DNA Längenstandard. K: positive, ca. 750 bp große scFv-Kontrolle, (Amersham Bioscience). 1-8: erfolgreich amplifizierte, rekombinante scFv-Proben.

3.1.4 Amplifikation von rekombinanten scFv in einem TOPO TA -Klonierungssystem

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten im TOPO TA Klonierungsvektor sind in der Regel frisch amplifizierte PCR-Produkte eingesetzt worden. Aus diesem Grund wurde hierbei auf die im Kapitel 3.1.3 erwähnten, zeitaufwendigen *SfiI*-, *NotI*-Restriktionsverdau zunächst verzichtet und die assemblierten scFv-Fragmente sind direkt nach dem Hinzufügen von Restriktionsschnittstellen in den oben genannten Vektor ligiert worden.

Die Subklonierung von Einzelkettenantikörperfragmenten im TOPO TA -Klonierungssystem verschaffte neben deren recht unkomplizierter Vervielfältigung noch weitere, wichtige Vorteile. Dank der mit Thymidin-Überhängen ausgestatteten Klonierungsstelle (siehe Abb. 3.1.4), konnten die frisch amplifizierten PCR-Produkte über ihre überhängenden Adenosin-Reste in einer 5-minütigen Ligationsreaktion, in Abwesenheit von Ligasen, in den TOPO TA -Vektor eingebaut werden. Des Weiteren ermöglichte die

Verwendung der TOPO TA -Klonierungsstrategie (siehe 2.3.9) eine problemlose Isolierung der, in *E. coli*-Bakterien vermehrten, scFv-Fragmente aus dem Klonierungsvektor, mittels Restriktionen mit den bereits erwähnten *Sfi*I- und *Not*I-Endonukleasen. Da viele Restriktionsenzyme deutlich effektiver in der Mitte eines DNA-Fragmentes als an seinen Enden schneiden, konnte in diesem Fall, durch das Ausschneiden von scFv aus dem Vektor, eine vollständige Restriktion der Insert-DNA, im Gegensatz zu der im Kapitel 3.1.3 beschriebenen Vorgehensweise, gewährleistet werden.

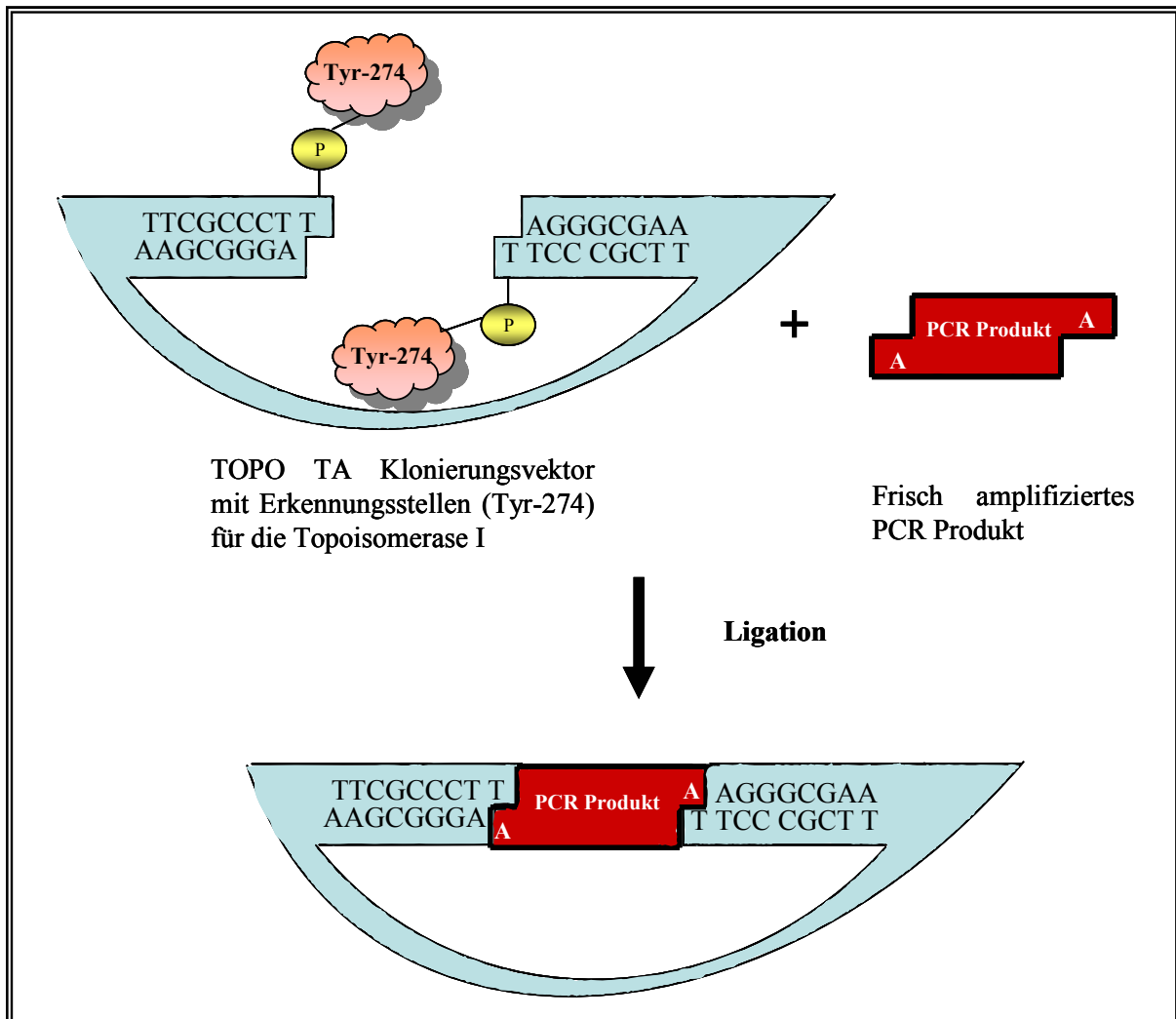


Abb. 3.1.4: Schematische Darstellung der TOPO TA-Klonierungsstrategie

Der Erfolg der Klonierung und der Restriktion von Einzelkettenantikörpern wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel überprüft. Die erwarteten ca. 760 bp großen scFv-Banden wurden anschließend aus dem Gel eluiert und über QIAquick-Säulen aufgereinigt. Nach der darauf folgenden DNA-Konzentrationsbestimmung sind die einzelnen scFv-Proben für eine Ligation und Klonierung in den pCANTAB 5 E Phagemid-Vektor eingesetzt worden (siehe 3.1.5).

3.1.5 Ligation und Klonierung von scFv-Antikörpern im pCANTAB 5E-Phagemid-Vektor

Für die Ligation von scFv-Antikörperfragmenten wurde der pCANTAB 5E -Phagemid Vektor ebenfalls mit den *SfiI*- und *NotI*-Endonukleasen geschnitten. Die Ligationsreaktion erfolgte nach dem im Kapitel 2.3.7.3 beschriebenen Protokoll. Anschließend sind die rekombinanten Phagemidkonstrukte in die TG1 *E. coli*-Bakterien transformiert worden. Da der verwendete pCANTAB 5E -Vektor mit einem Ampicillin-Resistenzgen ausgestattet war, konnten alle vektorhaltigen Transformanden nach dem Ausplattieren auf Ampicillin-Agarplatten erfolgreich ausselektiert werden. Von den ca. 1370 gewachsenen, positiven Bakterienkolonien wurden zunächst 10 Klone gepickt und mittels Kolonie-PCR (siehe 2.3.8.2) sowie Restriktionsanalysen auf das Vorhandensein des scFv-Fragmentes überprüft. Für die Durchführung der Kolonie-PCR sind die bereits erwähnten RS-Primer verwendet worden. Die Analyse der untersuchten Bakterienklone ergab, dass 5 von 10 gepickten Transformanden das ca. 760 bp große scFv-Fragment enthielten. Die auf Seite 105 aufgeführte Abbildung 3.1.5.A stellt die fünf mittels Kolonie-PCR amplifizierten scFv- Fragmente dar. Die Ergebnisse der PCR-basierten Untersuchung von Bakterienklonen wurden ebenfalls, durch die Analyse der *SfiI*- und *NotI*-Restriktionsverdau von isolierten Vektor-DNA-Proben, bestätigt. Auf dem in Abbildung 3.1.5.B präsentierten Gelfoto sind, nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung der *SfiI/NotI*-restringierten Phagemid-DNA, zwei unterschiedlich große DNA-Fragmente zu erkennen. Während die im hochmolekularen Bereich liegende DNA-Bande dem Phagemid-Vektor zuzuordnen ist, kann das ca. 760 bp große DNA-Fragment als ausgeschnittenes scFv-Insert identifiziert werden.

Nach dem oben beschriebenen Experimentmuster wurden zusätzlich noch weitere 20 positive Transformanden auf das Vorhandensein von scFv überprüft (Daten nicht gezeigt). Aus den Ergebnissen der zweiten „screening“-Runde ging hervor, dass 12 von 20 untersuchten Klonen das entsprechende ca. 760 bp. große scFv-Fragment enthielten.

Für die nachfolgenden „Phage Display“-Experimente standen somit insgesamt 17 positive Bakterienklone zur Verfügung. Vor der Generierung einer scFv-Phagenbibliothek wurde zunächst eine Sequenzanalyse der klonierten Antikörperfragmente durchgeführt (siehe 3.1.6).

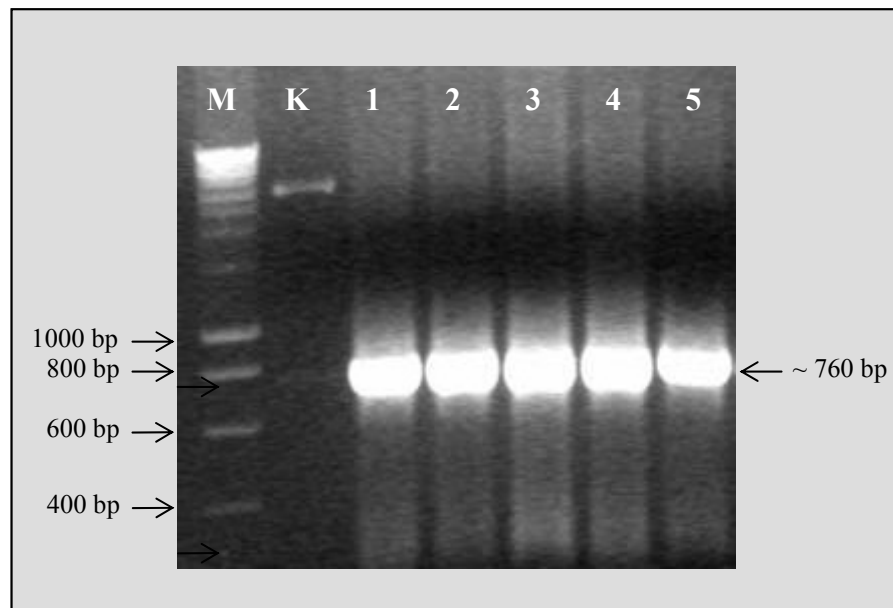


Abb.: 3.1.5.A: Amplifikation des rekombinanten scFv-Fragmentes mittels Kolonie-PCR

Die DNA der 1-5 positiven Transformanten wurde nach der Kolonie-PCR im 1,5%-igen Agarosegel für 1,5 h bei 90 V aufgetrennt. Bei allen Proben ist das ca. 760 bp große scFv-Fragment zu erkennen. M: SMART DNA-Längenstandard. K: positive scFv-Kontrolle (ca. 750 bp).

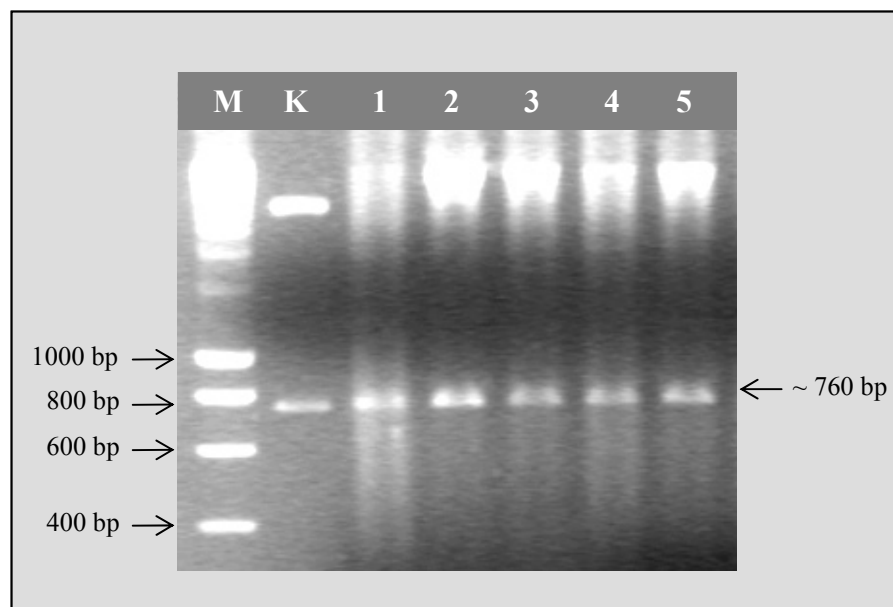


Abb.: 3.1.5.B: *SfiI/NotI*-Restriktionsverdau der DNA aus positiven Bakterienklonen

Nach einer Auftrennung der restringierten 1-5 DNA-Proben im 1,5% -igen Agarosegel ist die ca. 760 bp große Insert-Bande deutlich zu erkennen. M und K: siehe oben.

3.1.6 Sequenzierung der positiven Klone

Der Erfolg der Ligation und Klonierung von scFv-Antikörperfragmenten im pCANTAB 5 E Phagemid-Vektor wurde zuletzt mittels DNA-Sequenzierung von den 17 bereits überprüften (siehe 3.1.5), positiven Bakterienklonen verifiziert. Anhand der erhaltenen Sequenzdaten konnten mit Hilfe einer Kabat-Datenbank die sogenannten Konsensus-Regionen der rekombinanten scFv-Fragmente erfolgreich identifiziert werden. Dabei sind für die variablen Domänen (V_H und V_L) der untersuchten scFv jeweils drei CDR-Bereiche (complementarity determining regions) abgeleitet worden. Um eine fehlerfreie Zuordnung von Aminosäuren in die entsprechenden, hypervariablen Regionen zu gewährleisten, wurden hierbei die unten aufgeführten Regeln beachtet.

Identifizierung der hypervariablen Regionen nach Kabat (1987):

- **CDR-H1** - erreicht eine Länge von 10-12 Aminosäuren (AS) und beginnt direkt nach der AS-Abfolge: C-X-X-X. Im Anschluss an die CDR-H1 folgt ein W.
- **CDR-H2** - beginnt immer 15 AS nach dem Ende von CDR-H1. Der CDR-H2 ist häufig eine L-E-W-I-G -Sequenz vorgelagert, welche jedoch folgend variieren kann: K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A. Die Länge von CDR-H2 beträgt zwischen 16-19 Aminosäuren.
- **CDR-H3** - hat eine Länge von 3-25 AS und beginnt 33 AS nach dem Ende von CDR-H2, in der Regel zwei AS nach einem C. Der CDR-H3 ist eine C-X-X -Sequenz vorgelagert (oftmals ein C-A-R – Motiv). Nach der CDR-H3 folgt immer eine aus W-G-X-G bestehende Aminosäuresequenz.
- **CDR-L1** - besteht aus 10-17 AS und beginnt immer nach der 24. AS, in der Regel nach einem C. An die CDR-L1 schließt sich meistens eine der nachfolgend genannten Aminosäuresequenzen an: W-Y-Q, W-L-Q, W-F-Q oder W-Y-L.
- **CDR-L2** - beginnt immer 16 AS nach dem Ende der CDR-L1 und hat eine Länge von insgesamt 7 AS. Der CDR-L2 ist gewöhnlich eine I-Y-, V-Y-, I-K- oder I-F-Sequenz vorgelagert.
- **CDR-L3** - erreicht eine Länge von 7-11 AS und beginnt immer 33 AS nach dem Ende der CDR-L2, meistens nach einem C. Eine Ausnahme bildet hierbei die 7FAB, welche eine Deletion am Ende von CDR-L2 aufweist. Nach der CDR-L3 folgt in der Regel die Aminosäuresequenz F-G-X-G.

Bei der Erstellung von Konsensus-Sequenzen sind für alle untersuchten scFv-Fragmente die auf Seite 106 beschriebenen Bedingungen erfüllt worden. Auf diese Weise konnte letztlich bewiesen werden, dass es sich bei den 17 klonierten DNA-Fragmenten tatsächlich um funktionelle V_H - und V_L -Segmente von scFv-Antikörpern handelte. Aus dem sich anschließenden Vergleich der einzelnen Sequenzen untereinander ging weiterhin hervor, dass die untersuchten scFv-Fragmente eine deutliche Komplexität aufwiesen. Die hohe Vielfältigkeit der Einzelkettenantikörper war hauptsächlich auf die Unterschiede in der Aminosäureabfolge zwischen den einzelnen scFv zurückzuführen und konnte sowohl in den hypervariablen Regionen, als auch in den Gerüstregionen detektiert werden.

Zur Analyse der Bindungsaffinität sowie zur Selektion von CTA-spezifischen scFv-Antikörperfragmenten, wurden diese mittels der im Kapitel 2.4 beschriebenen „Phage display“-Technik auf der Oberfläche filamentöser M13KO7-Phagen exprimiert und in nachfolgenden *in situ*, *in vitro* sowie *in vivo* „Biopanning“-Experimenten spezifisch angereichert (siehe 3.2).

3.2 „Phage display“ mit CTA-spezifischen scFv-Antikörpern

3.2.1 Expression von rekombinanten scFv-Antikörpern auf der Oberfläche filamentöser M13-Bakteriophagen

Für die Selektion von CTA-spezifischen Antikörperfragmenten sind zunächst alle positiven Bakterienklone (1-17) zu einer sogenannten scFv-Bibliothek vereinigt worden. Diese Bibliothek wurde dann mit M13KO7-Helferphagen infiziert und zur Bildung sowie Anreicherung von rekombinanten Phagen in einem Selektionsmedium inkubiert (siehe 2.4.1). Hierbei wurden die in die Bakterien klonierten scFv-Fragmente in die M13-Phagen übertragen und als pIII-Fusionsprodukt auf deren Oberfläche exprimiert. Die infizierten Bakterien wurden anschließend pelletiert und die Phagen mittels einer PEG-Fällung aus den Kulturüberständen isoliert. Die auf diese Weise generierte scFv-Phagenbibliothek bestand aus einem Repertoire von schweren und leichten Antikörperketten, die in diversen Kombinationen auf der Oberfläche von M13-Phagen präsentiert waren. Um die Konzentration dieser kombinatorischen Phagenbibliothek ermitteln zu können, wurde im Folgenden eine Bestimmung des Phagentiters vorgenommen. Aus den erhaltenen Ergebnissen ging hervor, dass die Anzahl der gewonnenen, rekombinanten scFv-Phagen zwischen 10^{13} bis 10^{14} cfu (colony forming units) pro 1 ml Phagensuspension betrug.

Die mit Hilfe der „Phage Display“-Technik hergestellten, oberflächenpräsentierten Antikörperfragmente lieferten für die nachfolgenden Selektionsexperimente einen wichtigen Vorteil. Durch die Expression der jeweiligen V_H - und V_L -Domänen auf der Oberfläche von M13-Phagen waren die rekombinanten Antikörperfragmente für ihre Epitope frei zugänglich und konnten somit direkt, ohne vorherige Isolierung aus Zellkompartimenten, in „Biopanning“- Experimenten ausselektiert und angereichert werden.

3.2.2 Selektion der scFv-Phagenbibliothek auf Rattengefäßschnitten (*in situ*)

Die ersten drei Selektionsrunden der frisch hergestellten scFv-Phagenbibliothek erfolgten auf Rattengefäßschnitten, die unter Verwendung des in unserer Arbeitsgruppe etablierten Rattenmodells (siehe Herzog *et. al.* 2002) präpariert wurden. Hierbei handelte es sich um ein Arteriogenese-Modell bei dem, durch eine künstlich eingeleitete Okklusion der Femoralarterie, das Wachstum von Kollateralgefäßen aus bereits vorhandenen Anastomosen induziert wurde.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass ca. 24 Stunden nach der Gefäßligatur eine erhöhte Proliferation von Kollateralarterien auftritt. Das so induzierte Gefäßwachstum erreicht bereits nach drei Tagen sein Maximum, wird allerdings noch bis zum 7. Tag nach der Okklusion fortgesetzt (Herzog *et. al.* 2002). Während dieser Zeitperiode (insbesondere im Verlauf der ersten 3 Tage) kommt es in diversen Kompartimenten der proliferierenden Kollateralgefäße zur Expression von bestimmten, wachstumregulierenden Faktoren. Einer davon ist der zur Zeit von Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe untersuchte CSA (collateral specific antigen)-Komplex, welcher mit dem aus Hybridomazellen isolierten CTA-Antikörper anhand immunhistologischer sowie durchflußzytometrischer Analysen sowohl auf Schnitten von proliferierenden Kollateralgefäßen, als auch auf RHE-A-Endothelzellen nachgewiesen werden konnte. Da die Expression des oben genannten Protein-Komplexes vorwiegend während des Kollateralwachstums stattfindet, wurde er im Rahmen dieser Doktorarbeit als Target für die Selektion und Generierung von kollateralspezifischen scFv-Antikörperfragmenten ausgewählt.

Trotz langwieriger Bemühungen den isolierten CTA-Antikörper aufzureinigen und damit den CSA-Komplex aufzuklären, blieb dessen Struktur zum Zeitpunkt des experimentellen Teils dieser Doktorarbeit weitgehend unerforscht. Aufgrund des Mangels an einem gut charakterisierten, kopplungsfähigen „Screening“-Molekül für kollateralspezifische scFv-Antikörperfragmente, wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit eine neuartige „Biopanning“-Methode entwickelt, welche auf direktem Weg (durch Inkubation der scFv-

Phagen auf Kollateralgefäßen oder Endothelzellen) die Selektion und Anreicherung von CTA-spezifischen Antikörperfragmenten aus einer scFv-Phagenbibliothek ermöglicht. Die ersten Selektionsrunden der frisch generierten scFv-Phagenbibliothek sind wie bereits erwähnt unter Verwendung von Kollateralgefäßschnitten durchgeführt worden. Zur Anfertigung dieser Proben wurden den Ratten 3 Tage nach dem Femoralarterienverschluß die spiralförmig gewachsenen Kollateralarterien entnommen und für die Herstellung von Schnittpräparaten eingesetzt. Parallel dazu sind aus den jeweiligen Kontrollbeinen der Tiere ebenfalls Kollateralgefäße herausgeschnitten und zur Anfertigung von Kontrollpräparaten verwendet worden. Alle Gefäßproben wurden wie im Kapitel 2.6.1 beschrieben präpariert und sowohl im unfixierten als auch im acetonfixierten Zustand für die einzelnen „Biopanning“-Runden eingesetzt (siehe Abb. 3.2.2.A).

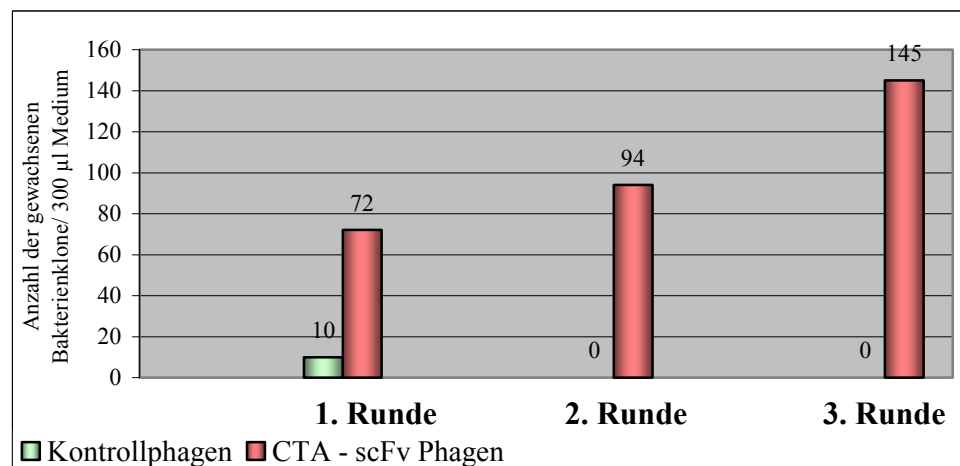


Abb. 3.2.2.A: Selektion der CTA-scFv-Phagen auf Schnitten von Kollateralarterien (*in situ*)

Im Verlauf der einzelnen „Biopanning“-Runden (1-3) konnten die CTA-scFv-Phagen erfolgreich ausselektiert und angereichert werden. Die Anzahl der positiven Phagen wurde durch das Auszählen der, auf Selektionsagarplatten gewachsenen, reinfizierten Bakterienklone ermittelt (Methodenbeschreibung, siehe Kapitel 2.4).

Die „Biopanning“-Experimente *in situ* sind nach dem im Kapitel 2.4.4.1 beschriebenen Protokollmuster durchgeführt worden. Die ersten drei Selektionsrunden erfolgten unter Verwendung von Kollateralgefäßschnitten aus dem sogenannten Probebein (3 Tage nach der Okklusion, s.o.). Bereits nach dem ersten „Biopanning“-Versuch konnten auf den Selektionsagarplatten 72 potentiell positive CTA-scFv-Klone detektiert werden (siehe Abb. 3.2.2.A). Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde eine Sequenzanalyse von 40 der insgesamt 72 gewachsenen Bakterienklone vorgenommen. Aus einem Homologievergleich der untersuchten DNA-Fragmente mit den in einer Kabat-Datenbank vorhandenen scFv-Sequenzen ging hervor, dass die auf Kollateralarterien ausselektierten Phagen tatsächlich vollständige, gefäßspezifische scFv-Antikörperfragmente exprimierten. Ein Vergleich der

Aminosäureabfolge der sequenzierten scFv untereinander zeigte das Auftreten von insgesamt 9 unterschiedlichen scFv-Sequenzmustern auf. Die größte, sequenzhomologe Antikörpergruppe umfasste 17 Bakterienklone und wurde mit der Bezeichnung K555bB2 versehen. Darauf folgte eine aus 14 Mitgliedern bestehende scFv-Einheit, die als K555aB4 benannt wurde. Drei weitere, identische Bakterienklone erhielten den Namen: K55MA. Neben den oben erwähnten scFv-Gruppen sind weiterhin noch 6 einzelne Antikörperfragmente identifiziert worden (K5A-K5F), deren Sequenzen sowohl voneinander, als auch von denen, der erstgenannten Klone stark abwichen. Außer den zahlreichen, spezifisch bindenden, rekombinanten scFv-Phagen wurden nach der ersten „Biopanning“-Runde ebenfalls einige negative Kontrollphagen detektiert (insgesamt 10 Kolonien). Die Anwesenheit dieser unspezifischen Klone auf Selektionsagarplatten deutete in erster Linie darauf hin, dass die anfangs gewählten Waschbedingungen (10 x 5 min mit 1 x PBS-Puffer und 10 x 5 min mit 1 x PBS/0,1% Tween 20-Puffer) scheinbar nicht stringent genug waren, um derartigen Kontaminationen vorzubeugen. Zur Verhinderung solcher unspezifischen Antigen-Antikörperreaktionen und zur Optimierung des gesamten Selektionssystems wurde in den folgenden „Biopanning“-Runden die Anzahl der Waschgänge um das Zweifache erhöht (20 x 5 min mit 1 x PBS-Puffer und 20 x 5 min mit 1 x PBS/0,1% Tween 20-Puffer). Hinsichtlich der bestehenden Gefahr, die durch Sequenzierung getesteten, positiven Klone mit eventuell mitgewachsenen, unspezifischen Kolonien zu kontaminieren, wurde in späteren Selektionsexperimenten bewusst auf den Einsatz der gesamten scFv-Phagenbibliothek verzichtet. Demzufolge sind für die zweite Experimentrunde ausschließlich die neun bereits sequenzierten scFv-Spezies (s.o.) verwendet worden. Die einzelnen Vertreter dieser Bakterienklone wurden zunächst miteinander vereinigt (jeweils 1 Klon pro scFv-Gruppe, s.o.), in einer Schüttelkultur bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase angezogen, mit M13-Phagen infiziert und anschließend auf Rattengefäßschnitten, wie bereits erwähnt, ausselektiert.

Nach der zweiten „Biopanning“-Runde sind auf den Selektionsagarplatten insgesamt 94 Bakterienkolonien detektiert worden. Durch Sequenzanalysen von 40 positiven Klonen konnte ein Überblick über die prozentuale Anreicherung der einzelnen, kollateralspezifischen scFv-Phagen gewonnen werden (siehe Abb. 3.2.2.B). Bei allen sequenzierten Bakterienklonen wurde die Anwesenheit des scFv-Insertfragmentes bestätigt. Die höchste scFv-Anreicherungsstufe (21 Klone) erreichten die K555bB2-Phagen. Darauf folgten die K555aB4-Phagen mit 13 Klonen und die K55MA-Phagen mit insgesamt 6 Klonen.

Die sechs nach der ersten „Biopanning“-Runde ausselektierten K5A-K5F-Phagen konnten innerhalb der 40 sequenzierten Klone nicht identifiziert werden. Die Änderung der Waschstringenz in der zweiten „Biopanning“-Runde hat sich sehr vorteilhaft auf die Selektion der Phagen ausgewirkt. Durch die Erhöhung der Anzahl von Waschgängen konnten die kollateralspezifischen Klone erfolgreich angereichert und die unspezifischen Kontrollphagen wirkungsvoll entfernt werden.

Das dritte „Biopanning“-Experiment auf Rattengefäßschnitten erfolgte unter Verwendung der bisher ausselektierten, kollateralspezifischen K555bB2-, K555aB4- und K55MA-Klone. Infolge dieser Selektionsrunde wurden insgesamt 145 positive scFv-Klone ermittelt. Nach Sequenzierung von 40 beliebig ausgewählten, positiven Bakterienkolonien konnte erneut eine sehr starke Anreicherung von K555bB2-Phagen (22 Klone) festgestellt werden. Die K555aB4-Phagen waren diesmal mit 15 Klonen und die K55MA-Phagen mit 3 Klonen vertreten. Die negativen Kontrollphagen sind auch in diesem Fall erfolgreich ausgewaschen worden. Eine Zusammenfassung der oben präsentierten Ergebnisse liefert die Abbildung 3.2.2.B.

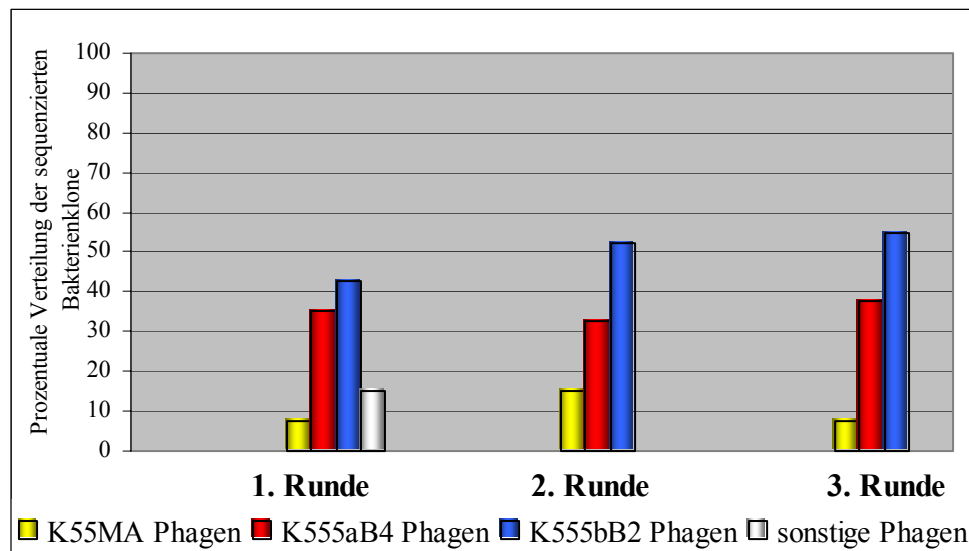


Abb. 3.2.2.B: Anreicherung der CTA-spezifischen Phagen während der einzelnen „Biopanning“-Runden auf Schnitten von Kollateralarterien (*in situ*).

Die prozentuale Verteilung der angereicherten Phagen pro Selektionsrunde betrug:

1. Runde = 42,5% K555bB2; 35% K555aB4; 7,5% K55MA; 15% K5A-K5F
2. Runde = 52,5% K555bB2; 32,5% K555aB4; 15% K55MA
3. Runde = 55% K555bB2; 37,5% K555aB4; 7,5% K55MA

Zur Überprüfung der Bindungsaffinität der angereicherten, kollateralspezifischen scFv-Phagen (K555bB2, K555aB4 sowie K55MA) wurden diese zuletzt einem „Biopanning“ auf Kollateralgefäßschnitten aus einem Kontrollbein der Ratte (bei dem keine Okklusion vorgenommen wurde) unterzogen. Im Anschluss an das Experiment sind auf den Selektionsagarplatten 8 positive Kolonien detektiert worden. Nach ausführlicher Analyse der Sequenzdaten konnten 7 davon als K55MA-Klone und eine als K555aB4-Klon identifiziert werden. Auf der negativen Kontrollplatte wurde ebenfalls eine Bakterienkolonie nachgewiesen, was darauf hindeutete, dass die unspezifischen M13-Kontrollphagen trotz der stringenten Waschbedingungen leider nicht vollständig entfernt werden konnten. Im Gegensatz dazu wurden die einst angereicherten, kollateralspezifischen K555bB2-Klone nach dem „Biopanning“ auf Kontrollgefäßschnitten nicht aufgefunden. Aus den vorliegenden Ergebnissen geht hervor, dass die K555bB2-scFv-Antikörperfragmente ausschließlich diejenigen Epitope spezifisch erkennen, welche auf proliferierenden Kollateralarterien lokalisiert sind, wie bereits im Fall des „Biopannings“ auf Gefäßschnitten aus dem ligierten Probebein deutlich zu erkennen war (siehe Seiten 109-111). Die K55MA-Phagen wurden sowohl auf Kontrollgefäßen als auch auf proliferierenden Kollateralarterien angereichert, was auf ein breites Affinitätsspektrum der K55MA-scFv-Antikörperfragmente hinweist. Bei den K555aB4-Phagen handelt es sich höchstwahrscheinlich, aufgrund deren hoher Spezifität auf Kollateralarterien aus dem Probebein, um kollateralspezifische Klone. Die Anwesenheit des einzigen K555aB4-Vertreters nach der Selektion auf Gefäßschnitten aus dem Kontrollbein, lässt eher auf eine Kontamination als auf eine spezifische Bindung schließen, zumal die negative Kontrollplatte ebenfalls mit einem Klon verunreinigt war (s.o.).

3.2.3 „Biopanning“ von gefäßspezifischen Phagen auf RHE-A/neg.-Endothelzellen

Die auf Rattengefäßschnitten (*in situ*) ausselektionierten Klone: K555bB2, K555aB4 und K55MA wurden weiterhin für *in vitro* „Biopanning“-Experimente auf Ratten-Herz-Endothelzellen eingesetzt. Die ersten drei Selektionsrunden erfolgten unter Verwendung der RHE-A-Endothelzelllinie. Die positiven, kollateralspezifischen Klone (s.o.) wurden in separaten Schüttelkulturen bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen, mit M13-Helferphagen infiziert und zur Selektion in jeweils drei getrennten Ansätzen (eine Zellkulturflasche pro scFv-Spezies) mit RHE-A-Endothelzellen inkubiert. Die unspezifischen Phagen wurden durch stringentes Waschen entfernt und die gebundenen, endothelspezifischen Klone durch Reinfektion mit TG1 *E. coli*-Bakterien von den RHE-A-Zellen eluiert.

Die reinfizierten scFv-Bakterien sind anschließend auf Selektionsagarplatten ausgestrichen und über Nacht angezogen worden. Im Anschluß an jede Selektionsrunde wurde die Anzahl der gewachsenen scFv-Kolonien ermittelt. Zur Überprüfung der Anwesenheit von scFv-Insertfragmenten sind stichprobenweise Sequenzanalysen von jeweils 10 Vertretern der ausselektionierten K555bB2-, K555aB4- und K55MA-Klone durchgeführt worden. Die jeweils positiven scFv-Spezies wurden in den nachfolgenden Selektionsrunden weiterverwendet.

Aus den erhaltenen „Biopanning“-Ergebnissen ging hervor, dass die kollateral-spezifischen K555bB2-, K555aB4- sowie K55MA-Klone im Verlauf der drei nacheinander durchgeführten Selektionsrunden erfolgreich angereichert werden konnten. Bereits nach dem ersten „Biopanning“-Experiment wurden auf den Selektionsagarplatten insgesamt 14.308 Kolonien detektiert. Die höchste Anzahl an positiven Klonen erreichten wieder die K555bB2-Phagen (7.390 Klone). Darauf folgten die K555aB4-Phagen mit 6.520 Klonen und die K55MA-Phagen mit 398 Klonen. Die unspezifischen Kontrollphagen konnten im Verlauf der zahlreichen Waschstapen leider nicht restlos entfernt werden, da auf den negativen Kontrollplatten ca. 54 Bakterienkolonien nachgewiesen wurden. Um die Kontamination mit unspezifischen Phagen zu verhindern, wurden in den nachfolgenden Selektionsrunden die letzten zehn Waschgänge bei niedrigerem pH-Wert durchgeführt (20 x 5 min mit 1 x PBS [pH 7,5], 10 x 5 min mit 1 x PBS/0,1% Tween 20-Puffer [pH 7,5] und 10 x 5 min mit 1 x PBS/0,1% Tween 20-Puffer [pH 5]).

Nach der zweiten „Biopanning“-Runde ist die Gesamtzahl der angereicherten Phagen deutlich angestiegen (14.715 Klone). Die K555bB2-Klone wurden diesmal mit 7.480 Kolonien, die K555aB4-Klone mit 6.790 Kolonien und die K55MA-Klone mit 445 Kolonien vertreten. Trotz der Änderung der Waschstringenz konnten die negativen Kontrollphagen nicht vollständig ausgewaschen werden. Die Anzahl der unspezifischen Klone wurde jedoch von 54 (s.o.) auf 19 reduziert.

Infolge der dritten Selektionsrunde auf RHE-A-Endothelzellen sind insgesamt 16.174 Phagen angereichert worden. Auf den entsprechenden Selektionsagarplatten wurden ca. 7.800 K555bB2-Klone, 7.740 K555aB4-Klone und 634 K55MA-Klone ermittelt. Die unspezifischen Kontrollphagen sind trotz stringenter Waschbedingungen ebenfalls nachgewiesen worden (28 Kolonien). Die auf der folgenden Seite präsentierten Abbildungen: 3.2.3.A und 3.2.3.B stellen eine schematische Zusammenfassung der oben aufgeführten Ergebnisse dar.

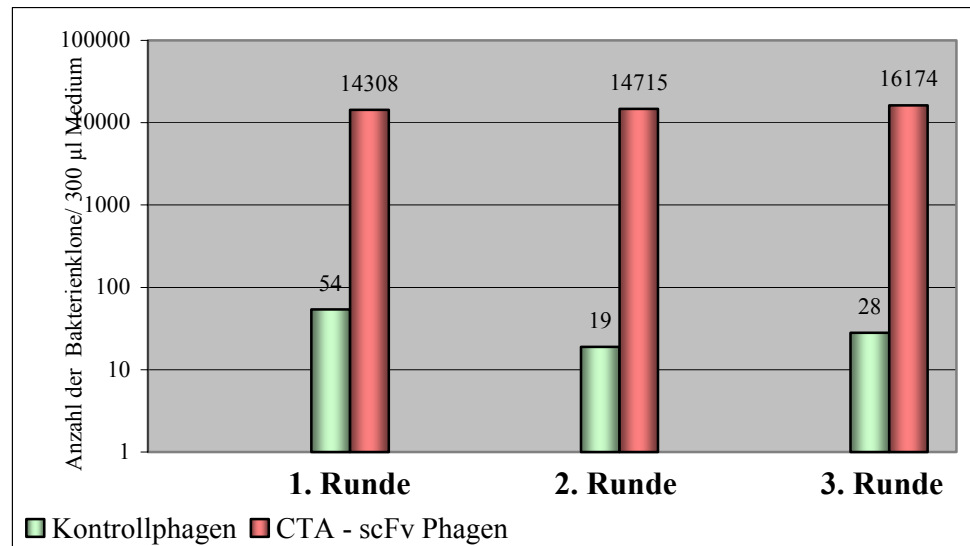


Abb. 3.2.3.A: Selektion der kollateralspezifischen scFv-Phagen auf RHE-A-Endothelzellen (*in vitro*)

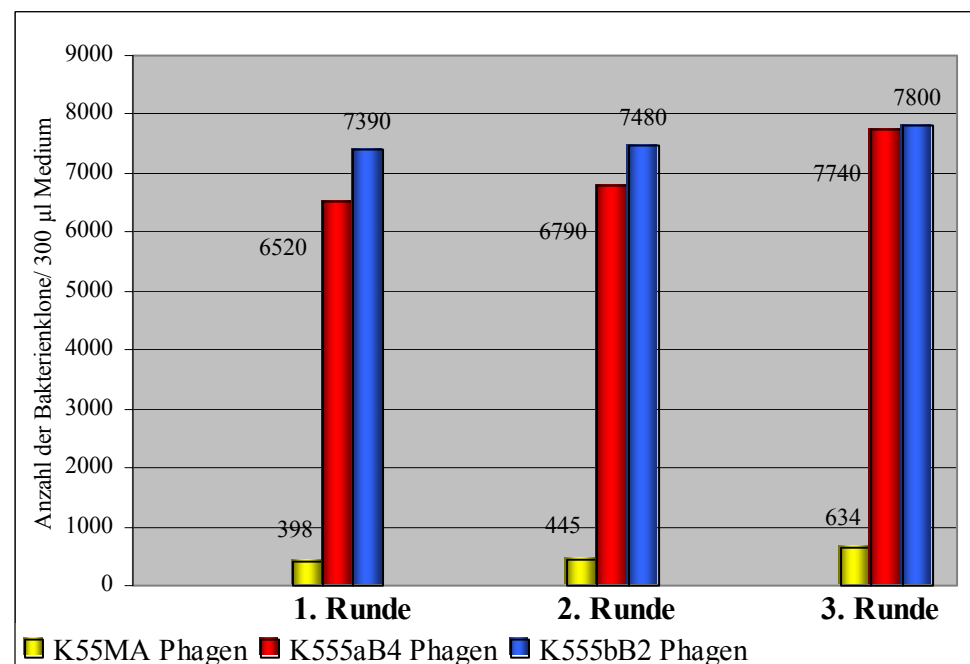


Abb. 3.2.3.B: Anreicherung der einzelnen CTA-spezifischen scFv-Klone im Verlauf des „Biopannings“ auf RHE-A-Endothelzellen (*in vitro*)

Um die Bindungsaffinität der angereicherten kollateral- sowie endothelspezifischen Phagen weiterzutesten, wurden diese einer Selektion auf RHE-neg.-Endothelzellen unterzogen. Im Anschluss an das Experiment konnten auf den Selektionsagarplatten ca. 350 K55MA- und 24 K555bB2-Klone detektiert werden. Die unspezifischen Kontrollphagen wurden während des „Biopanning“ leider nicht vollständig entfernt, die Anzahl der

nachgewiesenen Klone betrug 28. Die zuvor auf RHE-A-Endothelzellen angereicherten K555aB4-Phagen konnten nach dem „Biopanning“ auf RHE-neg.-Zellen nicht vorgefunden werden. Dieser Befund deutete darauf hin, dass die auf den letztgenannten Zellen vorhandenen Antigenstrukturen von den K555aB4-Antikörperfragmenten nicht erkannt wurden. Aus den vorliegenden Ergebnissen geht weiterhin hervor, dass die K55MA-Phagen, aufgrund deren gleichmäßig hoher Anreicherung auf beiden Endothelzelllinien, ein breites Spektrum von Antigenstrukturen zu erkennen schienen (siehe auch Kapitel 3.2.2). Im Gegensatz dazu zeigten die K555bB2-Phagen eine deutlich höhere Affinität für die auf RHE-A-Endothelzellen lokalisierten Epitope (7.800 Klone). Die wesentlich geringere Anreicherung der K555bB2-Klone auf den RHE-neg.-Zellen (ähnlich wie bei den Kontrollphagen, s.o.) deutete darauf hin, dass es sich hierbei eventuell um unspezifische Bindungen handeln könnte, welche trotz zahlreicher Waschschriffe leider nicht vollständig aufgelöst wurden.

3.2.4 Untersuchung der Gefäßspezifität von scFv-Antikörperfragmenten mittels *in vivo* „Biopanning“

Zur Untersuchung der Gefäßspezifität von scFv-Antikörperfragmenten *in vivo* wurden ausgewählte kollateral- sowie endothelspezifische Phagen intravasal den Sprague-Dawley Ratten injiziert (siehe 2.4.4.3). Von den drei auf Kollateralgefäßen und Endothelzellen angereicherten scFv-Spezies (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.3) sind für die *in vivo*-Selektion ausschließlich K555bB2- sowie K555aB4-Phagen weiterverwendet worden. Die ebenfalls ausselektierten K55MA-Phagen wurden, aufgrund der auf allen untersuchten Gefäßtypen und Endothelzelllinien nachgewiesenen Bindung, als nicht spezifisch genug angesehen und deshalb für die erwähnten „Biopanning“-Experimente nicht eingesetzt.

Nach dreimaliger Selektion der scFv-Phagen auf proliferierenden Kollateralgefäßen, konnte eine starke Anreicherung der untersuchten K555bB2- und K555aB4-Klone festgestellt werden (siehe Abb. 3.2.4.A). Die in den einzelnen Experiment-Runden ermittelte Anzahl der K555bB2-Kolonien lag mit den Werten von 25.000 (1. Runde), 26.000 (2. Runde) und 27.000 (3. Runde) eindeutig höher als die der detektierten K555aB4-Klone (1. Runde: 24.570, 2. Runde: 25.680, 3. Runde: 26.700; siehe Abb. 3.2.4.B). Nach einem parallel durchgeführten „Biopanning“-Experiment mit negativen Kontrollphagen konnten erfreulicherweise keine Kolonien nachgewiesen werden. Die Spezifität der K555bB2- und K555aB4-Phagen wurde des Weiteren durch eine *in vivo*-Selektion auf Kollateralgefäßen aus den jeweiligen Kontrollbeinen der oben erwähnten Versuchstiere getestet. Auch in diesem Fall konnten auf den Selektionsagarplatten keine scFv-Klone detektiert werden. Dieser Befund deutete darauf

hin, dass die auf der Phagenoberfläche präsentierten K555bB2- und K555aB4-Antikörperfragmente möglicherweise nur diejenigen Antigene *in vivo* spezifisch erkennen, welche auf proliferierenden Kollateralgefäßen lokalisiert sind.

In den unten dargestellten Abbildungen 3.2.4.A und 3.2.4.B wurden die oben aufgeführten Ergebnisse nochmals schematisch zusammengefasst.

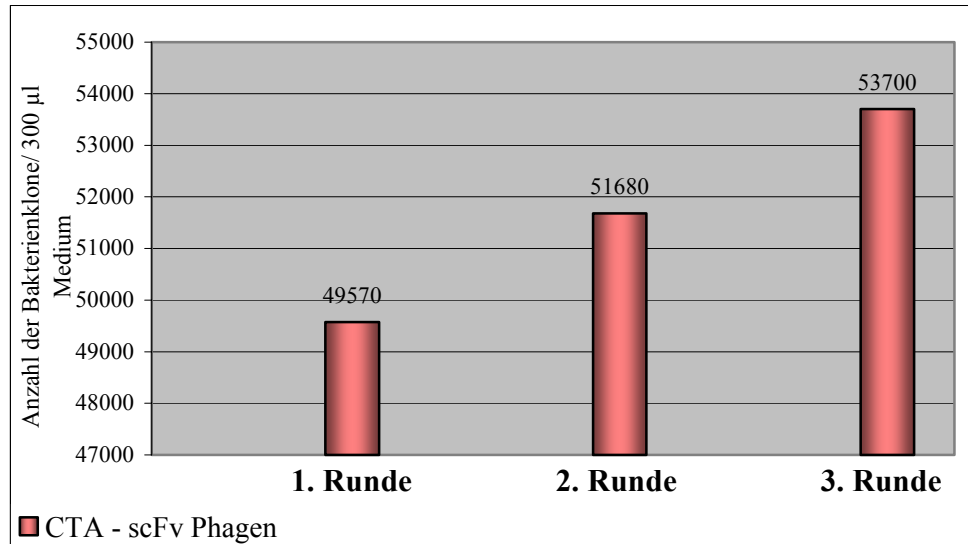


Abb. 3.2.4.A: Selektion von kollateral- und endothelspezifischen scFv-Phagen auf proliferierenden Kollateralgefäßen (*in vivo*)

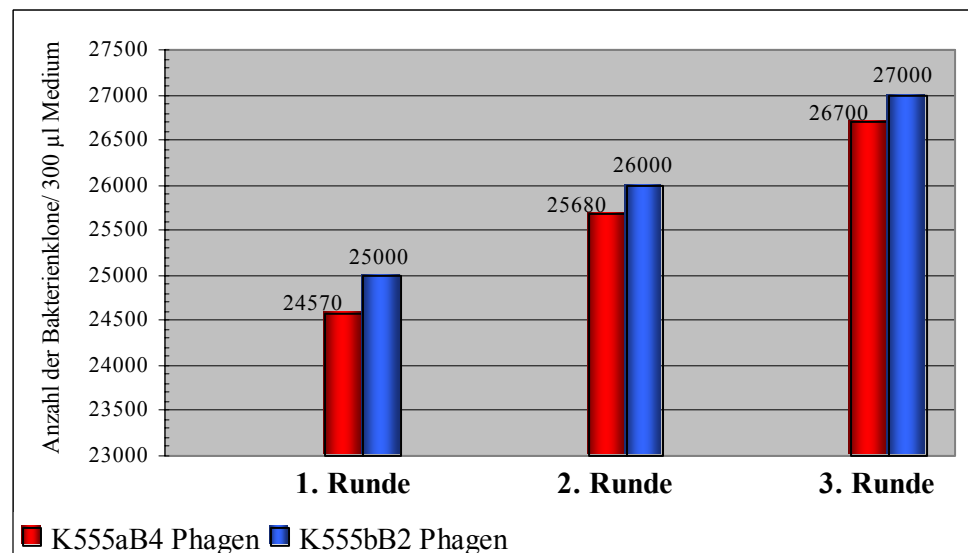


Abb. 3.2.4.B: Anreicherung der einzelnen CTA-spezifischen scFv-Klone im Verlauf des *in vivo* - „Biopannings“ auf proliferierenden Kollateralarterien

3.2.5 Analyse der Anreicherung von gefäßspezifischen CTA-scFv-Phagen

Im Verlauf der drei in den Kapiteln 3.2.2-3.2.4 beschriebenen „Biopanning“-Experimente konnte sowohl eine erfolgreiche Selektion, als auch eine deutliche Anreicherung von CTA-scFv-Phagen erzielt werden (siehe Abb. 3.2.5). Nach der ersten, *in situ* durchgeführten „Biopanning“-Reihe wurden insgesamt 145 positive Klone detektiert. Sequenzanalysen ergaben, dass es sich bei den, aus der gesamten scFv-Phagenbibliothek ausselektierten, kollateralspezifischen scFv-Antikörperfragmenten um drei unterschiedliche Spezies handelte (K555bB2, K555aB4 und K55MA). Die höchste Anreicherung zeigten die K555bB2- und K555aB4-Phagen. Die K55MA-Klone wurden sowohl auf Kollateralarterien aus dem Probebein als auch auf denen aus dem Kontrollbein nachgewiesen und somit als nicht spezifisch genug angesehen, um ausschließlich proliferierende Gefäße zu erkennen.

Nach dem *in vitro*-„Biopanning“ auf den CTA-exprimierenden RHE-A-Endothelzellen konnten ca. 16.174 positive scFv-Klone ermittelt werden. Damit ist die Gesamtzahl der angereicherten Spezies um ca. das 111-fache angestiegen. Die höchste Bindungsaffinität haben hierbei die K555bB2- sowie K555aB4-Phagen aufgewiesen. Die K55MA-Klone wurden nur im geringen Prozentsatz angereichert (ca. 4%). Nach anschließendem „Biopanning“ der kollateralspezifischen scFv-Phagen auf den RHE-neg.-Endothelzellen (die kein CTA exprimieren) sind auf den Selektionsagarplatten vorwiegend K55MA-Klone detektiert worden. Der Nachweis von K55MA-Phagen auf beiden Endothelzelltypen deutete darauf hin, dass es sich bei den, durch die K55MA-Antikörperfragmente erkannten, Antigenstrukturen höchstwahrscheinlich nicht um die CTA-Epitope, sondern um andere Proteine handelte. Aufgrund mangelnder CTA-Spezifität wurden die K55MA-Klone für die nachfolgende *in vivo*-Selektion nicht eingesetzt.

Infolge der *in vivo*-„Biopanning“-Experimente auf proliferierenden Kollateralarterien wurden insgesamt 53.700 positive scFv-Klone nachgewiesen. Die Anzahl der angereicherten scFv-Spezies ist somit nochmals um ca. das 3-fache angestiegen. Die K555bB2-Phagen waren auf den Selektionsagarplatten mit 27.000 Kolonien und die K555aB4-Phagen mit ca. 26.700 Kolonien vertreten. Zur Überprüfung der Bindungsaffinität wurden die angereicherten scFv-Phagen einer Selektion auf Kontrollgefäßen unterzogen. Im Anschluß an das Experiment konnten auf den Selektionsagarplatten keine Kolonien nachgewiesen werden. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die K555bB2- und K555aB4-Klone ausschließlich Antigenstrukturen auf proliferierenden Kollateralgefäßen spezifisch erkennen.

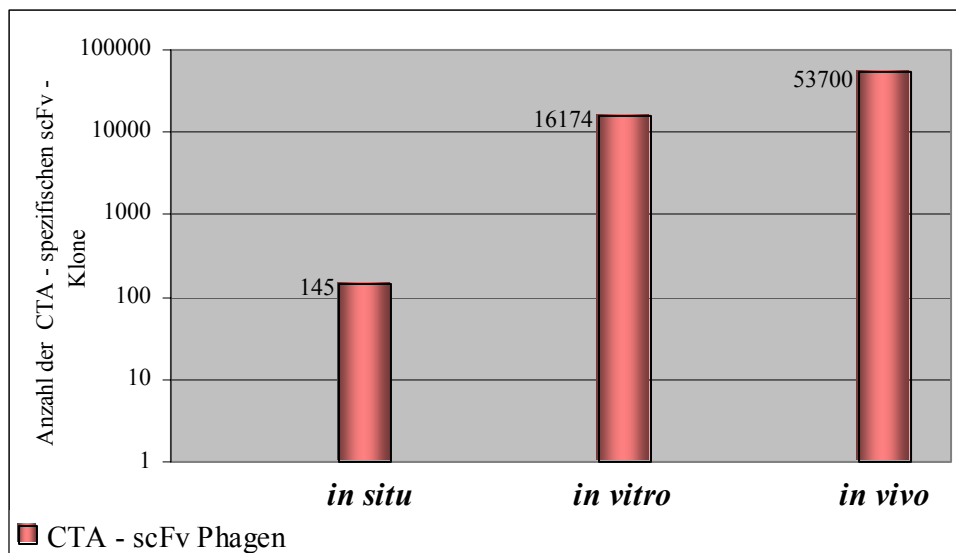


Abb. 3.2.5: Anreicherung der CTA-spezifischen Phagen im Verlauf von drei aufeinander folgenden „Biopanning“-Experimenten (*in situ*, *in vitro* und *in vivo*)

Die neben jedem Balken aufgeführten Werte beziehen sich auf die Gesamtanzahl der, nach der jeweils dritten Selektionsrunde angereicherten, positiven scFv-Phagen.

3.2.6 „Biopanning“ von CTA-spezifischen Phagen auf PAE-KDR-11-Endothelzellen

Die Bindungsaffinität der kollateral- und endothelspezifischen K555bB2- sowie K555aB4 - Phagen wurde weiterhin durch „Biopanning“ auf der PAE-KDR-11-Schweineaorta-Endothelzelllinie getestet. Die Selektion erfolgte nach dem bereits für die RHE-A/neg.-Endothelzellen entwickelten Versuchsprotokoll (siehe 2.4.4.2). Im Anschluss an das Experiment konnte auf den Selektionsagarplatten keine einzige scFv-Kolonie ermittelt werden. Dieser Befund deutete darauf hin, dass die untersuchten K555bB2- und K555aB4-Klone keine Spezifität zu den auf PAE-KDR-11-Endothelzellen vorhandenen Antigenen zeigten.

3.2.7 „Biopanning“ der CTA-spezifischen K555bB2- und K555aB4-Phagen auf Humangefäßschnitten (*in situ*)

Um feststellen zu können, ob die generierten, kollateralspezifischen scFv-Antikörperfragmente imstande sind, Antigenstrukturen auf humanen Kollateralarterien ebenfalls spezifisch zu erkennen, wurden die beiden positiven K555bB2- sowie K555aB4-Phagen einem *in situ*-„Biopanning“ auf Humangefäßschnitten aus proliferierenden Kollateralarterien und Kontrollgefäßen unterzogen. Die hierfür verwendeten Gefäßexemplare stammen von Patienten mit akuter Ischämie (proliferierende Kollateralgefäße) sowie von Kontrollpatienten (Kontrollgefäße, siehe 2.1.1). Die oben erwähnten, kollateralspezifischen Klone wurden für die Selektion in zwei getrennten Kulturansätzen angezogen, mit M13-Helferphagen infiziert und anschließend separat auf den entsprechenden Gefäßpräparaten inkubiert (Versuchs-

protokoll siehe 2.4.4.1). Im Anschluss an die „Biopanning“-Experimente konnten auf den Selektionsagarplatten sowohl positive K555bB2-, als auch K555aB4-Klone nachgewiesen werden. Die negativen Kontrollphagen wurden nicht detektiert. Im Verlauf der Selektion von K555bB2-Phagen konnte auf den oben genannten Gefäßproben eine deutliche Steigung der Anzahl an positiven scFv-Klonen beobachtet werden (siehe Abb. 3.2.7.A). Im Gegensatz dazu ist die Menge der auf beiden Gefäßtypen detektierten K555aB4-Klone nach allen drei Selektionsrunden nahezu gleich geblieben (siehe Abb. 3.2.7.B). Sowohl die K555bB2- als auch die K555aB4-Phagen zeigten während des „Biopannings“ eine etwas höhere Affinität für die auf Kontrollgefäßen vorhandenen Antigene. Dennoch konnten auf proliferierenden Kollateralarterien von den Patienten mit akuter Ischämie deutlich einige scFv-Phagen nachgewiesen werden. Aus den oben aufgeführten Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die auf Rattengefäßschnitten sowie Endothelzellen angereicherten CTA-spezifischen K555bB2- und K555aB4-Antikörperfragmente imstande waren, in einem Human-„Biopanning“-Modell, Antigenstrukturen sowohl auf proliferierenden Kollateralgefäßen als auch auf Kontrollgefäßen spezifisch zu erkennen.

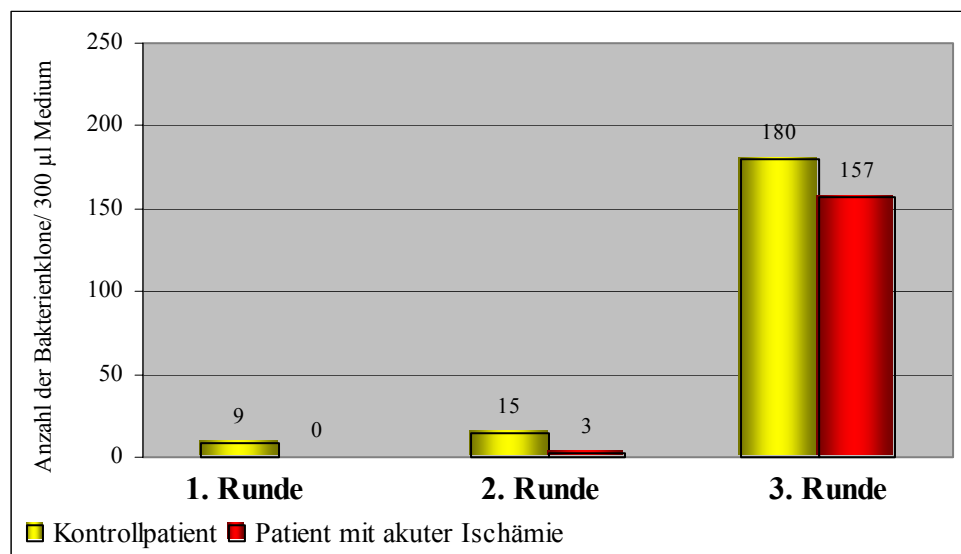


Abb. 3.2.7.A: Selektion der kollateralspezifischen K555bB2-Phagen auf Humangefäßschnitten (*in situ*)

Die kollateralspezifischen K555bB2-Phagen konnten nach allen drei Selektionsrunden auf den Humangefäßschnitten nachgewiesen werden. Die Anzahl der auf Kontrollgefäßen detektierten scFv-Klone lag insgesamt etwas höher (gelbe Balken), als die Menge der auf proliferierenden Gefäßen ermittelten Spezies (rote Balken).

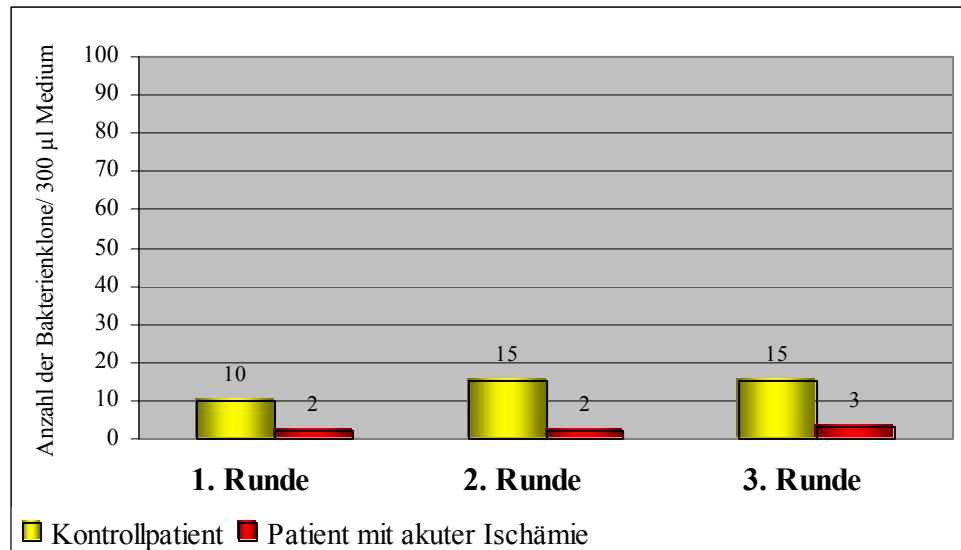


Abb. 3.2.7.B: Selektion der kollateralspezifischen K555aB4-Phagen auf Humengefäßschnitten (*in situ*)

Die kollateralspezifischen K555aB4-Phagen konnten nach dem *in situ*-„Biopanning“ auf Humengefäßschnitten erfolgreich nachgewiesen werden. Dennoch zeigten die positiven scFv-Klone eine wesentlich höhere Spezifität zu den auf Kontrollgefäßen vorhandenen Antigenstrukturen (gelbe Balken). Die auf proliferierenden Kollateralgefäßen lokalisierten Antigene wurden nur von einigen, wenigen K555aB4-Phagen spezifisch erkannt (rote Balken).

3.3 Restriktions- und Sequenzanalysen der ausselektionierten CTA-scFv-Antikörper

Nach jedem „Biopanning“-Experiment sind Restriktions- sowie Sequenzanalysen der angereicherten scFv-Klone durchgeführt worden. Mit Hilfe der *Sfi*I-, *Not*I-Restriktionsverdau konnte bei allen untersuchten scFv-Spezies die Anwesenheit des erwarteten (ca. 760 bp langen) Insert-Fragmentes eindeutig bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Um die korrekte Länge sowie genaue Nukleinsäurebasenabfolge der gefäßspezifischen scFv-Antikörperfragmente zu ermitteln, wurden im Anschluss an die Restriktionsanalysen einige, positive scFv-Klone sequenziert. Bereits nach der ersten „Biopanning“-Runde konnten neun unterschiedliche scFv-Sequenzmuster festgelegt werden. Im Verlauf der nachfolgenden Selektionsexperimente ist die Zahl, der nach ausführlichen Sequenzanalysen ermittelten, gefäßspezifischen scFv-Vertreter auf lediglich drei Klone (K555bB2, K555aB4 und K55MA) reduziert worden. Aus den Sequenzierungsergebnissen ging weiterhin hervor, dass die Länge der beiden K555bB2- und K555aB4-scFv-Spezies ca. 723 bp (d.h. 241 Aminosäuren) betrug. Der K55MA-Einzellkettenantikörper bestand aus ca. 729 bp (d.h. 243 Aminosäuren) und war somit um 6 Nukleotidpaare größer als die beiden erstgenannten scFv-Fragmente. Nach einem Homologievergleich der einzelnen DNA-Sequenzen untereinander konnte zwischen den

K555bB2- und K555aB4-Klonen eine ca. 99%-ige Übereinstimmung auf Nukleotidbasis festgestellt werden. Zwischen den K555aB4- und K55MA-scFv wurde eine ca. 97%-ige Homologie registriert und die K555bB2- und K55MA-Klone wiesen untereinander eine ca. 96%-ige Sequenzübereinstimmung auf.

Zur Überprüfung der Integrität der untersuchten scFv-Antikörperfragmente wurden deren Nukleotidsequenzen, unter Verwendung eines DNA-Translationsprogramms (siehe <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), in die Aminosäuresequenzen übersetzt. Anhand der Aminosäureabfolge wurden dann, nach den im Kapitel 3.1.6 aufgezählten Kabat-Regeln, die Erkennungssequenzen der einzelnen CDR-Bereiche abgeleitet. Da die erwähnten Kabat-Konventionen von allen drei Antikörperfragmenten erfüllt wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den angereicherten K555bB2-, K555aB4- sowie K55MA-Spezies um funktionelle scFv handelte. Ein Vergleich der gefäßspezifischen Antikörperfragmente mit der, in der IgG-Datenbank vorhandenen, scFv-Konsensussequenz wies einige Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung auf, die sowohl in den CDR-Regionen, als auch in den Gerüstregionen lokalisiert waren. Die meisten Sequenzabweichungen sind in den V_H-Domänen der Einzelkettenantikörper detektiert worden (siehe Abb. 3.3.A). Einige Basenpaaraustausche (insbesondere in unmittelbarer Nähe der „Linker“-Region) konnten auf die, durch die „Linker“-PCR (siehe 3.1.3) verursachten, Insertionen zurückgeführt werden. Aus dem Vergleich der K555bB2-, K555aB4- und K55MA-Antikörperfragmente untereinander ging hervor, dass diese ebenfalls einige Basenunterschiede aufwiesen. Zwischen den K555bB2- und K555aB4-Klonen wurden ausschließlich in den CDR-L1- und FWR-L3-Bereichen Sequenzunterschiede vorgefunden. Ein Vergleich der K555bB2- und K555aB4-scFv mit dem K55MA-Antikörperfragment zeigte hingegen die Anwesenheit von Aminosäurevariabilitäten in sechs diversen Regionen auf (FWR-H1, FWR-H2, FWR-H3, CDR-H3, CDR-L1 sowie FWR-L3, siehe Abb. 3.3.B). Die sowohl in den CDR-Regionen, als auch in den Gerüstregionen auftretenden Aminosäureabweichungen zwischen den einzelnen scFv-Spezies deuteten darauf hin, dass beide oben erwähnten Antikörperbereiche für die Spezifität und Affinität von scFv-Fragmenten eine wichtige Rolle spielen könnten. In den auf den beiden folgenden Seiten aufgeführten Abbildungen: 3.3.A und 3.3.B wurden Sequenzen der drei oben aufgeführten Einzelkettenantikörper detailliert dargestellt und miteinander verglichen.

5' *Sfi* I Startcodon

K555bB2: GCGGCCAGCCGGCCATG GCCCAGGTGAGCTGCAGGAGTCAGGCGCTGAGTTGGTGAAA

K555aB4: GCGGCCAGCCGGCCATG GCCCAGGTGAGCTGCAGGAGTCAGGCGCTGAGTTGGTGAAA

K55MA: GCGGCCAGCCGGCCATG GCCCAGGTGAGCTGCAGGAGTCAGGCGCTGAGTTGGTGAAA

K555bB2: CCTGGGGCTTCAGTGATAATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTCCTGACCATGCT

K555aB4: CCTGGGGCTTCAGTGATAATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTCCTGACCATGCT

K55MA: CCTGGGGCTTCAGTGATAATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTCCTGACCATGCT

K555bB2: ATTCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGACAGGGCCTGGAATTCATTGGATATATTTCTCCC

K555aB4: ATTCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGACAGGGCCTGGAATTCATTGGATATATTTCTCCC

K55MA: ATTCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATATTTCTCCC

K555bB2: GGAAATGATGATATTAAGTACAATGAGAAGTTTAAGGACAAGGCCACACTGACTGCAGAC

K555aB4: GGAAATGATGATATTAAGTACAATGAGAAGTTTAAGGACAAGGCCACACTGACTGCAGAC

K55MA: GGAAATGATGATATTAAGTACAATGAGAAGTTTAAGGACAAGGCCACACTGACTGCAGAC

K555bB2: AAATCTTCCAACACTGCTACATGCAGCTCAACAGTCTGACATCTGAAGATTCTGCAGTG

K555aB4: AAATCTTCCAACACTGCTACATGCAGCTCAACAGTCTGACATCTGAAGATTCTGCAGTG

K55MA: AAATCTTCCAACACTGCTACATGCAGCTCAACAGTCTGACATCTGAAGATTCTGCAGTG

K555bB2: TATTCTGTAAAAGGTCAACTAACTCCTTTGACTATTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACC

K555aB4: TATTCTGTAAAAGGTCAACTAACTCCTTTGACTATTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACC

K55MA: TATTACTGTAAAAGGTCAACTAACGAAGGATCCTTTGACTATTGGGGCCAAGGCACCACG

K555bB2: GTCCTCCCAAGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGGTCTGGCGGTGGCGGATCG

K555aB4: GTCCTCCCAAGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGGTCTGGCGGTGGCGGATCG

K55MA: GTCACCGTCTCTCAAGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGGTCTGGCGGTGGCGGATCG

K555bB2: GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATAACC

K555aB4: GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATAACC

K55MA: GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATAACC

K555bB2: ATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAAATATTTGGTTAAGCTGGTACCAGCAGAGACCA

K555aB4: ATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTCTTATTTATTTAAGCTGGTACCAGCAGAGACCA

K55MA: ATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTCTTATTTATTTAAGCTGGTACCAGCAGAGACCA

K555bB2: GGAAATAATCCTAAACTATTGATCTATAAGGCTTCCAACCTACACACTGGCGGCCCATCA

K555aB4: GGAAATAATCCTAAACTATTGATCTATAAGGCTTCCAACCTACACACTGGCGGCCCATCA

K55MA: GGAAATAATCCTAAACTATTGATCTATAAGGCTTCCAACCTACACACTGGCGGCCCATCA

K555bB2: AGGTTTAGGGGCAGTGGGTCTGGAACAGGTTTTCACATTAACCATCAGCAGCCTGCAGCCT

K555aB4: CACTTTAGGGGCAGTGGGTCTGGAACAGGTTTTCACATTAACCATCAGCAGCCTGCAGCCT

K55MA: CACTTTAGGGGCAGTGGGTCTGGAACAGGTTTTCACATTAACCATCAGCAGCCTGCAGCCT

K555bB2: GAAGACATTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTCAAAGTTATCCGTGGACGTTTGGTGGA

K555aB4: GAAGACATTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTCAAAGTTATCCGTGGACGTTTGGTGGA

K55MA: GAAGACATTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTCAAAGTTATCCGTGGACGTTTGGTGGA

K555bB2: GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCGGGCCGAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCG

K555aB4: GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCGGGCCGAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCG

K55MA: GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCGGGCCGAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCG

K555bB2: CTGGAACCGCGTGCCGCA TAG

K555aB4: CTGGAACCGCGTGCCGCA TAG

K55MA: CTGGAACCGCGTGCCGCA TAG

3' Not I E-tag Stopcodon

Abb. 3.3.A: DNA-Sequenzen der K555bB2-, K555aB4- und K55MA-scFv-Klone

Farbendeutung: schwere Ketten (V_H); Linker; leichte Ketten (V_L); Basenpaarabweichungen; Restriktionsschnittstellen, E-tag-Erkennungssequenz; Start- und Stopcodon

Aminosäuresequenz-Vergleiche

Bezeichnung der untersuchten Klone:

1) Konsensussequenz; 2) scFv-K555bB2; 3) scFv-K555aB4; 4) scFv-K55MA

Schwere Kette (V_H):

FWR-H1		CDR-H1	FWR-H2
1) X V K L X X S G X X L ! X P G X S ! \$! S C X ! S	G # % F % X X X X X X X X	W V \$ Q X P	
2) Q V K L Q E S G A E L V K P W A S V I I S C K A S	G Y T F T D H A I H - -	W V K Q K P	
3) Q V K L Q E S G A E L V K P W A S V I I S C K A S	G Y T F T D H A I H - -	W V K Q K P	
4) Q V Q L Q E S G A E L V K P G A S V I I S C K A S	G Y T F T D H A I H - -	W V K Q K P	
CDR-H2			
1) G \$ X L E W ! ! X I X X X X X G X X X Y X X X X	FWR-H3		K ! \$ X X ! % X D X S X X % ! Y X X X
2) E Q G L E F I G Y I S P G N D D I K Y N E K F K D	K A T L T A D K S S N T A Y M Q L - -		
3) E Q G L E F I G Y I S P G N D D I K Y N E K F K D	K A T L T A D K S S N T A Y M Q L - -		
4) G Q G L E W I G Y I S P G N D D I K Y N E K F K D	K A T L T A D K S S T A Y Y M Q L - -		
CDR-H3			
1) X S L X X E D % A X Y Y C X X	X X		W G
2) N S L T S E D S A V Y F C K R	S T N S F - - D Y - - - - -		W G
3) N S L T S E D S A V Y F C K R	S T N S F - - D Y - - - - -		W G
4) N S L T S E D S A V Y Y C K R	S T N E G S F E D Y - - - - -		W G
FWR-H4			
1) Q G T X V T V S S			
2) Q G T T V T V S S			
3) Q G T T V T V S S			
4) Q G T T V T V S S			

Leichte Kette (V_L):

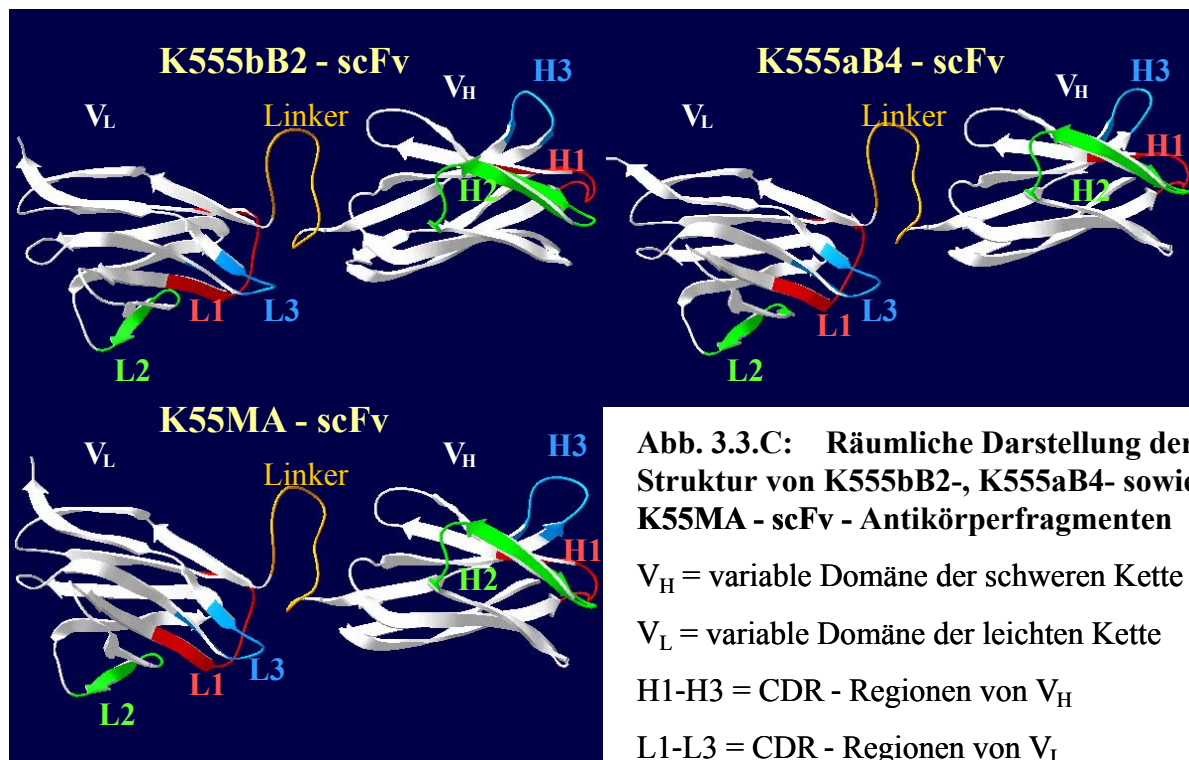
FWR-L1		CDR-L1	FWR-L2
1) ~ A V L T I Q P P X S ! % ! S L G X X V T I % C	X X S X X X X X X X X X X X X ! X	W Y Q Q K	
2) D I E L T Q S P S S L S A S L G D T I T I T C	H A S Q N I N I W - - - - - L S	W Y Q Q R	
3) D I E L T Q S P S S L S A S L G D T I T I T C	H A S Q N I L I Y - - - - - L S	W Y Q Q R	
4) D I E L T Q S P S S L S A S L G D T I T I T C	H A S Q N I L I Y - - - - - L S	W Y Q Q R	
CDR-L2			
1) X G X X P K ! L I Y X X % X X X S G V P X R F S G S ! S G T X X % L X I S X ! X X E D X !	FWR-L3		
2) P G N N P K L L I Y K A S N L H T G G P S R F R G S G S G T G F T L T I S S L Q P E D I A	G		
3) P G N N P K L L I Y K A S N L H T G G P S H F R G S G S G T G F T L T I S S L Q P E D I A	G		
4) P G N N P K L L I Y K A S N L H T G G P S H F R G S G S G T G F T L T I S S L Q P E D I A	G		
CDR-L3			
1) X Y # C	X X X X X X X X X X X X X X X X		F G X G T K L E I X K R A
2) T Y Y C	Q Q G Q S Y P W T - - - - -		F G G G T K L E L - K R -
3) T Y Y C	Q Q G Q S Y P W T - - - - -		F G G G T K L E L - K R -
4) T Y Y C	Q Q G Q S Y P W T - - - - -		F G G G T K L E L - K R -
FWR-L4			
1) X Y # C			
2) T Y Y C			
3) T Y Y C			
4) T Y Y C			

Abb. 3.3.B: Aminosäuresequenz-Vergleiche zwischen den V_H- und V_L-Domänen von gefäßspezifischen scFv-Klonen (K555bB2, K555aB4 und K55MA) und einer Konsensussequenz (Kabat-Datenbank)

Legende: FWR (H1-3 und L1-3) = Gerüstregionen; CDR (H-1,-2,-3 und L-1,-2,-3) = hypervariable Regionen; **Aminosäureabweichungen**; **Erkennungssequenzen der CDR-Regionen nach Kabat**

Zusätzlich zur Charakterisierung der Einzelkettenantikörper nach Kabat, wurden deren Aminosäuresequenzen mit einer Datenbank bereits publizierter, muriner Antikörper-Keimbahngene verglichen. Aus den erhaltenen Ergebnissen ging hervor, dass sich die generierten K555bB2-, K555aB4- und K55MA-scFv einigen bekannten Antikörperfamilien zuordnen ließen. Die V_H -Domäne der K555bB2- und K555aB4-Klone zeigte eine 90%-ige Homologie zu V_H - J558.48 Keimbahngenen, die aus der IgM-mRNA von LPS-stimulierten Zellen isoliert wurden (Datenbankeintrag NCBI: AF303879). Die V_H -Region des K55MA-scFv wies mit den oben genannten Genen eine Übereinstimmung von 98% auf. Die jeweiligen V_L - Domänen der drei untersuchten scFv-Klone besaßen eine hohe Homologie zum gr 32 Keimbahngenen (Datenbankeintrag NCBI: AJ231269). Dieser zur Klasse der V_L -kappa-Ketten-Keimbahngene gehörende Vertreter war mit der V_L -Domäne des K555bB2-Klons zu 91% und mit den V_L -Regionen der K555aB4- sowie K55MA-Klone zu 88% homolog.

Um feststellen zu können, ob und inwiefern sich die Aminosäurezusammensetzung der untersuchten scFv-Fragmente auf die Konformation deren Antigenbindungsstellen auswirkt, wurde mit Hilfe des automatischen „Protein-Homologie-Servers“ (Guex und Peitsch, 1997; Peitsch 1995; Schwede *et al.*, 2003) eine dreidimensionale Struktur der einzelnen scFv-Spezies errechnet und unter Verwendung des Swiss-Pdb-Viewer-Programms schematisch dargestellt (siehe Abb. 3.3.C).



Aus der, in Abb. 3.3.C präsentierten, computersimulierten 3D-Darstellung der K555bB2-, K555aB4- sowie K55MA-Antikörperstrukturen können zwischen den einzelnen scFv-Spezies keine eindeutigen Unterschiede in der Proteinfaltung ersehen werden. Die geringen Konformationsdifferenzen, welche hauptsächlich in den H1-H3 sowie L2- und L3-Regionen zu erkennen sind, deuten jedoch darauf hin, dass bereits kleine Abweichungen in der Aminosäureabfolge die Spezifität und Affinität von scFv-Antikörperfragmenten beeinflussen könnten.

3.4 Immunhistochemische Nachweise der CTA-Antikörperspezifität

Zur Verifizierung der aus dem „Biopanning“ sowie aus den Sequenzanalysen erhaltenen Ergebnisse sind, nach den im Kapitel 2.6 beschriebenen Protokollen, immunhistochemische Nachweise der CTA-Antikörperspezifität durchgeführt worden. Im ersten Teil dieser Experimentreihe wurde der Frage nach der genauen Lokalisierung von CSA (collateral specific antigen) auf Ratten-Kollateralgefäßen nachgegangen. Zu diesem Zweck wurden die präparierten Gefäßschnitte (siehe 2.6.1) mit dem aus Hybridomazellen isolierten und über die Protein L -Säule aufgereinigten CTA-157-Antikörper inkubiert und unter Verwendung von peroxidasegekoppelten DAM- bzw. GAM-Sekundärantikörper (siehe 2.1.9) immunhistochemisch angefärbt. Auf diese Weise konnten die CTA-157-Antikörpersignale mit den zellulären Verteilungsmustern der generierten, kollateralspezifischen Einzelkettenantikörper auf Rattengefäßschnitten *in situ* und *in vivo* verglichen werden. Dazu wurden die, auf der Oberfläche von M13-Phagen präsentierten, rekombinanten scFv-Fragmente zunächst auf den entsprechenden Gefäßpräparaten inkubiert, dann mit den Anti-M13- sowie GAM-PO- bzw. GAM-Cy₂-Antikörpern markiert und anschließend immunhistochemisch angefärbt (siehe 2.6.5-6). Ergänzt wurden diese Experimente durch die Untersuchung der Bindung von CTA-spezifischen scFv-Antikörperfragmenten auf den Gefäßen eines hepatozellulären Karzinoms. Nach der Lokalisierung der CTA-Expressionssignale auf Rattengefäßschnitten wurde, im zweiten Teil der Experimentreihe, deren Detektion auf Schnitten von Humangefäßen vorgenommen. Dazu sind die Gefäßpräparate, nach dem bereits erwähnten Versuchsaufbau (s.o.), unter Verwendung des CTA-157-Antikörpers sowie der kollateralspezifischen scFv-Phagen immunhistochemisch markiert und angefärbt worden. Die CTA-Färbungsergebnisse auf Ratten- sowie Humangefäßen wurden anschließend miteinander verglichen (siehe 3.5).

3.4.1 Lokalisierung der CTA-Expressionssignale in Rattengefäßendothelien mit Hilfe des CTA-157-Antikörpers

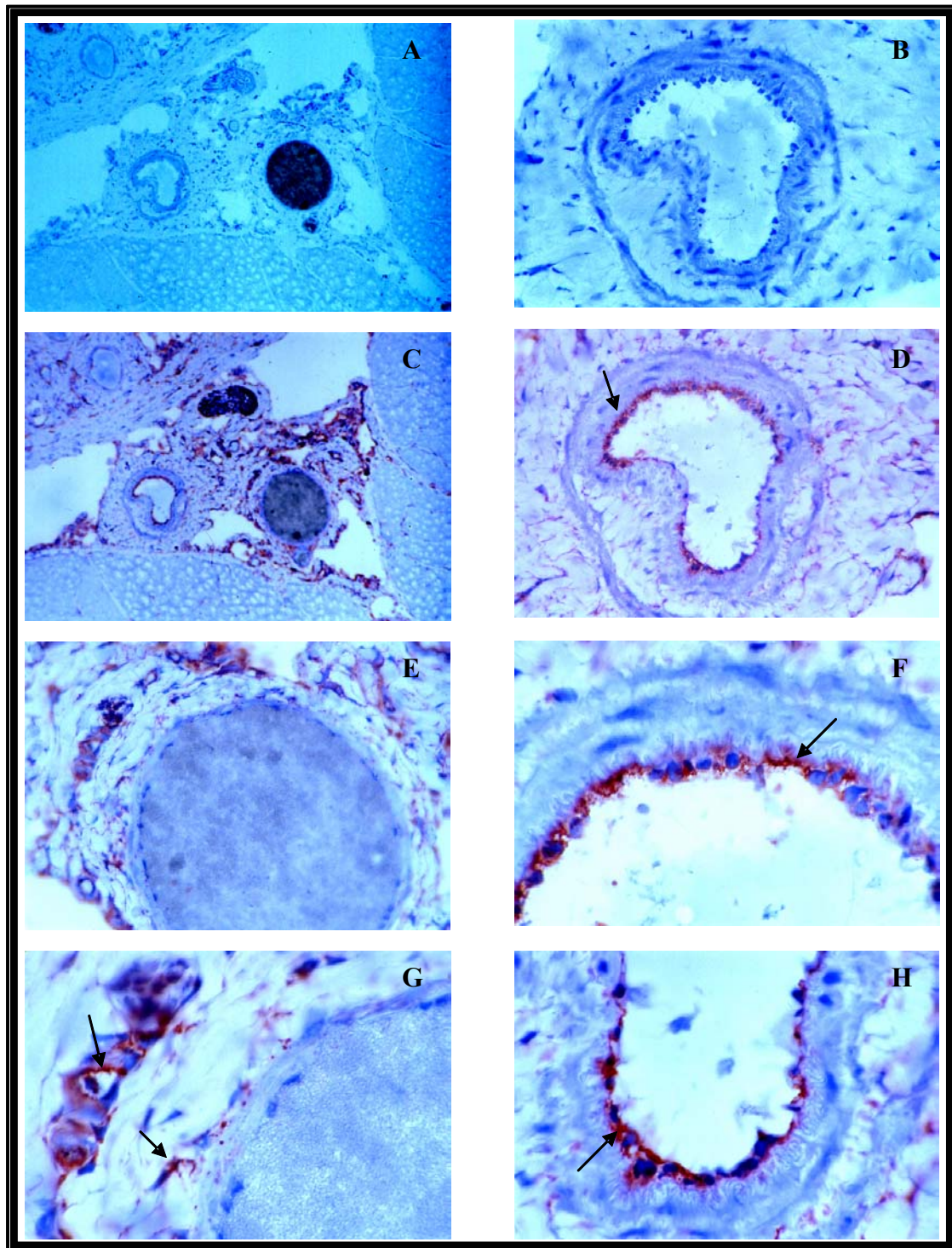


Abb. 3.4.1: CTA-157-Färbung serieller Rattengefäßschnitte aus ligiertem Probebein (3 Tage nach der Okklusion) unter Verwendung von DAM-PO-Sekundärantikörper

A-B: Kontrollschnitte ohne CTA-157; C-H: CTA-157-Antikörperfärbung; A + C: Übersicht (100 x Vergr.); B + D: Kollateralarterie, 400 x Vergr.; F + H: Kollateralarterie, 1000 x Vergr.; E + G: Kontrollgefäß (400 x und 1000 x Vergr.). Schwarze Pfeile: Antikörpersignale. Erläuterung auf Seite 127.

Für die immunhistochemischen Nachweise der CTA-Expression auf Rattengefäßschnitten sind sowohl acetonfixierte als auch unfixierte Gefrierpräparate verwendet worden. Anhand histologischer Untersuchungen wurden jedoch keine auffälligen Färbungsunterschiede zwischen den beiden oben genannten Präparatarten ermittelt. Nach einer genauen Analyse aller untersuchten Gefäßschnitte aus dem Probebein (siehe Abb. 3.4.1) konnte festgestellt werden, dass der CTA-157-Antikörper vorwiegend Epitope auf proliferierenden Kollateralarterien spezifisch erkennt (siehe Abb. 3.4.1.C, D, F und H). Eine stark ausgeprägte Antikörperfärbung war hierbei ausschließlich in der Endothelschicht dieser Gefäße zu beobachten (siehe Abb. 3.4.1.D, F und H). Dennoch konnten ebenfalls in den glatten Muskelzellen der Kollateralarterien vereinzelte Farbreaktionen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden auch in kleinen Kapillaren, Nervenzellen sowie auf Makrophagen einige CSA-Signale detektiert (Abb. 3.4.1.C). In nichtproliferierenden, arteriellen Gefäßen konnte nur eine sehr schwache CTA-157-Färbung registriert werden (Abb. 3.4.1.E und F). Die wenigen Farbsignale wurden hauptsächlich in den glatten Muskelzellen dieser Gefäße vorgefunden. Bei den Negativkontrollen, welche ohne Verwendung des Primärantikörpers präpariert wurden, konnte keine Immunreaktion nachgewiesen werden (3.4.1.A und B). Zur Überprüfung der CTA-157-Antikörperspezifität auf nichtproliferierenden Kollateralarterien, wurde des Weiteren eine immunhistochemische Färbung serieller Gefäßschnitte aus dem Kontrollbein der Ratten vorgenommen. Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass der CTA-157-Antikörper keine positiven Signale auf der Endothelschicht dieser Gefäße erkannt hat. Einige schwache Farbreaktionen wurden jedoch in den glatten Muskelzellen detektiert (Daten nicht gezeigt). Aus den oben aufgeführten Ergebnissen lässt sich schließen, dass die CTA-157-Epitope zum größten Teil auf Endothelzellen von proliferierenden Kollateralarterien lokalisiert sind.

3.4.2 Immunhistochemische Nachweise der CSA-Expression auf Rattengefäßschnitten unter Verwendung von CTA-spezifischen scFv-Phagen

Für die immunhistochemischen CSA-Nachweise mittels kollateralspezifischer scFv-Phagen sind die, aus dem „Biopanning“ ermittelten (siehe 3.2), hochaffinen K555aB4- sowie K555bB2- Klone verwendet worden. Beide Phagen-Spezies wurden für die Färbungsexperimente in einer Konzentration von 10^{13} - 10^{14} cfu/1 ml eingesetzt. Trotz einiger im „Biopanning“ festgestellten Spezifitätsunterschiede zwischen den beiden oben erwähnten scFv-Phagen, konnten auf der immunhistochemischen Ebene keine auffälligen Differenzen im Verteilungsmuster der Antikörpersignale registriert werden.

3.4.2.1 Untersuchung der Bindung von CTA-scFv-Phagen an Rattengefäßen *in situ*

Bei den *in situ* Experimenten wurde die gesamte immunhistochemische Reaktion (Inkubation der untersuchten Phagen auf Rattengefäßen, Markierung der Phagen mit entsprechenden Antikörpern usw., siehe 2.6.5 und 2.6.6) außerhalb des Tierorganismus, auf den dazu vorgesehenen Gefäßpräparaten durchgeführt. Aus den erhaltenen Ergebnissen ging hervor, dass die generierten, kollateralspezifischen K555bB2- sowie K555aB4-Antikörperfragmente an proliferierende Kollateralarterien assoziierten (Abb. 3.4.2.1.1.C sowie 3.4.2.1.2.D, E und F). Dabei waren die detektierten Farbsignale vorwiegend in der Endothelschicht dieser Gefäße lokalisiert (Abb. 3.4.2.1.2.E und F). Die nichtproliferierenden Kollateralarterien aus dem jeweiligen Kontrollbein der Ratten (Abb. 3.4.2.1.1.D) zeigten hingegen keine Immunreaktion mit den CTA-scFv -Phagen (Abb. 3.4.2.1.2.A-C).

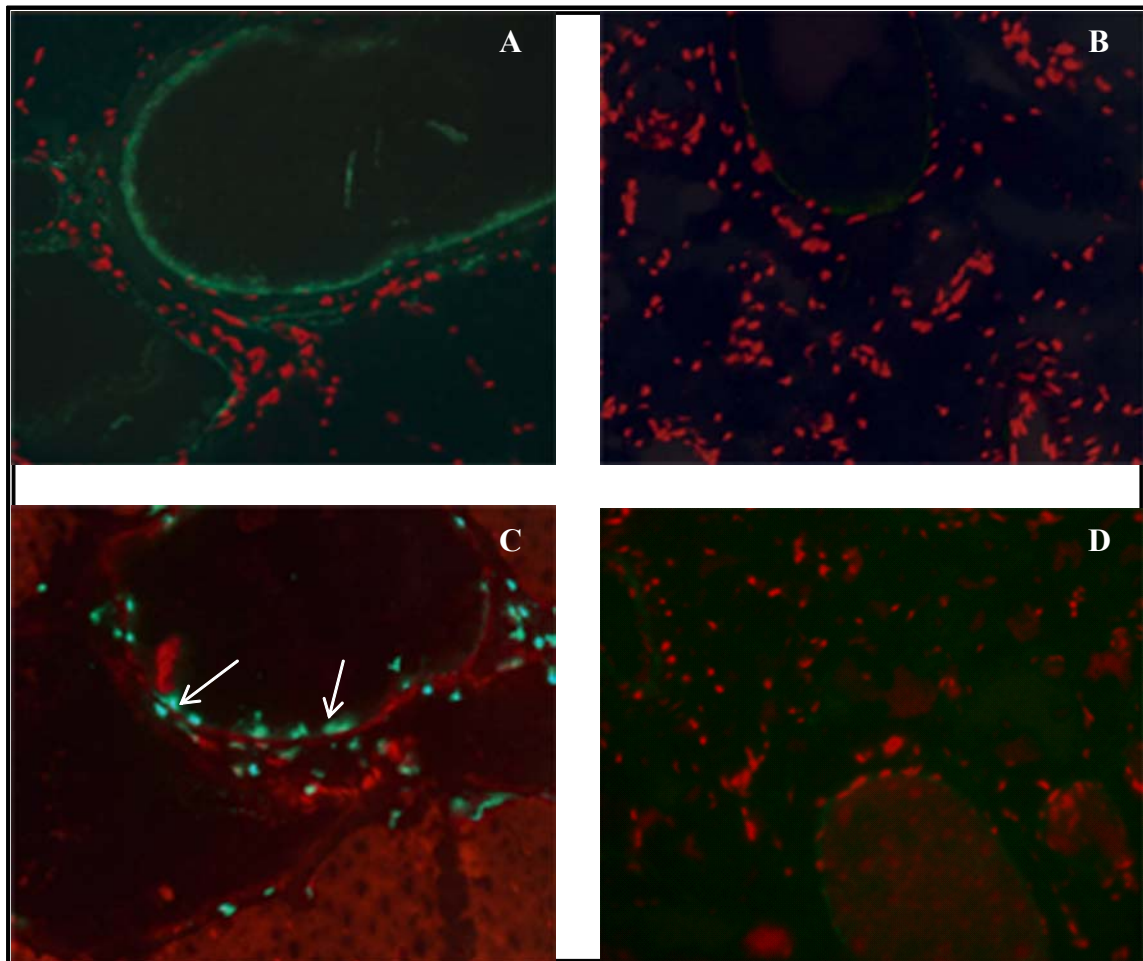


Abb. 3.4.2.1.1: BrdU-Fluoreszenzfärbung zum Nachweis der Proliferation von wachsenden Ratten-Kollateralgefäßen

A: Kontrollfärbung (ohne BrdU-Ak.) auf dem Probebein. Keine Proliferationssignale vorhanden. Im Vordergrund grüne Eigenfluoreszenz der *Lamina elastica interna* deutlich zu erkennen. B: Kontrollfärbung (s.o.) auf dem Kontrollbein; C: BrdU-Färbung auf dem Probebein (weiße Pfeile zeigen Proliferationssignale); D: BrdU-Färbung auf dem Kontrollbein. Sekundärantikörper: GAM-Cy₂; Kernfärbung: Propidiumjodid; Vergrößerung: 400-fach.

Die in direkter Nachbarschaft zu proliferierenden Kollateralarterien liegenden Gefäße (Abb.3.4.2.1.2.D) wiesen ebenfalls keine positiven Farbsignale mit den CTA-scFv-Phagen auf. Um die Gefahr einer möglichen, unspezifischen Antikörperfärbung auszuschließen, wurden die untersuchten Gefäßpräparate zusätzlich mit den scFv-negativen M13-Kontrollphagen immunhistochemisch getestet. Wie den Abbildungen 3.4.2.1.1.A-B und 3.4.2.1.2.A-C zu entnehmen ist, konnten sowohl auf den Gefäßen aus dem Probebein als auch auf denjenigen aus dem Kontrollbein keine unspezifischen Antikörperreaktionen registriert werden.

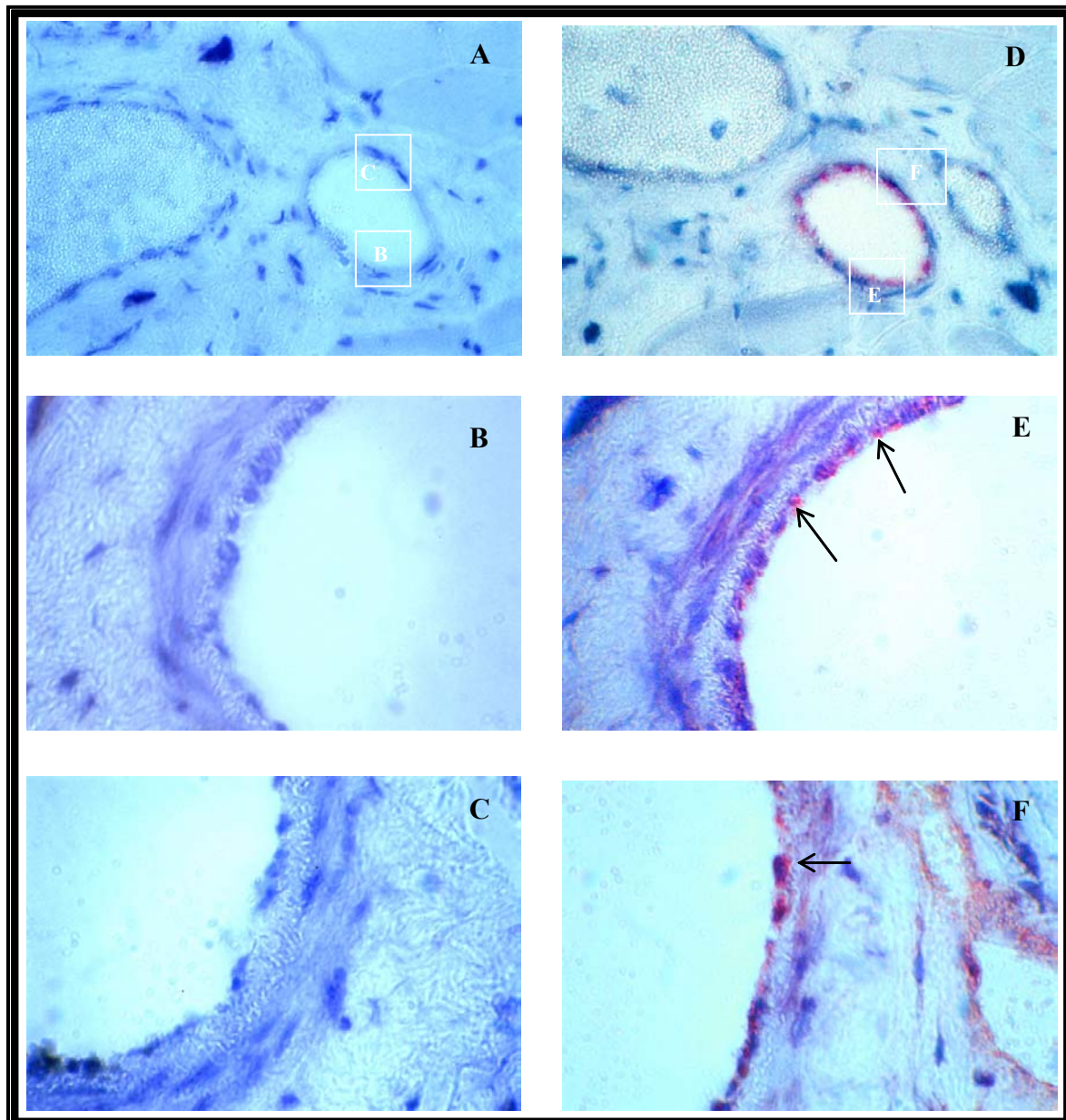


Abb. 3.4.2.1.2: Immunhistochemische Färbung von K555bB2-scFv-Phagen sowie M13-Kontrollphagen auf Rattengefäßschnitten

A-C: M13-Kontrollphagen zeigen keine Immunreaktion auf Gefäßen aus dem Probebein; D-F: K555bB2-scFv-Phagenfärbung auf Gefäßen aus dem Probebein (schwarze Pfeile = Färbungssignale); A und D: Übersicht (400 x Vergr.); B, C, E und F: 1000 x Vergr.; Sekundäntikörper: Anti-M13; Tertiäntikörper: GAM-PO; Gegenfärbung der Zellkerne: Mayers Hemalaun. Erläuterung im Text.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der CSA-Lokalisation in Rattengefäßen mittels des CTA-157-Antikörpers (siehe 3.4.1) korrelierten mit den oben beschriebenen *in situ*-Färbungen unter Verwendung von kollateralspezifischen scFv-Phagen. In den beiden nacheinander aufgeführten Versuchsreihen wurde das Verteilungsmuster der CTA-Signale vorwiegend in der Endothelschicht von proliferierenden Kollateralarterien detektiert. Die Endothelzellen der Kontrollgefäße zeigten hingegen keine Immunreaktion mit den untersuchten Antikörpern. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die aus Hybridomazellen generierten K555bB2- sowie K555aB4-Einzelkettenantikörper-Spezies imstande sind CTA-Epitope auf Rattengefäßschnitten spezifisch zu erkennen.

3.4.2.2 Untersuchung der Bindung von CTA-scFv-Phagen an Rattengefäße *in vivo*

Bei der Untersuchung der CTA-Bindungsaffinität *in vivo* sind die kollateralspezifischen K555bB2- und K555aB4-scFv-Phagen sowie die M13-Kontrollphagen in separaten Experimentansätzen den Versuchstieren intravasal injiziert worden (siehe 2.4.4.3). Nach 10-minütiger Zirkulation der Phagen im Gefäßsystem wurden den Ratten die Kollateral- und die Kontrollgefäße entnommen und für die „Biopanning“- (siehe 3.2.4) bzw. die immunhistochemischen Experimente weiterverwendet. Eine genaue Analyse der gefärbten Gefäßschnitte ergab, dass die untersuchten K555bB2- und K555aB4-scFv-Antikörperfragmente auch unter *in vivo*-Bedingungen in der Lage sind Epitope auf proliferierenden Kollateralarterien spezifisch zu erkennen (Abb.3.4.2.2.1.F-H). Aufgrund des scheinbar unabwendbaren Kollabierens der präparierten Gefäße während der Einbettung, konnten leider keine eindeutigen Aufschlüsse über die genaue Lokalisation der CTA-Signale in den entsprechenden Gefäßstrukturen gewonnen werden. Ähnlich wie bei den *in situ*-Experimenten wurden auf den benachbarten Kontrollgefäßen keine positiven scFv-Farbsignale detektiert (Abb.3.4.2.2.1.C). Die aus dem jeweiligen Kontrollbein der Tiere isolierten Kollateralarterien zeigten ebenfalls keine Immunreaktion mit den CTA-scFv-Phagen (Abb.3.4.2.2.1.D).

Ergänzend zur Phagenfärbung wurden die untersuchten Gefäße mit einem PCNA-Antikörper (siehe 2.1.9) auf proliferative Effekte hin geprüft. Aus den erhaltenen Ergebnissen ging hervor, dass es sich bei den aus dem Probebein isolierten Gefäßen tatsächlich um wachsende Kollateralarterien handelte (Abb.3.4.2.2.1.B und E). Die detektierten Proliferations-signale wurden sogar an genau den gleichen Gefäßstellen wie diejenigen aus der CTA-scFv-Phagenfärbung vorgefunden (Abb.3.4.2.2.1.E und F). Alle übrigen, getesteten Gefäßproben wiesen hingegen keine Proliferationsmerkmale auf (Daten nicht gezeigt).

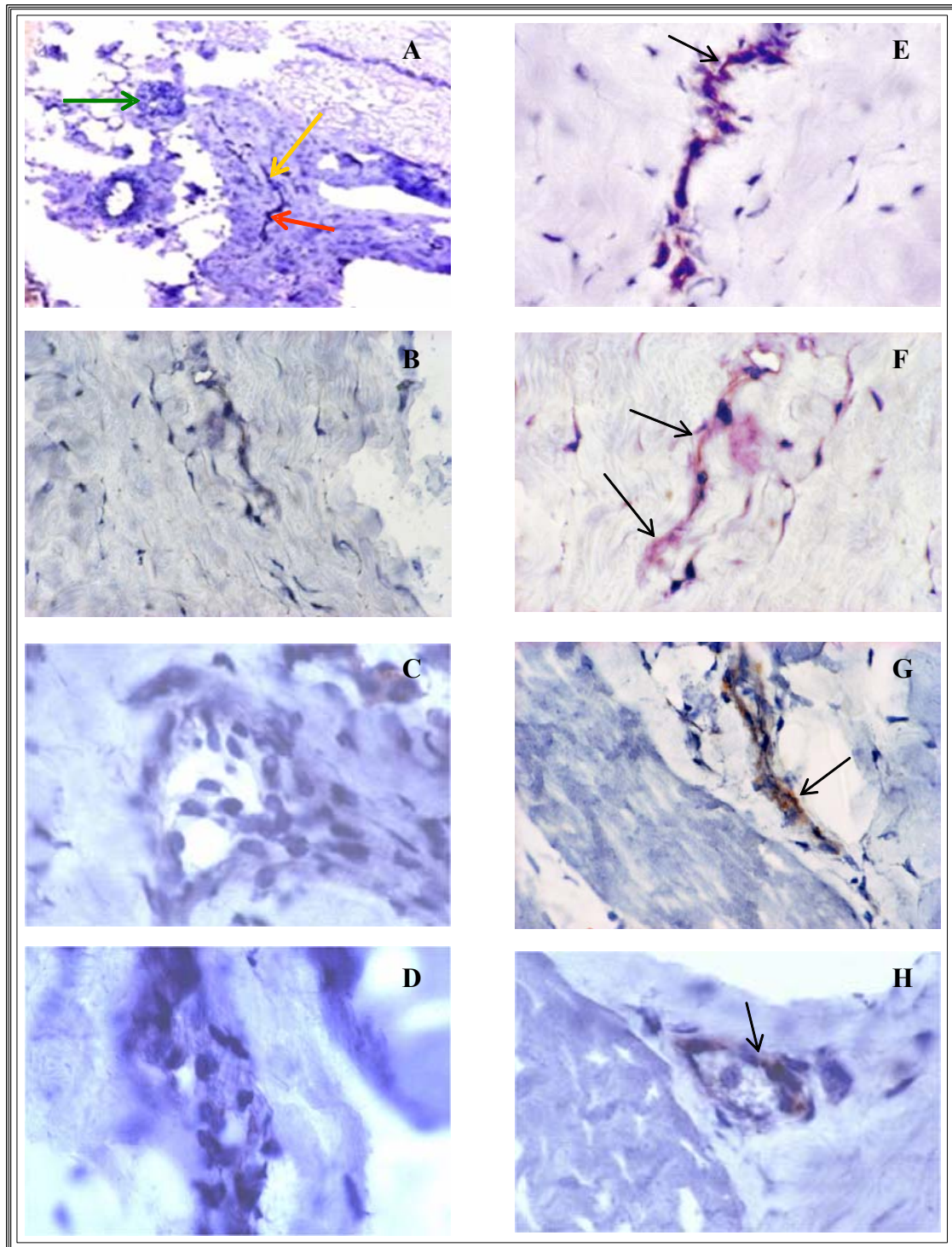
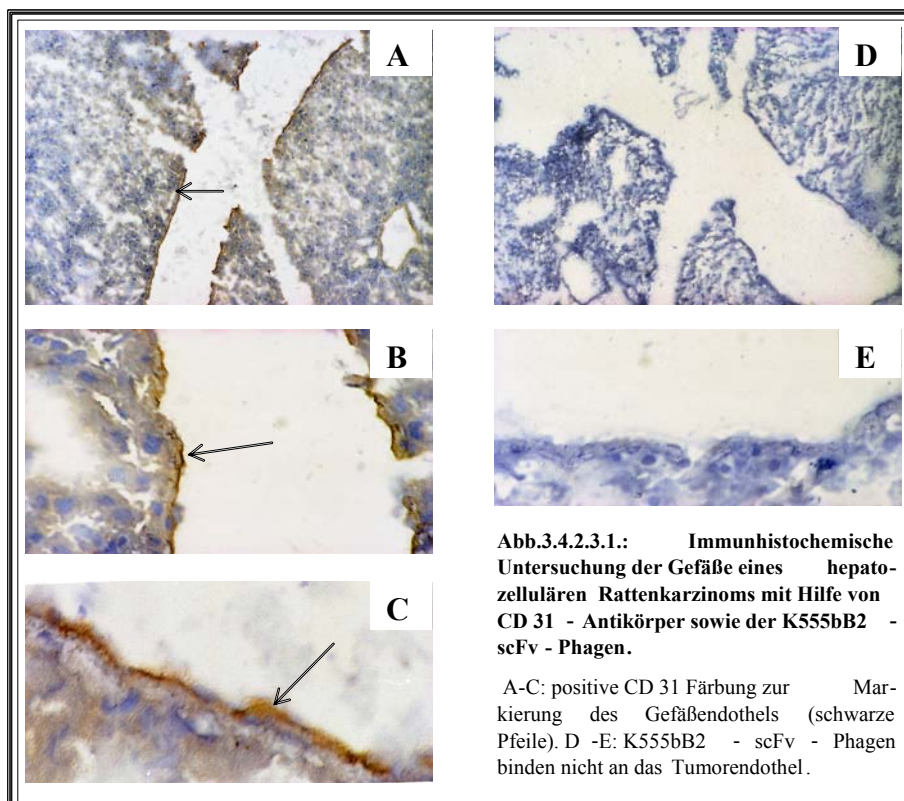


Abb.3.4.2.2.1: Immunhistochemische Nachweise der Bindung von K555bB2-scFv-Phagen an proliferierende Rattengefäße *in vivo*

A: Übersicht (100 x Vergr., Probebein); B: PCNA-Negativkontrolle (400 x Vergr., Probebein); C: K555bB2-scFv-Phagen zeigen keine Immunreaktion auf einem Kontrollgefäß aus dem Probebein (1000 x Vergr.); D: K555bB2-scFv-Phagen weisen keine Antikörpersignale auf einem Gefäß aus dem Kontrollbein auf (1000 x Vergr.); E: PCNA-Färbung (600 x Vergr., Probebein); F-H: K555bB2-scFv-Phagenfärbung (F: 600 x Vergr., G-H: 1000 x Vergr., Probebein). Sekundärantikörper für die PCNA-Färbung: GAM-PO; Sekundärantikörper für die Phagenfärbung: Anti-M13; Tertiärantikörper: GAM-PO. Pfeile: schwarz = Antikörpersignale, gelb = Bildausschnitte G und H, rot = Bildausschnitte B, E und F; grün = Bildausschnitt C.

3.4.2.3 Untersuchung der Bindung von CTA-scFv-Phagen an Tumorgefäße

In den vorangegangenen Kapiteln (siehe 3.4.2.1-2) wurde bereits gezeigt, dass die generierten K555bB2- sowie K555aB4-Antikörperfragmente mit einer sehr hohen Affinität an Antigenstrukturen, die auf Endothelzellen von wachsenden Kollateralarterien lokalisiert sind, binden. Dabei waren die proliferativen Eigenschaften dieser Gefäße im Wesentlichen durch eine künstlich eingeleitete Okklusion ausgelöst worden (siehe 3.2.2). Um feststellen zu können, ob die CTA-scFv-Antikörperfragmente ebenfalls imstande sind, Epitope auf Endothelien von proliferierenden Tumorgefäßen spezifisch zu erkennen, wurden immunhistochemische Färbungen auf Gefäßschnitten eines exemplarisch ausgewählten, hepatozellulären Rattenkarzinoms durchgeführt. Zur Markierung der Endothelschicht der untersuchten Tumorgefäße diente der CD31-Antikörper (Abb.3.4.2.3.1.A, B und C). Die Überprüfung der Gefäßproliferation erfolgte mit dem bereits erwähnten (siehe Kapitel 3.4.2.2) PCNA-Antikörper (Daten nicht gezeigt). Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass die kollateralspezifischen K555bB2- sowie K555aB4-Antikörperfragmente keine Antigenstrukturen auf Endothelzellen von proliferierenden Tumorgefäßen spezifisch erkannt haben (Abb. 3.4.2.3.1.D und E). Die glatten Muskelzellen der oben genannten Gefäße wiesen ebenfalls keine positiven Immunreaktionen auf. Aus den aufgeführten Ergebnissen lässt sich schließen, dass auf einigen proliferierenden Gefäßen angiogenetischen Ursprungs (z.B. auf Tumorgefäßen) kein CSA-Komplex exprimiert wird.



3.4.3 Lokalisierung der CSA-Expressionssignale in Humangefäßendothelien mit Hilfe des CTA-157-Antikörpers

Nachdem das Expressionsmuster des CSA-Komplexes auf Rattengefäßen ermittelt worden war, wurden nun Untersuchungen unternommen, die CTA-157-Antikörpersignale ebenfalls auf humanen Gefäßschnitten immunhistochemisch nachzuweisen und zu lokalisieren. Zu diesem Zweck wurden proliferierende Kollateralgefäße von Patienten mit akuter Ischämie sowie nichtproliferierende Gefäße von Kontrollpatienten eingesetzt. Eine genaue Analyse der Färbungsergebnisse auf Gefäßpräparaten von Patienten mit akuter Ischämie zeigte, dass der CTA-157-Antikörper imstande war Antigenstrukturen auf diesen Gefäßen spezifisch zu erkennen. Anders, als im Rattenmodell, wurden hierbei die meisten Antikörpersignale in den glatten Muskelzellen der Gefäße vorgefunden (Abb.3.4.3.1.B). Dennoch konnten auch in der Endothelschicht der untersuchten Gefäßproben deutliche Immunreaktionen registriert werden (Abb.3.4.3.1.C). Auf den parallel dazu getesteten Negativkontrollen wurden hingegen keine Antikörpersignale nachgewiesen (Abb.3.4.3.1.D). Die Untersuchung der Antikörperfärbung auf Gefäßpräparaten von Kontrollpatienten zeigte vereinzelte CTA-157-Signale, die vorwiegend in den glatten Muskelzellen der Gefäße lokalisiert waren (Abb.3.4.3.2.B). Die Endothelschicht dieser Gefäße wies auf den ersten Blick keine positive Färbung auf, erst bei genauerer Betrachtung einiger Gefäßausschnitte konnten auch hier einzelne CTA-157-positive Bereiche erkannt werden (Abb.3.4.3.2.C).

Um die proliferativen Effekte der beiden untersuchten Gefäßarten zu testen, wurden diese mit einem Antikörper gegen das nukleäre Proliferationsantigen Ki-67 inkubiert. Aus den erhaltenen Ergebnissen ging hervor, dass ausschließlich die von Patienten mit akuter Ischämie isolierten Gefäße deutliche Proliferationsmerkmale aufwiesen. Ähnlich wie bei der oben erwähnten CTA-157-Färbung, wurden auch hierbei die meisten Proliferations-signale in den glatten Muskelzellen detektiert (Abb.3.4.3.1.F). Dennoch konnten in der Endothelschicht dieser Gefäße ebenfalls positive Immunreaktionen mit dem Ki-67-Antikörper registriert werden (Abb.3.4.3.1.G). Im Gegensatz dazu zeigten die von Kontrollpatienten gewonnenen Gefäßproben weder im Endothel noch in den glatten Muskelzellen positive Antikörpersignale (3.4.3.2.E-F). Die Negativkontrollen wiesen ebenfalls keine Färbung auf (Abb. 3.4.3.1.D).

Aus den oben aufgeführten immunhistochemischen Untersuchungen geht hervor, dass die vom CTA-157-Antikörper erkannten Antigene sowohl auf proliferierenden als auch auf nichtproliferierenden Humangefäßen exprimiert wurden. Die detektierten Antikörpersignale waren jedoch auf den proliferierenden Gefäßen von Patienten mit akuter Ischämie wesentlich stärker ausgeprägt, als auf denjenigen von Kontrollpatienten.

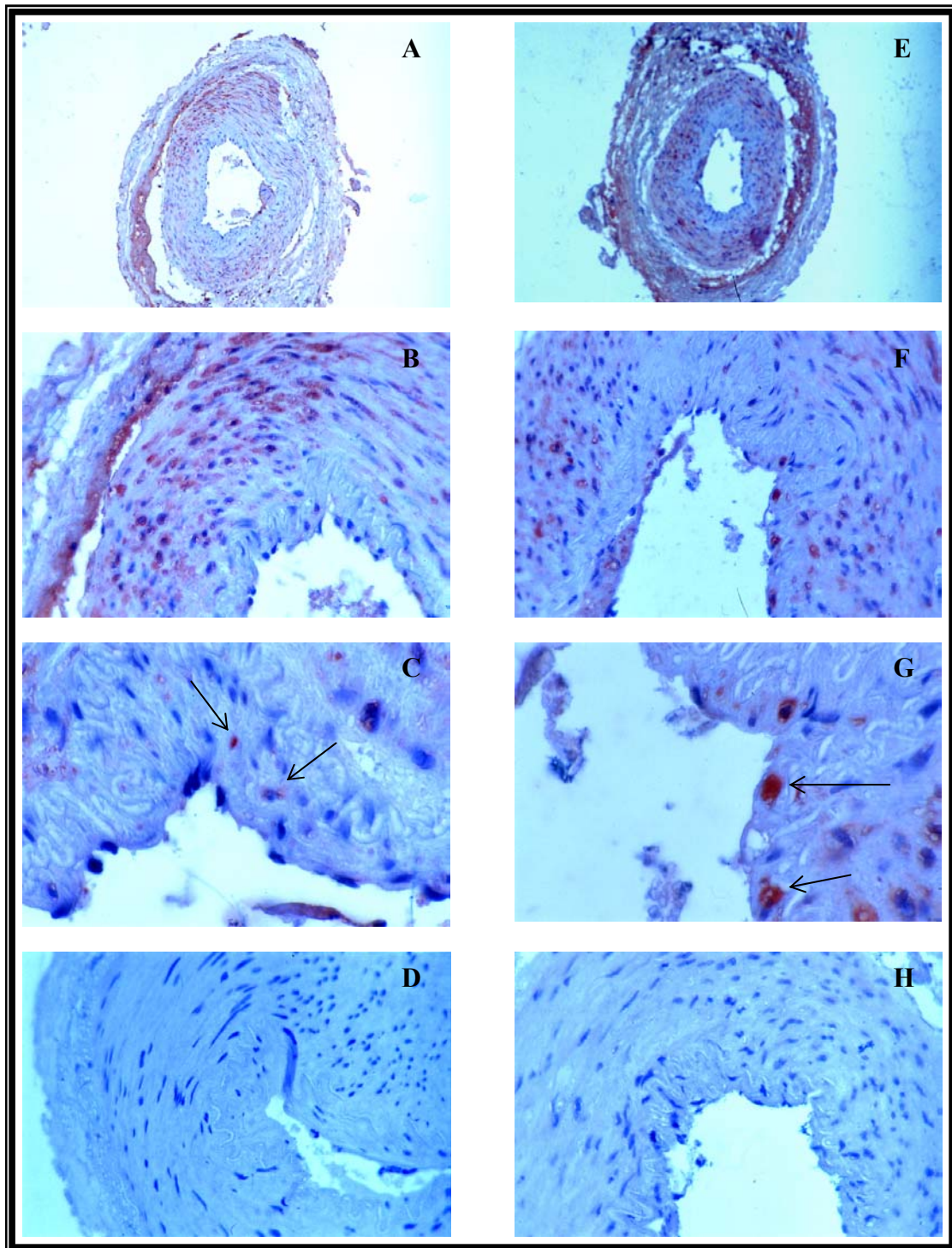


Abb.3.4.3.1: CTA-157- und Ki-67-Antikörpernachweise auf Humangefäßschnitten eines Patienten mit akuter Ischämie

A-C: CTA-157-Antikörperfärbung. Die Antigensignale sind vorwiegend in glatten Muskelzellen, vereinzelt auch im Gefäßendothel zu erkennen (schwarze Pfeile). A = Übersicht (100 x Vergr.), B = Ausschnitt (400 x Vergr.), C = Ausschnitt (1000 x Vergr.); D = CTA-157-Negativkontrolle (400 x Vergr.); Sekundärantikörper = GAM-PO; E-H: Ki-67-Antikörperfärbung. Die Ki-67-Antigensignale treten hauptsächlich in glatten Muskelzellen, vereinzelt auch im Endothel des Gefäßes auf (schwarze Pfeile). E = Übersicht (100 x Vergr.), F = Ausschnitt (400 x Vergr.), G = Ausschnitt (1000 x Vergr.), H = Negativkontrolle (400 x Vergr.). Sekundärantikörper = DAR-PO; Die jeweiligen Antikörpersignale sind als rot gefärbte Punkte deutlich zu erkennen.

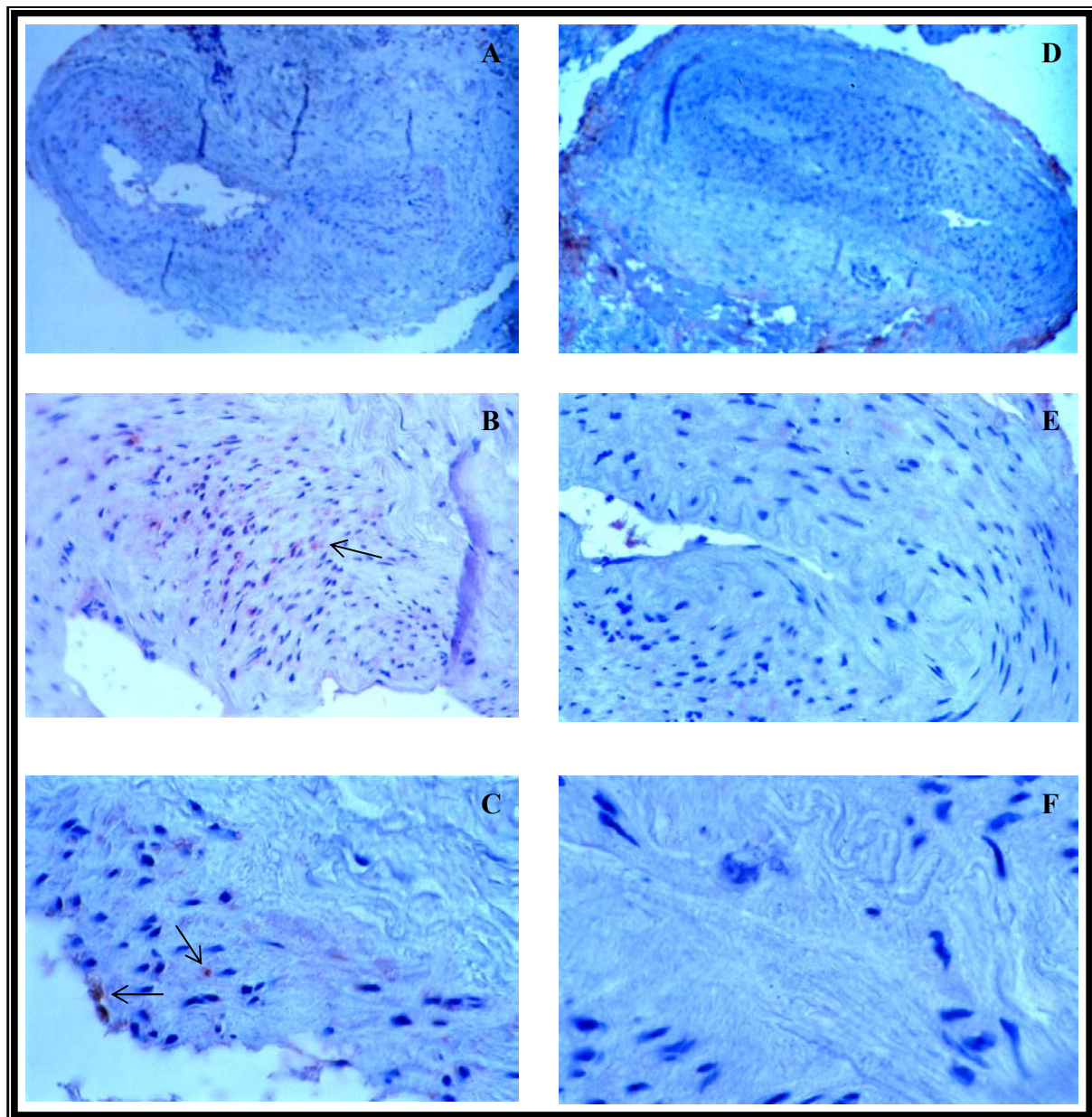


Abb. 3.4.3.2: CTA-157- und Ki-67-Antikörpernachweise auf Humangefäßschnitten eines Kontrollpatienten

A-C: CTA-157-Antikörperfärbung, vereinzelte CTA-157-Antikörpersignale sind vorwiegend in glatten Muskelzellen des Gefäßes zu erkennen (schwarze Pfeile). A = Übersicht (100 x Vergr.), B = Ausschnitt (400 x Vergr.), C = Ausschnitt (1000 x Vergr.); Sekundärantikörper = GAM-PO; D-F: Ki-67-Antikörperfärbung, keine Ki-67-Farbreaktion zu erkennen. D = Übersicht (100 x Vergr.), E = Ausschnitt (400 x Vergr.), F = Ausschnitt (1000 x Vergr.); Sekundärantikörper = DAR-PO.

3.4.4 Immunhistochemische Nachweise der CSA-Expression auf Humangefäßschnitten unter Verwendung von CTA-spezifischen scFv-Phagen

Nach Lokalisierung des CSA-Expressionsmusters auf Humangefäßschnitten mit Hilfe des CTA-157-Antikörpers (siehe 3.4.3) sollte des Weiteren untersucht werden, ob sich die CSA-Antigensignale ebenfalls unter Verwendung von kollateralspezifischen K555bB2- sowie K555aB4-Antikörperfragmenten auf den oben erwähnten Gefäßpräparaten immunhistochemisch nachweisen lassen. Wie der Abbildung 3.4.4 zu entnehmen ist, konnten sowohl auf den proliferierenden Kollateralgefäßen von Patienten mit akuter Ischämie, als auch auf den nichtproliferierenden Gefäßproben von Kontrollpatienten einzelne spezifische Immunreaktionen detektiert werden (siehe schwarze Pfeile). Die dokumentierte CTA-Antikörperfärbung war zwar nicht so stark ausgeprägt gewesen wie diejenige, die im Kapitel 3.4.3 beschrieben wurde, konnte aber dennoch sowohl in der Endothelschicht als auch in den glatten Muskelzellen der Gefäße eindeutig nachgewiesen werden.

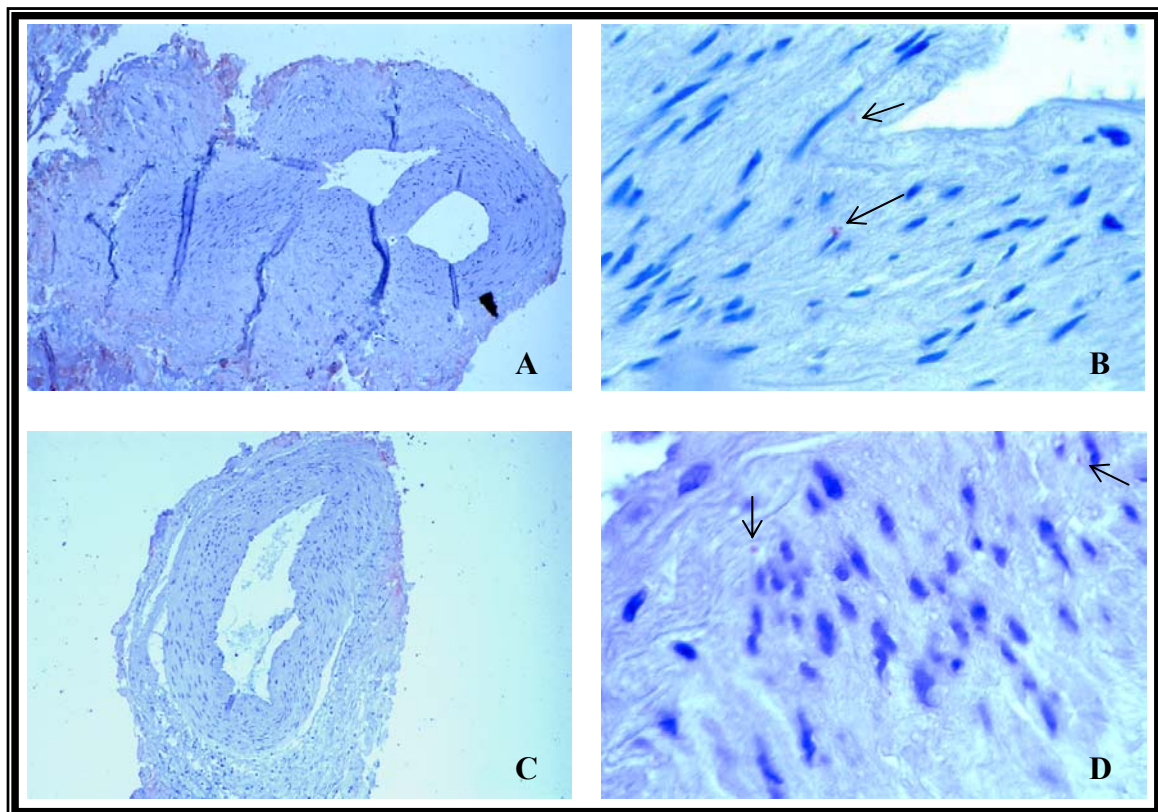


Abb. 3.4.4: Immunhistochemische Färbung von K555bB2-scFv-Phagen auf Humangefäßschnitten

A-B: K555bB2-scFv-Phagenfärbung auf Gefäßschnitten vom Kontrollpatienten, vereinzelte Antikörpersignale sind sowohl im Endothel, als auch in glatten Muskelzellen sichtbar (schwarze Pfeile). A = Übersicht (100 x Vergr.), B = Ausschnitt (1000 x Vergr.). C-D: K555bB2-scFv-Phagenfärbung auf Gefäßschnitten vom Patienten mit akuter Ischämie, vereinzelte Antikörpersignale sind vorwiegend in glatten Muskelzellen zu erkennen (schwarze Pfeile). C = Übersicht (100 x Vergr.), D = Ausschnitt (1000 x Vergr.).

Zur Überprüfung der Antikörperspezifität der CTA-scFv-Phagen wurden zusätzlich Färbungsexperimente mit den CTA-negativen M13-Kontrollphagen durchgeführt. Auf den untersuchten Gefäßschnitten konnten jedoch keine unspezifischen Antikörpersignale registriert werden. Aus den aufgeführten Ergebnissen lässt sich schließen, dass die auf Rattengefäßen ausselektierten, kollateralspezifischen K555bB2- sowie K555aB4-Einzelkettenantikörper in der Lage sind einige auf Humangefäßen exprimierte CSA-Antigenstrukturen spezifisch zu erkennen.

3.4.5 Vergleich der CSA-Antigenexpressionsmuster auf Endothelien von Ratten- und Humangefäßen

Mit Hilfe des CTA-157-Antikörpers sowie der CTA-spezifischen K555bB2- und K555aB4-scFv-Phagen konnte die Expression des CSA-Komplexes sowohl auf Ratten- als auch auf Humangefäßschnitten erfolgreich nachgewiesen werden. Im Rattenmodell sind die meisten CTA-Signale im Endothel von proliferierenden Kollateralarterien detektiert worden. Die glatten Muskelzellen dieser Gefäße wiesen nur vereinzelte Farbreaktionen auf. Die Endothelschicht von nichtproliferierenden Kollateralarterien sowie anderen Kontrollgefäßen zeigte hingegen keine spezifischen Antikörpersignale. In den glatten Muskelzellen dieser Gefäße konnten jedoch schwache CTA-Farbreaktionen registriert werden. Proliferierende Gefäße aus einem hepatozellulären Karzinom wiesen weder im Endothel, noch in den glatten Muskelzellen positive CTA-Antikörpersignale auf.

Im Humanmodell wurde die Expression des CSA-Komplexes sowohl auf proliferierenden als auch auf nichtproliferierenden Gefäßpräparaten nachgewiesen. Die proliferierenden Gefäßproben zeigten jedoch deutlich stärkere Antikörperfärbungen (siehe Nachweise mit dem CTA-157-Antikörper) als die nichtproliferierenden. Ein wesentlicher Unterschied zu den Rattengefäßen bestand hier im Verteilungsmuster der CTA-Antikörpersignale in den entsprechenden Gefäßbereichen. Im Gegensatz zu den Rattengefäßen, wurden in Humangefäßproben die meisten CTA-Antikörpersignale in den glatten Muskelzellen vorgefunden. Die Endothelschicht dieser Gefäße wies nur vereinzelte Farbreaktionen auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das CSA-Komplex auf Gefäßen von zwei verschiedenen Spezies exprimiert wird (Ratte und Mensch). Die unterschiedlichen Expressionsmuster der CSA-Antigensignale in den untersuchten Ratten- bzw. Humangefäßen sind möglicherweise auf deren diverse physiologischen Ursprünge sowie auf die Heterogenität der einzelnen Gefäßstrukturen zurückzuführen (siehe 4.3).

3.5 Untersuchung der VEGFR-2-Antigenexpression auf Human- und Rattengefäßen mittels VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Phagen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde bereits gezeigt, dass mit Hilfe von generierten Einzelkettenantikörpern, die gegen das CSA-Komplex gerichtet waren, die Heterogenität von arteriogenen und nichtarteriogenen Gefäßen im Ratten- sowie Humanmodell nachgewiesen werden konnte. In der folgenden Experimentreihe sollte nun am Beispiel der VEGFR-2-Antigenexpression das Verteilungsmuster eines weiteren gefäßwachstumsspezifischen Antikörpermoleküls auf Kollateral- sowie Kontrollgefäßen verschiedener Spezies (Ratte und Mensch) untersucht werden. Zur Detektion der VEGFR-2-Antigen-signale wurden die von Herrn Dr. T. Böldicke (GBF, Braunschweig) freundlicherweise zur Verfügung gestellten VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Antikörperfragmente eingesetzt. Diese auf der Oberfläche von M13-Phagen präsentierten Einzelkettenantikörper stammen ursprünglich aus Hybridomazellen, die aus den B-Lymphozyten von Mäusen generiert wurden, welche mit der extrazellulären Domäne des humanen VEGFR-2 (KDR) immunisiert worden waren. Der oben erwähnte A7-scFv-Antikörperklon wurde zuvor durch „Biopanning“ auf KDR markierten Mikrotiterplatten aus einer VEGFR-2-Phagenbibliothek ausselektiert, angereichert und anschließend im Phagen-ELISA, FACS, BIAcore sowie durch immunhistochemische Analysen (auf Humangefäßschnitten von Nierenarterien) auf seine Affinität zum VEGFR-2 getestet (Böldicke *et. al.*, 2001).

3.5.1 „Biopanning“ und Anreicherung von VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Phagen auf Humangefäßen

Zur Untersuchung der Bindungsaffinität von VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Phagen auf humanen Kollateral- und Kontrollgefäßen (*in situ*) wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit „Biopanning“-Experimente auf Gefäßschnitten von Patienten mit akuter Ischämie sowie von Kontrollpatienten durchgeführt (Versuchsprotokoll siehe 2.4.4.1). Aus den erhaltenen Ergebnissen ging hervor, dass die VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Antikörperfragmente imstande waren KDR-Epitope auf beiden oben genannten Gefäßexemplaren spezifisch zu erkennen. Im Verlauf von drei aufeinander folgenden „Biopanning“-Runden konnte auf den Gefäßpräparaten von Kontrollpatienten eine deutliche Steigung der Anzahl an positiven A7-scFv-Klonen beobachtet werden (1. Runde: 536 Klone, 2. Runde: 738 Klone, 3. Runde: 1074 Klone). Auf den proliferierenden Kollateralarterien von Patienten mit akuter Ischämie wurde hingegen nach allen drei „Biopanning“-Experimenten eine nahezu gleich bleibende Anzahl antigenassoziierter A7-scFv-Phagen registriert (Abb. 3.5.1).

Aus einem Vergleich der ermittelten Phagenmengen auf den oben erwähnten Gefäßproben ging hervor, dass die untersuchten VEGFR-2-Antigensignale auf den Kontrollgefäßen wesentlich stärker ausgeprägt waren, als auf den proliferierenden Kollateralarterien (siehe Abb. 3.5.1).

Um ein Kontaminationsrisiko mit unspezifischen Reaktionspartnern auszuschließen, wurden die oben erwähnten Gefäßexemplare einem „Biopanning“ mit den negativen M13-Kontrollphagen unterzogen. Im Anschluss an das Experiment, konnten auf den entsprechenden Selektionsagarplatten keine M13-Phagenkolonien detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund deutete darauf hin, dass durch stringente Waschbedingungen (siehe 3.2.3) alle unspezifischen Phagen erfolgreich entfernt werden konnten.

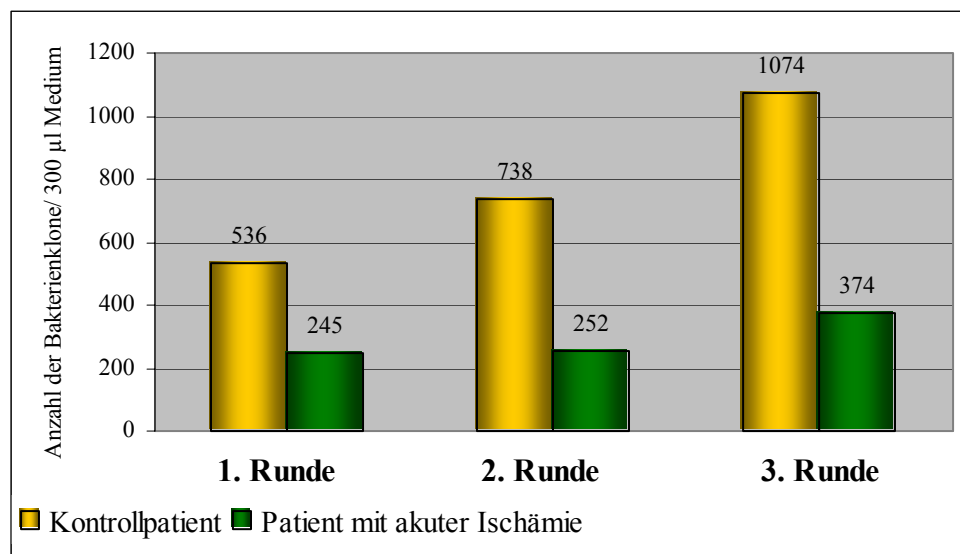


Abb. 3.5.1: Anreicherung von VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Phagen auf Humangefäßschnitten (*in situ*)

Die VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Phagen konnten nach allen drei „Biopanning“-Runden auf den Humangefäßschnitten nachgewiesen werden. Die Anzahl der auf Kontrollgefäßen detektierten A7-scFv-Klone lag deutlich höher (gelbe Balken), als die Menge der auf proliferierenden Kollateralarterien ermittelten A7-scFv-Phagen (grüne Balken).

3.5.2 Immunhistochemische Nachweise der VEGFR-2-Expression auf Humangefäßen unter Verwendung von A7-scFv-Phagen

Zur Verifizierung der aus den „Biopanning“-Experimenten erhaltenen Ergebnisse sowie zur genauen Lokalisierung der KDR-Antigensignale auf den untersuchten Humangefäßen (s.o.) wurden immunhistochemische VEGFR-2-Antikörperfärbungen unter Verwendung von VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Phagen vorgenommen. Die Färbungsergebnisse zeigten, dass sowohl auf den nichtproliferierenden Gefäßen von Kontrollpatienten als auch auf den

proliferierenden Kollateralarterien von Patienten mit akuter Ischämie deutliche VEGFR-2-Antigensignale nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.5.2.1-2). Analog zu den „Biopanning“-Experimenten wurde auch auf immunhistochemischer Ebene eine wesentlich stärkere A7-scFv-Antikörperreaktion auf den Gefäßen von Kontrollpatienten registriert. Eine genaue Analyse der untersuchten Schnittpräparate zeigte, dass die VEGFR-2-Signale bei den Kontrollpatienten sowohl im Endothel als auch in den glatten Muskelzellen lokalisiert waren. Die proliferierenden Kollateralarterien von Patienten mit akuter Ischämie wiesen hingegen vorwiegend in den glatten Muskelzellen intensive A7-scFv-Immunreaktionen auf. Im Endothel der oben genannten Gefäßproben konnten nur vereinzelte VEGFR-2-Signale detektiert werden. Bei parallel durchgeführten Kontrollfärbungen mit den negativen M13-Phagen wurden auf keinem der untersuchten Gefäßexemplare positive Antigen-Antikörperreaktionen festgestellt (Abb. 3.5.2.2.E-H).

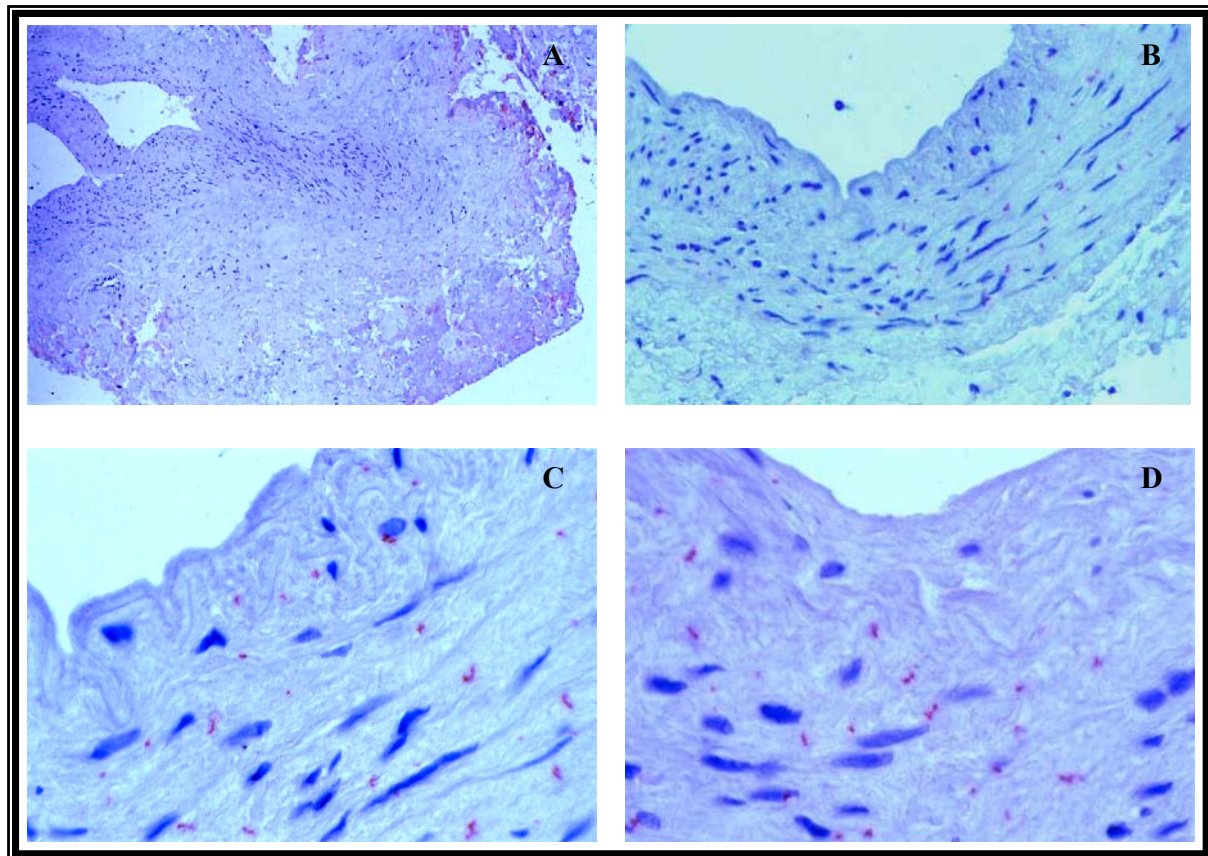


Abb. 3.5.2.1: Immunhistochemische Nachweise der VEGFR-2-Antigensignale auf Humangefäßschnitten eines Kontrollpatienten unter Verwendung von A7-scFv-Phagen

VEGFR-2-spezifische A7-scFv-Antikörpersignale sind sowohl in glatten Muskelzellen als auch im Endothel des Gefäßes deutlich zu erkennen (rote Färbung). A: Übersicht (100 x Vergr.), B: Ausschnitt (400 x Vergr.), C-D: Ausschnitte (1000 x Vergr.); Sekundärantikörper: Anti-M13, Tertiärantikörper: DAM-PO.

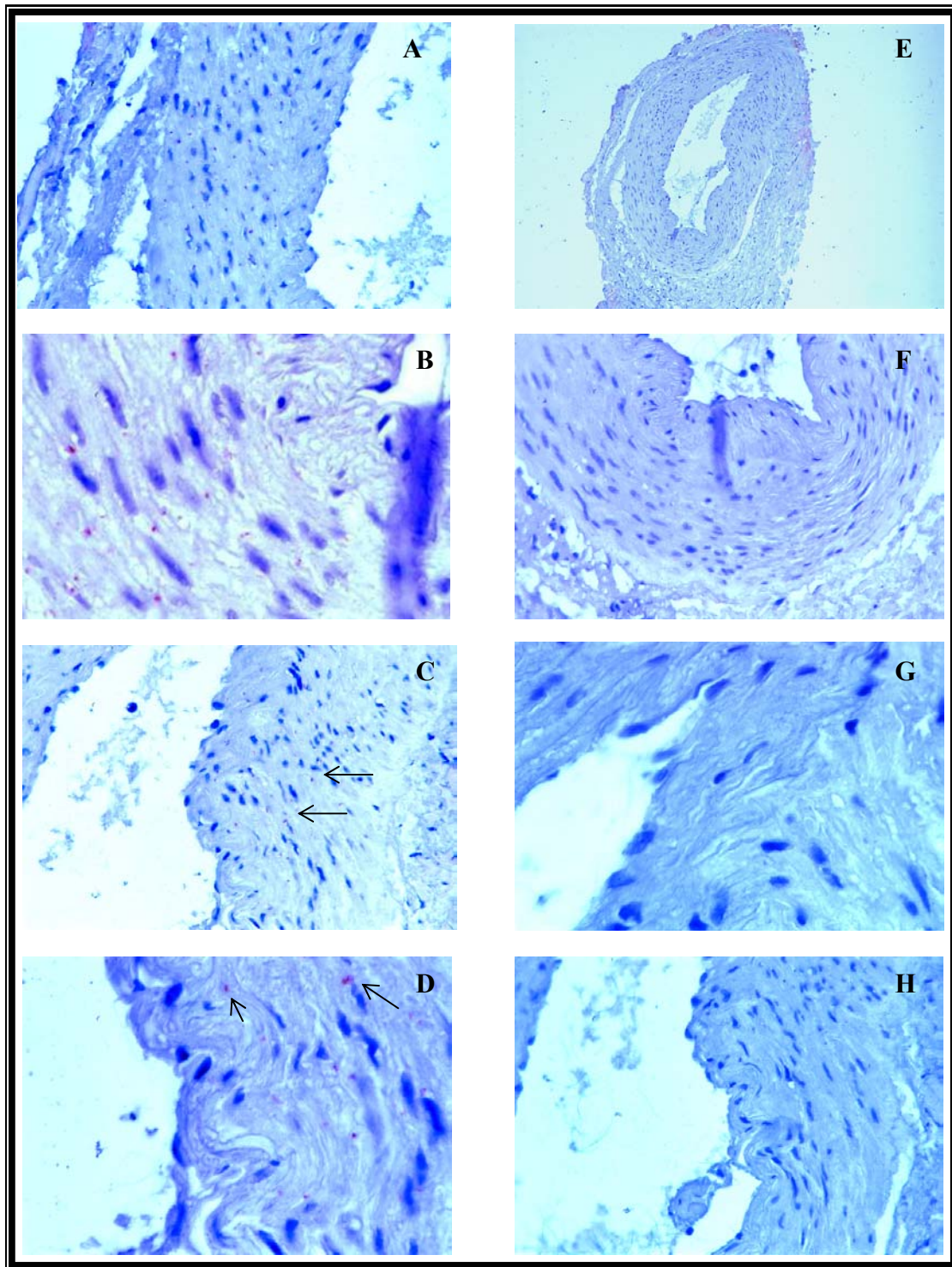


Abb. 3.5.2.2: Immunhistochemische Nachweise der VEGFR-2-Antigensignale auf Humangefäßschnitten eines Patienten mit akuter Ischämie unter Verwendung von A7-scFv-Phagen

A-D: VEGFR-2-Färbung unter Verwendung von A7-scFv-Phagen. VEGFR-2-Antigensignale treten hauptsächlich in den glatten Muskelzellen des Gefäßes auf. E-H: Kontrollfärbung mit Hilfe unspezifischer M13-Phagen; A, C, F und H = Ausschnitte (400 x Vergr.); B, D und G = Ausschnitte (1000 x Vergr.); E = Übersicht (100 x Vergr.); Sekundärantikörper: Anti-M13; Tertiärantikörper: DAM-PO; Schwarze Pfeile: Antigen-Antikörpersignale.

3.5.3 „Biopanning“ und immunhistochemische Untersuchung der VEGFR-2-Expression auf Rattengefäßen unter Verwendung von A7-scFv-Phagen

Die Expression von VEGFR-2 auf proliferierenden Ratten-Kollateralarterien wurde bereits in den experimentellen Arbeiten von Frau A. Becker (UKE Hamburg, Kardiologie, AG Dr. W.D. Ito) mittels kommerziell erhältlicher Flk-1-Antikörper erfolgreich nachgewiesen. Dabei sind die meisten Antigensignale in der Endothelschicht der oben genannten Gefäße detektiert worden. Nun sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit die Bindungsaffinität von VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Phagen zu den auf Rattengefäßen vorhandenen Flk-1-Antigenstrukturen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden „Biopanning“ sowie immunhistochemische Experimente unter Verwendung von proliferierenden Kollateralarterien und Kontrollgefäßen vorgenommen. Nach mehrmals wiederholten „Biopanning“-Runden konnten auf keinem der oben erwähnten Gefäßexemplare die VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Phagen ermittelt werden. Die im Anschluss an das „Biopanning“ durchgeführten immunhistochemischen Färbungsexperimente haben die negativen „Biopanning“-Ergebnisse zusätzlich bestätigt (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die auf der Oberfläche von M13-Phagen präsentierten, KDR-spezifischen A7-Einzelkettenantikörper nicht in der Lage waren, die auf Rattengefäßen exprimierten VEGFR-2-Epitope spezifisch zu erkennen.

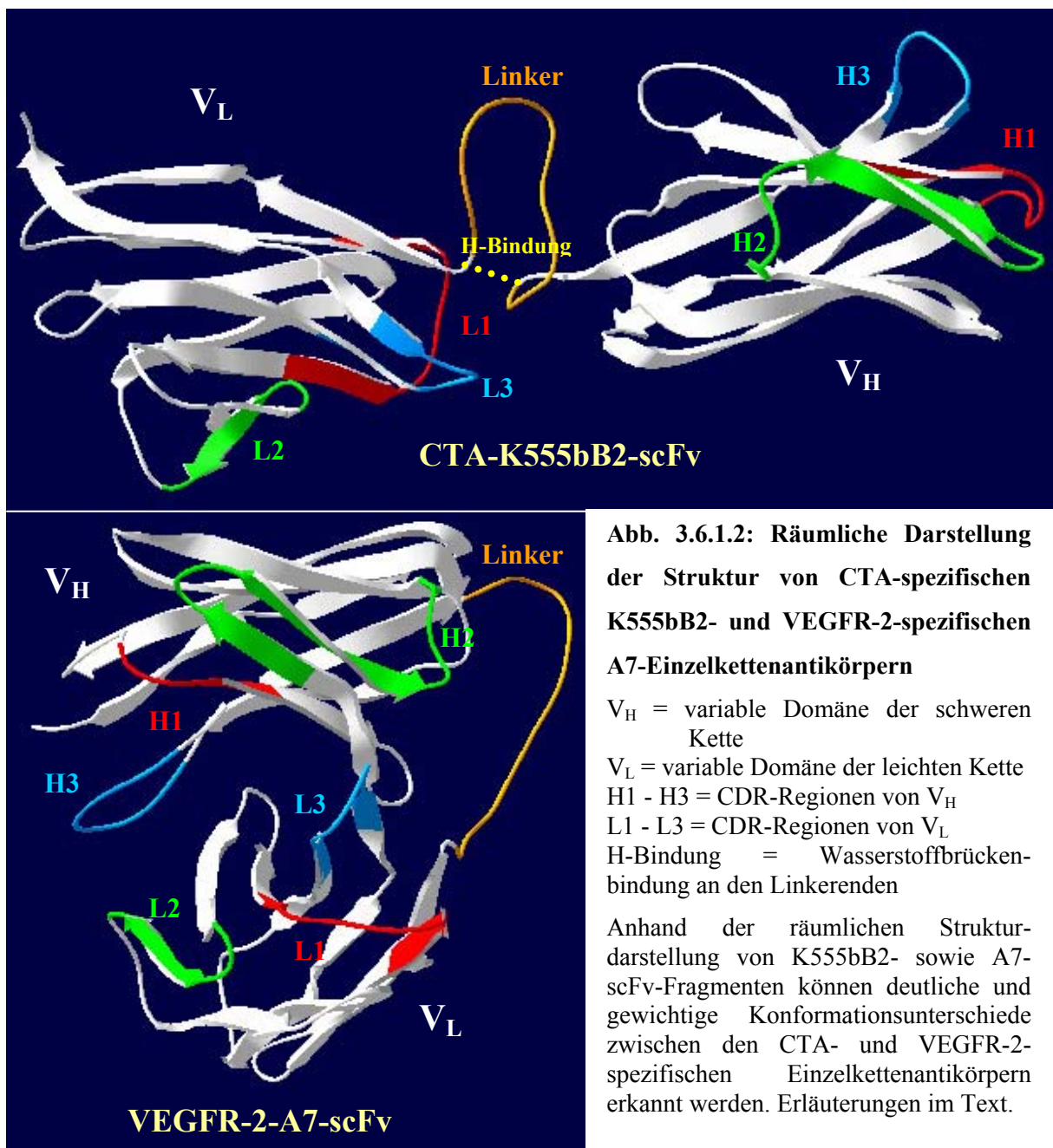
3.6 Analyse der Bindungseigenschaften von CTA- sowie VEGFR-2-Einzelkettenantikörpern

3.6.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen von CTA- und VEGFR-2-scFv

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften gefäßspezifischer CTA- sowie VEGFR-2-Einzelkettenantikörper wurde zunächst ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden bereits erwähnten K555bB2- und A7-scFv-Spezies vorgenommen (siehe Abb. 3.6.1.1). Die Sequenzanalysen ergaben, dass der aus insgesamt 241 Aminosäuren (723 bp) aufgebaute VEGFR-2-scFv-Antikörper die gleiche Länge aufwies wie das CTA-spezifische K555bB2-scFv-Fragment (siehe 3.3). Nach einer genaueren Untersuchung der jeweiligen Sequenzen wurden jedoch wesentliche Unterschiede in der Aminosäureabfolge zwischen den beiden oben genannten Proteinen aufgedeckt. Die meisten Sequenzabweichungen konnten in den V_L -Regionen der Einzelkettenantikörper detektiert werden (insgesamt 45 unterschiedliche Aminosäuren). Dabei waren die heterologen Aminosäuren sowohl in den hypervariablen Bereichen, als auch in den Gerüstregionen der jeweiligen V_L -Domänen lokalisiert (10 AS in

Trotz zahlreicher Aminosäureunterschiede konnte dennoch eine ca. 53%-ige Sequenzhomologie zwischen den VEGFR-2- und CTA-spezifischen Einzelkettenantikörpern registriert werden („Blast Search“-Ergebnis).

An die oben erwähnten Sequenzanalysen schloss sich ein Vergleich der räumlichen Struktur von K555bB2- sowie A7-scFv-Antikörperfragmenten an. Aus der unten präsentierten, computersimulierten Darstellung der jeweiligen 3D-Strukturen kann ersehen werden, dass die beiden untersuchten Einzelkettenantikörper deutlich unterschiedliche Faltungseigenschaften besaßen (Abb. 3.6.1.2). Während der CTA-spezifische K555bB2-scFv einen breit ausgestreckten Konformationszustand aufwies, zeigte der VEGFR-2-spezifische A7-scFv hingegen eine sehr kompakte und zusammenhängende Struktur.



Bei dem CTA-spezifischen K555bB2-Antikörperfragment waren die CDR-Bereiche der beiden V_H - und V_L -Domänen in zwei entgegengesetzte Richtungen ausgestreckt und konnten somit keine gemeinsame Antigenbindungstasche ausbilden. Die daraus resultierende, sehr geringe (bis fehlende) Affinität der V_H - und V_L -Domänen zueinander sowie die bereits erwähnte, ausgedehnte Form des gesamten CTA-scFv-Moleküls können höchstwahrscheinlich auf die zwischen den einzelnen Seitenketten wirkenden, intramolekularen Kräfte zurückgeführt werden. In der „Linker“-Region konnte beispielsweise zwischen den Aminosäuren Serin (119) und Isoleucin (135) eine stabile ca. 2,69 nm lange Wasserstoffbrückenbindung nachgewiesen werden (Abb. 2.6.1.2), welche die beiden „Linker“-Enden zusammenhielt und möglicherweise damit die Faltungseigenschaften der jeweiligen variablen Domänen beeinflusst hat. Im Gegensatz zu dem K555bB2-Spezies bildete das VEGFR-2-spezifische A7-Antikörperfragment einen zusammenhängenden scFv-Komplex. Die beiden CDR-Regionen der V_H - und V_L -Domänen befanden sich in einer direkten, räumlichen Nähe zueinander und bildeten somit eine sogenannte Bindungstasche für das Antigen. Zwischen den beiden „Linker“-Enden konnten bei dem A7-scFv keine Wasserstoffbrückenbindungen festgestellt werden. Dieser Proteinabschnitt wurde (anders als bei dem K555bB2-scFv) durch die Aminosäuren Serin (119) und Aspartat (135) flankiert.

Trotz bestehender Strukturunterschiede konnten zwischen den CTA- und VEGFR-2-spezifischen Einzelkettenantikörpern gewisse Ähnlichkeiten in der räumlichen Anordnung der hypervariablen H1- und L1-Bereiche festgestellt werden. Die jeweiligen CDR-H1-Regionen waren in beiden Fällen von den entsprechenden CDR-H2- sowie CDR-H3-Schleifen und die CDR-L1-Regionen von den entsprechenden CDR-L2- sowie CDR-L3-Schleifen seitlich umgeben (Abb. 3.6.1.2).

3.6.2 Vergleich der Verteilung von CTA- und VEGFR-2-scFv-Antikörpersignalen auf Humangefäßen

Die Untersuchung der Bindungseigenschaften der beiden strukturell und funktionell sehr unterschiedlichen, gefäßspezifischen CTA- sowie VEGFR-2-Einzelkettenantikörper wurde zuletzt durch einen Vergleich der Verteilung von K555bB2- sowie A7-Antikörpersignalen auf Schnitten von Humangefäßen ergänzt. Anhand einer genauen Analyse der in den Kapiteln 3.2.7, 3.4.4 und 3.5.1-2 präsentierten Ergebnisse konnte schließlich festgestellt werden, dass die beiden oben erwähnten scFv-Antikörperfragmente eine deutlich höhere Affinität auf den Gefäßproben von Kontrollpatienten erwiesen haben. Die untersuchten CTA- sowie VEGFR-2-Antikörpersignale wurden sowohl im Endothel, als auch in den glatten Muskelzellen dieser

Gefäße registriert. Die proliferierenden Kollateralarterien von Patienten mit akuter Ischämie zeigten hingegen wesentlich schwächere CTA- und VEGFR-2-scFv- Immunreaktionen. Die CTA-Antikörpersignale konnten hier sowohl im Endothel als auch in den glatten Muskelzellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden die VEGFR-2- Signale hauptsächlich in den glatten Muskelzellen dieser Gefäße dokumentiert. Die Endothelschicht zeigte nur vereinzelte Farbreaktionen. Aus einem Quantitätsvergleich der CTA- und VEGFR-2-Antikörpersignale auf den Humangefäßschnitten ging hervor, dass die A7-Antikörperfragmente auf beiden Gefäßtypen insgesamt eine viel stärkere Affinität aufwiesen, als die CTA-scFv (siehe Abb. 3.4.4 und 3.5.2.1-2). Möglicherweise waren die ursprünglich auf Rattengefäßen ausselektionierten kollateralspezifischen K555bB2-scFv nicht in der Lage, alle auf humanen Kollateralarterien vorhandenen CTA-Epitope spezifisch zu erkennen.

3.7 Untersuchung der Spezifität löslicher scFv-Antikörper auf Endothelien von Humangefäßen

Zur Verifizierung der aus dem Phagenexpressionssystem gewonnenen Erkenntnisse (siehe Kap. 3.2-3.6) sowie zur weiteren Charakterisierung gefäßspezifischer CTA- und VEGFR-2-Einzelkettenantikörper wurden diese in bakteriellen *E. coli*-Systemen exprimiert und in Form von löslichen Proteinen auf ihre Antigenpezifität immunhistochemisch getestet. Aufgrund der Tatsache, dass in den bereits beschriebenen *in situ*-Experimenten auf Ratten-Kollateralarterien (siehe 3.5.3) keine spezifischen VEGFR-2-Antigensignale unter Verwendung von phagenexprimierten A7-scFv nachgewiesen werden konnten, wurden für die Bindungsaffinitätsanalysen von löslichen CTA- und VEGFR-2-Antikörperfragmenten ausschließlich humane Gefäßexemplare eingesetzt.

3.7.1 Herstellung löslicher CTA- sowie VEGFR-2-scFv in *Escherichia coli*

Die Herstellung von löslichen Antikörperfragmenten wurde parallel in zwei verschiedenen *E. coli*-Stämmen, HB2151 und BL21(DE3), vorgenommen. Zur Untersuchung der scFv-Proteinexpression sind jeweils drei Fraktionen (Zytosol, Periplasma und Überstand) der mit IPTG induzierten Bakterienkulturen verwendet worden (siehe 2.5.2). Die daraus gewonnenen Eluate wurden zunächst aufgereinigt und eingeeengt (siehe 2.5.4-2.5.5). Nach anschließender Bestimmung des Proteingehaltes wurden die einzelnen Fraktionsproben in einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot -Analysen auf die Anwesenheit von CTA- bzw. VEGFR-2-Einzelkettenantikörpern überprüft (siehe 2.5.7-2.5.12).

Wie aus den in der Abbildung 3.7.1 dokumentierten Ergebnissen hervorgeht, konnten im bakteriellen *E. coli* HB2151-System ausschließlich die VEGFR-2-spezifischen A7-scFv als vollständige, lösliche scFv-Proteine exprimiert werden. Die erwarteten ca. 30-32 kDa A7-scFv-Banden wurden sowohl im Kulturüberstand (20 h nach der IPTG-Induktion, Abb. 3.7.1.A-B) als auch in den periplasmatischen Extrakten (4 und 8 h nach der IPTG-Induktion, Abb. 3.7.1.B-C) erfolgreich nachgewiesen. Neben dem VEGFR-2-scFv-Volllängenprotein (s.o.) ist in einigen periplasmatischen Fraktionen zusätzlich eine weitere, niedermolekulare (ca. 17 kDa) Proteinbande detektiert worden (siehe Abb. 3.7.1.C). Hierbei handelte es sich vermutlich um ein proteolytisches scFv-Abbauprodukt, welches wegen einer enthaltenen C-terminalen E-tag-Polypeptidsequenz im Western Blot spezifisch erkannt wurde.

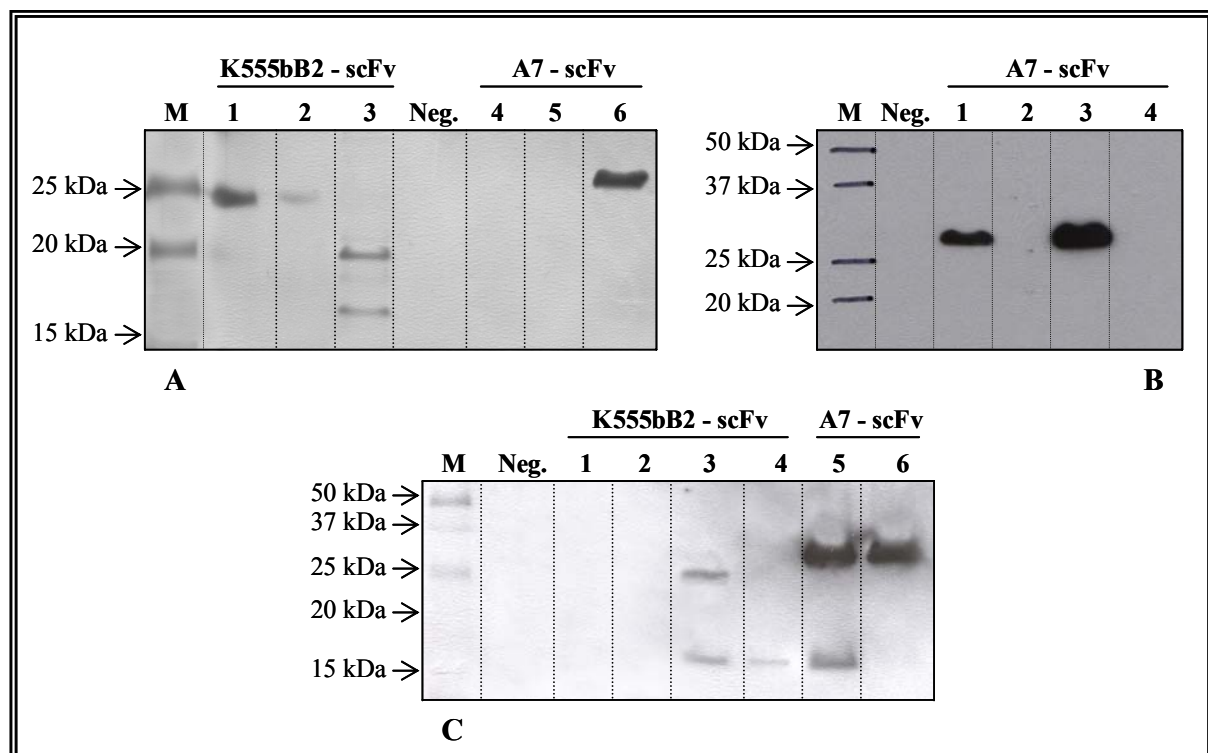


Abb. 3.7.1: Western Blot -Analysen der im *E. coli* HB2151-Stamm exprimierten, löslichen CTA- und VEGFR-2-Antikörperfragmente

A: 1-3 = Untersuchung der Expression des CTA-spezifischen K555bB2-scFv im Kulturüberstand: 1 = 20 h, 2 = 14 h, 3 = 8 h nach Induktion mit IPTG; 4-6 = Analyse der Expression des VEGFR-2-spezifischen A7-scFv im Kulturüberstand: 4 = 8 h, 5 = 14 h, 6 = 20 h nach Induktion mit IPTG.

B: 1-4 = Vergleich der A7-scFv-Expressionssignale 20 h (Proben 1+2) und 4 h (Proben 3+4) nach Induktion mit IPTG: 1 = im Kulturüberstand, 2 = im Zytosol, 3 = im Periplasma, 4 = im Zytosol.

C: 1-4 = Untersuchung der CTA-scFv-Expressionssignale in zytosolischen (Proben 1+2) und in periplasmatischen (Proben 3+4) Extrakten: 1 = 4 h, 2 = 8 h, 3 = 4 h, 4 = 8 h nach Induktion mit IPTG. 5+6 = Vergleich der VEGFR-2-scFv-Expressionssignale in periplasmatischen Extrakten: 5 = 4 h, 6 = 8 h nach Induktion mit IPTG.

M = Precision Plus Protein Längenstandard; Neg. = HB2151-Negativkontrolle: in A = aus dem Kulturüberstand, in B = aus dem zytosolischen Extrakt, in C = aus der periplasmatischen Fraktion.

Parallel zu den in der Abb. 3.7.1 aufgeführten Western Blot -Nachweisen, wurden die oben erwähnten VEGFR-2-scFv auf den mit Coomassie- sowie Silberfärbung angefärbten SDS-PAA-Gelen visualisiert (Daten nicht gezeigt). In den als Negativkontrollen fungierenden HB2151-Extrakten konnten nach einer Coomassie- bzw. Silberfärbung ebenfalls ca. 30 kDa große Proteinbanden detektiert werden. Diese zeigten jedoch im Western Blot unter Verwendung eines Anti-E-tag-Antikörpers keine positiven VEGFR-2-scFv-Signale (siehe Abb. 3.7.1.A-C).

Eine genauere Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Expression und Sekretion von A7-scFv in verschiedenen Kompartimenten von *E. coli* HB2151 ergab, dass die löslichen Antikörperfragmente bereits 4-8 h nach Induktion der Genexpression in den periplasmatischen Raum transportiert wurden (Abb. 3.7.1.B-C). Nach längeren Kultivierungszeiten (ca. 20 h nach der Induktion) konnte eine Sekretion der scFv ins Kulturmedium festgestellt werden (Abb. 3.7.1.A). Photometrische Bestimmungen der Proteinkonzentration in den jeweiligen Fraktionen zeigten, dass die Ausbeute an löslichen A7-scFv in den periplasmatischen Extrakten (350 µg/ml aus 1. L Bakterienkultur) um ca. das Dreifache höher war, als deren Menge in den untersuchten Kulturüberständen (110 µg/ml aus 1. L Bakterienkultur). Im Zytosol wurden zu keinem Zeitpunkt lösliche A7-scFv nachgewiesen (Abb. 3.7.1.B).

Im Gegensatz zu den VEGFR-2-A7-Einzelkettenantikörpern konnten die kollateralspezifischen K555bB2- sowie K555aB4-scFv in dem oben erwähnten *E. coli* HB2151-Stamm nicht als vollständige, lösliche scFv-Proteine exprimiert werden. Nach wiederholt durchgeführten Expressionsversuchen wurden in einigen Fraktionen lediglich kurze, die E-tag-Erkennungssequenz tragende CTA-scFv-Fragmente vorgefunden. Diese sind sowohl in den untersuchten Kulturüberständen als auch in einigen periplasmatischen Extrakten nachgewiesen worden (Abb. 3.7.1.A und C). Anhand der Größe der im Western Blot detektierten Proteinbanden konnte festgestellt werden, dass es sich hierbei sowohl um einzelne V_H- bzw. V_L- Ketten (ca. 16 kDa) als auch um unvollständige scFv-Fragmente handelte (ca. 25 und 20 kDa), welche als Abbauprodukte nach proteolytischer Degradation der Einzelkettenantikörper in verschiedenen Kompartimenten der Bakterienzellen sezerniert wurden. Die erwarteten ca. 30-32 kDa CTA-scFv-Banden konnten leider in keiner der untersuchten Bakterienfraktionen nachgewiesen werden. Aufgrund der im *E. coli* HB2151-System erzielten, enttäuschenden CTA-scFv-Expressionsergebnisse wurde der Bakterienstamm gewechselt und eine erneute Expression von löslichen Einzelkettenantikörper in *E. coli* BL21(DE3)-Bakterien vorgenommen. Als Positivkontrolle fungierte hier, der bereits im *E. coli* HB2151-System löslich exprimierte, VEGFR-2-spezifische A7-scFv-Antikörper.

Trotz des Systemwechsels zeigten die im *E. coli* BL21(DE3)-Stamm erzielten Expressionsergebnisse leider dieselbe Tendenz wie im Fall der o.g. HB2151. Während die löslichen A7-scFv sowohl aus den Kulturüberständen (20 h nach der Induktion) als auch aus den periplasmatischen Extrakten (4 und 8 h nach der Induktion) erfolgreich isoliert werden konnten, lagen die löslichen CTA-scFv-Fragmente ausschließlich als niedermolekulare Degradationsprodukte in den untersuchten Proteinfractionen vor (Daten nicht gezeigt). Da bereits aus mehreren Literaturquellen bekannt ist, dass sogar eine einzige V_H-Domäne in der Lage sein kann eine stabile Antikörper-Antigenbindung einzugehen (Utsumi und Karush, 1964; Ward *et al.*, 1989), wurden die oben erwähnten, degradierten, kollateralspezifischen Antikörperfragmente, trotz des Fehlens von einigen funktionellen Regionen, für die im Kapitel 3.7.3 beschriebenen *in situ*-Bindungsaffinitätsexperimente eingesetzt.

3.7.2 Anreicherung von gefäßspezifischen, löslichen scFv-Antikörperfragmenten

Für die immunhistochemischen Funktionalitätsanalysen wurden die gefäßspezifischen, löslichen Einzelkettenantikörper in der Regel aus 1 L Bakterienkulturen gewonnen. Zur Isolierung der E-tag- bzw. His-tag-markierten scFv sind die untersuchten Proteinextrakte zunächst über die entsprechend gekoppelten Säulen (siehe 2.5.4) aufgereinigt worden. Um detektierbare Mengen an sekretierten scFv-Proteinen zu erhalten, wurden die gereinigten Proteinextrakte im Folgenden durch Ultrafiltration aufkonzentriert.

Die in der Tabelle 3.7.2 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass die VEGFR-2-spezifischen, löslichen A7-scFv sowohl in den periplasmatischen Extrakten als auch in den Kulturüberständen in hohen Konzentrationen angereichert wurden. Im Gegensatz dazu konnten die löslichen CTA-spezifischen Antikörperfragmente (siehe 3.7.1) in beiden *E. coli*-Systemen nur in geringen Mengen produziert werden. Um für die folgenden, immunhistochemischen Untersuchungen ausreichende Konzentration von CTA-scFv zur Verfügung zu haben, mussten nun die Antikörperausbeuten aus mehreren parallel angezogenen 1 L Bakterienkulturen miteinander vereinigt werden.

Bezeichnung des Einzelkettenantikörpers	Bakterienstämme			
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)		<i>E. coli</i> HB2151	
	Periplasma	Überstand	Periplasma	Überstand
VEGFR-2-scFv	220 µg/ml	100 µg/ml	350 µg/ml	110 µg/ml
CTA-scFv	0,9 µg/ml	0,3 µg/ml	1,5 µg/ml	0,5 µg/ml

Tab. 3.7.2: Konzentration der aufgereinigten, löslichen scFv in diversen Bakterienextrakten.

3.7.3 Immunhistochemische Nachweise der Epitopspezifität löslicher Einzelkettenantikörper auf Humangefäßschnitten

Im abschließenden Teil der Experimente wurde mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen die Epitopspezifität der in bakteriellen Expressionssystemen generierten, löslichen VEGFR-2- sowie CTA-scFv auf Humangefäßschnitten (*in situ*) untersucht. Aus den erhaltenen Ergebnissen ging hervor, dass die VEGFR-2-spezifischen Antigen-signalen mittels löslicher A7-scFv sowohl auf den Gefäßexemplaren von Kontrollpatienten als auch auf den proliferierenden Kollateralgefäßen von Patienten mit akuter Ischämie eindeutig nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 3.7.3.1-2). Dabei wurden die VEGFR-2-Epitope, auf beiden Gefäßtypen gleichermaßen, im Endothel und in den glatten Muskelzellen lokalisiert. Da auf den untersuchten Kontrollschnitten, welche in Abwesenheit des Primärantikörpers präpariert wurden, keine Immunreaktion festgestellt wurde (Abb.3.7.3.2.E-F), konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den in Abb. 3.7.3.1-2.A-D dokumentierten Farbsignalen tatsächlich um VEGFR-2-spezifische Antigen-Antikörperreaktionen handelte.

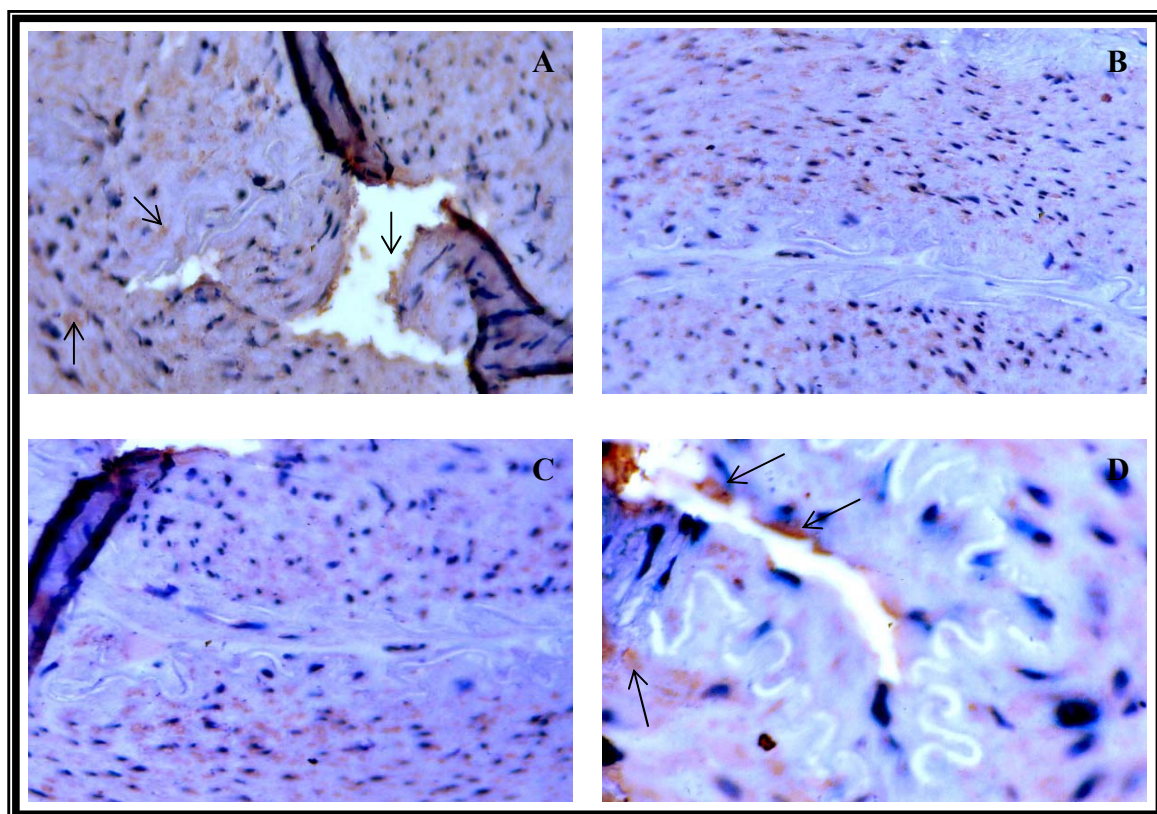


Abb. 3.7.3.1: Immunhistochemische Färbungen zur Untersuchung der Spezifität von löslichen VEGFR-2-scFv auf Humangefäßschnitten eines Kontrollpatienten

A-D: VEGFR-2-Färbung unter Verwendung von löslichen A7-Einzelkettenantikörpern. VEGFR-2-spezifische Antigen-Antikörpersignale treten sowohl in den glatten Muskelzellen als auch im Endothel auf. A-C = Ausschnitte (400 x Vergr.); D = Ausschnitt (1000 x Vergr.). Sekundärantikörper: Anti-E-tag; Tertiärantikörper: GAM-PO; Schwarze Pfeile: Antigen-Antikörpersignale.

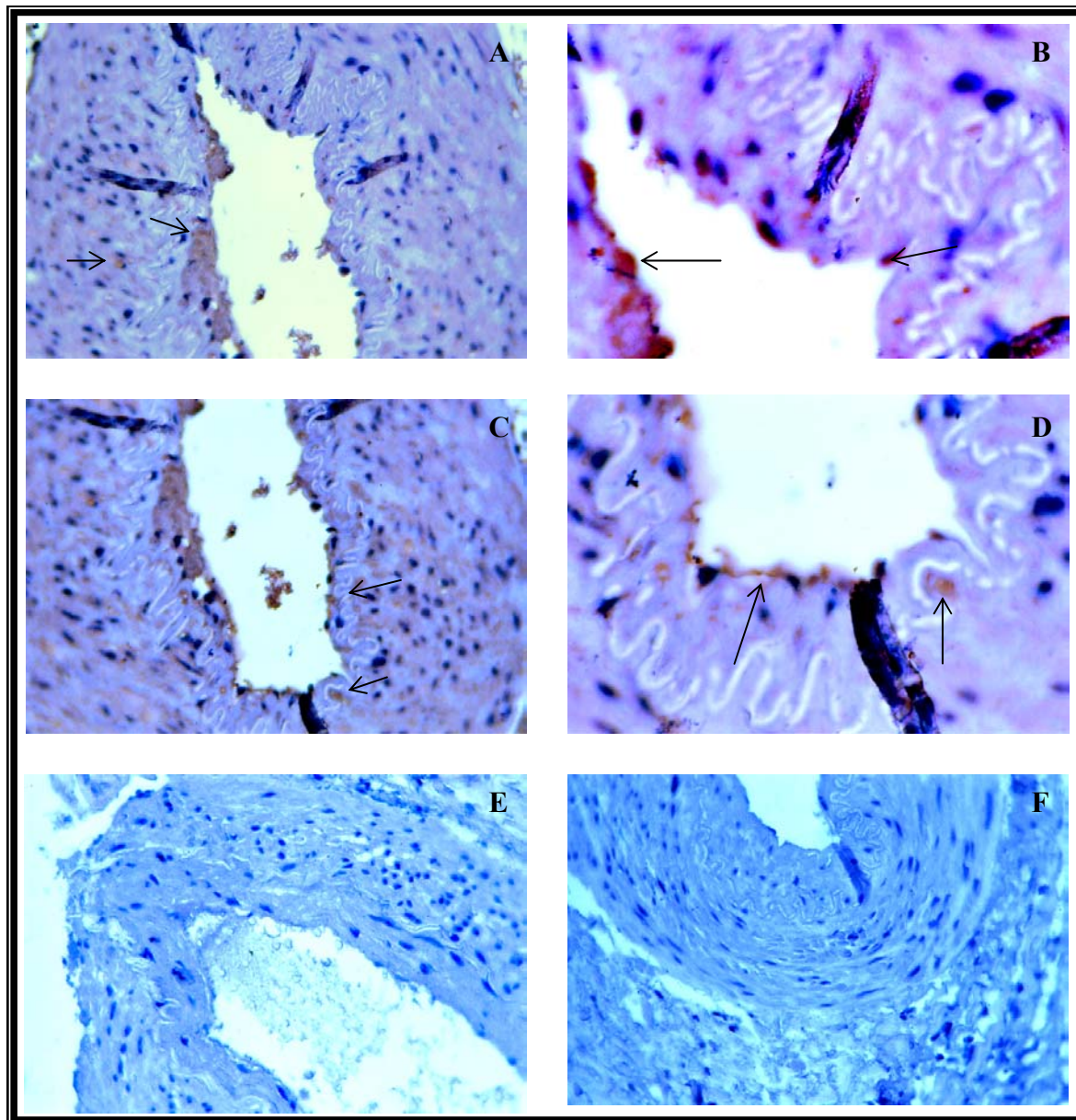


Abb. 3.7.3.2: Immunhistochemische Färbungen zur Untersuchung der Spezifität von löslichen VEGFR-2-scFv auf Humangefäßschnitten eines Patienten mit akuter Ischämie

A-D: VEGFR-2-Färbung unter Verwendung von löslichen A7-Einzelkettenantikörpern. Die VEGFR-2-spezifischen Antigen-Antikörpersignale sind sowohl in den glatten Muskelzellen als auch im Endothel deutlich zu erkennen. E-F: Kontrollfärbung ohne den Primärantikörper zeigt keine Farbreaktion. A, C = Ausschnitte (400 x Vergr.); B, D = Ausschnitte (1000 x Vergr.); E, F = Ausschnitte (100 x Vergr.). Sekundärantikörper: Anti-E-tag; Tertiärantikörper: GAM-PO; Schwarze Pfeile: Antigen-Antikörpersignale.

Im Gegensatz zu den VEGFR-2-A7-scFv zeigten die generierten, löslichen, CTA-spezifischen Antikörperfragmente auf keinem der untersuchten Humangefäßexemplare immunhistochemisch nachweisbare Farbreaktionen (Daten nicht gezeigt). Diese enttäuschenden jedoch nicht unerwarteten CTA-Funktionalitätsergebnisse können unter anderem auf die ungewöhnlich niedrigen Expressionsraten der löslichen CTA-scFv in

bakteriellen Expressionssystemen zurückgeführt werden (siehe Tab.3.7.2). Die Konzentration der angereicherten CTA-scFv war ca. um das 250-fache geringer im Vergleich zu der löslich exprimierten VEGFR-2-scFv und reichte damit nicht aus, um eine Lokalisierung der CTA-spezifischen Antigen-signalen auf den untersuchten Gefäßpräparaten immunhistochemisch zu ermitteln. Eine weitere Ursache für das Fehlen der Antigenbindungsaffinität bei den CTA-spezifischen Antikörperfragmenten könnte mit der Größe der im Western Blot nachgewiesenen CTA-scFv-Proteinbanden begründet werden, welche hauptsächlich im niedermolekularen Bereich detektiert wurden und somit eher an proteolytische Abbauprodukte als an funktionsfähige Antikörperfragmente erinnerten (siehe 3.7.1). Trotz mehrmaliger Optimierung der Versuchsbedingungen sowie des anschließenden Wechsels des Expressionssystems, ist es im Rahmen dieser Arbeit leider nicht gelungen, experimentelle Voraussetzungen zu finden, unter denen die löslichen CTA-spezifischen Antikörperfragmente ihre Epitope auf Humangefäßen (*in situ*) spezifisch erkennen könnten, wie es im Fall der CTA-scFv-Phagen zu beobachten war (siehe 3.4.4). Dennoch konnte aus den negativen immunhistochemischen Färbungsergebnissen eindeutig geschlossen werden, dass unvollständige CTA-spezifische scFv sowie einzelne CTA-V_L-Domänen definitiv nicht in der Lage sind, stabile Antikörper-Antigenbindungen einzugehen.

3.7.4 Vergleich der Antigenbindungsaffinitäten zwischen den löslichen VEGFR-2-scFv-Antikörpern und den VEGFR-2-exprimierenden Phagen auf humanen Gefäßschnitten

Die Expression des VEGFR-2 (KDR) auf Humangefäßen konnte sowohl mit Hilfe von VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Phagen als auch mittels löslicher A7-scFv erfolgreich nachgewiesen werden (Kap. 3.5 und 3.7.3). Auf den Gefäßschnitten von Kontrollpatienten wiesen die oben genannten scFv-Antikörperfragmente die gleiche Spezifität zum Antigen auf. Das Verteilungsmuster der Antigen-signalen auf den proliferierenden Gefäßen von Patienten mit akuter Ischämie deutete hingegen auf geringe Affinitätsunterschiede zwischen den beiden Einzelkettenantikörpern hin. Während die phagenexprimierten A7-scFv vorwiegend in den glatten Muskelzellen und nur vereinzelt im Endothel dieser Gefäße nachgewiesen wurden, zeigten die bakteriell exprimierten, löslichen A7-scFv in beiden oben genannten Gefäßkompartimenten intensive Farbreaktionen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die löslichen A7-scFv in der Lage waren, eine höhere Anzahl an Epitopstrukturen spezifisch zu erkennen als die phagenexprimierten A7-scFv.

4 DISKUSSION

4.1 Generierung von CTA-spezifischen scFv-Antikörpern

Der Einsatz gefäßspezifischer Einzelkettenantikörper für die Erforschung molekularer Unterschiede zwischen angio- bzw. arteriogenetischen Gefäßen sowie zur Identifizierung und Charakterisierung bisher nicht bekannter Gefäßoberflächenmoleküle ist von großem Nutzen für die künftige Diagnostik und Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen. Um gefäßspezifische Antikörperpopulationen herzustellen, wurden (im Rahmen früherer Experimente, siehe 2.1.2) Mäuse mit Membranpräparaten aus Ratten-Kollateralarterien immunisiert. Nachdem der gewünschte Antikörpertiter im Serum erreicht wurde, wurde den Mäusen die Milz entnommen. Die aus der Milz isolierten B-Lymphozyten wurden im weiteren Schritt mit Myelomzellen zu sogenannten Hybridomazellen fusioniert. Diese wurden anschließend auf Schnitten von Kollateralarterien sowie Ratten-Herz-Endothelzellen hinsichtlich der Antigenpezifität, der von ihnen sezernierten monoklonalen Antikörper, getestet. Im Rahmen dieser Selektion sind mehrere kollateral- bzw. endothelspezifische Hybridomaklone identifiziert worden. Dennoch konnte nur bei einem einzigen Klon (CTA-157-2), sowohl auf den Kollateralarterien als auch auf den Ratten-Herz-Endothelzellen spezifische Antigenreaktivität nachgewiesen werden. Genauere Untersuchungen des CTA-157-2-Hybridomaüberstandes ergaben, dass die darin enthaltenen monoklonalen Antikörper dem IgM-Isotyp angehörten.

In mehreren Literaturquellen (Janeway und Travers, 1997; Breitling und Dübel, 1997) ist bereits beschrieben worden, dass IgM-Antikörper die allererste Antikörperpopulation ausmachen, die bei einer humoralen Immunantwort gebildet wird. Sie werden in der Regel von B-Zellen produziert, die keine Affinitätsreifung durchlaufen haben, und weisen daher eine sehr geringe Affinität auf. IgM-Moleküle besitzen eine pentamere Struktur mit 10 Antigenbindungsstellen und sind somit in der Lage, gleichzeitig mit multimeren Antigenen interagieren zu können. Die hohe Multivalenz verleiht diesen Antikörpern einen enormen Aviditätsvorteil und kompensiert auf diese Weise die geringe Affinität der einzelnen Monomere. Der Aviditätseffekt der IgM-Antikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Erkennung und Markierung von Antigenenbindungsstellen auf Kollateralgefäßen und Ratten-Herz-Endothelzellen genutzt. Um bei der Suche nach kollateralspezifischen Molekülen zum einen mögliche Interaktionen des monoklonalen CTA-157-2-Antikörpers mit gleichzeitig mehreren, unterschiedlichen Antigenen zu unterbinden und zum anderen gezielte Epitopstrukturen auf Kollateralgefäßen anzusteuern, wurden unter Verwendung der CTA-

positiven Hybridomaklone hochaffine, rekombinante scFv-Antikörperfragmente generiert. Die Amplifikation der genetischen Information für die CTA-Einzelkettenantikörper erfolgte über die aus Hybridomazellen isolierte mRNA (Hybridomarescue). Diese Nukleinsäure eignet sich hervorragend für die Klonierung von scFv-Antikörperfragmenten, da sie einerseits zu einem hohen Prozentsatz für monoklonale Antikörper kodiert und andererseits (im Gegensatz zur genomischen DNA) weder Introns noch Promotorregulationssequenzen enthält und somit die Synthese einer korrekten scFv-Sequenz ermöglicht. Bei der Isolierung der gesamt-RNA aus Hybridomazellen wurde beobachtet, dass die aus frisch geernteten Klonen erzielten RNA-Ausbeuten deutlich höher waren als diejenigen aus den schockgefrorenen und bei -80°C gelagerten Zellsedimenten. Die nachfolgenden Qualitätsnachweise der einzelnen RNA-Proben mittels eines Formaldehydgels zeigten dennoch deutliche RNA-Degradationssignale bei den frisch präparierten Isolaten und keine Degradationsspuren bei den aus tiefgefrorenen Zellen gewonnenen RNA-Proben (siehe Abb. 3.1.1). Dieses überraschende Ergebnis könnte letztlich damit erklärt werden, dass die zum Sedimentieren der frisch geernteten Zellen gewählte Kühltemperatur (4°C) höchstwahrscheinlich nicht tief genug war, um die, unmittelbar nach der Entfernung des Mediums, auftretende Aktivierung der zelleigenen RNasen zu verhindern und den darauf folgenden, enzymatischen Abbau der RNA zu stoppen. Im Gegensatz dazu konnte bei den auf -80°C abgekühlten Hybridomazellen aufgrund der im Reagenzgefäß herrschenden, niedrigen Temperatur die Degradation der RNA erfolgreich unterbunden werden.

Die Klonierung von scFv-Antikörperfragmenten erfolgte unter Verwendung von hochqualitativen mRNA-Proben. Um eine stabile Matrize für die Synthese von Einzelkettenantikörpern zu erhalten wurde die mRNA zunächst in die cDNA umgeschrieben. Daraufhin sind mit Hilfe von degenerierten Primern (siehe 2.1.5) in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen die V_{H} - und V_{L} -Domänen amplifiziert worden. In einem weiteren PCR-Schritt, der sogenannten assembly-PCR, wurden die oben erwähnten variablen Regionen unter Verwendung einer „Linker“-Sequenz zu einem scFv zusammengesetzt und vervielfältigt. Im Anschluss an die scFv-Synthese wurden über eine weitere PCR-Reaktion vektorkompatible Restriktionsschnittstellen (*SfiI* und *NotI*) hinzugefügt. Während die beiden V_{H} - und V_{L} -Domänen problemlos amplifiziert werden konnten, traten bei der Generierung von scFv-Antikörperfragmenten einige Schwierigkeiten auf. Zum einen ließen sich die V_{H} - und V_{L} -PCR-Produkte nur sehr schwer zu einem kompletten Einzelkettenantikörper verbinden, zum anderen konnten die mühsam amplifizierten, vollständigen scFv nur in geringen Mengen produziert werden, was sich auf die späteren Ligationsexperimente negativ auswirkte.

Zur Behebung des erstgenannten Problems wurde die anfangs verwendete *Taq* DNA-Polymerase durch eine Platinum Pfx DNA-Polymerase ersetzt. Die *Taq* DNA-Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und ist somit nicht in der Lage, die fehlgepaarten Nukleotide nach der DNA-Polymerisation zu entfernen. Die Platinum Pfx DNA-Polymerase zeichnet sich hingegen durch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität aus, die eine direkte Synthesekorrektur (proofreading) erlaubt und somit das Auftreten von unerwünschten DNA-Strangabbrüchen sowie die Entstehung von Mutationen durch falsch gepaarte Nukleotide verhindert. Die Auswechslung der Polymerase hat sich in den nachfolgenden PCR-Reaktionen als sehr vorteilhaft erwiesen und zur Amplifikation vollständiger Antikörperfragmente beigetragen.

Um für die nachfolgenden Ligationsexperimente ausreichende Mengen an scFv-Antikörperfragmenten zur Verfügung zu haben, wurden diese unter Verwendung des TOPO TA-Klonierungsvektors zunächst in TOP 10 *E. coli*-Kulturen vermehrt und nach anschließender Gewinnung der Plasmid-DNA mittels *Sfi*I-, *Not*I-Restriktionsendonukleasen vollständig aus dem Vektor geschnitten. Dank dieser Klonierungsstrategie konnten einerseits brauchbare Mengen an scFv hergestellt werden und andererseits die einst durch PCR-Reaktion hinzugefügten Restriktionsschnittstellen an beiden Enden des Einzelkettenantikörpers korrekt verdaut werden (siehe 2.3.9).

Zur Untersuchung der Funktionalität wurden die generierten, rekombinanten scFv sowohl in einem Phagen-Oberflächensystem („Phage Display“-Technik) als auch in Form von löslichen Proteinen exprimiert und mittels diverser, immunhistochemischer Färbungsexperimente auf ihre Spezifität getestet. Für die Expression im Phagensystem sind die scFv-Antikörperfragmente zunächst in einen pCANTAB 5E -Phagemid-Vektor ligiert und in *E. coli*-Kulturen vervielfältigt worden. Der Erfolg der Klonierung konnte durch Kolonie-PCR sowie Restriktionsanalysen eindeutig bestätigt werden. Zur Überprüfung der Antikörperstruktur sind anschließend Sequenzanalysen sowie -vergleiche mit den bereits in der Kabat-Datenbank publizierten scFv-Sequenzen durchgeführt worden. Anhand der erhaltenen Sequenzdaten konnten bei 17 scFv-Klonen die, für die meisten Einzelkettenantikörper charakteristischen, Konsensusregionen erfolgreich identifiziert werden. Zur Analyse der Bindungsaffinität sowie zur Selektion von CTA-spezifischen Antikörperfragmenten wurden die positiven scFv-Klone mittels der oben erwähnten „Phage Display“-Technik auf der Oberfläche von M13KO7-Phagen exprimiert und in nachfolgenden „Biopanning“-Experimenten angereichert.

4.2 Selektion kollateralspezifischer scFv-Antikörperfragmente auf Gefäßschnitten bzw. Endothelzellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete und weitgehend modifizierte „Phage display“-Technologie stellt eine sehr effiziente Methode dar, die, nach Klonierung von Einzelkettenantikörpern in Phagemidvektoren, eine Selektion spezifisch bindender scFv-Phagen ermöglicht. Für die erfolgreiche Expression und Selektion der rekombinanten Antikörperfragmente spielten sowohl die Eigenschaften des ausgewählten Phagemidvektors als auch die des für die Transformation eingesetzten Bakterienstammes eine sehr wichtige Rolle. Um die Expression von generierten Einzelkettenantikörpern auf der Oberfläche von M13-Phagen zu gewährleisten, wurden diese bei der Ligation in den pCANTAB 5E -Vektor explizit an das 5'-Ende der GenIII-Sequenz (fd gene3) inseriert, welche für das pIII-Oberflächenprotein des M13-Bakteriophagen kodiert (g3p). Mit Hilfe dieser Klonierungsstrategie konnten, nach kurzzeitiger Induktion der Genexpression, scFv-pIII-Fusionsproteine erfolgreich exprimiert und auf der Oberfläche von M13-Phagen nachgewiesen werden. Die Expression der Fusionsproteine stand hierbei unter einer strengen Kontrolle des von außen induzierbaren *lac* Promotors, welcher wiederum durch den, vom *lac I^q* -Gen kodierten, *lac* Repressor reguliert wurde (nach Amersham Pharmacia).

Zur Produktion von rekombinanten scFv-Phagen wurden die TG1 *E. coli*-Bakterien eingesetzt. Dieser sogenannte Suppressorstamm besitzt die Fähigkeit, das, zwischen dem scFv-Gen und der g3p-Sequenz vorhandene, Amber-Stopcodon zu überlesen und somit ein vollständiges scFv-pIII-Fusionsgen zu transkribieren (Breitling und Dübel 1997). Infolge einer Infektion der Bakterien mit Helferphagen wurde die Phagemid-DNA unter der Kontrolle des Phagen-genoms repliziert und mit Hilfe der im Phagemid-Vektor enthaltenen g3p-Signalsequenz in das Periplasma von *E. coli* transportiert. Dort wurde sie in lange, filamentöse Phagenpartikel eingebaut, die das rekombinante Antikörperfragment als pIII-Fusionsprotein auf ihrer Oberfläche präsentierten. Die auf diese Weise entstandenen scFv-Phagen wurden anschließend in ein Kulturmedium sezerniert und dort angereichert.

Die Selektion kollateralspezifischer scFv-Antikörperfragmente erfolgte durch eine schrittweise Anreicherung spezifisch bindender Phagen aus der gesamten scFv-Phagenbibliothek (siehe 3.2). Aufgrund der Umstände, dass es sich bei dem untersuchten CSA-Komplex (collateral specific antigen-Komplex) primär um eine neuartige und bisher nicht beschriebene Molekül-Einheit handelte und zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten auch keine aufgereinigten Antigenfraktionen zur Verfügung standen, wurden alle Selektions- und Anreicherungsexperimente direkt auf Gefäßschnitten bzw. Endothelzellen vorgenommen.

4.2.1 Optimierung der Selektionsbedingungen für die CTA-scFv-Phagen

Für eine erfolgreiche Anreicherung von antigenspezifischen Phagen spielen die gewählten Selektionsbedingungen eine sehr wichtige Rolle. Dennoch müssen für die meisten Antigene die optimalen „Biopanning“-Parameter in der Regel empirisch ermittelt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die anfangs gewählten Standard-Selektionsbedingungen (Krebber *et al.*, 1997; Marks *et al.*, 1991) aufgrund einiger unerwünschter Phänomene (geringe scFv-Phagen-Ausbeuten, Anreicherung unspezifischer Phagen sowie pilzliche Kontaminationen) mehrfach verändert und optimiert. Die Expression der scFv-Antikörperfragmente auf der Oberfläche von M13-Phagen war zunächst, wegen geringer Ausbeuten an rekombinanten Phagen, wenig zufriedenstellend und musste des öfteren wiederholt werden. Als ein Grund für die niedrige scFv-Expressionsrate kam zunächst eine mögliche Autoligation des Vektors in Frage. Diese Annahme konnte durch eingehende Sequenzanalysen der scFv-Bibliothek definitiv ausgeschlossen werden. Eine weitere Ursache konnte in der Beschaffenheit der TG1 *E. coli*-Bakterien liegen. Dieser Bakterienstamm ist zwar in der Lage, scFv-pIII-Fusionsgene zu transkribieren, da aber das Überlesen des Amber-Stopcodons nur in 20% der Fälle stattfindet (Amersham Pharmacia), können neben den scFv-Phagen auch zusätzliche Produkte (wie z.B. lösliche scFv-Proteine) gebildet werden und zur erheblichen Senkung der scFv-Phagen-Expressionsrate beitragen. Eine weitere Erklärung dieses Phänomens wurde von Hoogenboom *et al.*, 1998 und Krebber *et al.*, 1997 postuliert. In mehreren Experimenten haben die Autoren erfolgreich nachgewiesen, dass die niedrige scFv-Phagen-Expression zum größten Teil durch eine ineffiziente Verpackung der rekombinanten Phagenpartikel während der Freisetzung von Bakteriophagen zustande kam. Im Laufe des sogenannten „Phage rescue“ wird in der Regel ein Gemisch aus Wildtyp-pIII- und scFv-pIII-Molekülen auf der Phagenoberfläche exprimiert. Da die leeren Phagemide aufgrund ihrer geringen Größe einen deutlichen Selektionsvorteil gegenüber den rekombinanten Spezies aufweisen, konnten die Autoren (s.o.) nur bei 10% der freigesetzten Phagenpartikel ein korrekt gefaltetes Antikörperfragment auf der Oberfläche detektieren.

Bisherige Bemühungen, den Anteil an unspezifischen M13-Phagen zu reduzieren, zeigten wenig Erfolg (Berdichevsky *et al.*, 1999; Krebber *et al.*, 1997; Rakonjac *et al.*, 1997). Um für die Selektionsexperimente dennoch ausreichende Mengen an rekombinanten scFv-Phagen zur Verfügung zu haben, mussten schließlich, aus Mangel an verbesserten Expressionstechniken, mehrere „Phage rescue“-Experimente parallel durchgeführt werden.

Bereits nach der ersten „Biopanning“-Runde wurden auf den Schnitten von Kollateralarterien negative M13-Kontrollphagen nachgewiesen (siehe 3.2.2). Durch die Erhöhung der Waschstringenz konnten in den nachfolgenden Selektionsschritten unspezifische Wechselwirkungen zwischen den leeren Phagen und den auf Gefäßschnitten exprimierten Epitopen erfolgreich aufgehoben werden. Ein ähnliches Problem ergab sich während der Selektion von scFv-Phagen auf RHE-Zellen. Anders als auf den Kollateralgefäßen konnten die auf Endothelzellen assoziierten, negativen Kontrollphagen (trotz erhöhter Waschstringenz) bedauerlicherweise nicht entfernt werden. Zur Lösung dieses Problems wurde die von Tur *et al.*, 2001 vorgeschlagene Senkung des pH-Wertes (von pH 7,5 auf pH 5,0) während der letzten zehn Waschgänge ausgetestet. Die Änderung des pH-Wertes hat zwar zur deutlichen Reduktion der Anzahl an negativen Phagen beigetragen, dennoch konnten diese sogar nach der dritten Selektionsrunde immer noch nicht vollständig eliminiert werden (siehe 3.2.3). Trotz der wiederholt auftretenden und nicht aufgelösten Kontaminationsprobleme mit unspezifisch bindenden Kontrollphagen wurde auf den RHE-Zellen eine insgesamt erfolgreiche Selektion antigenspezifischer Phagen verzeichnet. Während die Anreicherung von CTA-scFv-Phagen nach jeder Selektionsrunde anstieg (von 14.308 nach der ersten Selektionsrunde auf 16.174 nach der dritten Selektionsrunde), ist die Anzahl der negativen Kontrollphagen im Laufe des „Biopanning´s“ nahezu gleich geblieben (1.Runde = 54 Phagen, 3.Runde = 28 Phagen).

Ferner wurden, insbesondere während der anfangs durchgeführten „Phage display“-Experimente, einige Pilzkolonien auf den untersuchten Selektionsagarplatten detektiert. Derartige Kontaminationen traten ausschließlich nach der Verpackung der scFv-Phagen in die TG1-Bakterien auf und wurden hauptsächlich auf unsterile „Biopanning“-Bedingungen zurückgeführt. Diesem Phänomen konnte zum einen durch die Behandlung der Gewebeproben mit Natriumazid-Lösung und zum anderen durch das Autoklavieren bzw. Sterilfiltrieren aller für die Selektion vorgesehenen Chemikalien entgegengewirkt werden.

4.2.2 „Biopanning“-Experimente mit CTA-spezifischen Phagen auf Rattengefäßen und RHE-Zellen

Das „Screening“ von Phagen-Peptid-Bibliotheken auf Gewebeschnitten (*in situ*) und Zellen (*in vitro*) sowie in diversen *in vivo*-Modellen ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden (Lu *et al.*, 2002; Watters *et al.*, 1997; Essler und Ruoslahti, 2002). Unter Verwendung dieser Technologie wurden zum einen Phagen selektiert, die imstande waren, bestimmte Arten von Tumorzellen, -geweben (Corti *et al.*, 1998; Essler und Ruoslahti, 2001) oder sogar atherosklerotische Plaques (Houston *et al.*, 2001) spezifisch zu erkennen, sowie zum anderen neuartige Peptide ermittelt, welche mit hoher Affinität an angiogenetische Markermoleküle assoziierten (Arap *et al.*, 1998). Trotz der großen Vielfalt an veröffentlichten „Phage display“-Protokollen konnte keine der bisher angewandten „Biopanning“-Techniken auf die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente erfolgversprechend übertragen werden.

Zur Identifizierung und Isolierung hochaffiner CTA-scFv-Antikörperfragmente wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere verschiedene „Targeting-Systeme“ (*in situ*, *in vitro* sowie *in vivo*) entwickelt. Die Selektion kollateralspezifischer Phagen aus einer frisch generierten scFv-Phagenbibliothek wurde zunächst unter Verwendung von Ratten-Kollateralgefäßschnitten (*in situ*) vorgenommen. Mit Hilfe des in unserer Arbeitsgruppe etablierten Arteriogenese-Modells konnten die proliferierenden Kollateralgefäße nicht nur problemlos identifiziert, sondern auch von den nichtproliferierenden Kollateralarterien bzw. Kontrollgefäßen eindeutig unterschieden werden (siehe 3.2.2 und 3.4). Infolge des *in situ* „Biopanning“ wurden insgesamt 9 unterschiedliche, kollateralspezifische scFv-Antikörperklone identifiziert. Drei davon (K555bB2-, K555aB4-, und K55MA-scFv) konnten auf den untersuchten Rattengefäßschnitten erfolgreich angereichert werden. Während die K555bB2- und K555aB4-scFv-Phagen hauptsächlich an die auf proliferierenden Kollateralarterien vorhandenen Epitope banden, wurden die K55MA-scFv-Spezies sowohl auf den wachsenden Kollateralgefäßen als auch auf den nichtproliferierenden Kontrollgefäßen nachgewiesen. Die drei *in situ* angereicherten scFv-Klone wurden weiterhin in „Biopanning“-Experimenten auf Ratten-Herz-Endothelzellen (*in vitro*) auf ihre Antigenspezifität getestet. Für diese Untersuchungen standen zum einen die das CSA-Komplex exprimierenden RHE-A- und zum anderen die CSA-defizienten RHE-neg.-Zellen zur Verfügung. Die Selektion von CTA-spezifischen scFv-Phagen erfolgte unter Verwendung des RHE-A-Stammes. Die RHE-neg.-Spezies dienten vorwiegend als Kontrollzellen, mit deren Hilfe unspezifisch bindende scFv-Klone erfasst werden sollten. Die höchste *in vitro* Anreicherung haben auch in diesem Fall die

K555bB2- sowie K555aB4-Phagen aufgewiesen. Die K55MA-scFv-Antikörperklone konnten nur mit geringem Prozentsatz (ca. 4%) angereichert werden und wurden sowohl auf RHE-A- als auch auf den RHE-neg.-Zellen detektiert, was letztlich auf deren mangelnde Assoziation an die CSA-Epitope hindeutete. Zur Verifizierung der, aus den *in situ* sowie *in vitro*-Experimenten, erhaltenen Ergebnisse wurden die kollateral- sowie endothelspezifischen K555bB2- und K555aB4-Phagen abschließend einer *in vivo* „Biopanning“-Reihe in Kollateral- bzw. Kontrollgefäßen der Ratten unterzogen (siehe 3.2.4). Auch unter diesen Selektionsbedingungen konnte in proliferierenden Kollateralarterien eine hohe Anreicherung spezifisch bindender K555bB2- und K555aB4-Phagen verzeichnet werden. In den untersuchten Kontrollgefäßen wurden hingegen keine scFv-Phagen nachgewiesen.

Zur Aufklärung der DNA-Struktur sowie der daraus resultierenden Bindungseigenschaften der angereicherten scFv-Antikörperfragmente wurden im Anschluss an die jeweiligen „Biopanning“-Experimente ausführliche Restriktions- sowie Sequenzanalysen der selektionierten scFv-Klone durchgeführt. Aus dem Sequenzvergleich der drei *in situ* und *in vitro* angereicherten K555bB2-, K555aB4- sowie K55MA-Klone ging hervor, dass deren DNA- und Aminosäuresequenzen sehr starke Homologien untereinander zeigten (siehe 3.3). Bemerkenswert in diesem Zusammenhang war dennoch die Beobachtung, dass die K55MA-Klone, trotz der oben erwähnten Sequenzähnlichkeiten, in viel geringerem Maße auf den proliferierenden Kollateralarterien und RHE-A-Zellen angereichert wurden, als die K555bB2- und K555aB4-scFv-Antikörperfragmente (s.o.). Des Weiteren konnten die K55MA-Phagen, im Gegensatz zu den K555bB2- und K555aB4-Spezies, ebenfalls auf den Kontrollgefäßen bzw. den Kontrollzellen zahlreich nachgewiesen werden. Um festzustellen, ob die Aminosäurezusammensetzung der einzelnen scFv-Klone deren Konformation und somit auch deren Bindungseigenschaften beeinflusst, wurde ein Vergleich der 3D-Strukturen der oben erwähnten scFv-Klone durchgeführt. Die Analyse der dreidimensionalen Strukturen lieferte keine eindeutigen Hinweise zur Aufklärung der, zwischen den einzelnen Klonen beobachteten, Affinitätsunterschiede. Die vorliegenden Ergebnisse deuten dennoch darauf hin, dass die K55MA-scFv-Antikörperfragmente, trotz hoher Sequenzhomologie mit den K555bB2- und K555aB4-scFv-Klonen, imstande waren, an völlig andere Epitopstrukturen zu binden als die letztgenannten Spezies. Diese Annahme lässt die Spekulation zu, dass sogar geringe Abweichungen in der Nukleotidsequenz zu erheblichen Differenzen in der Spezifität und Affinität von scFv-Antikörperfragmenten führen können. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste jedoch zunächst die Struktur des entsprechenden Antigens vollständig aufgeklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es mit Hilfe der drei eigenständig entwickelten „Biopanning“-Systeme gelungen ist, rekombinante scFv-Antikörperfragmente zu selektieren, welche in der Lage waren, die auf proliferierenden Kollateralarterien (der Ratten) sowie RHE-A-Zellen vorhandenen CSA-Epitope spezifisch zu erkennen.

4.2.3 Alternative Selektionsmethoden für antigenspezifische Einzelkettenantikörper

Die fortschreitende Expansion der Phage display-Technologie auf diverse Bereiche der Forschung und Diagnostik führte in den letzten 10 Jahren zur Entwicklung mehrerer, alternativer Selektionsmethoden für antigenspezifische Einzelkettenantikörper aus scFv-Phagenbibliotheken. Die meisten der bisher beschriebenen „Screening“-Techniken basieren auf der Selektion von scFv-Antikörpern gegen bereits bekannte Antigene, die in aufgereinigter Form entweder auf festen Oberflächen immobilisiert sind (z.B. Phagen-ELISA) oder biotinyliert in Lösungen vorliegen. Bei der von Hawkins *et al.*, 1992 veröffentlichten „Biopanning“-Methode wurde die untersuchte scFv-Phagenbibliothek mit einem gelösten, biotinylierten Antigen inkubiert. Der so entstandene Antigen-Phagen-Komplex wurde mit Streptavidin-gekoppelten Magnetpartikeln versetzt, die, nach einer weiteren Inkubation, über die Biotin-Streptavidin-Bindung einen Antigen-Phagen-Magnetpartikel-Komplex ausgebildet haben. Nach anschließendem Waschen wurden die unspezifischen scFv-Klone entfernt und die antigenspezifischen scFv-Phagen mit Hilfe eines Magnetseparators aus der gesamten Lösung erfolgreich isoliert. Trotz der relativ einfachen Handhabung konnte diese viel versprechende „Biopanning“-Technik für die Untersuchungen während dieser Doktorarbeit leider nicht angewandt werden, da kein aufgereinigtes Antigen zur Verfügung stand.

Als eine weitere prominente scFv-Selektionsmethode gilt der sogenannte Phagen-ELISA (Valadon und Scharff, 1996). Hierbei wird das Antigen in der Regel auf einer Plastikoberfläche immobilisiert. Alternativ können sogar antigenpräsentierende Zellen an Plastikoberflächen fixiert werden (Palmer *et al.*, 1997). Nach dem Absättigen unspezifischer Bindungen wird das aufgereinigte bzw. in nativer Form vorhandene Antigen zunächst mit der zu untersuchenden scFv-Phagenbibliothek inkubiert. Die unspezifischen Phagenpartikel werden im Folgenden durch mehrmaliges Waschen entfernt und die antigenspezifischen scFv-Klone mit einem enzymkonjugierten Antikörper gegen ein Phagen-Oberflächenprotein (z.B. das pVIII-Protein) nachgewiesen. Nach anschließender Reinfektion mit TG1 *E. coli*-Bakterien können die positiven scFv-Antikörperfragmente isoliert und charakterisiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls Versuche unternommen, die RHE-Zellen auf ELISA-Platten zu immobilisieren und die scFv-Phagenbibliothek gegen den von Endothelzellen exprimierten, nativen CSA-Antigen-Komplex zu selektieren. Diese Methode hat sich jedoch als sehr unzuverlässlich erwiesen, da es infolge intensiver Waschschriffe zu drastischen Verlusten von Zellen kam und somit keine reproduzierbaren Messergebnisse erzielt werden konnten.

Parallel zum Phagen-ELISA wurde von Lekkerkerker und Logtenberg (1999) eine auf der Durchflusszytometrie basierende scFv-Selektionstechnik entwickelt. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode beruht zum einen darauf, dass die zu untersuchende scFv-Phagenbibliothek (ähnlich wie beim Phagen-Zell-ELISA) gegen native, auf der Oberfläche von Zellen exprimierte Antigene selektiert werden kann. Zum anderen müssen die Zellen, anders als beim Phagen-ELISA, nicht immobilisiert werden. Bei diesem Verfahren werden die antigenpräsentierenden Zellen zunächst mit den scFv-Phagen und dann mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen können die unspezifischen scFv-Phagen entfernt werden. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Bindungen erfolgt durch die Messung der Fluoreszenzsignale der einzelnen Zellen und wird in einem FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) -Gerät durchgeführt. Hierbei werden die Zellen in einem Pufferstrom durch eine Kapillare gepresst. Der Probenstrahl wird mit Laserlicht entsprechender Wellenlänge bestrahlt und die Fluoreszenz der Zellen nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch Laserstrahl gemessen. Die Messergebnisse aller Zellen können anschließend durch computergestützte Auswertung visualisiert werden. Den oben erwähnten Autoren ist es auf diese Weise gelungen, aus einer humanen scFv-Phagenbibliothek einige scFv-Klone zu selektieren, die an Epitope auf humanen dendritischen Zellen spezifisch banden. Die Selektion antigenspezifischer scFv-Phagen mit der FACS-Methode ist allerdings sehr aufwendig, da nicht die gesamte Phagenbibliothek auf einmal, sondern die einzelnen, isolierten scFv-Phagenklone nur nacheinander untersucht werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf den Einsatz der Durchflusszytometrie zur Selektion kollateralspezifischer scFv-Phagen auf RHE-Zellen verzichtet. Nach dem *in vitro* durchgeführten „Biopanning“ (siehe 3.2.3) sind sehr starke Kontaminationen mit unspezifischen Kontrollphagen festgestellt worden, so dass auch eine FACS-Selektion der scFv-Antikörperfragmente keine zuverlässigen Ergebnisse versprach.

Eine zunehmende Popularität gewinnt heutzutage die von Malmberg *et al.*, 1996 beschriebene Selektion von scFv-Phagenbibliotheken unter Verwendung von BIAcore Biosensoren. Diese Technologie beruht auf der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Liedberg *et al.*,

1983) und ermöglicht die Analyse molekularer Antigen-Antikörper-Interaktionen ohne Markierung einer der beiden Reaktionspartner. Bei diesem System wird das Antigen auf einem Sensorchip immobilisiert, während der untersuchte scFv-Antikörper (bzw. die scFv-Phagenbibliothek) in einem kontinuierlichen Pufferfluss appliziert wird. Hierbei kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den vorbeiströmenden scFv-Antikörpermolekülen (bzw. den scFv-Phagenpartikeln) und dem Oberflächengekoppelten Antigen, die mit Hilfe einer BIAcore 2000-Apparatur detektiert und ausgewertet werden. Über mathematische Berechnungen kinetischer Parameter wie: K_{on} (Bindungsrate) und K_{off} (Dissociationsrate) können dann die Affinitäten der untersuchten Antikörperfragmente (bzw. scFv-Phagen) genau ermittelt werden (Karlsson *et al.*, 1991). Die auf diese Weise identifizierten und zugleich selektierten, antigenspezifischen scFv-Antikörper (bzw. scFv-Phagen) werden anschließend eluiert und angereichert. Diese moderne und viel versprechende scFv-„Screening“-Methode konnte jedoch ebenfalls nicht angewandt werden, da, wie bereits erwähnt, kein aufgereinigtes Antigen zur Verfügung stand.

4.2.4 Vor- und Nachteile der „Phage Display“-Technik

Die „Phage display“-Technologie bietet wesentliche Vorteile gegenüber anderen scFv-Antikörper-Expressionssystemen. Insbesondere bei der Suche nach organ- bzw. gewebe-spezifischen Target-Molekülen, deren Epitope unbekannt sind, gewinnt diese Technologie zunehmend an Bedeutung. Durch die Selektion von antigenspezifischen scFv-Antikörperfragmenten, die auf Oberflächen von Phagen präsentiert werden, können neue Antigene erfolgreich aufgespürt und lokalisiert werden (Smith *et al.*, 2005). Des weiteren ermöglicht die „Phage display“-Methode eine Selektion von scFv-Antikörpern sowohl gegen denaturierte als auch im nativen Zustand vorhandene Antigene (Lekkerkerker und Logtenberg, 1999). Mit Hilfe dieser Technologie können ebenfalls die, in diversen Konformationszuständen beobachteten, Affinitätsunterschiede zwischen den entsprechenden Bindungspartnern ausführlich analysiert und miteinander verglichen werden. Ein besonders breites Spektrum an „Biopanning“-Möglichkeiten für phagenexprimierte Antikörperfragmente steht für die Untersuchungen in Anwesenheit von bekannten Antigenen zur Verfügung (siehe 4.2.3). Hierbei können zum einen die nicht bindenden scFv-Phagen vollständig selektiert und zum anderen die antigenspezifischen scFv-Klone, je nach deren Bindungskonstanten in stärker bzw. schwächer affin differenziert werden (Lu *et al.*, 2003). Ein weiterer Vorteil der „Phage display“-Technologie besteht darin, dass diese in verschiedenen Systemen (*in vitro*, *in situ* sowie *in vivo*) etabliert werden kann, was

insbesondere hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse eine wichtige Rolle spielt (siehe 3.2.2-3.2.5).

Trotz der vielen, aufgeführten Vorteile gilt die Selektion von antigenspezifischen Molekülen mittels „Phage display“ als eine sehr aufwendige Methode, die sehr viel Erfahrung und Geduld erfordert. Eine einst zur Untersuchung von bestimmten scFv-Antikörpern entwickelte und ausgetestete „Biopanning“-Technik kann in der Regel nicht vollständig für die Selektion neuartiger Antikörperfragmente übernommen werden. Für jede neue Antigen-Antikörper-Interaktion muss somit ein eigenständiges Selektionssystem etabliert werden, was mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden ist. Ferner erscheint es ratsam, bei der Selektion von scFv-Antikörperfragmenten gegen unbekannte Antigene, die aus dem Phagen-Oberflächen-Expressionssystem erzielten Ergebnisse mit einem anderen Expressionssystem (z.B. bakteriellen *E. coli*-System) nochmals zu verifizieren.

4.3 Nachweise der Heterogenität des Endothels verschiedenartiger, arterieller Gefäße

Die Entstehung von neuen Blutgefäßen erfordert eine komplexe Interaktion zwischen verschiedenen angio- bzw. arteriogenetischen Mediatoren und deren Rezeptoren. Während die meisten Kapillarwachstum stimulierenden Agenzien bereits ausführlich untersucht wurden, ist über die Kollateralwachstum fördernden Moleküle bisher wenig bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, mit Hilfe des CTA-157-2-Antikörpers sowie der eigenständig generierten, kollateralspezifischen scFv-Antikörperfragmente einen bislang unbekanntem, auf Kollateralarterien vorhandenen CSA-Komplex nachzuweisen und zu lokalisieren. Die, mit Hilfe immunhistochemischer Färbungstechniken vorgenommene, zelluläre Lokalisierung des untersuchten Antigen-Komplexes lieferte zum einen wichtige Aufschlüsse über sein Verteilungsmuster in den einzelnen Gefäßwandschichten und zum anderen einige Hinweise auf die Heterogenität verschiedenartiger, arterieller Gefäße.

4.3.1 Lokalisierung der CTA-Antigensignale auf Ratten- und Humangefäßen

Die Struktur und Funktionalität diverser, vaskulärer Endothelien wurde in der Vergangenheit oft untersucht und miteinander verglichen. In diesem Zusammenhang wurden ebenfalls Versuche unternommen, mit Hilfe von Phagen-Peptidbibliotheken, unterschiedliche Expressionsmuster endothelspezifischer Rezeptormoleküle auf Gefäßendothelien unter normalen bzw. pathologischen Bedingungen nachzuweisen sowie gewebespezifische Expression einiger, endothelialer Markermoleküle in Abhängigkeit von der Gefäßlokalisie-

rung aufzuzeigen (Trepel *et al.*, 2002). Mit den, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, durchgeführten Untersuchungen der CSA-Expression auf diversen arteriellen Gefäßen konnte die von einigen Autoren beschriebene „molekulare Heterogenität vaskulärer Endothelien“ (Rajotte *et al.*, 1998) eindeutig bestätigt werden. Darüber hinaus ließ sich anhand der erhaltenen Ergebnisse feststellen, dass sogar zwischen den einzelnen arteriellen Gefäßarten deutliche Unterschiede in der Molekülausstattung existieren. In mehreren unabhängigen *in situ* Experimenten unter Verwendung des Ratten-Arteriogenese-Modells konnte gezeigt werden, dass der CSA-Komplex auf proliferierenden Kollateralgefäßen vorwiegend in der Intima und auf den nichtproliferierenden Kollateralarterien hauptsächlich in der Media bzw. Adventitia lokalisiert ist. Eine ausführliche Analyse der Verteilung der CTA-157-2 bzw. CTA-scFv-Antikörpersignale auf den wachsenden Kollateralgefäßen ergab, dass der untersuchte Antigen-Komplex besonders stark auf den Endothelzellen und nur sehr schwach auf den glatten Muskelzellen dieser Gefäße exprimiert wurde. Ein nahezu gegensätzliches CSA-Expressionsmuster wurde auf den nichtproliferierenden Kollateral- sowie Kontrollgefäßen beobachtet, wo eine spezifische Immunreaktion hauptsächlich auf den glatten Muskelzellen und nur vereinzelt in der Endothelschicht detektiert werden konnte. Die Resultate der vorliegenden Untersuchungen lassen letztlich darauf schließen, dass der CSA-Komplex vorwiegend auf den arteriogenetischen Gefäßen (proliferierende Kollateralgefäße) exprimiert wird. Diese Beobachtungen konnten ebenfalls durch Untersuchungen der CTA-Antikörpersignale auf proliferierenden Tumorgefäßen bestätigt werden. Demzufolge wurden auf den, während der Tumorangiogenese entstandenen, proliferierenden Kapillargefäßen, im Gegensatz zu den proliferierenden Kollateralarterien (s.o.), keine CSA-Antigen-signale registriert. Aufgrund dieser Befunde kann spekuliert werden, dass der untersuchte CSA-Komplex möglicherweise bei dem Prozess der Arteriogenese eine wichtige Rolle spielt.

Neben den oben erwähnten Unterschieden in der CSA-Expression auf diversen Gefäßarten wurde mittels weiterer, immunhistochemischer Färbungsexperimente zusätzlich auch eine speziesabhängige Heterogenität proliferierender Kollateralarterien nachgewiesen. Im Humanmodell konnte, ähnlich wie auf Rattengefäßen, die stärkste CSA-Antigen-expression auf wachsenden Kollateralgefäßen detektiert werden. Dennoch wurden auf den proliferierenden Humangefäßexemplaren, anders als im Rattenmodell, die meisten CTA-Antikörpersignale in den glatten Muskelzellen lokalisiert. Die Endothelschicht dieser Gefäße wies nur vereinzelte Farbreaktionen auf. Die daraus resultierende, speziesabhängige Heterogenität der Kollateralgefäße kann zum einen auf genetische Differenzen zwischen den Ratten- bzw. Humangefäßen (Schaper und Schaper 2004) und zum anderen auf die

unterschiedliche Größe der untersuchten Kollateralarterien zurückgeführt werden. Ein morphologischer Vergleich der jeweiligen Gefäßstrukturen untereinander zeigte, dass die Media der proliferierenden, humanen Kollateralarterien aus wesentlich mehr Schichten von glatten Muskelzellen aufgebaut ist als die Media der korrespondierenden Rattengefäße. Höchstwahrscheinlich sind, aufgrund der unterschiedlichen Gefäßwandstärke, die beim Kollateralwachstum wirkenden hämodynamischen Kräfte (z. B. radiäre Spannung oder Dehnungsreize) in den Humangefäßen ganz anders verteilt als in den Rattengefäßen. Damit könnte wiederum die unterschiedliche Expression von strömungsregulierenden Genen oder anderen arteriogenetischen Molekülen (z.B. CSA-Komplex) in den untersuchten Spezies-Modellen erklärt werden.

Trotz unterschiedlicher Verteilung der CTA-Antikörpersignale in den untersuchten Gefäßen kann jedoch festgehalten werden, dass die Expression des CSA-Komplexes in beiden Arteriogenese-Modellen (Ratte und Human) mit den proliferativen Effekten des Gefäßwachstums korrelierte. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist dennoch die Beobachtung, dass beim Wachstum von Ratten-Kollateralgefäßen vorwiegend die Endothelzellen während bei der Arteriogenese von humanen Kollateralarterien hauptsächlich die glatten Muskelzellen proliferierten.

4.3.2 Verteilungsmuster der VEGFR-2-Antikörpersignale auf Humangefäßen

VEGFR-2 (KDR) gehört zu den wichtigsten Regulatoren der Vaskulogenese und Angiogenese (auch Tumorangiogenese) und wird während dieser Prozesse in wachsenden Blutgefäßen verstärkt exprimiert (Millauer *et al.* 1993). In ruhenden (nicht wachsenden) Gefäßen wird dieser Rezeptor in der Regel herunterreguliert (Risau, 1997). Eine Ausnahme-situation konnte dennoch in Blutgefäßen humaner Nieren beobachtet werden, wo eine erhöhte VEGFR-2-Expression nicht mit der Gefäßneubildung, sondern mit der vaskulären Permeabilität im Nierenglomerulus zusammenhing (Simon *et al.* 1998).

Aufgrund der Tatsache, dass der VEGFR-2 in angiogenetischen Vorgängen eine wichtige Rolle spielt, wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob und in welchem Ausmaß dieser sogenannte, proangiogenetische Faktor während des Wachstums von Kollateralgefäßen (Arteriogenese) exprimiert wird. Dazu wurde, unter der Verwendung von VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Antikörperfragmenten, das Expressionsmuster dieses Rezeptors auf humanen Kollateralgefäßen mittels „Biopanning“ sowie immunhistochemischer Färbungsexperimente untersucht. Der Einsatz von Einzelkettenantikörpern zur Beantwortung ähnlicher Fragestellungen ist in der Vergangenheit bereits mehrmals beschrieben worden.

Böldicke *et al.* (2001) ist es gelungen, mit Hilfe eigenständig generierter, löslicher A7-scFv-Antikörperfragmente die Expression von VEGFR-2 in der Interlobulararterie der humanen Niere und in den Glomerulus-Kapillaren immunhistochemisch nachzuweisen. Besonders interessant in diesem Zusammenhang war die Beobachtung, dass die detektierten Expressionssignale ausschließlich in der Endothelschicht der untersuchten Gefäße lokalisiert waren. Die glatten Muskelzellen zeigten hingegen keine Antigen-Antikörper-Reaktionen. In Anlehnung an die oben erwähnten Experimente wurden für die Suche nach VEGFR-2-Expressionssignalen auf den humanen Kollateralgefäßen (anders als bei Böldicke) phagen-exprimierte A7-scFv-Antikörperfragmente verwendet. Die Resultate dieser Untersuchungen zeigten, dass die A7-scFv-Phagen in der Lage waren, VEGFR-2-Epitope sowohl auf den proliferierenden Kollateralgefäßen (von Patienten mit akuter Ischämie) als auch auf den Kontrollarterien (von Kontrollpatienten) spezifisch zu erkennen. Überraschenderweise musste anhand der „Biopanning“-Ergebnisse festgestellt werden, dass die VEGFR-2-Phagen auf den Kontrollgefäßen viel stärker angereichert waren als auf den wachsenden Kollateralarterien. Zur Verifizierung der „Biopanning“-Daten sowie zur Lokalisierung der KDR-Antigensignale wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Auch anhand dieser Untersuchungen konnte eine deutlich stärkere VEGFR-2-Expression auf den Gefäßen vom Kontrollpatienten verzeichnet werden. Die KDR-spezifischen Antigen-Antikörpersignale waren hierbei sowohl im Endothel als auch auf den glatten Muskelzellen sehr gleichmäßig verteilt. Auf den proliferierenden Kollateralarterien vom Patienten mit akuter Ischämie wurde ebenfalls VEGFR-2-Expression nachgewiesen. Die spezifischen Farbsignale waren jedoch weniger stark ausgeprägt und wurden, im Kontrast zu den Ergebnissen von Böldicke (s.o.), vorwiegend in den glatten Muskelzellen dieser Gefäße lokalisiert. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es mit Hilfe von phagenexprimierten, VEGFR-2-spezifischen A7-scFv-Antikörperfragmenten gelungen ist, die KDR-Expression auf humanen Kollateralarterien erfolgreich nachzuweisen. Durch genaue Lokalisierung der Antigen-Antikörpersignale konnte ebenfalls die Heterogenität verschiedener, arterieller Gefäße im Humanmodell aufgezeigt werden. Des Weiteren ging aus den durchgeführten Untersuchungen hervor, dass die VEGFR-2-Expression nicht mit der Proliferation von Gefäßen im Rahmen der Arteriogenese einhergeht. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass möglicherweise wesentliche Unterschiede in der Expression und Funktionalität des VEGFR-2 zwischen den angio- und arteriogenetischen Gefäßen existieren.

4.4 Affinitätsunterschiede zwischen gefäßspezifischen scFv-Antikörpern in diversen Spezies-Modellen

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der CSA-Expression auf Kollateralgefäßen sowie Endothelzellen verschiedener Spezies fiel auf, dass die phagenexprimierten scFv-Antikörperfragmente sowohl im Vergleich mit dem monoklonalen CTA-157-2 als auch untereinander (z.B. K555bB2, K555aB4 und K55MA) deutliche Spezifitäts- und Affinitätsunterschiede aufwiesen. Bereits nach dem ersten *in situ* „Biopanning“-Experiment auf Ratten-Kollateralgefäßen wurden aus der scFv-Phagenbibliothek mehrere antigenspezifische scFv-Klone selektiert. Allerdings nur zwei davon (K555bB2- und K555aB4-scFv) konnten auf den proliferierenden Kollateralarterien (*in situ* und *in vivo*) sowie RHE-A-Zellen (*in vitro*) erfolgreich angereichert werden. Trotz der nachgewiesenen, sehr hohen Sequenzhomologie zwischen den beiden kollateralspezifischen scFv-Klonen (s.o.) wurden dennoch, durch die „Biopanning“-Ergebnisse, erkennbare Unterschiede in deren Bindungsaffinität festgestellt.

Weitere Affinitätsunterschiede wurden, wie bereits erwähnt, zwischen dem monoklonalen CTA-157-2 und den CTA-scFv-Antikörperfragmenten registriert. Bei den immunhistochemischen CSA-Nachweisen auf proliferierenden Kollateralgefäßen der Ratte wiesen die beiden Antikörper (s.o.) eine nahezu gleiche Spezifität auf. Die, auf den korrespondierenden Kontrollgefäßen vorhandenen, CSA-Signale konnten hingegen ausschließlich mit Hilfe des CTA-157-2-Antikörpers detektiert werden. Die CTA-scFv-Antikörperfragmente waren, auch nach mehrmaliger Wiederholung der Färbungsexperimente, nicht in der Lage, die wenigen, in den glatten Muskelzellen dieser Gefäße lokalisierten, CSA-Epitope spezifisch zu erkennen. Ähnlich wie im Rattenmodell konnten auch auf den untersuchten Humangefäßen deutliche Affinitätsunterschiede zwischen dem CTA-157-2- und den CTA-scFv-Antikörperfragmenten beobachtet werden. Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Bindungsaffinität dieser Antikörper könnte zum einen in der Struktur der beiden Moleküle und zum anderen in einer möglichen Variabilität der CTA-Rezeptoren liegen. Wie bereits im Kapitel 4.1 erwähnt wurde, gehört der monoklonale CTA-157-2-Antikörper dem IgM-Isotyp an. Ein natürliches IgM-Antikörper-Molekül besitzt in der Regel 10 Antigenbindungsstellen und damit auch eine viel höhere Avidität verglichen mit nur einer Bindungsstelle bei einem rekombinanten scFv-Antikörperfragment (wie z.B. CTA-scFv). Da die Affinität des IgM-Antikörpers im Allgemeinen als sehr niedrig anzusetzen ist, wird sie durch den Aviditätsgewinn kompensiert. Dank dieses Vorteils sind die IgM-Moleküle oft in der Lage, auch Antigene mit sehr ähnlichen Epitopstrukturen spezifisch zu erkennen.

Die rekombinanten scFv-Antikörperfragmente zeichnen sich hingegen durch eine sehr hohe Bindungsaffinität aus, können allerdings nur an bestimmte Antigenstrukturen spezifisch binden. Bei einer scFv-Bindung an diverse, strukturähnliche Antigenepitope kommt es in der Regel, aufgrund geringer Avidität dieser Moleküle, zur einer schnellen Dissoziation der Antikörper-Rezeptorbindung, was letztlich zum Ausbleiben der Antigen-Antikörpersignale führt. Um den Aviditätseffekt der kollateralspezifischen scFv-Antikörperfragmente zu erhöhen und damit die Spezifität dieser Moleküle auf mehrere, strukturähnliche CSA-Komplex-Epitope zu erweitern, sollte in künftigen Experimenten, die, in diesem Zusammenhang von mehreren Autoren vorgeschlagene, Konstruktion von bispezifischen sowie bivalenten scFv oder den sogenannten „Diabodies“ vorgenommen werden (Le Gall *et al.*, 1999; Raag und Whitow, 1995).

Neben den oben aufgeführten Affinitätsdifferenzen zwischen den verwendeten CTA-Antikörpern wurden des Weiteren speziesabhängige Unterschiede in der Bindungsaffinität der gefäßspezifischen CTA- sowie VEGFR-2-scFv-Antikörperfragmente auf den untersuchten Gefäßschnitten sowie Endothelzellen registriert. Aus der Analyse immunhistochemischer Färbungsexperimente ging hervor, dass die einst auf Rattengefäßen ausselektierten, kollateralspezifischen scFv-Antikörperfragmente auf den untersuchten Humangefäßschnitten wesentlich schwächere Antigen-Antikörpersignale aufwiesen als auf den entsprechenden Ratten-Kollateralarterien. Ein ähnliches Phänomen wurde ebenfalls nach dem „Biopanning“ von CTA-scFv-Phagen auf den RHE-A/neg.- bzw. PAE-KDR-11-Endothelzelllinien beobachtet. Während auf den Ratten-Herz-Endothelzellen (insbesondere RHE-A) eine sehr starke Anreicherung der CTA-scFv-Phagen dokumentiert wurde, konnten auf den Schweineaorta-Endothelzellen (PAE-KDR-11) keine einzigen CTA-spezifischen Antigen-Antikörpersignale ermittelt werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die „rattenspezifischen“ CTA-scFv-Antikörperfragmente mit viel geringerer Affinität an die, auf anderen Spezies vorhandenen, CSA-Antigenstrukturen binden. Möglicherweise weist das CSA-Protein auf diversen Spezies-Modellen gewisse strukturelle Unterschiede auf. Diese könnten jedoch erst nach erfolgreicher Aufreinigung des Antigen-Komplexes eingehender untersucht werden.

Die gleiche Tendenz konnte bei der Untersuchung der VEGFR-2-scFv-Spezifität auf Ratten- sowie Humangefäßen festgestellt werden. Auch in diesem Fall zeigten die ursprünglich auf humanen Nierenarterien ausselektierten A7-scFv-Phagen auf den untersuchten Humangefäßen sehr starke Antigen-Antikörperreaktionen. Auf den korrespondierenden Ratten-Kollateralarterien konnten hingegen, trotz positiver Nachweisreaktionen mit

einem kommerziellen Anti-VEGFR-2-Antikörper, keine spezifischen VEGFR-2-scFv-Signale verzeichnet werden.

4.5 Expression von löslichen scFv in bakteriellen Expressionssystemen

Das bakterielle *E. coli*-Expressionssystem ist in der Vergangenheit mehrfach für die Generierung von löslichen scFv-Antikörperfragmenten eingesetzt worden (Breitling und Dübel, 1997). Jedoch nicht immer endeten diese Expressionsexperimente mit dem erwünschten Erfolg (Duan und Pomerantz, 1994; Duenas *et al.*, 1995). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten, trotz wiederholter Änderung und Optimierung der Expressionsbedingungen, nur die VEGFR-2-scFv als funktionelle, lösliche Proteine hergestellt werden. Die kollateralspezifischen scFv-Antikörper wurden hingegen nur in Form von unvollständigen scFv-Fragmenten (ca. 25 kDa) oder einzelnen V_L-Domänen (ca. 16 kDa) in den untersuchten *E. coli*-Extrakten vorgefunden. Es gibt mehrere potentielle Faktoren, die eine erfolgreiche Produktion von löslichen CTA-scFv beeinträchtigt haben könnten. Diese werden im Folgenden ausführlich diskutiert.

4.5.1 Einfluss des Bakterienwachstums sowie einiger Expressionsparameter auf die Produktion löslicher scFv-Antikörperfragmente

Die Expression von Fremdproteinen hat sehr oft einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum des Wirtsorganismus. Durch eine rasche Anhäufung von exprimierten Fremdproteinen kann in den Wirtszellen eine Stresssituation ausgelöst werden, die zur deutlichen Verlangsamung des gesamten Zellwachstums führt (Eckart und Bussineau, 1996). Als eine sehr häufige Ursache für die Senkung des Wachstumsverhaltens von *E. coli*-Kulturen wird die Expression von toxischen Proteinen postuliert, welche die Lyse von Bakterienzellen hervorrufen und deren Wachstumsrate dadurch erheblich herabsetzen (Somerville *et al.*, 1994). Bei der Kultivierung von *E. coli* HB2151-Bakterien für die Produktion von löslichen CTA- sowie VEGFR-2-Antikörperfragmenten konnten, trotz der Verwendung des gleichen Expressionsvektors (pCANTAB 5E), deutliche Wachstumsunterschiede zwischen den beiden gefäßspezifischen scFv-Klonen verzeichnet werden. Bis zur Induktion der Genexpression wiesen die beiden Spezies (s.o.) zunächst ein fast identisches Wachstumsverhalten auf. Nach Zugabe von IPTG (Induktion der Genexpression) konnte bei dem VEGFR-2-scFv-Klon, ähnlich wie bei den HB2151-Kontrollbakterien (ohne scFv-Insert), eine wesentlich stärkere Zunahme der optischen Dichte (schnelles Wachstum) beobachtet werden als bei der CTA-scFv-Spezies. Während die VEGFR-2-exprimierenden *E. coli*-Bakterien bereits 12-14 h nach

der IPTG-Induktion die stationäre Phase erreichten, gingen die viel langsamer wachsenden CTA-scFv-Kulturen erst 20-22 h nach der Induktion in die stationäre Phase über. Ein ähnliches Phänomen konnte ebenfalls nach der Umklonierung der CTA- sowie VEGFR-2-scFv in den pET15b-Expressionsvektor und der Expression der beiden scFv-Antikörperfragmente im BL21(DE3)-*E. coli*-Stamm beobachtet werden. Diese auffällige Verlangsamung des Wachstums von CTA-scFv-Bakterienklonen nach der Induktion der Genexpression ist höchstwahrscheinlich auf die Expression der CTA-scFv-Antikörperfragmente zurückzuführen. Möglicherweise übten die exprimierten, eukaryontischen CTA-scFv-Proteine auf die wachsenden *E. coli*-Bakterien toxische Effekte aus und führten, durch das Absterben einiger Bakterienzellen, zur deutlichen Senkung deren Wachstumsverhaltens. Eine langsam fortschreitende Zelllyse sowie die Ansammlung von unerwünschten Zellabbauprodukten könnten des Weiteren eine Übersäuerung des verwendeten Kulturmediums hervorgerufen und damit die Produktion sowie Sekretion von korrekt gefalteten, löslichen CTA-scFv-Proteinen stark beeinträchtigt haben.

Aus den Ergebnissen der Western Blot -Experimente ging deutlich hervor, dass die löslichen CTA-scFv-Antikörperfragmente sowohl ins Periplasma als auch in das Kulturmedium in unvollständiger Form und mit sehr geringen Ausbeuten sezerniert wurden. Möglicherweise hatte die Stärke und Länge der Induktion des lacZ-Promotors einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität und Quantität der entstandenen Antikörperfragmente ausgeübt. Eine zu starke Induktion des Promotors (verursacht durch zu hohe IPTG-Konzentrationen) könnte beispielsweise zur Überlastung des bakteriellen Sekretionsapparates führen und das Verhältnis von korrekt gefalteten zu unvollständigen Antikörperfragmenten erheblich zugunsten der Letztgenannten verschieben (Dübel *et al.*, 1992). Eine zu lange IPTG-Induktion würde wiederum (aufgrund der Lyse von Bakterienzellen) zur Freisetzung von proteolytischen Enzymen führen und damit eine mögliche Degradation der frisch sezernierten scFv stark begünstigen. Für die Produktion von löslichen VEGFR-2-spezifischen Antikörperfragmenten konnten die richtigen Induktions- sowie Expressionsparameter erfolgreich festgelegt werden. Die Expression der CTA-scFv bedarf hingegen einer weiteren Optimierung.

Für die Expression toxischer Proteine wurde in der Vergangenheit oft der Einsatz von stark reprimierbaren und chemisch induzierbaren Tetrazyklin-Promotoren vorgeschlagen (Skerra, 1994; Schiweck und Skerra, 1995). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Expression von rekombinanten Proteinen erst ab dem Zeitpunkt der Induktion zulassen (Breitling und Dübel, 1997). Auf diese Weise können einerseits einige toxische Effekte

ausgeschlossen werden und andererseits kann eine verbesserte Produktion korrekt gefalteter scFv-Proteine erreicht werden. Auch im Bezug auf die Expression der CTA-scFv könnte möglicherweise der Ersatz des bisher verwendeten (mit einem lacZ-Promotor ausgestatten) pCANTAB 5E-Vektors gegen ein anderes, durch Tetrazyklin-Promotor-induzierbares, Expressionssystem zur erfolgreichen Produktion löslicher, kollateralspezifischer Antikörperfragmente beitragen.

4.5.2 Strukturelle Unterschiede zwischen den CTA- und VEGFR-2-scFv

Anhand vergleichender Sequenz- sowie 3D-Strukturanalysen konnten zwischen den gefäßspezifischen CTA- und VEGFR-2-scFv-Antikörpern deutliche strukturelle Unterschiede registriert werden (siehe 3.6). Diese haben höchstwahrscheinlich im Wesentlichen zu Differenzen im Expressions- sowie Sekretionsverhalten der beiden scFv-Moleküle im *E. coli*-System beigetragen. Ähnlich wie bei dem VEGFR-2-scFv (Böldicke *et al.*, 2001) konnten auch in den abgeleiteten Konsensussequenzen des CTA-scFv-Antikörpers hochkonservierte Reste und Motive bekannter Immunglobulingene identifiziert werden. Trotz starker Aminosäuredifferenzen wurden dennoch in der CTA-scFv-Sequenz keine auffälligen Mutationen vorgefunden. Diese Befunde führten zu der Annahme, dass das CTA-scFv-Molekül (ähnlich wie der VEGFR-2-scFv-Antikörper) die nötigen Voraussetzungen erfüllt, als funktioneller, löslicher scFv-Antikörper im *E. coli*-System exprimiert zu werden. Die, im Anschluss an die Expressionsexperimente, durchgeführten Western Blot sowie immunhistochemischen Analysen haben diese Annahme jedoch nicht bestätigt. Wiederholte Bemühungen, vollständige und funktionelle CTA-scFv-Antikörperfragmente in diversen Expressionsvektoren (pCANTAB 5E und pET15b) und Bakterienstämmen (HB2151 und BL21[DE3]) zu exprimieren, blieben stets ohne Erfolg. Während die VEGFR-2-scFv sowohl über die E-tag- (pCANTAB 5E-System, siehe 3.7.1) als auch über die His-tag-Polypeptidsequenz (pET15b-System, Daten nicht gezeigt) im Western Blot mit großen Ausbeuten nachgewiesen wurden, konnten die E-tag markierten CTA-scFv nur in sehr geringen Konzentrationen und ausschließlich im degradierten Zustand in periplasmatischen Extrakten sowie Kulturüberständen detektiert werden. Die mit His-tag- Polypeptiden markierten CTA-scFv-Moleküle wurden hingegen nicht einmal in degradiertem Form im Western Blot ermittelt. Diese kontroversen CTA-scFv-Nachweisergebnisse sind höchstwahrscheinlich auf die, zwischen den His-tag- und E-tag-Polypeptiden zu verzeichnenden, Längenunterschiede zurückzuführen. Aufgrund des Umstandes, dass das His-tag-Fragment (6 Aminosäuren) wesentlich kürzer ist als die korrespondierende E-tag-Sequenz (13 Amino-

säuren), konnte es während der Sekretion der CTA-scFv zu einer sterischen Beeinflussung des His-tag-Polypeptides gekommen sein, welche dazu geführt hat, dass die sezernierten Antikörperfragmente „versteckt“ in den untersuchten Extrakten vorlagen und somit weder gereinigt noch detektiert werden konnten.

Die aus den Western Blot-Analysen gewonnenen Erkenntnisse wurden darüber hinaus mittels immunhistochemischer Färbungsexperimente bestätigt. Aus den erhaltenen Ergebnissen ging hervor, dass die löslichen VEGFR-2-scFv in der Lage waren, die auf den untersuchten Humangefäßschnitten vorhandenen Antigenstrukturen spezifisch zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigten die CTA-scFv-Antikörper weder auf den humanen noch auf den Ratten-Kollateralgefäßen (Daten nicht gezeigt) detektierbare Antigen-Antikörperreaktionen. Mit diesen Ergebnissen konnte eindeutig demonstriert werden, dass es sich bei den im Western Blot nachgewiesenen CTA-scFv-Banden um nichtaktive, fehlerhaft assemblierte oder sogar degradierte scFv-Antikörperfragmente handelte.

Die mit Hilfe einer computersimulierten Darstellung präsentierte räumliche Struktur von VEGFR-2- und CTA-scFv-Antikörpern (siehe Abb. 3.6.1.2) gab sogar einige Hinweise auf eventuelle Bindungs- bzw. Faltungsunterschiede zwischen den beiden scFv-Molekülen. Während der VEGFR-2-spezifische A7-scFv eine sehr kompakte und eher zusammenhängende Struktur mit einer deutlich ausgebildeten Antigenbindungstasche aufwies, zeigte der CTA-scFv-Antikörperfragment hingegen einen eindeutig ausgestreckten Konformationszustand. Die beiden V_H - und V_L -Domänen des CTA-scFv waren in zwei entgegengesetzte Richtungen ausgestreckt und zeigten wenig Affinität zueinander. Diese ungewöhnlich ausgedehnte Form des CTA-scFv-Antikörpers hing möglicherweise mit der Struktur des CSA-Antigens zusammen. Die neuesten Untersuchungen des monoklonalen CTA-157-2-Antikörpers in unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass dieser sowohl die $\alpha 7$ - (26 kDa) als auch die $\beta 3$ -Einheit (21 kDa) des 20S Ratten-Proteasoms spezifisch erkennt. Diese Befunde deuten darauf hin, dass es sich bei dem auf proliferierenden Kollateralgefäßen und RHE-A-Zellen nachgewiesenen CSA-Komplex möglicherweise um eine hochmolekulare und hochselektive Enzymeinheit handelt. Weil das 20S Proteasom einen zylindrisch angeordneten, heterodimeren Komplex darstellt, welcher aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist, erscheint es plausibel, dass das CTA-spezifische scFv-Antikörperfragment, um an weit auseinander lokalisierte Antigenepitope zu binden (wie im Fall des 20S Proteasoms), einen ebenfalls ausgestreckten, strukturellen Aufbau aufweisen muss. Mit diesen Erkenntnissen kann auch die deutlich stärkere Bindungsaktivität des aus 10 Valenzen bestehenden, monoklonalen CTA-157-2, welcher an gleichzeitig mehrere Untereinheiten des CSA-

Komplexes binden kann, gegenüber dem scFv-Fragment begründet werden. Während der ausgedehnte Konformationszustand des CTA-scFv-Antikörpers wesentliche Vorteile bei der Erkennung eines Antigen-Komplexes (wie z. B. des Proteasoms) bietet, kann er jedoch für die Generierung von löslichen scFv in bakteriellen *E. coli*-Systemen negative Konsequenzen haben. Die ausgedehnte scFv-Struktur könnte beispielsweise die Wanderung des CTA-scFv-Antikörpers durch die Zellmembran von *E. coli*-Bakterien, während der sekretorischen Vorgänge, erheblich erschweren und somit starke Ausbeute-Verluste oder sogar Proteindegradationen verursachen.

Trotz der vielen Vorteile, welche die Expression von Proteinen im prokaryontischen *E. coli*-System bietet (siehe Kapitel 1.4.3), konnten mit dieser Methode keine funktionellen CTA-spezifischen scFv-Antikörperfragmente generiert werden. Höchstwahrscheinlich ist dieses System nicht in der Lage, eine korrekte Faltung dieser Antikörperfragmente zu gewährleisten. Um die Funktionalität der einst phagenexprimierten, kollateralspezifischen scFv in Form von löslichen Proteinen zu untersuchen, sollten in künftigen Experimenten für die Produktion von rekombinanten Antikörperfragmenten alternative Expressionssysteme (z.B. Baculovirus-System; Maeda, 1989) herangezogen werden.

4.7 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante scFv-Antikörperfragmente generiert, die in der Lage waren, die auf proliferierenden Kollateralgefäßen vorhandenen Antigenstrukturen im Ratten- sowie Humanmodell spezifisch zu erkennen. Um diese Antikörperfragmente herzustellen, musste zunächst eine entsprechende „Phage display“-Technik entwickelt werden, welche durch die Erhöhung der Selektionsstringenz eine signifikante Reduzierung der Anzahl an unspezifischen scFv-Antikörpern ermöglichte. Die, mit diesem optimierten System, hergestellten, phagenexprimierten CTA-scFv wurden mittels immunhistochemischer Experimente auf ihre Spezifität getestet. Unter Verwendung dieser Methode konnte ebenfalls die Lokalisierung kollateralspezifischer Antikörpersignale in Endothelien verschiedener Gefäße und Spezies erfolgreich ermittelt werden. Die Untersuchung der Bindungsspezifität sowie -affinität der CTA-scFv über ELISA- RIA- oder BIAcore-basierte Festphasenmethoden war zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten nicht möglich, da kein aufgereinigtes Antigen zur Verfügung stand. Um genauere Aussagen über die Funktionalität der phagenexprimierten CTA-scFv treffen zu können und deren Anwendbarkeit für die gezielte Ansteuerung von gefäßspezifischen Antigenstrukturen zu ermöglichen, sollte zunächst im Rahmen der Proteomanalyse von proliferierenden Kollateralarterien sowie RHE-A-Endothelzellen die Struktur des CSA-Komplexes aufgeklärt werden.

5 Zusammenfassung

Erkenntnisse über die Regulation des Gefäßwachstums im Rahmen der Angiogenese und Arteriogenese haben eine wichtige Bedeutung für die Diagnostik und Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen. Im Mittelpunkt der angio- und arteriogenetischen Vorgänge steht das Endothel der Blutgefäße, welches die Koordination verschiedener physiologischen und pathophysiologischen Prozesse stark beeinflusst. Bei der Steuerung der Einwanderung von Entzündungszellen, der Organspezifität pathologischer Veränderungen und beim Gefäßwachstum spielt die Heterogenität des Endothels verschiedener Gefäßarten eine entscheidende Rolle. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Heterogenität der arteriellen Gefäße mit Hilfe von Einzelkettenantikörpern (scFv), die gegen spezifische Endothelien gerichtet sind, zu demonstrieren. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Unterscheidung des Endothels solcher proliferierender Gefäße, die der Angiogenese (Kapillarsprossung) unterliegen, von denen, die zur Arteriogenese (Remodelling preexistierender Shunts) zählen. Diesem Ziel diente zum einen die Generierung von kollateralspezifischen scFv-Antikörpern und zum anderen die Entwicklung und Optimierung einer zuverlässigen Methode zum Nachweis gefäßspezifischer Antigene im Ratten- und Humanmodell.

Als Ausgangsmaterial für diese Experimente fungierten Ratten, bei denen, nach künstlicher Ligation im Bereich der Femoralarterie, die Kollateralgefäße entnommen wurden. Mit den Membranpräparationen aus den Kollateralarterien wurden Mäuse immunisiert. Aus der Milz der Mäuse wurden die B-Lymphozyten isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Die daraus resultierenden Hybridomazellen wurden mittels immunhistochemischer Färbungen auf ihre Spezifität an Schnitten von Kollateralarterien überprüft. Die positiven Hybridomazellen wurden ausselektiert. Aus den kollateralspezifischen Hybridomzellen wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe von degenerierten Primern wurden die variablen Regionen der schweren und leichten Kette amplifiziert, mit einer Linkersequenz verbunden, in ein Phagemid-Vektor ligiert und in *E. coli*-Bakterien transformiert. Durch die Inkubation der Bakterien mit M13-Bakteriophagen wurden die scFv-Vektoren in diese übertragen und als pIII-Fusionsprodukt auf deren Oberfläche exprimiert. Die Bindungsspezifität der scFv-exprimierenden Phagen wurde durch mehrmalige „Biopanning“-Versuche *in situ*, *in vitro* und *in vivo* überprüft. Nach jedem erfolgreichen „Biopanning“-Experiment wurde eine genaue Sequenzanalyse der scFv-Antikörper vorgenommen. Homologievergleiche der kollateralspezifischen scFv-Klone mit bekannten Immunglobulin-Sequenzen aus der Kabat-Datenbank ermöglichten eine genaue Lokalisierung der

hypervariablen Regionen und lieferten zudem wichtige Auskünfte über die Stabilität der selektionierten CTA-scFv-Antikörperfragmente.

Durch den Einsatz immunhistochemischer Färbungstechniken konnte der Verteilungsmuster von phagenexprimierten CTA-scFv-Antikörpern in verschiedenen Kompartimenten der Ratten- sowie Humangefäße genau lokalisiert werden. Dabei hat sich herausgestellt, dass der, mit den CTA-scFv-Phagen detektierte, CSA-Komplex (collateral specific antigen - Komplex) vorwiegend auf arteriogenetischen Gefäßen exprimiert wird. Ruhende sowie angiogenetische Gefäße (z.B. Tumorgefäße) zeigten hingegen keine spezifischen Farbreaktionen mit den kollateralspezifischen Antikörperfragmenten. Neben den Unterschieden in der CSA-Expression auf verschiedenen Gefäßarten wurde des Weiteren eine speziesabhängige Heterogenität proliferierender Kollateralgefäße nachgewiesen. Während die im Rattenmodell detektierten CTA-scFv-Signale hauptsächlich im Endothel der proliferierenden Kollateralarterien vorzufinden waren, wurden auf den proliferierenden Humangefäßen die meisten CTA-scFv-Reaktionen in den glatten Muskelzellen lokalisiert.

Im zweiten Teil der Experimente wurde die Expression eines weiteren gefäßspezifischen scFv-Antikörpers (VEGFR-2-scFv) auf Human- sowie Rattengefäßen untersucht. Durch die Analyse der Verteilung von VEGFR-2-Antikörpersignalen in den oben erwähnten Spezies-Modellen konnte die postulierte, speziesabhängige Heterogenität arterieller Gefäße ebenfalls bestätigt werden. Ferner ging aus den durchgeführten Untersuchungen hervor, dass die VEGFR-2-Expression nicht mit der Proliferation von Gefäßen im Rahmen der Arteriogenese einhergeht.

Zur Verifizierung der, mit dem Phagenexpressionssystem erzielten, Ergebnisse sowie zur weiteren Charakterisierung der gefäßspezifischen CTA-scFv- und VEGFR-2-Antikörperfragmente wurde abschließend die Expression und Produktion von löslichen scFv-Proteinen in bakteriellen *E. coli*-Expressionssystem vorgenommen. Trotz wiederholter Optimierung diverser Expressionsparameter konnten im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit ausschließlich die VEGFR-2-scFv als aktive, lösliche Proteine hergestellt und auf ihre Funktionalität überprüft werden. Die kollateralspezifischen scFv-Antikörper wurden hingegen nur in Form von unvollständigen scFv-Fragmenten oder einzelnen V_L-Domänen in den untersuchten *E. coli*-Extrakten vorgefunden. Um die Charakterisierung der CTA-scFv weiter fortzuführen, sollten künftig zur Produktion von löslichen Antikörperfragmenten alternative Expressionssysteme (z.B. Baculovirus-System) herangezogen werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ABBAS, A.K., POBER, J. S., LICHTMAN, A. H. (1994). Antibodies and antigens. *Cellular and molecular immunology*, **2nd edition**, 33-64.
- ACHEN, M.G., JELTSCH, M., KUKK, E., MÄKINEN, T., VITALI, A., WILKS, A.F., ALITALO, K., STACKER, S.A. (1998). Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk 1) and VEGF receptor 3 (Flt 4). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 548-553.
- AGUAYO, A., KANTARJIAN, H., MANSOURI, T., GIDEL, C., ESTEY, E., THOMAS, D., KOLLER, C., ESTROV, Z., O'BRIEN, S., KEATING, M., FREIREICH, E., ALBITAR, M. (2000). Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*, **96**, 2240-2245.
- ARAP, W., PASQUALINI, R., RUOSLAHTI, E. (1998). Chemotherapy targeted to tumor vasculature. *Curr. Opin. Oncol.*, **10**, 560-565.
- ARRAS, M., ITO, W.D., SCHOLZ, D., WINKLER, B., SCHAPER, J., SCHAPER, W. (1998). Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J. Clin. Invest.*, **101**, 40-50.
- ASAHARA, T., MUROHARA, T., SULLIVAN, A., SILVER, M., VAN DER ZEE, R., LI, T., WITZENBICHLER, B., SCHATTEMAN, G., ISNER, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, **275**, 964-967.
- ASAHARA, T., MASUDA, H., TAKAHASHI, T., KALKA, C., PASTORE, C., SILVER, M., KEARNE, M., MAGNER, M., ISNER, J.M. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.*, **85**, 221-228.
- AUERBACH, W., AUERBACH, R. (1994). Angiogenesis inhibition. *Pharmac. Ther.*, **63**, 265-311.
- AUSPRUNK, D.H., FOLKMAN, J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular Research*, **14**, 53-65.
- BANAI, S., SHWEIKI, D., PINSON, A., CHANDRA, M., LAZAROVICI, G., KESHET, E. (1994). Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc. Res.*, **28**, 1176-1179.
- BARBAS, I., C.F., KANG, A.S., LERNER, R.A., BENKOVIC, S.J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **88**, 7978-7982.
- BARLEON, B., SOZZANI, S., ZHOU, D., WEICH, H.A., MANTOVANI, A., MARME, D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*, **87**, 3336-3343.
- BASILICO, C., MOSCATELLI, D. (1992). The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.*, **59**, 115-165.
- BERDICHEVSKY, Y., BEN-ZEEV, E., LAMED, R., BENHAR, I. (1999). Phage display of a cellulose binding domain from *Clostridium thermocellum* and its application as a tool for antibody engineering. *J. Immunol. Methods.*, **228**, 151-162.
- BIRD, R.E., HARDMAN, K.D., JACOBSON, J.W., JOHNSON, S., KAUFMAN, B.M., LEE, S., LEE, T., POPE, S.H., RIORDAN, G.S., WHITLOW, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, **242**, 423-426.

- BIRD, R.E., WEBB WALKER, B. (1991). Single chain antibody variable regions. *Tibtech*, **9**, 132-137.
- BJORCK, L. (1988). Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for IgL chains. *J. Immunol.*, **140**, 1194-7.
- BLIGHT, M.A., HOLLAND, I.B., CHERVEAUX, C. (1994). Protein secretion pathways in *Escherichia coli*. *Current Opinions in Biotechnology.*, **5**, 468-474.
- BOEGEHOLD, M.A. (1998). Heterogeneity of endothelial function within the circulation. *Current Opinions in Nephrology & Hypertension.*, **7**, 71-78.
- BOHLEN, H., MANZKE, O., PATEL, B., MOLDENHAUER, G., DORKEN, B., VON FLIEDNER, V., DIEHL, V., TESCH, H. (1993). Cytolysis of leukemic B cells by T cells activated via two bispecific antibodies. *Cancer Research*, **53**, 4310-4314.
- BÖLDICKE, T., TESAR, M., GRIESEL, C., ROHDE, M., GRÖNE, H-J., WALTENBERGER, J., KOLLET, O., LAPIDOT, T., YAYON, A., WEICH, H. (2001). Anti-VEGFR-2 scFvs for cell isolation. Single-chain antibodies recognizing the human Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the surface of primary endothelial cells and preselected CD34⁺ cells from cord blood. *Stem Cells*, **19**, 24-36.
- BONIECE, I.R., WAGNER, J.A. (1993). Growth factors protect PC 12 cells against ischemia by a mechanism that is independent of PKA, PKC, and protein synthesis. *J. Neurosci.*, **13(10)**, 4220-4228.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- BREITLING, F., DÜBEL, S. (1997). Rekombinante Antikörper. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin*.
- BRINKMANN, U., PAI, L.H., FITZGERALD, D.J., WILLINGHAM, M., PASTAN, I. (1991). B3 (Fv)-PE38KDEL, a single chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **88**, 8616-8620.
- BRINKMANN, U., CHOWDHURY, P.S., ROSCOE, D.M., PASTAN, I. (1995). Phage-display of disulfide-stabilized Fv fragments. *Journal of Immunological Methods*, **182**, 41-50.
- BUCHNER, J., RUDOLPH, R. (1991). Renaturation, purification and characterisation of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*, **9**, 157-162.
- BURKE, T., BOLGER, R., CHECOVICH, W., LOWERY, R. (1996). Measurement of peptide binding affinities using fluorescence polarization. *Phage display of peptides and proteins. A laboratory manual, Academic Press.*, **18**, 305-326.
- BURTON, D.R. (1987). Structure and function of antibodies. *Molecular Genetics of Immunoglobulins*, 1-50.
- BURTON, D.R., BARBAS, C.F., PERSSON, M.A., KOENIG, S., CHANOCK, R.M., LERNER, R.A. (1991). A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **88**, 10134-10137.
- CAO, Y. (2001). Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **33**, 357-369.

- CARMELIET, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, **6**, 389-395.
- CARMELIET, P., JAIN, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**, 249-257.
- CATHCART, M.K., MOREL, D.W., CHISOLM, G.M. (1985). Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. *J. Leukoc. Biol.*, **38**, 341-350.
- CINES, D.B., POLLAK, E.S., BUCK, C.A., LOSCALZO, J., ZIMMERMAN, G.A., MCEVER, R.P., POBER, J.S., WICK, T.M., KONKLE, B.A., SCHWARTZ, B.S., BATNATHAN, E.S., MCCRAE, K.R., HUG, B.A., SCHMIDT, A.M., STERN, D.M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, **91**, 3527-3561.
- CLACKSON, T., HOOGENBOOM, H.G., GRIFFITHS, K.S., WINTER, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, **352**, 624-628.
- CLAUSS, M., WEICH, H., BREIER, G., KNIES, U., RÖCKL, W., WALTENBERGER, J., RISAU, W. (1996). The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities - Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, **271**, 17629-17634.
- COLOMA, M.J., MORRISON, S.L. (1997). Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. *Nature Biotechnology*, **15**, 159-163.
- COOPER, T.G. (1981). Biochemische Arbeitsmethoden. *Walter de Gruyter, Berlin, New York*, 356-357.
- CORTI, A., GASPARRI, A., SACCHI, A., CURNIS, F., SANGREGORIO, R., COLOMBO, B., SICCARDI, A.G., MAGNI, F. (1998). Tumor targeting with biotinylated tumor necrosis factor alpha: structure-activity relationships and mechanism of action on avidin pretargeted tumor cells. *Cancer Res.*, **58**, 3866-3872.
- DAVIS, S., ALDRICH, T.H., JONES, P.F., ACHERSON, A., COMPTON, D.L., JAIN, F., RYAN, T.E., BRUNO, J., RADZIEJEWSKI, C., MAISONPIERRE, P.C., YANCOPOULOS, G.D. (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie-2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, **87**, 1161-1169.
- DE JONGE, J., BRISSINCK, J., HEIRMAN, C., DEMANET, C., LEO, O., MOSER, M., THIELEMANS, K. (1995). Production and characterisation of bispecific single-chain antibody fragments. *Molecular Immunology*, **32**, 1405-1412.
- DE LARCO, J.E., TODARO, G.J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **75**, 4001-4005.
- DEINDL, E., BUSCHMANN, I., HOEFER, I.E., PODZUWEIT, T., BOENGLER, K., VOGEL, S., VAN ROYEN, N., FERNANDEZ, B., SCHAPER, W. (2001). Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res.*, **89**, 779-786.
- DERHAAG, J.G., DUIJVESTIJN, A.M., EMEIS, J.J., ENGELS, W., VAN BREDA VRIESMAN, P.J. (1996). Production and characterization of spontaneous rat heart endothelial cell lines. *Lab. Invest.*, **74**, 437-451.
- DETMAR, M., BROWN, L.F., CLAFFEY, K.P., YEO, K-T., KOCHER, O., JACKMAN, R.W., BERSE, B., DVORAK, H.F. (1994). Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J. Exp. Med.*, **180**, 1141-1146.

- DUAN, L., POMERANTZ, R.J. (1994). Elimination of endogenous aberrant kappa chain transcripts from sp2/0-derived hybridoma cells by specific ribozyme cleavage: utility in genetic therapy of HIV-1 infections. *Nucleic Acids. Res.*, **22**, 5433-5438.
- DÜBEL, S., BREITLING, F., KLEWINGHAUS, I., LITTLE, M. (1992). Regulated secretion and purification of recombinant antibodies in *E. coli*. *Cell Biophys.*, **21**, 69-79.
- DUENAS, M., AYALA, M., VAZQUEZ, J., OHLIN, M., SODERLIND, E., BORREBAECK, C.A., GAVILONDO, J.V. (1995). A point mutation in a murine immunoglobulin V-region strongly influences the antibody yield in *Escherichia coli*. *Gene*, **158**, 61-66.
- ECKART, M.R., BUSSINEAU, C.M. (1996). Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **7**, 525-530.
- ESSLER, M., RUOSLAHTI, E. (2002). Molecular specialization of breast vasculature: A breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2252-2257.
- FAJARDO, L.F., KWAN, H.H., KOWALSKI, J., PRIONAS, S.D., ALLISON, A.C. (1992). Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, **140**, 539-544.
- FALCONE, D.J., MCCAFFREY, T.A., HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A., GARCIA, M. (1993). Transforming growth factor-beta 1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol.*, **155**, 595-605.
- FERRARA, N., HENZEL, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **161**, 8510-8518.
- FERRARA, N., HOUCK, K.A., JAKEMAN, L.B., WINER, J., LEUNG, D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J. Cell. Biochem.*, **47**, 211-218.
- FERRARA, N. (1996). Vascular endothelial growth factor. *Eur. J. Cancer*, **32 A**, 2413-2422.
- FERRARA, N., DAVIS-SMYTH, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev.*, **18**, 4-25.
- FOLKMAN, J. (1971). Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, **285**, 1182-1188.
- FOLKMAN, J., HAUDENSCHILD, C. (1980). Angiogenesis *in vitro*. *Nature*, **288**, 551-556.
- FOLKMAN, J. (1984). Angiogenesis. In: *Biology of endothelial cells*. (Jaffe E.A., Hrsg.), Martinus Nijhoff Publishers, Boston, The Hague, Dordrecht., 412-428.
- FOLKMAN, J. (1985). Tumor Angiogenesis. *Adv. Cancer Res.*, **43**, 175-203.
- FOLKMAN, J. (1986). How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? - G. H. A. clowes memorial award lecture. *Cancer Research*, **46**, 467-473.
- FOLKMAN, J., WATSON, K., INGBER, D., HANAHAN, D. (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*, **339**, 58-61.
- FOLKMAN, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 4-6.
- FOLKMAN, J., SHING, Y. (1992). Angiogenesis. [Review] [113 refs]. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 10931-10934.
- FOLKMAN, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, **1**, 27-31.

- FOOTE, J., MILSTEIN, C. (1991). Kinetic maturation of an immune response. *Nature*, **352**, 530-532.
- FRANCISCO, J.A., GILLILAND, L.K., STEBBINS, M.R., NORRIS, N.A., LEDBETTER, J.A., SIEGALL, C.B. (1995). Activity of a single-chain immunotoxin that selectively kills lymphoma and other B-lineage cells expressing the CD40 antigen. *Cancer Research*, **55**, 3099-3104.
- FRIGUET, B., CHAFOTTE, A.F., DJAVADI-OHANIANCE, L., GOLDBERG, M.E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunological Methods*, **77**, 305-319.
- FROMER, C.H., KLINTWORTH, G.K. (1975). An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. *Am. J. Pathol.*, **79**, 537-554.
- GENTZ, R., KUYS, Y., ZWIEB, C., TAATJES D., TAATJES, H., BANNWARTH, W., STUEBER, D., IBRAHIMI, I. (1988). Association of degradation and secretion of three chimeric polypeptides in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **170** (5), 2212-2220.
- GITAY-GOREN, H., HALABAN, R., NEUFELD, G. (1993). Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 702-708.
- GOLDBERG, M.E., DJAVADI-OHANIANCE, L. (1993). Methods for measurement of antibody/antigen affinity based on ELISA and RIA. *Current Opinions in Immunology*, **5**, 278-281.
- GOSPODAROWICZ, D., THAKRAL, K.K. (1978). Production of a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **75**, 847-851.
- GROSS, J.L., MOSCATELLI, D., RIFKIN, D.B. (1983). Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **80**, 2623-2627.
- GRUBER, M., SCHODIN, B.A., WILSON, E.R., KRANZ, D.M. (1994). Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Immunology*, **152**, 5368-5374.
- GUEX, N., PEITSCH, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Elektrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- HANAHAH, D., FOLKMAN, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**, 353-364.
- HANAHAH, D. (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*, **277**, 48-50.
- HARADA, K., FRIEDMAN, M., LOPEZ, J.J., WANG, S.Y., LI, J., PRASAD, P.V., PEARLMAN, J.D., EDELMAN, E.R., SELLKE, F.W., SIMONS, M. (1996). Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *Amer. J. Physiol.*, **39**, H1791-H1802.
- HAWKINS, R.E., RUSSELL, S.J., WINTER, G. (1992). Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.*, **226**, 889-896.

- HAYDEN, M.S., LINSLEY, P.S., GAYLE, M.A., BAJORATH, J., BRADY, W.A., NORRIS, N.A., FELL, H.P., LEDBETTER, J.A., GILLILAND, L.K. (1994). Single-chain mono- and bispecific antibody derivatives with novel biological properties and anti-tumor activity from COS cell transient expression system. *Theoretical Immunology*, **1**, 3-15.
- HEES, H. (2000). Kreislaufsystem. In: *Histologie (H. Hees, F. Sinowatz, Hrsg.)*, 191-204. Deutscher Ärzte Verlag, Köln.
- HELISCH, A., SCHAPER, W. (2000). Angiogenesis and arteriogenesis - not yet for prescription. *Z Kardiol.*, **89**, 239-244.
- HERTIG, A.T. (1935). Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contrib. Embryol.*, **25**, 37-82.
- HERZOG, S., SAGER, H., KHMELEVSKI, E., DEYLI, A., ITO, W.D. (2002). Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **283**, H2012-H2020.
- HILL, H.R., STOCKLEY, P.G. (1996). Phage presentation. *Molecular Microbiology*, **20**, 685-692.
- HIRATSUKA, S., MINOWA, O., KUNO, J., NODA, T., SHIBUYA, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **95**, 9349-9354.
- HOBSON, B.D. (1984). Endothelial proliferation in tumors and normal tissues: continuous labelling studies. *Br.J.Cancer*, **49**, 405-413.
- HÖCKEL, M., SCHLENGER, K., DOCTROW, S., KISSEL, T., VAUPEL, P. (1993). Therapeutic angiogenesis. *Arch. Surg.*, **128**, 423-429.
- HOOGENBOOM, H.R., GRIFFITHS, A.D., JOHNSON, K.S., CHISWELL, D.J., HUDSON, P., WINTER, G. (1991). Multi subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 4133-4137.
- HOOGENBOOM, H.R., DE BRUINE, A.P., HUFTON, S.E., HOET, R.M., ARENDS, J.W., ROOVERS, R.C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, **4**, 1-20.
- HOUSTON, P., GOODMAN, J., LEWIS, A., CAMPBELL, C.J., BRADDOCK, M. (2001). Homing markers for atherosclerosis: applications for drug delivery, gene delivery and vascular imaging. *FEBS Lett.*, **492**, 73-77.
- HTUN, P., ITO, W.D., HOEFER, I.E., SCHAPER, J., SCHAPER, W. (1998). Intramyocardial infusion of FGF-1 mimics ischemic preconditioning in pig myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **30**, 867-877.
- ISNER, J.M., LOSORDO, D.W. (1999). Therapeutic angiogenesis for heart failure. *Nature Medicine*, **5**, 491-492.
- ITO, W.D., KHMELEVSKI, E. (2003). Tissue macrophages: "Satellite Cells" for growing collateral vessels? A hypothesis. *Endothelium.*, **10**, 233-235.
- JANEWAY, C.A., TRAVERS, P. (1997). *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag. Berlin, Oxford. 2. Auflage.
- JESNOWSKI, R., NÄHRING, J., WOLF, K. (1995). A rapid and reliable method for PCR-based amplification of chromosomal and mitochondrial DNA from intact yeast cells. *Current Genetics*, **27**, 318-319.

- JIN, K.L., MAO, X.O., GREENBERG, D.A. (2000). Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in *in vitro* ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **97**, 10242-10247.
- JONES, P.T., DEAR, P.H., FOOTE, J., NEUBERGER, M.S., WINTER, G. (1986). Replacing the complementary-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, **321**, 522-525.
- JOUKOV, V., PAJUSOLA, K., KAIPAINEN, A., CHILOV, D., LAHTINEN, I., KUKK, E., SAKSELA, O., KALKKINEN, N., ALITALO, K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.*, **15**, 290-298.
- KABAT, E.A., WU, T.T., REID-MILLER, M., PERRY, H.M., GOTTESMAN, K.S. (1987). Sequences of proteins of immunological interest. *US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office*.
- KALEBIC, T., GARBISA, S., GLASER, B., LIOTTA, L.A. (1983). Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. *Science*, **221**, 281-283.
- KANNEL, W.B. (1997). Cardiovascular risk factors in the elderly. *Coron Artery Dis.*, **8**, 565-575.
- KARLSSON, R., MICHAELSSON, A., MATTSSON, L. (1991). Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol. Methods.*, **145**, 229-240.
- KATOH, O., TAUCHI, H., KAWAISHI, K., KIMURA, A., SATOW, Y. (1995). Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Research*, **55**, 5687-5692.
- KECK, P.J., HAUSER, S.D., KRIVI, G., SANZO, K., WARREN, T., FEDER, J., CONOLLY, D.T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, **246**, 1309-1312.
- KENDALL, R.L., WANG, G., THOMAS, K.A. (1996). Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **226**, 324-328.
- KLAGSBRUN, M., D'AMORE, P.A. (1991). Regulators of angiogenesis. *Annu. Rev. Physiol.*, **53**, 217-239.
- KNAPPIK, A., PLÜCKTHUN, A. (1995). Engineered turns of a recombinant antibody improve its *in vivo* folding. *Protein-Engineering*, **8**, 81-89.
- KNIGHTON, D.R., HUNT, T.K., THAKRAL, K.K., GOODSON, W.H. (1982). Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an *in vivo* study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann. Surg.*, **196**, 379-388.
- KOCH, A.E., HARLOW, L., HAINES, G.K., AMENTO, E.P., UNEMORI, E.N., WONG, W-L., POPE, R.M., FERRARA N. (1994). Vascular endothelial growth factor: a cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*, **152**, 4149-4156.
- KÖHLER, G., MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 52-53.
- KORPELAINEN, E.I., ALITALO, K. (1998). Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Current Opinions in Cell Biology*, **10**, 159-164.

- KREBBER, A., BORNHAUSER, S., BURMESTER, J., HONEGGER, A., WILLUDA, J., BOSSHARD, H.R., PLUCKTHUN, A. (1997). Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J. Immunol. Methods.*, **201**, 35-55.
- KROLL, J., WALTENBERGER, J. (1998). VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **252**, 743-746.
- KROLL, J., WALTENBERGER, J. (1999). A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): Rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **265**, 636-639.
- KURUCZ, I., TITUS, J.A., JOST, C.R., JACOBUS, C.M., SEGAL, D.M. (1995). Retargeting of CTL by an efficiently refolded bispecific single-chain Fv dimer produced in bacteria. *Journal of Immunology*, **154**, 4576-4582.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LAITINEN, M., ZACHARY, I., BREIER, G., PAKKANEN, T., HAKKINEN, T., LUOMA, J., ABEDI, H., RISAU, W., SOMA, M., LAAKSO, M., MARTIN, J.F., YLÄ-HERTTUALA, S. (1997). VEGF gene transfer reduces intimal thickening via increased production of nitric oxide in carotid arteries. *Hum. Gene Ther.*, **8**, 1737-1744.
- LE GALL, F., KIPRIYANOV, S.M., MOLDENHAUER, G., LITTLE, M. (1999). Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding. *FEBS Lett.*, **453**, 164-168.
- LEE, C., LI, P., INOUE, H., BRICKMANN, E.R., BECKWITH, J. (1989). Genetic studies on the inability of β -galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Journal of Bacteriology*, **171**, 4609-4616.
- LEKKERKERKER, A., LOGTENBERG, T. (1999). Phage antibodies against human dendritic cell subpopulations obtained by flow cytometry-based selection on freshly isolated cells. *J. Immunol. Methods.*, **231**, 53-63.
- LEUNG, D.W., CACHIANES, G., KUANG, W.J., GOEDDEL, D.V., FERRARA, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, **246**, 1306-1309.
- LIEDBERG, B., NYLANDER, C., LUNDSTRÖM, I. (1983). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors Actuators*, **4**, 299.
- LIN, Y., WEISDORF, D.J., SOLOVEY, A., HEBBEL, R.P. (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J.Clin.Invest.*, **105**, 71-77.
- LINDNER, P., GUTH, B., WÜLFING, C., KREBBER, C., STEIPE, B., MÜLLER, F., PLÜCKTHUN, A. (1992). Purification of native proteins from the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli* using IMAC and histidine tails: a comparison of proteins and protocols. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology.*, **4**, 41-55.
- LITTLE, S., CAMPBELL, C.J., EVANS, I.J., HAYWARD, E.C., LILLEY, R.J., ROBINSON, M.K. (1989). A short N-proximal region of prochymosin inhibits the secretion of hybrid proteins from *Escherichia coli*. *Gene*, **83**, 321-329.

- LORIMER, I.A., KEPPLER-HAFKEMEYER, A., BEERS, R.A., PEGRAM, C.N., BIGNER, D.D., PASTAN, I. (1996). Recombinant immunotoxins specific for mutant epidermal growth factor receptor: targeting with a single chain antibody variable domain isolated by phage display. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **93**, 14815-14820.
- LOTTSPREICH, F., ZORBAS, H. (1998). Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*, 677-678.
- LU, D., SHEN, J., VIL, M.D., ZHANG, H., JIMENEZ, X., BOHLEN, P., WITTE, L., ZHU, Z. (2003). Tailoring in vitro selection for a picomolar affinity human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2 for enhanced neutralizing activity. *J. Biol. Chem.*, **278**, 43496-43507.
- LU, H., ZHENG, Y.F., JIN, D.D. (2002). Application of laser capture microdissection in screening phage display peptide library from osteosarcoma tissues. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, **22**, 1079-1080.
- LUTTUN, A., CARMELIET, G., CARMELIET, P. (2002). Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc. Med.*, **12**, 88-96.
- MACK, M., RIETHMULLER, G., KUFER, P. (1995). A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **92**, 7021-7025.
- MADRI, J.A., PRATT, B.M., TUCKER, A.M. (1988). Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor- β depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J. Cell. Biol.*, **106**, 1375-1384.
- MAEDA, S. (1989). Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.*, **34**, 351-372.
- MAHONY, J.B., COOMBES, B.K., & REVIEW., F.M.L.A.-. (2001). Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: does the evidence support a causal or contributory role? *FEMS Microbiol Lett.*, **197**, 1-9.
- MAISONPIERRE, P.C., SURI, C., JONES, P.F., BARTUNKOVA, S., WIEGAND, S.J., RADZIEJEWSKI, C., COMPTON, D., MCCLAIN, J., ALDICH, T.H., PAPADOPOULOS, N., DALY, T.J., DAVIS, S., SATO, T.N., YANCOPOULOS, G.D. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie-2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science*, **277**, 55-60.
- MALMBORG, A.C., DUENAS, M., OHLIN, M., SODERLIND, E., BORREBAECK, C.A. (1996). Selection of binders from phage displayed antibody libraries using the BIAcore biosensor. *J. Immunol. Methods.*, **198**, 51-57.
- MANTOVANI, A., SOZZANI, S., INTRONA, M. (1997). Endothelial activation by cytokines. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **832**, 93-116.
- MARKS, J.D., HOOGENBOOM, H.R., BONNERT, T.P., MCCAFFERTY, J., GRIFFITHS, A.D., WINTER, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.*, **222**, 581-597.
- MASECAR, B.L., DADD, C.A., BAUMBACH, G.A., HAMMOND, D.J. (1996). Nonradioactive sequencing of random peptide recombinant phage. Phage display of peptides and proteins. *A laboratory manual, Academic Press.*, **17**, 293-303.
- MATSUMOTO, M., NISHINAKAGAWA, H., KUROHMARU, M., HAYASHI, Y., OTSUKA, J. (1992). Pregnancy and lactation affect the microvasculature of the mammary gland in mice. *J. Vet. Med. Sci.*, **54**, 937-943.

- MATTHEWS, W., JORDAN, C.T., GAVIN, M., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G., LEMISCHKA, I.R. (1991). A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and close genetic linkage to c-kit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **88**, 9026-9030.
- MEYER, M., CLAUSS, M., LEPPLE-WIENHUES, A., WALTENBERGER, J., AUGUSTIN, H.G., ZICHE, M., LANZ, C., BÜTTNER, M., RZIHA, H.-J., DEHIO, C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.*, **18**, 363-374.
- MILLAUER, B., WIZIGMANN-VOOS, S., SCHNURCH, H., MARTINEZ, R., MOLLER, N.P., RISAU, W., ULLRICH, A. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, **72**, 835-846.
- MILLER, R.A., OSEROFF, A.R., STRATTE, P.T., LEVY, R. (1983). Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma. *Blood*, **62**, 988-995.
- MOLL, K.J., MOLL, M. (1995). Allgemeine Anatomie und Histologie. 14. Auflage; Jungjohann Verlagsgesellschaft; Neckarsulm-Lübeck-Ulm.
- MONTESANO, R. (1986). Cell-extracellular matrix interactions in morphogenesis: an in vitro approach. *Experientia*, **42**, 977-985.
- MOSCATELLI, D., GROSS, J.L., RIFKIN, D.B. (1981). Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells. *J. Cell. Biol.*, **91**, 201a.
- MOSES, M.A., KLAGSBRUN, M., SHING Y. (1995). The role of growth factors in vascular cell development and differentiation. *Int. Rev. Cytol.*, **161**, 1-48.
- MOSIMANN, W., KOHLER, T. (1990). Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. *Verlag Paul Parey*, 1. Auflage.
- MÜHLHARDT, C. (2003). Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. *Spektrum Akademischer Verlag*, 4. Auflage, 123-125.
- MÜLLER, G., BEHRENS, J., NUSSBAUMER, U., BÖHLEN, P., BIRCHMEIER, W. (1987). Inhibitory action of transforming growth factor β on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **84**, 5600-5604.
- MÜLLER-BERGHHAUS, G. (1998). Grundlagen der Hämostaseologie. Schettler G, Greten H. (Hrsg.), Innere Medizin. 9. Auflage; *Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York*.
- NAWROTH, P., LASCH, H.G. (1999). Vaskuläre medizin systematisch. 1. Auflage; *Bremen; UNI-MED Verlag*.
- NICOSIA, R.F., NICOSIA, S.V., SMITH, M. (1994). Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am. J. Pathol.*, **145**, 1023-1029.
- NISHIMURA, T., NAKATAKE, Y., KONISHI, M., ITOH, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1492**, 203-206.
- NODEN, D.M. (1989). Embryonic origins and assembly of blood vessels. *Am Rev Respir Dis.*, **140**, 1097-103.
- NOLL, S., SCHAUB-KUHNEN, S. (2000). Praxis der Immunhistochemie. *Urban & Fischer; München, Jena*, 13-18.

- OGAWA, S., OKU, A., SAWANO, A., YAMAGUCHI, S., YAZAKI, Y., SHIBUYA, M. (1998). A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31273-31282.
- OLOFSSON, B., PAJUSOLA, K., KAIPAINEN, A., VON EULER, G., JOUKOV, V., SAKSELA, O., ORPANA, A., PETTERSSON, R.F., ALITALO, K., ERIKSSON, U. (1996). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **93**, 2576-2581.
- OLOFSSON, B., KORPELAINEN, E., PEPPER, M.S., MANDRIOTA, S.J., AASE, K., KUMAR, V., GUNJI, Y., JELTSCH, M.M., SHIBUYA, M., ALITALO, K., ERIKSSON, U. (1998). Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **95**, 11709-11714.
- ORLIDGE, A., D'AMORE, P.A. (1986). Pericyte and smooth muscle cell modulation of endothelial cell proliferation. *J. Cell Biol.*, **103**, part 2, 471a.
- ORLIDGE, A., D'AMORE, P.A. (1987). Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **105**, 1455-1462.
- PAJUSOLA, K., APRELIKOVA, O., KORHONEN, J., KAIPAINEN, A., PERTOVAARA, L., ALITALO, L., ALITALO, K. (1992). Flt-4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Research*, **52**, 5738-5743.
- PALMER, D.B., GEORGE, A.J., RITTER, M.A. (1997). Selection of antibodies to cell surface determinants on mouse thymic epithelial cells using a phage display library. *Immunology*, **91**, 473-478.
- PARK, J.E., CHEN, H.H., WINER, J., HOUCK, K.A., FERRARA, N. (1994). Placenta growth factor. *J. Biol. Chem.*, **269**, 25646-25654.
- PARMLEY, S.F., SMITH, G.P. (1989). Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **251**, 215-218.
- PASQUALINI, R., RUOSLAHTI, E. (1996). Tissue targeting with phage peptide libraries. *Mol. Psychiatry*, **1**, 423.
- PEITSCH, M.C. (1995). Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology*, **13**, 658-660.
- PEPPER, J., VASSALLI, J.D., ORCI, L., MONTESANO, R. (1993). Biphasic effect of transforming growth factor- β 1 on *in vitro* angiogenesis. *Exp. Cell. Res.*, **204**, 356-363.
- PINTAVOM, P., BALLERMANN, B.J. (1997). TGF-beta and the endothelium during immune injury. *Kidney Int.*, **51**, 1401-1412.
- PIPP, F., HEIL, M., ISSBRUCKER, K., ZIEGELHOEFFER, T., MARTIN, S., VAN DEN HEUVEL, J., WEICH, H., FERNANDEZ, B., GOLOMB, G., CARMELIET, P., SCHAPER, W., CLAUSS, M. (2003). VEGFR-1-selective VEGF homologue PIGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ. Res.*, **92**, 378-385.
- PLENDL, J., SINOWATZ, F., AUERBACH, R. (1992). Die Heterogenität des vaskulären Endothels. *Anat. Histol. Embryol.*, **21**, 256-262.
- PLENDL, J. (1997). Das Gefäßendothel: organ- und entwicklungsphasenspezifische Heterogenität im *in vitro* Modell. Habilitationsschrift. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

- PLOUET, J., SCHILLING J., GOSPODAROWICZ, D. (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.*, **8(12)**, 3801-3806.
- PLOUET, J., MOUKADIRI, H. (1990). Characterization of the receptor to vasculotropin on bovine adrenal cortex-derived capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **265**, 22071-22074.
- RAAG, R., WHITLOW, M. (1995). Single-chain Fvs. *FASEB J.*, **9**, 73-80.
- RADER, C., CHERESH, D.A., BARBAS, C.F.III (1998). A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **95**, 8910-8915.
- RAJOTTE, D., ARAP, W., HAGEDORN, M., KOIVUNEN, E., PASQUALINI, R., RUOSLAHTI, E. (1998). Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J. Clin. Invest.*, **102**, 430-437.
- RAVINDRANATH, N., LITTLE-IHRIG, L., PHILLIPS, H.S., FERRARA, N., ZELEZNIK, A.J. (1992). Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology*, **131**, 254-260.
- REHM, H. (2000). Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. *Spektrum Akademischer Verlag*, 3. Auflage, 5.
- RIBATTI, D., VACCA, A., NICO, B., RONCALI, L., DAMMACCO, F. (2001). Postnatal vasculogenesis. *Mech. Dev.*, **100**, 157-163.
- RIECHMANN, L., CLARK, M., WALDMANN, H., WINTER, G. (1988). Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, **332**, 323-327.
- RISAU, W. (1996). What, if anything, is an angiogenic factor? *Cancer Metastasis. Rev.*, **15**, 149-151.
- RISAU, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-674.
- ROSS, R. (1992). The pathogenesis of atherosclerosis. *The heart disease, a textbook of cardiovascular medicine*.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., EHRLICH, H.A., ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSEN, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **74**, 5463-5467.
- SATO, T.N., TOZAWA, Y., DEUTSCH, U., WOLBURG-BUCHHOLZ, K., FUJIWARA, Y., GENDRON-MAGUIRE, M., GRIDLEY, T., WOLBURG, H., RISAU, W., QIN, Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*, **376**, 70-74.
- SCHAPER, W., BUSCHMANN, I. (1999). Arteriogenesis, the good and bad of it. *Cardiovasc. Res.*, **43**, 835-837.
- SCHAPER, W., SCHOLZ, D. (2003). Factors regulating Arteriogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 1143-1151.
- SCHAPER, W., SCHAPER, J. (2004). Arteriogenesis. *Kluwer Academic Publishers*, Boston, Dordrecht, London.

- SCHIWECK, W., SKERRA, A. (1995). Fermenter production of an artificial Fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling. *Proteins*, **23**, 561-565.
- SCHOLZ, D., CAI, W.-J., SCHAPER, W. (2001). Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis*, **4**, 247-257.
- SCHWEDE, T., KOPP, J., GUEX, N., PEITSCH, M.C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3381-3385.
- SENGER, D.R., GALLI, S.J., DVORAK, A.M., PERRUZZI, C.A., HARVEY, V.S., DVORAK, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, **219**, 983-985.
- SENGER, D.R., PERRUZZI, C.A., FEDER, J., DVORAK, H.F. (1986). A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Research*, **46**, 5629-5632.
- SENGER, D.R., LEDBETTER, S.R., CLAFFEY, K.P., PAPADOPOULOS SERGIU, A., PERRUZZI, C.A., DETMAR, M. (1996). Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the $\alpha_v\beta_3$ integrin, osteopontin and thrombin. *Am. J. Pathol.*, **149**, 293-305.
- SHI, Q., RAFFI, S., WU, M.H., WIJELATH, E.S., YU, C., ISHIDA, A., FUJITA, Y., KOTHARI, S., MOHLE, R., SAUVAGE, L.R., MOORE, M.A.S., STORB, R.F., HAMMOND, W.P. (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, **92**, 362-367.
- SHIBUYA, M., YAMAGUCHI, S., YAMANE, A., IKEDA, T., TOJO, A., MATSUSHIME, H., SATO, M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, **5**, 519-524.
- SIMON, M., ROCKL, W., HORNIG, C., GRONE, E.F., THEIS, H., WEICH, H.A., FUCHS, E., YAYON, A., GRONE, H.J. (1998). Receptors of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in fetal and adult human kidney: localization and [125I] VEGF binding sites. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **9**, 1032-1044.
- SKERRA, A. (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene*, **151**, 131-135.
- SKOBE, M., HAWIGHORST, T., JACKSON, D.G., PREVO, R., JANES, L., VELASCO, P., RICCARDI, L., ALITALO, K., CLAFFEY, K., DETMAR, M. (2001). Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nature Medicine*, **7**, 192-198.
- SMITH, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **228**, 1315-1317.
- SMITH, J., KONTERMANN, R.E., EMBLETON, J., KUMAR, S. (2005). Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis. *FASEB J.*, **19**, 331-341.
- SOMERVILLE, J.E.J., GOSHORN, S.C., FELL, H.P., DARVEAU, R.P. (1994). Bacterial aspects associated with the expression of a single-chain antibody fragment in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 595-603.
- SPRINGER, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, **76**, 301-314.

- STACKER, S.A., CAESAR, C., BALDWIN, M.E., THORNTON, G.E., WILLIAMS, R.A., PREVO, R., JACKSON, D.G., NISHIKAWA, S.-J., KUBO, H., ACHEN, M.G. (2001). VEGF-D promotes metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nature Medicine*, **7**, 186-191.
- TAKESHITA, S., ZHENG, L.P., BROGI, E., KEARNEY, M., PU, L-Q., BUNTING, S., FERRARA, N., SYMES, J.F., ISNER, J.M. (1994). Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J. Clin. Invest.*, **93**, 662-670.
- TAKESHITA, S., PU, L-Q., STEIN, L.A., SNIDERMAN, A.D., BUNTING, S., FERRARA, N., ISNER, J.M., SYMES, J.F. (1994). Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation*, **90**, 228-234.
- TERMAN, B.I., CARRION, M.E., KOVACS, E., RASMUSSEN, B.A., EDDY, R.L., SHOWS, T.B. (1991). Identification of new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, **6**, 1677-1683.
- TERMAN, B.I., DOUGHER-VERMAZEN, M., CARRION, M.E., DIMITROV, D., ARMELLINO, D.C., GOSPODAROWICZ, D., BÖHLEN, P. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **187**, 1579-1586.
- TOBOREK, M., KAISER, S. (1999). Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic. Res. Cardiol.*, **94**, 295-314.
- TONEGAWA, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**, 575-851.
- TREPEL, M., ARAP, W., PASQUALINI, R. (2002). In vivo phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 399-404.
- TUR, M.K., HUHN, M., SASSE, S., ENGERT, A., BARTH, S. (2001). Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages. *Biotechniques*, **30**, 404-413.
- UTSUMI, S., KARUSH, F. (1964). Subunits of purified rabbit antibody. *Biochemistry*, **3**, 1329-1338.
- VAISMAN, N., GOSPODAROWICZ, D., NEUFELD, G. (1990). Characterization of the receptors for endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19461-19466.
- VALADON, P., SCHARFF, M.D. (1996). Enhancement of ELISAs for screening peptides in epitope phage display libraries. *J. Immunol. Methods.*, **197**, 171-179.
- VIEIRA, J., MESSING, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology.*, **153**, 3-11.
- WALTENBERGER, J., CLAESSON-WELSH, L., SIEGBAHN, A., SHIBUYA, M., HELDIN, C.H. (1994). Different signal transduction properties of *KDR* and *Flt-1*, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26988-26995.
- WARD, E.S., GUSSOW, D., GRIFFITHS, A.D., JONES P.T., WINTER, G. (1989). Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, **341**, 544-546.
- WATTERS, J.M., TELLEMAN, P., JUNGHANS, R.P. (1997). An optimized method for cell-based phage display panning. *Immunotechnology*, **3**, 21-29.
- WINTER, G., MILSTEIN, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature*, **349**, 293-299.

-
- WINTER, G., GRIFFITHS, A.D., HAWKINS, R.E., HOOGENBOOM, H.R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annual Reviews in Immunology*, **12**, 433-455.
- ZHAO, L., EGHBALI-WEBB, M. (2001). Release of pro- and anti-angiogenic factors by human cardiac fibroblasts: effects on DNA synthesis and protection under hypoxia in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1538**, 273-282.
- ZHU, Z., LEWIS, G.D., CARTER, P. (1995). Engineering high affinity humanized anti p185HER2/anti CD3 bispecific F(ab')₂ for efficient lysis of p185HER2 overexpressing tumor cells. *Int. J. Cancer*, **62**, 319-324.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
°C	Grad Celsius
A	Adenin
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Abs.	Absolut
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BLAST	basic local alignment search tool
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	Circa
cDNA	Komplementäre DNA
CDR	complementarity determining region
cfu	colony forming units
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CSA	collateral specific antigen
CTA	collateral targeting antibody
ddH ₂ O	destilliertes und deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosintriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol

<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N',-Tetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether) N,N,N',N',-Tetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
F(ab') ₂	zwei, über eine Disulfidbrücke verbundene, Fab
Fab	fragment antigen binding
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H-Kette	schwere Kette
HCL	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfat
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
L-Kette	leichte Kette
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
m	Meter
m ²	Quadratmeter
mAk	monoklonaler Antikörper
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter

mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
N	Normal
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
ORF	offener Leserahmen
ori	Replikationsursprung
p	pico (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-Buffered Saline (phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Polyethylen
pfu	plaque forming units
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
Q	Glutamin
R	Arginin (in Verbindung mit Aminosäuren)
RHE	Ratten-Herz-Endothelzellen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	revers transkribierte Polymerasekettenreaktion
scFv	„single chain fragment of the variable region“ (Einzelkettenantikörper)
sec	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
T	Thymin

Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside
Xc	Xylen-Cyanol
z.B.	zum Beispiel
z.Zt.	zur Zeit

7.2 Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Experimentelle Kardiologie/Angiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf angefertigt.

Herrn Prof. Dr. T. Meinertz danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Anleitungsrechtes sowie die Begutachtung meiner Dissertationsschrift.

Herrn Prof. Dr. K. Wiese danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens der Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wulf Ito für die Betreuung dieser Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft, die Ermöglichung der Teilnahme an mehreren Kongressen sowie stete Unterstützung auch während schwieriger Etappen meines „Marathons“.

Herrn Dr. S. Ergün und Frau K. Miete danke ich für die Herstellung von sämtlichen in dieser Arbeit verwendeten Paraffinpräparaten.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Ito, AG Münzel, AG Baldus, AG Patten sowie AG Kähler danke ich für die kollegiale Unterstützung und nette Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich bei Andrea, Petra, Matthias, Natalie, Juliane, Sandra, Sabine und Eugen für die experimentelle Unterstützung, praktischen Ratschläge und die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bei Agnieszka, Bettina und Petra möchte ich mich für die Durchsicht des Manuskriptes sowie ihren moralischen Zuspruch herzlich bedanken.

Meinen lieben Eltern und meiner Oma danke ich vor allem für ihre mentale Unterstützung und die mir entgegengebrachte Geduld.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann, der sein Vertrauen in mich gesetzt hat und meine Ängste, dass ich es nicht schaffen könnte, immer gut ignoriert hat. Mein Erfolg gehört Dir.