**Untersuchung bispezifischer
Intradiabodies gegen die Integrine $\alpha_v\beta_3$,
 $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$ auf ihre anti-angiogenen
Eigenschaften**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Sandra Seelke
aus Berlin

Göttingen 2012

D7

Referent: Prof. Dr. S. Hoyer-Fender

Korreferent: PD Dr. W. Kramer

Tag der mündlichen Prüfung:

1 EINLEITUNG	1
1.1 Angiogenese	1
1.2 Tumorangienese	2
1.3 Integrine	3
1.3.1 Die Integrine $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ und $\alpha 5\beta 1$	5
1.4 Intrabodies/Intradiabodies	6
1.6 Phagen Display	8
1.6.1 Antikörper Phagen Display	9
1.7 Zielsetzung	11
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Materialien	12
2.1.1 Verwendete Geräte	12
2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	13
2.1.3 Bakterienstämme/Helferphagen	16
2.1.4 Plasmide/Phagemide	17
2.1.5 Ausgangsmaterialien für das Antikörper-Phagen-Display	18
2.1.6 Rekombinante Adenoviren	18
2.1.7 Oligonukleotide	19
2.1.8 Antikörper, Enzyme und Proteine	22
2.1.9 Reaktionssysteme (Kit's)	23
2.1.10 sonstige Materialien	24
2.1.11 Medien	24
2.1.12 Lösungen und Puffer	25
2.1.13 Verwendete Zelllinien	29
2.1.14 Hühnereier	29
2.1.15 Software	29
2.2 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1 Reverse Transkription	30
2.2.2 Polymerasekettenreaktion	30
2.2.3 <i>realtime</i> PCR	33
2.2.4 Gezielte Mutagenese-PCR (<i>site-directed mutagenesis pcr</i>)	34
2.2.5 Agarosegelelektrophorese	35
2.2.6 Gelextraktion mittels <i>freeze-squeeze</i>	36
2.2.7 Gelextraktion mittels Elutrap	36
2.2.8 Ethanolpräzipitation	36
2.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.2.10 Sequenzanalyse	37
2.2.11 Minipräparation von Plasmid-DNA	38
2.2.12 Maxipräparation von Plasmid-DNA	38
2.2.13 Restriktionsverdau von DNA	38
2.2.14 Ligation	39
2.2.15 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	39
2.2.16 Elektroporation	40
2.3 Proteinbiochemische Methoden	40
2.3.1 Gesamtzellextrakt	40
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Lowry)	40
2.3.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.3.4 Western Blot	42
2.4 Zellbiologische Methoden	43

2.4.1 Auftauen von Zellen	43
2.4.2 Zählen von Zellen	43
2.4.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen	43
2.4.4 Einfrieren von Zellen	44
2.4.5 Präparation rekombinanter Adenoviren	44
2.4.6 Infektion von Zellen mit Hilfe rekombinanter Adenoviren	45
2.4.7 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	45
2.4.8 Zelladhäsionsassay	47
2.4.9 Zellproliferationsassay	47
2.4.10 Tube Formation Assay	48
2.4.11 Chorioallantoismembran-Assay	48
2.5 Immunhistochemische Methoden	49
2.5.1 Immunfluoreszenz von Zellen	49
2.5.2 Immunfluoreszenz von CAM-Tumoren	50
2.6 Methoden des Phagen Display	51
2.6.1 Helferphagenpräparation	51
2.6.2 Titerbestimmung einer Phagenlösung	51
2.6.3 Biopanning	52
2.6.4 ELISA mit präsentierten Fab-Fragmenten	54
3 ERGEBNISSE	57
3.1 Die Infektion mit dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha v \beta 3$) und dem Intradiabody #4 (anti- $\alpha v \beta 3 / \alpha 5 \beta 1$) führt zu einer reduzierten Oberflächenpräsentation von Integrinen	57
3.2 Die Expression der Intra(dia)bodies führt zur Lokalisation der Integrine im Endoplasmatischen Retikulum	61
3.3 Die Infektion mit dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha v \beta 3$) und dem Intradiabody #4 (anti- $\alpha v \beta 3 / \alpha 5 \beta 1$) hat keinen Einfluss auf die mRNA-Menge der Integrine	63
3.4 Die herabgesetzte Oberflächenpräsentation von Integrinen hemmt die Proliferation der Endothelzellen	65
3.5 Die Reduktion der Integrinpräsentation vermindert die Adhäsionskapazität von Endothel- und Melanomzellen	66
3.6 Das Potential zur Gefäßbildung der Endothelzellen wird durch eine herabgesetzte Integrinpräsentation aufgehoben	68
3.7 Das Tumorstadium ist durch die veränderte Integrinpräsentation nicht beeinflusst	70
3.8 Die beeinträchtigte Tumorangiogenese bei mit JC7U (anti- $\alpha v \beta 3$) infizierten Melanomzellen führt zu einer eingeschränkten Durchblutung der Tumoren	72
3.9 Die herabgesetzte Integrinpräsentation führt bei Endothelzellen zur veränderten Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden	73
3.10 Etablierung und Anwendung des Phagen Display	75
3.10.1 Immunisierung der Kaninchen gegen die Integrine $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ bzw. $\alpha 5 \beta 1$	75
3.10.2 Etablierung des Phagen Display und Generierung einer Positivkontrolle gegen VEGF-R2	77
3.10.3 Generierung einer $\alpha v \beta 5$ -Bibliothek	80
3.10.4 Selektion von zehn bindenden Fab-Fragmenten gegen $\alpha v \beta 5$	83
4 DISKUSSION	88

4.1 Eine durch Intra(dia)bodies herabgesetzte Integrinpräsentation von $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ vermindert die Oberflächenpräsentation von $\alpha v\beta 5$ und $\beta 1$	89
4.2 Reduktion der Integrinpräsentation vermindert die Adhäsionskapazität von Endothel- und Melanomzellen	91
4.3 Die verminderte Oberflächenpräsentation von Integrinen hemmt die Proliferation der Endothelzellen	92
4.4 Die Gefäßbildung von Endothelzellen ist durch eine verminderte Integrinpräsentation aufgehoben	94
4.5 Der Knockout von $\alpha v\beta 3$ bei Melanomzellen führt zu einer beeinträchtigten Durchblutung der Tumoren	95
4.6 Generierung bindender $\alpha v\beta 5$ -Fab-Fragmente	98
5 ZUSAMMENFASSUNG	101
6 LITERATURVERZEICHNIS	103

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa (ungefähr)
CAM	Chorioallantoismembran
C _H	konstante Domänen der schweren Kette eines IgG
C _T	Zyklus der <i>realtime</i> -PCR, bei dem der Schwellenwert erreicht ist (<i>Threshold Cycle</i>)
C _K	konstante Domäne der leichten Kette eines IgG
DEPC	Diethylpyrocarbonat

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere (lat.: et alii)
EtBr	Ethidiumbromid
EZM	extrazelluläre Matrix
Fab	<i>fragment antigen binding</i> (Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FN	Fibronektin
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hemagglutinin Dekapeptid Sequenz
HCl	Salzsäure
His ₆ -tag	Hexahistidin Sequenz
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>

IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
K	Kalium
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton (Molekulargewicht von Proteinen)
KDEL	Aminosäuresequenz (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Leucin)
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	Luria Bertani
M	Molar
max.	maximal
mA	Milliampère
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(4-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
n	Länge der Oligonukleotide

Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaAc	Natriumacetat
NaDoc	Natriumdeoxycholat
nm	Nanometer
OD (OD ₆₀₀)	optische Dichte (optische Dichte bei 600 nm)
ompA	Signalpeptid in <i>E. coli</i>
p3	Hüllprotein 3
p8	Hüllprotein 8
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris buffered Saline</i>)
PBST	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris buffered Saline</i>) mit Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDECGF	<i>platelet-derived endothelial-cell growth factor</i>
pelB	Signalpeptid in <i>E. coli</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
pmol	pikomol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RGD	Aminosäuresequenz (Arginin, Glycin und Asparaginsäure)
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SB	Super Broth
scFv	<i>single chain variable fragment</i> (die variablen Regionen der leichten und schweren Kette eines Antikörpers)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Broth mit Glukose
ss	einzelsträngig
T _A	<i>annealing</i> -Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris buffered Saline</i>)
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris buffered Saline</i>) mit Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tie-1/Tie-2	<i>tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domain Protein 1/Protein 2</i>
T _m	Schmelztemperatur
TNF α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	<i>Unit(s)</i> (definierte Enzymeinheit)
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCSM13	Helferphage
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-R2	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
V _H	variable Region der schweren Kette
V _L	variable Region der leichten Kette
VN	Vitronektin
Vol.	Volumen
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
z. B.	zum Beispiel
Ω	Ohm
κ	kappa

1 Einleitung

1.1 Angiogenese

Es gibt zwei Mechanismen, die zur Bildung von Blutgefäßen führen, die Vaskulogenese und die Angiogenese. Bei der Vaskulogenese handelt es sich um die Bildung von neuen Blutgefäßen aus embryonalen Vorläuferzellen des Gefäßendothels, den Angioblasten, wohingegen bei der Angiogenese neue Blutgefäße aus bereits existierenden Blutgefäßen gebildet werden. Dieser Prozess ist bei physiologischen Vorgängen wie der Embryonalentwicklung, Wundheilung und Reproduktion essentiell und wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Endothelzellen, periendothelialen Zellen, Matrixmolekülen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren reguliert (Joussen *et al.*, 2003). Damit die Bildung eines neuen Gefäßes eingeleitet werden kann, bedarf es spezifischer angiogener Faktoren und ihrer Gegenspieler, die für eine kontrollierte Bildung neuer Blutgefäße sorgen. Einige angiogene Moleküle sind verschiedene Wachstumsfaktoren wie z. B. der *basic fibroblast growth factor* (bFGF), der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), der *platelet-derived endothelial-cell growth factor* (PDECGF) oder der *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), Angiopoietin 1 und 2, Angiogenin oder die CXC-Chemokine, welche die Angiogenese begünstigen. Zu den Inhibitoren der Angiogenese gehören das Angiostatin, Endostatin oder Thrombospondin, welches zu einer Familie glykosylierter, extrazellulärer Matrixmoleküle gehört (Distler *et al.*, 2003). Ein Auslöser der Angiogenese, sowohl in normalem als auch krankhaftem Gewebe, ist Hypoxie (Sauerstoffmangel). Der Verlauf der Angiogenese kann in drei Phasen unterteilt werden. Verschiedene Moleküle koordinieren dabei komplexe zelluläre Prozesse, die darin resultieren, dass die extrazelluläre Matrix (EZM) umgestaltet wird, es zur Invasion von Endothelzellen kommt und schließlich zur Migration, Proliferation und Reifung dieser Zellen (Brooks 1996). In der ersten Phase kommt es durch angiogene Moleküle zur Aktivierung von Endothelzellen, wobei die dabei zirkulierenden Moleküle von verschiedenen Zellen (z. B. Makrophagen, Mastzellen oder inflammatorischen Zellen) stammen können. Nachdem die ruhenden Endothelzellen aktiviert worden sind, kommt es in einer zweiten Phase zur Weiterleitung von Signalen innerhalb der Zellen, die vor allem über verschiedene Tyrosinkinaserzeptoren, wie z. B. die Angiopoietin-Rezeptoren Tie-1 und Tie-2 oder den *vascular endothelial growth factor receptor* 2 (VEGF-R2), vermittelt werden. Die Signalweiterleitung führt zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. Integrine), zur Sekretion proteolytischer Enzyme (z. B. Matrixmetalloproteinasen (MMP)), sowie zur Proliferation, Migration und Invasion von Endothelzellen. In der dritten Phase wandern die proliferierenden Endothelzellen entlang

eines chemotaktischen Gradienten, lagern sich als Monolayer zusammen und bilden röhrenähnliche Strukturen aus (Distler *et al.*, 2003), sodass ausdifferenzierte Blutgefäße entstehen (Brooks 1996). Ist das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Faktoren gestört, kommt es zu einer deregulierten Angiogenese und damit zu verschiedenen Krankheitsbildern wie beispielsweise der rheumatischen Arthritis, der diabetischen Retinopathie, dem Tumorwachstum und der Metastasenbildung (Brooks 1996, Folkman and Shing 1992). Die Zusammensetzung der EZM, die in unterschiedlichen Regionen variiert, spielt eine Rolle hinsichtlich des Verhaltens von Zellen und beeinflusst damit auch die Zell-Matrix Interaktion.

Damit sich beispielsweise ein klinisch erkennbarer Tumor bilden kann, muss der Wirt eine Blutversorgung zur Verfügung stellen und im Anschluss daran auch eine weitere Versorgung des Tumorgewebes gewährleisten. Die Tumoren können dabei auch weiter entfernt gelegene Blutgefäße stimulieren, was bei normalem Gewebe hingegen auf eine maximale Entfernung von 50 μm beschränkt ist (Ribatti *et al.*, 1999). Der dadurch ermöglichte Zugang einzelner Tumorzellen in das Blutgefäßsystem wird durch die neu gebildeten, hyperpermeablen Blutgefäße (Dvorak *et al.*, 1995) zusätzlich begünstigt und erlaubt die Ansiedlung von Tumorzellen in weiter entfernt gelegenen Regionen (Bildung von Metastasen).

1.2 Tumorangiogenese

Bei der Tumorangiogenese handelt es sich um einen pathologischen Vorgang, bei dem der Tumor für sein Wachstum auf eine ausreichende Blutversorgung angewiesen ist (Weis and Cheresh 2011). Ein Tumor kann nur dann stetig weiter wachsen, wenn gewährleistet ist, dass die Tumorzellen ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Dafür muss der Tumor ab einer gewissen Größe permanent das Wachstum neuer Blutgefäße stimulieren, wodurch zugleich der Zugang einzelner Tumorzellen zum Blutgefäßsystem erleichtert und damit die Bildung von Metastasen in entfernt gelegenen Organen begünstigt wird (Folkman and Shing 1992). Der Tumor gibt Zytokine und Wachstumsfaktoren in seine Umgebung ab, was dazu führt, dass ruhende, normale Endothelzellen aktiviert werden und es zu einer Kaskade von Ereignissen kommt (Abb. 1), die bei der Tumorangiogenese fehlerhaft reguliert werden (Weis and Cheresh 2011). Während der Tumorangiogenese ist zudem die Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen des Knochenmarks zu beobachten, sowie die Differenzierung von Tumor-Stammzellen, welche an der Bildung der Blutgefäße beteiligt sind, die den Tumor ernähren (Weis and Cheresh 2011). Die Verbindung zwischen extrazellulären Matrixmolekülen und den intrazellulären Signalwegen stellen die wichtigsten Zelladhäsionsmoleküle, die

Integrine, her (Desgrosellier and Cheresch 2010), denen eine bedeutende Rolle in der Regulierung der Angiogenese zugesprochen wird. Die Integrine $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ und $\alpha5\beta1$ spielen bei der Vermittlung angiogener Signale von Endothelzellen auf Wachstumsfaktoren, wie z. B. VEGF, eine entscheidende Rolle. Ihre verstärkte Präsentation auf verschiedenen Tumorzellen und auf Gefäßen, die die Tumorzellen ernähren, machen sie zu interessanten Zielmolekülen, um das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese zu unterbinden.

Abb. 1: Quelle: Weis and Cheresch 2011. Aktivierung ruhender Endothelzellen durch die vom Tumor induzierte Abgabe von u. a. Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Matrixmetalloproteinasen (MMPs) in dessen Umgebung. Es kommt zur Umgestaltung der EZM und Invasion von Endothelzellen, was in der Bildung neuer Blutgefäße resultiert. Zudem finden sich vom Knochenmark rekrutierte endotheliale Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*, (EPC)), die an der Bildung der Blutgefäße beteiligt sind.

1.3 Integrine

Integrine sind glykosylierte, heterodimere Zelladhäsionsmoleküle, die aus zwei nicht kovalent miteinander verbundenen Untereinheiten (α , β) bestehen und deren gemeinsame Funktion in einer Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktion besteht (Caswell *et al.*, 2009). Die bislang identifizierten 18 α - und 8 β -Untereinheiten bilden 24 verschiedene funktionelle Integrine (Abb. 2), welche sich in ihrer Spezifität für extrazelluläre Liganden unterscheiden (Hynes 2002). Beide Untereinheiten haben eine längere extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und einen kürzeren zytoplasmatischen Anteil (Abb. 2), wodurch die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbunden ist und Signale sowohl von innen nach außen als auch in umgekehrter Richtung übermittelt werden können. Dadurch können Integrine zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Apoptose regulieren (van der Flier and Sonnenberg 2001).

A

B

Abb. 2: Integrin-Rezeptoren im Überblick (A) und die Darstellung eines Integrinheterodimers (B). A: Es können 24 funktionelle Integrine gebildet werden, die sich in ihrer Ligandenspezifität unterscheiden oder auf bestimmten Zellen vorliegen. Die Integrine $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ und $\alpha 5 \beta 1$ gehören zu den RGD-Rezeptoren. Quelle: Hynes 2002. B: Jedes Integrinheterodimer besteht aus je einer nicht kovalent miteinander verbundenen α - und β -Kette. Beide Untereinheiten bestehen aus einer längeren extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einem kürzeren zytoplasmatischen Anteil. Durch die Bindung an die EZM über beide Untereinheiten und die Bindung an Talin und α -Aktinin im Zytoplasma erfolgt eine Signalweiterleitung in beide Richtungen. Quelle: Alberts *et al.*, 2002.

Mit Hilfe verschiedener Integrin-Knockout-Mäuse, sowie durch Verwendung von Integrin-Antagonisten, konnten die unterschiedlichen Aufgaben der Integrine verdeutlicht werden, sodass ein besserer Einblick in deren Funktion gewährleistet ist (Hodivala-Dilke *et al.*, 2003, Hynes 2002). Jedoch sind aufgrund dieser Studien Unklarheiten hinsichtlich der Funktion von Integrinen aufgetreten, vorwiegend in Bezug auf ihre Funktion während der Angiogenese. Integrine binden entweder an einzelne Liganden oder aber an viele verschiedene Liganden. Ein Ligand kann wiederum von mehreren Integrinen gebunden werden (Silva *et al.*, 2008). In Abhängigkeit davon, welche der 24 möglichen Integrine auf einer Zelle präsentiert werden, tragen sie entscheidend dazu bei, ob eine Zelle in einem bestimmten Umfeld adhären und damit auch überleben kann. In verschiedenen Prozessen wie der Proliferation von Endothelzellen während der Angiogenese, bei der Rekrutierung inflammatorischer Zellen oder dem invasiven Verhalten von Tumorzellen muss die Bindung zwischen Integrinen und ihren Liganden gut aufeinander abgestimmt sein, da andernfalls z. B. durch nicht ligierte Integrine auf Zellen in einer ungeeigneten Umgebung Apoptose initiiert werden kann (Weis and

Cheresh 2011). Einige in der Angiogenese gut charakterisierte Integrine sind $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ und $\alpha 5\beta 1$.

1.3.1 Die Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ und $\alpha 5\beta 1$

Die drei Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ und $\alpha 5\beta 1$ gehören zur Gruppe der RGD-Rezeptoren, deren Haupterkenungssequenz das Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Motiv (RGD-Motiv) verschiedener Liganden ist (Hynes 2002). Zu den von diesen Rezeptoren bindenden Liganden gehören u. a. Fibronectin, Vitronectin, von Willebrand Faktor und Thrombospondin. Während $\alpha 5\beta 1$ für Fibronectin bindungsspezifisch ist und $\alpha v\beta 5$ nur Vitronectin bindet, bindet $\alpha v\beta 3$ alle genannten Matrixmoleküle. Außerdem spielen diese genannten Integrine auch eine entscheidende Rolle bei der durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren vermittelten Angiogenese. Während $\alpha v\beta 3$ in einer durch bFGF oder TNF- α vermittelten Angiogenese involviert ist, ist $\alpha v\beta 5$ dies in einer durch VEGF oder TGF- α vermittelten Angiogenese (Friedlander *et al.*, 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass Antagonisten gegen $\alpha 5\beta 1$ eine durch bFGF und TNF- α induzierte Angiogenese blockieren, sodass $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ in dem gleichen Angiogenese-Signalweg involviert sind (Kim *et al.*, 2000a). Somit regulieren unterschiedliche Signalwege die Angiogenese und es verdeutlicht die Implikation der Integrine in der Angiogenese. Das Integrin $\alpha v\beta 3$ zeigt während der Angiogenese eine deutlich veränderte Präsentation auf verschiedenen Zelltypen. Auf ruhenden Blutgefäßen ist $\alpha v\beta 3$ nur gering präsentiert, wohingegen es bei der Angiogenese *in vivo* verstärkt auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen vorliegt (Brooks *et al.*, 1994). Ebenso wie $\alpha v\beta 3$ liegt $\alpha 5\beta 1$ auf Blutgefäßen in normalen Geweben nur in geringem Maße vor, auf Blutgefäßen von Tumoren ist dieses Integrin dagegen stark hochreguliert (Kim *et al.*, 2000a). Daneben kann die Ligation eines Integrins auch das Verhalten anderer Integrine beeinflussen (Integrin crosstalk), was beispielsweise für die Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ gezeigt wurde. Hierbei reguliert $\alpha 5\beta 1$ die Funktion von $\alpha v\beta 3$ *in vitro* und *in vivo* über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (Kim *et al.*, 2000b) und fördert das Überleben von Endothelzellen während der Angiogenese *in vivo*, indem es die Aktivität der Proteinkinase A unterdrückt (Kim *et al.*, 2002).

Die Bedeutung der Integrine in der Angiogenese wird zusätzlich durch Untersuchungen mit Antikörpern, RGD-Peptiden oder Knockout-Mäusen hervorgehoben. Antikörper und RGD-Peptide gegen $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ blockierten die Angiogenese (Eliceiri and Cheresh 1999, Kumar *et al.*, 2001), während Mäuse denen die $\beta 3$ -Untereinheit oder die Untereinheiten $\beta 3$

und $\beta 5$ fehlten, sowohl ein verstärktes Tumorstadium als auch eine verstärkte Angiogenese aufwiesen (Reynolds *et al.*, 2002). Neueste Erkenntnisse wiederum zeigten, dass nanomolare Konzentrationen von RGD-Inhibitoren von $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ das Tumorstadium und die Tumorangio-genese *in vivo* verstärken, indem die durch VEGF stimulierte Migration von Endothelzellen gefördert wird (Reynolds *et al.*, 2009). Diese diskrepanten Ergebnisse zeigen zum einen die wichtige Rolle der Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ und $\alpha 5\beta 1$ in der Tumorangio-genese und zum anderen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen bezüglich ihrer Rolle als negative oder positive Regulatoren.

Die Fähigkeit von Endothelzellen Kapillargefäße zu bilden und so die Blutversorgung von normalem und auch von kanzerogenem Gewebe zu gewährleisten, bietet einen pharmakologischen Angriffspunkt, um die Bildung neuer Blutgefäße bei pathologischen Prozessen zu unterbinden. Verschiedene Angiogenese-Inhibitoren werden derzeit klinisch eingesetzt und in der Forschung erprobt, wobei sie sich in ihren funktionellen Ansatzpunkten innerhalb der Angiogenesewege unterscheiden. So werden monoklonale Antikörper gegen Wachstumsfaktoren (z. B. Bevacizumab, ein humanisierter Antikörper gegen den Wachstumsfaktor VEGF-A) und gegen Rezeptor-Tyrosinkinasen eingesetzt (z. B. SU5416, ein Antikörper gegen VEGF-R2), sowie natürlich vorkommende Inhibitoren, die die Proliferation von Endothelzellen unterbinden (z. B. Angiostatin und Endostatin) oder auch Integrininhibitoren wie z. B. Cilengitid und Vitaxin (Eskens 2004). Über die bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten Untersuchungsmethoden hinaus, bietet der Einsatz von Intrabodies bzw. Intradiabodies eine weitere Möglichkeit, die Funktionsweise der Integrine zu untersuchen.

1.4 Intrabodies/Intradiabodies

Intrabodies sind intrazellulär exprimierte Antikörper, die die Zellphysiologie und den Zellmetabolismus auf verschiedene Weise verändern können (Marasco 1997). Sie bestehen aus einem *single chain variable fragment*(scFv)-Fragment, bei dem die variable Region der leichten Kette (V_L) über einen Peptidlinker mit der variablen Region der schweren Kette (V_H) verbunden ist (Abb. 3). Durch das Anhängen einer spezifischen Signalsequenz können Intrabodies in verschiedenen Zellkompartimenten zurückgehalten werden, wo sie je nach Kompartiment unterschiedlich stabil exprimiert werden (Marasco 1997). Sollen die Intrabodies im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten werden, so wird C-terminal eine KDEL-Sequenz angefügt. Eine Weiterentwicklung stellen bispezifische, tetravalente Antikörperfragmente dar, die als Intradiabodies bezeichnet werden (Abb. 3). Sie kombinieren

zwei scFv-Fragmente mit verschiedener Spezifität, wobei die konstanten Domänen C_H2 und C_H3 der schweren Kette eines IgG als Verbindung dienen. Das daraus resultierende bifunktionale Antikörperfragment scFv-C_H2-C_H3-scFv bildet zusammen mit einem weiteren solchen bifunktionalen Antikörperfragment über homophile Interaktion von C_H3 ein 150 kDa großes Dimer (Jendreyko *et al.*, 2003). Jedes der bifunktionalen Antikörperfragmente enthält eine C-terminale KDEL-Sequenz, sodass diese Intradiabodies ebenfalls im ER zurückgehalten werden. In Abbildung 3 sind ein Intrabody und ein Intradiabody schematisch dargestellt.

Abb. 3: Schematische Darstellung (A) eines Intrabodies (ca. 28 kDa) und (B) eines Intradiabodies (nach Vorlage von Jendreyko, *et al.* (Jendreyko *et al.*, 2003) modifiziert). scFv kennzeichnet die variablen Regionen V_H und V_L eines Antikörpers, die über einen Peptidlinker miteinander verbunden sind. Die konstanten Domänen C_H2 und C_H3 eines humanen IgG1 dienen als Verbindungsstück zwischen zwei scFv-Fragmenten, wobei eine homophile Interaktion über die C_H3 Domänen besteht und so ein 150 kDa Dimer gebildet wird. C-terminal wurde eine KDEL-Sequenz angefügt, welche die Retention im ER vermittelt.

Da Intrabodies bzw. Intradiabodies (kurz: Intra(dia)bodies) gegen bestimmte Epitope eines Zielproteins gerichtet sind, ist es möglich, ganz spezifisch eine von mehreren Funktionen eines Proteins zu blockieren, während die anderen Funktionen des Proteins erhalten bleiben. In Hinsicht auf die zu untersuchenden Integrine $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ und $\alpha 5 \beta 1$ können diese mit Hilfe der stabil im ER exprimierten Intra(dia)bodies einzeln, gleichzeitig und in verschiedenen Kombinationen gehemmt werden. Damit die Intra(dia)bodies in die gewünschten Zellen gelangen können, werden adenovirale Vektoren als Transfervehikel eingesetzt. Rekombinante Adenoviren zur Infektion verschiedener Zelllinien, welche die genetische Information für die Intra(dia)bodies kodieren, können mit Hilfe des pAdEasy-Systems hergestellt werden, welches 1998 beschrieben wurde (He *et al.*, 1998). Die betreffende Gensequenz befindet sich hierbei in einem adenoviralen Vektor, der neben einem HA-tag sowohl einen CMV-Promotor, als auch Informationen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) enthält. Mit Hilfe des GFP ist es

möglich, die Infektionseffizienz bei den Zielzellen zu überprüfen, da nur die infizierten Zellen grün fluoreszieren. Zur Vermehrung des Virus wird eine Verpackungszelllinie benötigt (293), welche die fehlenden viralen Proteine zur Verfügung stellt, da die rekombinanten Adenoviren allein replikationsdefizient sind. Durch das vorhandene GFP kann ebenfalls die Vermehrung des Virus mit Hilfe der Zelllinie 293 verfolgt werden und eine Präparation in großem Maßstab erfolgen (*high titer preparation*).

Für die Generierung neuer Intra(dia)bodies, welche die variablen Regionen der leichten und schweren Kette beinhalten und damit spezifisch an ein bestimmtes Antigen (z. B. $\alpha\beta 5$) binden, ist es notwendig, zunächst eine Vielzahl bindender Antikörper für das Antigen zu generieren, um dann aus diesen einen hoch affinen Antikörper zu isolieren. Eine Möglichkeit hoch affine Antikörper zu selektieren, bietet die Methodik des Phagen Display, welche es ermöglicht aus einer Bibliothek von über 10^9 verschiedenen Klonen ein spezifisches Protein zu selektieren.

1.6 Phagen Display

Das Phagen Display ist ein *in vitro* Selektionssystem, bei dem verschiedene Peptid- oder Proteinbibliotheken, einschließlich hoch affiner Antikörperfragmente, auf der Oberfläche filamentöser Phagen präsentiert werden (Smith 1985). Die für das Phagen Display verwendeten Bakteriophagen (kurz: Phagen) sind Viren, die verschiedene gram-negative Bakterien infizieren und zirkuläre Einzelstrang-DNA besitzen (Abb. 4). Die am besten charakterisierten filamentösen Phagen sind f1, fd oder M13, die für die Infektion von Bakterien den F-Pilus benötigen, weshalb sie als Phagen der Ff Klasse bezeichnet werden (Barbas *et al.*, 2001).

Abb. 4: Aufbau eines filamentösen Phagen mit den Hüllproteinen p3, p6, p7, p8 und p9, sowie der einzelsträngigen Phagen-DNA, Quelle: Bratkovic 2009. Im Gegensatz zu p8, welches mit ca. 2700 Kopien den Proteinzyylinder bildet, liegt das Hüllprotein p3 an einem Ende des Phagen in fünf Kopien vor.

Für die Oberflächenpräsentation wird auf genetischer Ebene das zu präsentierende Protein mit einem Hüllprotein eines Phagen fusioniert, sodass es einerseits auf der Oberfläche des Phagen präsentiert werden kann und der Phage gleichzeitig die genetische Information für das Protein trägt. Diese Fusion wird in der Regel entweder mit dem Hüllprotein p8 oder dem Hüllprotein p3 durchgeführt. Die Fusion erfolgt dabei nicht direkt ins Phagen genom, sondern in einen Phagemid-Vektor, der eine Kombination aus Plasmid und Phagen-Vektor darstellt. Da Phagemid-Vektoren jedoch keine viralen Struktur- und Replikationsproteine kodieren, kann die Phagemid-DNA nur nach Superinfektion mit Helferphagen in einen Phagenpartikel verpackt werden, da dieser die fehlenden viralen Proteine bereitstellt (Bratkovic 2009).

1.6.1 Antikörper Phagen Display

Bei dem Antikörper Phagen Display wird die bindende Domäne eines Antikörpers (scFv- oder Fab-Fragment) mit einem Hüllprotein fusioniert und anschließend auf dessen Oberfläche präsentiert (Abb. 5). Hierfür werden zunächst Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen, anschließend die B-Zellen isoliert und durch PCR-Reaktionen wird eine Antikörper-Bibliothek (z. B. eine Fab-Bibliothek) generiert. Aus dieser generierten Fab-Bibliothek erfolgt die Selektion spezifisch bindender Fab-Fragmente im sogenannten Biopanning (Abb. 5). Hierbei werden die *E. coli*-Zellen mit Helferphagen infiziert, woraufhin die auf der Oberfläche von Phagen präsentierten Fab-Fragmente an das entsprechende immobilisierte Antigen binden sollen. Durch mehrere Waschschriffe innerhalb des Biopannings werden nur bindende Phagen isoliert, diese in *E. coli* amplifiziert und weiteren Runden eines Biopannings unterzogen. Pro Runde eines Biopannings wird die zur Verfügung gestellte Antigenkonzentration vermindert und gleichzeitig die Anzahl der Waschschriffe erhöht, um hoch spezifische Fab-Fragmente zu selektieren. Die Immunisierung von Kaninchen birgt dabei die Möglichkeit, mit Hilfe des Phagen Display monoklonale Antikörper zu selektieren, die mit humanen und murinen Antigenen kreuz reagieren und damit von Interesse für den Einsatz in präklinischen Mausmodellen sind (Popkov *et al.*, 2003).

Abb. 5: A: Schematische Darstellung des verkürzten Hüllproteins p3, welches aus der C-terminalen Domäne des ursprünglichen p3 Hüllproteins besteht und dem damit verbundenen Fab-Fragment, Quelle: Bratkovic 2009. B: Überblick des Verlaufs zur Selektion spezifischer und hoch affiner Antikörperfragmente. Nach Immunisierung wird ausgehend von der hergestellten cDNA der B-Zellen eine Fab-Bibliothek generiert, die in einen Phagemid-Vektor kloniert wird. Die Diversität der Fab-Bibliothek liegt sowohl in den variablen Regionen, als auch in deren zufälligen Kombinationen während der PCR-Reaktionen. In einem folgenden Biopanning werden bindende Fab-Fragmente isoliert und in *E. coli* amplifiziert, sodass zum Schluss nur hoch affine Fab-Fragmente vorliegen, Quelle: Schirrmann *et al.*, 2007.

1.7 Zielsetzung

Die Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ und $\alpha 5\beta 1$ spielen eine wichtige Rolle in der Angiogenese. Die genaueren Wirkmechanismen dieser Integrine in angiogenen Regulationsmechanismen sind hingegen noch unklar und einige der hierzu publizierten Untersuchungen scheinen sogar im Widerspruch zueinander zu stehen. Ziel dieser Arbeit ist es, tiefere Einblicke in die Funktionsweise der Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ und $\alpha 5\beta 1$ zu gewinnen und deren Rolle in angiogenen Prozessen klarer zu charakterisieren. Hierzu sollen im Rahmen funktioneller Untersuchungen Knockdown Experimente durchgeführt werden, in denen die zelluläre Oberflächenpräsentation dieser Integrine mit Hilfe intrazellulärer Antikörper (Intrabodies bzw. Intradiabodies) herunter reguliert wird.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, die Methodik des Antikörper Phagen Display zu etablieren und sie als Grundlage für die Generierung neuer Intra(dia)bodies zu verwenden. Dafür soll nach erfolgreicher Etablierung des Antikörper Phagen Display eine Fab-Bibliothek gegen das Integrin $\alpha v\beta 5$ generiert werden, aus der mit Hilfe des Phagen Display ein spezifisch bindendes Fab-Fragment gegen dieses Integrin selektiert werden soll.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Elektroporator Gene Pulser Xcell	Biorad, München
ELUTRAP Electro-Separation System	Whatman, Dassel
FACScan, FACSAria II, FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop, Axio Imager	Zeiss, Jena
Fluoreszenz-Stereomikroskop, MZ FLIII	Leica, Wetzlar
Geldokumentations-System	Biometra, Göttingen
Gelkammer, vertikale Minigelanlage	Biometra, Göttingen
Glomax® 96-well-Platten Luminometer	Promega, Mannheim
Inkubator BBD 6220	Thermo Scientific, Dreieich
Luminescent Image Analyzer LAS-4000	Fujifilm, Düsseldorf
Mikroskop, invers DM IRB	Leica, Wetzlar
Multilabel Counter Wallac 1420	Perkin Elmer, San Jose, USA
MyiQ Single Color RealTime PCR Detection System	Biorad, München
NanoDrop-Spektrophotometer	Thermo Scientific, Dreieich
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetus (Pipetting aid)	Gilson, Limburg, Schweden
Semi-Dry-Blot-Apparatur, Fastblot B44	Biometra, Göttingen
Sequenziergerät, 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Spannungsgerät EPS 3500	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Sterilbank Sterilgard III Advance	The Baker Company, Sanford, USA
Sunrise, <i>Microplate Reader</i>	Tecan, Crailsheim

Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Rundschüttler, Certomat H	Schütt, Göttingen
Tischzentrifuge 5415R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Sorvall Ultra Pro 80	Thermo Scientific, Dreieich
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

2.1.2.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
14 ml sterile PP Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
15 ml / 50 ml Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
24-well Flachbodenkulturplatten	Nunc, Wiesbaden
6-well Flachbodenkulturplatten	Nunc, Wiesbaden
96-well Flachbodenkulturplatten	Nunc, Wiesbaden
96-well-Platten (weiß)	Thermo Scientific, Dreieich
Blotting-Papier	Heinemann Labortechnik, Duderstadt
Centrifugal Filter Units, Ultrafree-MC	Millipore, Schwalbach
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmalhandschuhe	Hartmann, Heidenheim
Elektroporationsküvetten (0,2 cm)	Biorad, München
Elutrap BT1/BT2 Membranen	Whatman, Dassel
Elutrap Device	Whatman, Dassel
Filter (Bottle Top Filter, 0,45 µm)	BD Falcon, Heidelberg
Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Immobilon-P Membran (PVDF, 0,45 µm)	Millipore, Schwalbach
Kanülen, 21 G	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen

Kryostat, CM 3050S	Leica, Wetzlar
Leukosilk	Diapore TM HealthCare, Neuss
Minisart-plus Filter, 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger, Superfrost Ultra Plus	Thermo Scientific, Dreieich
PCR Gefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Rundbodenröhrchen (für FACS-Analyse)	Becton Dickinson, Heidelberg
Slide-A-Lyzer® 10K Dialysekassetten	Thermo Scientific, Dreieich
Spritzen Omnifix 12 ml, 30 ml	B. Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zellstoff-Unterlage MoliNea plus L	Hartmann, Heidenheim
Zentrifugenflaschen, weithalsig, Nalgene®	Omnilab, Göttingen

2.1.2.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
ABTS	Roche, Mannheim
Acrylamid-Mix Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
APC Streptavidin	BD Pharmingen™
Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun, Melsungen
Bacto™ Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Matrigel™ <i>Basement Membrane Matrix</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Serva, Heidelberg
Carbenicillin Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, München
Cäsiumchlorid	Paesel + Lorei, Frankfurt

Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
dNTP Set, 100 mM Lösungen	GE Healthcare, Freiburg
ECL-Lösung	Millipore, Schwalbach
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethanol 99 %, vergällt	Chemie-Vertrieb, Hannover
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
GelRed	Biotrend, Köln
Glykogen	Roche, Mannheim
Glyzerin	Fisher Scientific, Schwerte
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Matrigel	Becton Dickinson, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Biorad, München
3-(4-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat Dihydrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
p-nitrophenyl N-acetyl-beta-D-glucosaminid	Sigma-Aldrich, München
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Sigma-Aldrich, München
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, München
Ponceau-S	Sigma, Deisenhofen

Random Primer	Invitrogen, Karlsruhe
RNaseOUT™	Invitrogen, Karlsruhe
Roti-Load	Roth, Karlsruhe
Saccharose	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, München
Tissue Tek	Sakura Finetek, Staufen
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton-X	Sigma-Aldrich, München
Trypanblau Lösung (0,4 %)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin 250	Becton Dickinson, Heidelberg
Tryptone Bacton	Becton Dickinson, Heidelberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
UltraPure Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.1.3 Bakterienstämme/Helferphagen

<i>E. coli</i> K12 ER2738	NEB, Frankfurt am Main
<u>Genotyp:</u> F' <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^h Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>λ</i> _{fix::Tn10} (Tet ^R)/ <i>fhuA2 glnV</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>thi-1</i> Δ(<i>hsdS-mcrB</i>)5	
<i>E. coli</i> XL1-Blue elektrokompente Zellen	Stratagene, Waldbronn
<u>Genotyp:</u> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^q ΔM15 Tn10 (Tet ^R)]	
Chemisch kompetente Zellen BioBlue	Bioline, Luckenwalde
<u>Genotyp:</u> <i>recA1, em>endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_k, m_{k+}) supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^q ΔM15 Tn10(Tet ^R)]	
VCSM13 <i>Interference-Resistant Helper Phage</i>	Stratagene, Waldbronn

2.1.4 Plasmide/Phagemide

Ein Phagemid-Vektor ist ein Plasmid, das sowohl einen Replikationsursprung von *E. coli* als auch den eines filamentösen Phagen trägt. Weiterhin enthält ein Phagemid-Vektor ein Antibiotika-Resistenzgen, kodiert keine viralen Struktur- oder Replikationsproteine und das Phagemid-Genom kann in die Hülle eines Phagen eingebaut werden. Der in dieser Arbeit verwendete Phagemid-Vektor ist pComb3XSS (Abb. 6) (Scripps Research Institute, Labor Carlos Barbas, USA), welcher eine Ampicillin-Resistenz vermittelt und nach Verdau mit dem Restriktionsenzym SfiI als pComb3X bezeichnet wird (Abb. 7). Der pComb3X Phagemid-Vektor trägt jeweils die genetische Information für die generierten Fab-Fragmente und steht unter Kontrolle des *lacZ* Promotors, womit die Proteinsynthese der Fab-Fragmente durch IPTG induziert werden kann.

Abb. 6: Der pComb3XSS Vektor (modifiziert nach Vorlage von Barbas, C.F. (Barbas 2012a)) mit zwei Stuffer Fragmenten, die nach einem SfiI-Verdau entfernt werden können. Über die SfiI-Schnittstellen kann die Klonierung eines Zielgens erfolgen. GeneIII: kodiert die C-terminale Domäne des Hüllproteins p3. H6: His6-tag; HA: Hemagglutinin-tag; ompA und pelB sind Signalsequenzen für den Transport ins Periplasma von *E. coli*; amber codon (Stopp), lacZ: mit IPTG induzierbarer Promotor. Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen; f1 ori: Replikationsursprung eines Phagen.

Abb. 7: Nach Vorlage von Barbas *et al.*, 2001 bearbeitet. pComb3X Vektor mit einem über die SfiI Schnittstellen klonierten Fab-Fragment und dem C-terminalen Ende des p3 Hüllproteins. H6: His6-tag; HA: Hemagglutinin-tag; ompA und pelB sind Signalsequenzen für den Transport ins Periplasma von *E. coli*; amber codon (Stopp) für die Expression löslicher Fab-Fragmente in *E. coli non-suppressor* Stämmen. *lacZ*: mit IPTG induzierbarer Promotor.

Der Vektor pAraH6HATT (Scripps Research Institute, Labor Carlos Barbas, USA; (Barbas 2012b)) enthält ein humanes Fab-Fragment, das gegen das Tetanus Toxin (TT) gerichtet ist, kann mit Arabinose induziert werden, enthält ebenfalls SfiI Schnittstellen und vermittelt eine Chloramphenicolresistenz. Dieser Vektor diente ausschließlich als *template* zur Amplifikation der humanen konstanten Domänen der leichten und schweren Kette.

2.1.5 Ausgangsmaterialien für das Antikörper-Phagen-Display

Die RNA (bereitgestellt von Frau Dr. med. Kollmar) für das Antikörper-Phagen-Display wurde aus B-Lymphozyten von New-Zealand-White Kaninchen isoliert, die zuvor mit $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ bzw. $\alpha 5\beta 1$ immunisiert worden waren. Weiterhin stand Serum dieser immunisierten Kaninchen zur Verfügung.

2.1.6 Rekombinante Adenoviren

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Adenoviren (Abb. 8) kodieren den Kontrollintradibody T2V2, den Intrabody JC7U (anti- $\alpha\beta 3$) bzw. den Intradibody #4 (anti- $\alpha\beta 3/\alpha 5\beta 1$) und sind im Scripps Research Institute, Labor Carlos Barbas hergestellt und von Frau Dr. med. Kollmar zur Verfügung gestellt worden.

Abb. 8: Nach Vorlage von Jendreyko *et al.*, 2003 bearbeitet. Schematische Darstellung (A) des Intrabodies JC7U (anti- $\alpha v \beta 3$), (B) des Intradiabodies #4 (anti- $\alpha v \beta 3 / \alpha 5 \beta 1$) und (C) des Kontrollintradiabodies T2V2. Die konstanten Domänen C_{H2} und C_{H3} eines humanen IgG1 dienen als Verbindungsstück zwischen zwei scFv-Fragmenten (rot, blau bzw. grün), wobei eine homophile Interaktion der C_{H3} Domänen bei den Intradiabodies besteht und ein 150 kDa Dimer gebildet wird. C-terminal wurde eine KDEL-Sequenz angefügt, welche die Retention im ER vermittelt.

2.1.7 Oligonukleotide

2.1.7.1 Oligonukleotide für chimäre Kaninchen/Mensch Fab Bibliotheken

Oligonukleotide für die Amplifikation der genetischen Information der V_L- und V_H-Regionen von Kaninchen

V_K 5' sense

RSVK1	5' GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGMTGACCCAGACTCCA 3'
RSVK2	5' GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGATMTGACCCAGACTCCA 3'
RSVK3	5' GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGATGACCCAGACTGAA 3'

V_K 3' reverse

RHybK1-B	5' AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATTTCACATTGGTGCC 3'
RHybK2-B	5' AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTAGGATCTCCAGCTCGGTCCC 3'
RHybK3-B	5' AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGACsACCACCTCGGTCCC 3'

V_λ 5' sense

RSCλ1	5' GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGCTGACTCAGTCGCCCTC 3'
-------	--

V_λ 3' reverse

RHybL-B 5' AGATGGTGCAGCCACAGTTCGGCCTGTGACGGTCAGCTGGGTCCC 3'

V_H 5' sense

RHyVH1 5' GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGTCGGTGGAGGAGTCCRGG 3'

RHyVH2 5' GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGTCGGTGAAGGAGTCCGAG 3'

RHyVH3 5' GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGTCGYTGGAGGAGTCCGGG 3'

RHyVH4 5' GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGSAGCAGCTGRTGGAGTCCGG 3'

V_H 3' reverse

RHyIgGCH1-B 5'CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGARGAGAYGGTGACCAGGGTGCC3'

Oligonukleotide für die Amplifikation der genetischen Information der humanen C_κ-Region und der pelB Signalsequenz von einem klonierten humanen Fab

HKC-F (sense) 5' CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC 3'

Lead-B (reverse) 5' GGCCATGGCTGGTTGGGCAGC 3'

Oligonukleotide für die Amplifikation der humanen C_H1 Kette von einem klonierten humanen Fab

HIgGCH1-F (sense) 5' GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC 3'

dpseq (reverse) 5' AGAAGCGTAGTCCGGAACGTC 3'

Oligonukleotide für das Zusammenfügen der variablen (V_L) Sequenzen des Kaninchens mit der humanen konstanten Region der leichten Kette

RSC-F (sense) 5' GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGCTC 3'

Lead-B (reverse) (siehe oben)

Oligonukleotide für das Zusammenfügen der variablen (V_H) Sequenzen des Kaninchens mit der humanen konstanten Region der schweren Kette

LeadVH (sense) 5' GCTGCCCAACCAGCCATGGCC 3'

dpseq (reverse) (siehe oben)

Oligonukleotide für das Zusammenfügen der chimären leichten Sequenzen mit den chimären schweren Sequenzen (Herstellung der Sequenzen von Fab-Fragmenten)

RSC-F (sense) (siehe oben)

dp-EX (reverse) 5' GAGGAGGAGGAGGAGGAGAGAAGCGTATGCCGGAACGTC 3'

2.1.7.2 Oligonukleotide für *realtime* PCR

α v sense	5' AACTCAAGCAAAAGGGAGCA 3'
α v reverse	5' GGGTTGCAAGCCTGTTGTAT 3'
β 3 sense	5' GACAAGGGCTCTGGAGACAG 3'
β 3 reverse	5' ACTGGTGAGCTTTCGCATCT 3'
β 5 sense	5' ACAAGGGAGTCCTCTGCTCA 3'
β 5 reverse	5' GGGGCACTTCTCACACATCT 3'
α 5 sense	5' AGCCTCAGAAGGAGGAGGAC 3'
α 5 reverse	5' GGTTAATGGGGTGATTGGTG 3'
β 1 sense	5' CATCTGCGAGTGTGGTGTCT 3'
β 1 reverse	5' GGGGTAATTTGTCCCGACTT 3'
GAPDH sense	5' ACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG 3'
GAPDH reverse	5' AGCTTGACAAAGTGGTCGTGAGG 3'

2.1.7.3 Oligonukleotide für die Sequenzierung

ompseq	5' AAGACAGCTATCGCGATTGCAG 3'
pelseq	5' ACCTATTGCCTACGGCAGCCG 3'
gback	5' GCCCCCTTATTAGCGTTTGCCATC 3'
CLrev	5' GGAAGATGAAGACAGATGGTG 3'
KX	5' GAAGTTATTCAGCAGGCACAC 3'

2.1.7.4 Oligonukleotide für die Mutagenese-PCR

Mutagenese sense 1	5' GGGCCTGAGTTCGCCCCTCAC 3'
Mutagenese reverse 1	5' GTGACGGGCGAACTCAGGCCC 3'
Mutagenese sense 2	5' GGGGAGAGTGTTAATTCTAGA 3'
Mutagenese reverse 2	5' TCTAGAATTAACACTCTCCCC 3'
Mutagenese sense 3	5' GGACAAGAAAGCAGAGCCCA 3'
Mutagenese reverse 3	5' TGGGCTCTGCTTCTTGTCC 3'

2.1.8 Antikörper, Enzyme und Proteine

2.1.8.1 Primärantikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
<i>Biotinylated anti-human VEGF R2/KDR antibody</i> <i>Goat IgG</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Fab anti-human IgG (H+L) (goat) antibody</i>	Rockland, Gilbertsville, USA
<i>ImmunoPure® Goat anti-human IgG (κ)</i>	Thermo Scientific, Dreieich
<i>ImmunoPure® Human IgG, whole molecule</i>	Thermo Scientific, Dreieich
<i>Mouse mAb anti-actin</i>	Millipore, Schwalbach
<i>Mouse mAb anti-g3p-Antibody</i>	MoBiTec, Göttingen
<i>Mouse mAb anti-human Integrin αβ3 (LM609)</i>	Millipore, Schwalbach
<i>Mouse mAb anti-human Integrin αβ5 (P1F6)</i>	Millipore, Schwalbach
<i>Mouse mAb anti-human Integrin α5, (P1D6)</i>	Millipore, Schwalbach
<i>Mouse mAb anti-human Integrin β1, (P4C10)</i>	Millipore, Schwalbach
<i>Mouse mAb anti-human VEGF R2/KDR</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Mouse mAb anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)</i> <i>(Thr202/Tyr204)</i>	Cell Signaling, Boston, USA
<i>Mouse anti-PI3-Kinase</i>	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
<i>Mouse anti-MEP 21 antibody, IgG1κ</i>	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. J. Wilting, Zentrum Anatomie, Göttingen
<i>Mouse mAb anti-PDI – ER marker</i>	Abcam, Cambridge, UK
<i>Rabbit anti-Akt antibody</i>	Cell Signaling, Boston, USA
<i>Rabbit anti-phospho Akt (Ser473)</i>	Cell Signaling, Boston, USA
<i>Rabbit anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)</i>	Cell Signaling, Boston, USA
<i>FITC anti-human CD31, mouse IgG1κ</i>	Biozol, Eching
<i>HRP/anti-M13 monoclonal conjugate</i>	GE Healthcare, Freiburg

2.1.8.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
<i>Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse IgG (H+L)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Biotin-SP-conjugated AffiniPureF(ab')₂ Fragment Donkey anti-mouse IgG (H+L)</i>	Jackson ImmunoResearch Suffolk, UK
<i>Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Donkey anti-rabbit IgG (H+L)</i>	Jackson ImmunoResearch Suffolk, UK
<i>Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat anti-rat IgG (H+L)</i>	Jackson ImmunoResearch Suffolk, UK
<i>HRP-conjugated anti-rabbit IgG</i>	Cell Signaling, Boston, USA
<i>Peroxidase conjugated, Rat mAb anti-HA</i>	Roche, Mannheim
<i>Peroxidase-conjugated AffiniPure, Goat anti-mouse IgG (H+L)</i>	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

2.1.8.3 Enzyme

Restriktionsendonuklease Sfi I	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase & 5x Ligase Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8.4 Proteine

Fibronectin, human	Biochrom AG, Berlin
<i>Human Integrin $\alpha 5\beta 1$, purified protein</i>	Millipore, Schwalbach
<i>Human Integrin $\alpha v\beta 3$, Octyl-β-D-glucopyranoside Formulation</i>	Millipore, Schwalbach
<i>Human Integrin $\alpha v\beta 5$, Octyl-β-D-glucopyranoside Formulation</i>	Millipore, Schwalbach
<i>Recombinant Human VEGF-R2/KDR Fc Chimera</i>	R&D Systems, Wiesbaden
Vitronectin, human	Promega, Mannheim

2.1.9 Reaktionssysteme (Kit's)

Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim

Superscript First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
DC Protein Assay (Lowry)	Biorad, München
BD BioCoat™ Angiogenesis System-Endothelial Cell Tube Formation	Becton Dickinson, Heidelberg
iQ SYBR Green Supermix	Biorad, München

2.1.10 sonstige Materialien

2.1.10.1 DNA-Längenstandards

6x DNA <i>Loading Dye</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>GeneRuler</i> 1 kb DNA Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>GeneRuler</i> 100 bp DNA Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.10.2 Protein-Längenstandards

<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i> , 10 bis 170 kDa	Thermo Scientific, Dreieich
---	-----------------------------

2.1.11 Medien

2.1.11.1 Medien für Bakterien

Alle verwendeten Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert. Sterilfiltrierte Antibiotika wurden, wenn benötigt, nach dem Abkühlen der Medien auf 50°C zugegeben.

LB-Agar:	32 g LB-Agar in 1 l H ₂ O lösen, in sterile Petrischalen gießen
LB-Carbenicillin-Agar:	1 ml Carbenicillin (100 mg/ml) pro 1 l LB-Agar
LB-Chloramphenicol-Agar:	1 ml Chloramphenicol (30 mg/ml) pro 1 l LB-Agar
LB-Kanamyzin-Agar:	1 ml Kanamyzin (50 mg/ml) pro 1 l LB-Agar
LB-Tetrazyklin-Agar:	2 ml Tetrazyklin (5 mg/ml) pro 1 l LB-Agar
LB-Top-Agar:	0,35 g Bacto-Agar, 1,5 g LB-Medium in 50 ml H ₂ O durch aufkochen vollständig lösen
SB-Medium:	5 g MOPS, 15 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, in 900 ml H ₂ O lösen, pH-Wert auf 7,0 einstellen und auf 1 l mit H ₂ O auffüllen

SOB-Medium:	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 186 mg KCl in 900 ml H ₂ O lösen, pH-Wert auf 7,0 einstellen und auf 1 l mit H ₂ O auffüllen
SOC-Medium:	48,5 ml autoklaviertes SOB-Medium vor Gebrauch mit 1 ml 1 M Glukose und 500 µl 1 M MgCl ₂ versetzen

2.1.11.2 Medien/Zusätze für die Zellkultur

DMEM 4,5g/l Glukose	Lonza, Köln
RPMI	Lonza, Köln
EGM-2MV Bullet Kit	Lonza, Köln
FCS	Biochrom, Berlin
PBS	Lonza, Köln
DMSO	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	Lonza, Köln
Pen/Strep	Lonza, Köln

2.1.12 Lösungen und Puffer

50x ABTS (20 mg/ml)
2 g in 100 ml H₂O lösen

ABTS-Lösung
105 µl 50x ABTS, 1 µl H₂O₂ in 5,1 ml Citratpuffer lösen

Adhäsions-Substratpuffer
0,1 M Natriumcitrat pH 5,0, 7,5 mM p-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide, 0,5 % TritonX-100, mit H₂O auf 50 ml auffüllen

Adhäsions-Stopp-Puffer
50 mM Glyzin pH 10,4, 5 mM EDTA, mit H₂O auf 50 ml auffüllen

Agarosegel (1 %)
1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer lösen, aufkochen und in Gelkammer gießen

APS (10 %)
0,5 g BSA in 50 ml PBS lösen, steril filtrieren

Blotpuffer (10x)
250 mM Tris, 1,92 M Glyzin, pH 8,6 (nicht einstellen), mit H₂O auf 1 l auffüllen

Blotpuffer (1x)
100 ml Methanol, 100 ml 10x Blotpuffer, mit H₂O auf 1 l auffüllen

Blockpuffer für Western Blot

5 % BSA in TBST oder 5 % Milch in PBST lösen

BSA/PBS (1 % bzw. 2 %)

0,5 g bzw. 1 g BSA in 50 ml PBS lösen, steril filtrieren

BSA/TBS (1 % bzw. 3 %)

0,5 g bzw. 1,5 g BSA in 50 ml TBS lösen, steril filtrieren

CaCl₂ (1 M)

73,51 g in 500 ml H₂O lösen, autoklavieren

Carbenicillin (100 mg/ml)

5 g in 50 ml H₂O lösen, steril filtrieren

Chloramphenicol (30 mg/ml)

1,5 g in 50 ml 100 % EtOH lösen

Citratpuffer (1x)

6,62 g Zitronensäure, 5,44 g Natriumcitrat Dihydrat, pH 4,0, mit H₂O auf 1 l auffüllen, autoklavieren

CsCl-Lösung (15 %)

9,09 g in 1x TBS lösen, steril filtrieren

CsCl-Lösung (40 %)

28,45 g in 1x TBS lösen, steril filtrieren

Dialyselösung

10 % Glycerin, 10 mM Tris pH 8,1, mit H₂O auf 1 l auffüllen

EDTA (0,5 M)

93,05 g, pH 8,0, in 500 ml H₂O lösen, autoklavieren

Einfriermedium (Zellkultur)

5 % DMSO/FCS, Lagerung bei -20°C

FACS Puffer zur Analyse von Zellen

1 % (w/v) BSA, 0,03 % (w/v) NaN₃, 25 mM HEPES in 1x PBS, pH 7,4

FACS Puffer zum Sortieren von Zellen

1 mM EDTA, 25 mM HEPES, pH 7,0, mit 1x PBS auf 1 l auffüllen, autoklavieren

Glukose (1 M)

180,2 g in 1 l H₂O lösen, steril filtrieren

Glukose (20 %)

10 g in 50 ml H₂O lösen, steril filtrieren

Glyzerin (10 %)

100 ml Glyzerin mit 900 ml H₂O mischen, steril filtrieren

IPTG (0,5 M)

5,96 g in 50 ml H₂O lösen, steril filtrieren

Kanamycin (50 mg/ml)

2,5 g in 50 ml H₂O lösen, steril filtrieren

KCl (250 mM)

9,3 g in 500 ml H₂O lösen, autoklavieren

0,1 M KPP

0,1 M KH₂PO₄, 0,1 M K₂HPO₄, pH 7,4 bis 7,8, in 1 l H₂O lösen

Laufpuffer (10x)

25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,1 % SDS, pH 8,6 mit H₂O auf 1 l auffüllen

Locke-Lösung

1,61 M NaCl, 0,16 M KCl, 0,14 M CaCl₂, mit H₂O auf 1 l auffüllen, autoklavieren

Nach dem Autoklavieren wurde eine 1 %ige Pen/Strep-Lösung zugesetzt

Lysispuffer

30 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X- 100, 0,5 % NaDoc, 1 mM Dithiothreitol (DTT), mit H₂O auf 10 ml auffüllen

MgCl₂ (1M)

203,31 g in 1 l H₂O lösen, steril filtrieren

NaCl (5M)

146,0 g in 400 ml H₂O lösen und mit H₂O auf ein Volumen von 1 l auffüllen, autoklavieren

Natriumacetat, pH 4,6 (3M)

246,09 g NaC₂H₃O₂·3·H₂O in 200 ml H₂O lösen, pH-Wert mit Eisessig auf 4,6 einstellen und auf 1 l mit H₂O auffüllen, autoklavieren

Natriumacetat, pH 5,2 (3M)

246,09 g NaC₂H₃O₂·3·H₂O in 200 ml H₂O lösen, pH-Wert mit Eisessig auf 5,2 einstellen und auf 1 l mit H₂O auffüllen, autoklavieren

Natriumazid (0,02 %)

0,2 mg in 1 ml H₂O lösen, Lagerung bei 4°C

PBS (1x)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4, mit H₂O auf 1 l auffüllen, autoklavieren

PBST

0,1 % Tween 20 in 1x PBS lösen

20 % PEG/2,5M NaCl

200 g PEG-8000 und 146,1 g NaCl in 700 ml H₂O sorgfältig mischen, auf in Volumen von 1 l mit H₂O auffüllen, steril filtrieren

PFA/PBS (4 %)

4 g PFA in 100 ml PBS, pH 7,4 mit NaOH einstellen

Probenpuffer (2x)

100 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 12,5 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau

Sammelgelpuffer (4x)

0,5 M Tris, pH 6,8, 0,4 % SDS mit H₂O auf 1 l auffüllen

TAE (1x)

40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0, mit H₂O auf 1 l auffüllen, steril filtrieren

TBS (1x)

50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4

TBST

0,1 % Tween 20 in 1x TBS lösen

Tetrazyklin (5 mg/ml)

250 mg in 50 ml 100 % EtOH lösen

Trenngelpuffer (4x)

1,5 M Tris, pH 8,8, 0,4 % SDS mit H₂O auf 1 l auffüllen

Tris (1 M, pH 7,4)

121,1 g Tris in 700 ml H₂O lösen, pH auf 7,4 einstellen und auf 1 l mit H₂O auffüllen, autoklavieren

Triton-X 0,2 %/PBS

200 µl Triton-X in 200 ml PBS lösen

Triton-X 0,2 %/PBS + 1 % BSA

2 g BSA in 200 ml Triton-X 0,2 %/PBS lösen

Tween/TBS (0,05 %)

25 mg Tween 20 in TBS lösen

Tween/TBS (0,05 %)

25 mg Tween 20 in TBS lösen

2.1.13 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Lieferant
HUVEC, humane Endothelzellen der Nabelschnurvene	Lonza
MS1, murine Endothelzellen	ATCC
M21, humane Melanomzellen	ursprünglich von Donald Morton, John Wayne Cancer Institute, Santa Monica, USA
293, menschliche embryonale Nierenzellen	ATCC

2.1.14 Hühnereier

Es wurden für den Chorioallantoismembran-Assay befruchtete, pathogenfreie Hühnereier (*specific pathogen free chicken egg*) der Firma Charles River, Deutschland verwendet.

2.1.15 Software

In der folgenden Tabelle sind die für Messungen und Auswertungen verwendeten Programme aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete Software und deren Anwendung

Programm	Verwendung
Adobe Photoshop CS2	Bildbearbeitung
Bioedit und Gentle	Sequenzauswertung
Cell Quest Pro	Durchflusszytometrische Messung und Auswertung
Endnote X1	Literaturverwaltung
GraphPad Prism 5	Erstellen von Grafiken und statistische Auswertung mittels gepaartem T-Test
LAS-4000 FujiFilm	Western Blot Detektion
LAS Core und AxioVision	Aufnahme von Stereomikroskop- und Mikroskopbildern
Magellan bzw. Wallac 1420	ELISA Messung
Word	Textverarbeitung
GloMax® 96	Lumineszenz Messung

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für diesen Vorgang ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase notwendig, die als reverse Transkriptase (RT) bezeichnet wird. Die gewonnene cDNA diente als Ausgangsmaterial für eine nachgeschaltete PCR.

Für die Synthese von cDNA als Ausgangsmaterial für die Herstellung einer Fab-Bibliothek wurden 20 µg der jeweiligen RNA verwendet und mit dem Invitrogen Superscript First-Strand cDNA Synthesis Kit nach Angaben des Herstellers umgeschrieben. Die RNA lag bereits isoliert aus Milz und Knochenmark von Kaninchen vor, die mit den zu untersuchenden Antigenen immunisiert wurden.

Für die Synthese von cDNA, als *template* für die *realtime*-PCR, wurden 500 ng der zu untersuchenden RNA verwendet, mit 0,1 µl *random primer* (0,3 pmol/µl) und 1 µl dNTP's (2,2 mM dNTP Mix) versetzt und mit H₂O auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 min bei 65°C inkubiert, auf Eis gestellt und mit 4 µl 5x *first strand buffer*, 2 µl 0,1 M DTT sowie 1 RNaseOUT (40 U/µl) versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 2 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl SuperScript II RT (200 U/µl) wurde der Ansatz 10 min bei 25°C inkubiert, anschließend 50 min bei 42°C und zum Schluss 15 min bei 70°C. Die cDNA wurde entweder direkt für eine *realtime* PCR verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur *in vitro* Amplifikation von DNA (Mullis and Faloona 1987, Saiki *et al.*, 1988). Die PCR-Technik ist in drei Schritte unterteilt:

1. Denaturierung der doppelsträngigen (ds) DNA, sodass diese einzelsträngig (ss) vorliegt.
2. Anlagerung zweier Oligonukleotide (*primer*) an die ssDNA, welche die zu amplifizierende Zielsequenz flankieren (*annealing*). Die Anlagerung erfolgt bei einer für die Oligonukleotide spezifischen Temperatur. Diese Schmelztemperatur (T_m) ist abhängig von der unterschiedlichen Basenzusammensetzung und Länge der Oligonukleotide (n) und lässt sich nach folgender Formel berechnen: $T_m[^\circ\text{C}] = 69,3 + 0,41 \cdot (\%G/C) - 650/n$. Die optimale *annealing*-Temperatur T_A für eine PCR wird nach $T_A[^\circ\text{C}] = ((T_{m1} + T_{m2})/2) -$

3°C bestimmt. T_{m1} und T_{m2} stehen dabei für die Schmelztemperaturen der für die PCR verwendeten *primer*.

3. Verlängerung der *primer*, komplementär zur DNA-Matrize, mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (Elongation).

Für die Amplifikation der variablen Regionen V_L und V_H wurde die cDNA immunisierter Kaninchen verwendet, für C_K und C_{H1} der Vektor pAraH6HAT^T, der ein humanes Fab-Fragment gegen das Tetanus Toxin enthält. Die *first overlap extension* PCR dient dem Zusammenschluss und der Amplifikation der gereinigten PCR-Produkte von V_L und C_K , sowie von V_H und C_{H1} . In der *second overlap extension* PCR werden die in der *first overlap extension* PCR gebildeten und gereinigten PCR-Produkte zu Fab-Fragmenten zusammengefügt, sodass diese in den mit SfiI verdauten Vektor pComb3XSS kloniert werden können. Während den PCR's (Abb. 9) werden zudem die nötigen SfiI Schnittstellen und die *leader* Sequenz pelB eingebracht.

Abb. 9: Generierung einer chimären Fab-Bibliothek mit variablen Regionen vom Kaninchen (V_L und V_H) und humanen konstanten Regionen (C_K und C_{H1}). Die Pfeile stellen die verwendeten *primer* dar, die in den PCR-Reaktionen verwendet wurden. Die mit den PCR-Reaktionen eingefügten SfiI-Schnittstellen dienen der Klonierung in den pComb3X-Vektor. Quelle: Popkov *et al.*, 2003.

Ein Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 1 µl *template*-DNA (ca. 100 ng), je 3 µl *primer* (20 µM), 10 µl 10x *Expand High Fidelity Buffer*, 8 µl dNTPs (jeweils 10 mM), 0,5 µl (bzw. 0,75 µl bei der *second overlap extension* PCR) *Expand High Fidelity Enzyme* mix und wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Die PCR-Programme sind in den Tabellen 2, 3 und 4 angegeben.

Tab. 2: Programm der PCR zur Amplifikation von V_L , V_H , C_K und C_H1

Amplifikation von V_L , V_H , C_K und C_H1	Temperatur	Zeit V_L & V_H / C_K & C_H1	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	1 min	
Denaturierungs-Phase	94°C	30 s / 15 s	V_L & V_H 30 C_K & C_H1 20
Anlagerungs-Phase	60°C	30 s	
Elongations-Phase	72°C	1,5 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Tab. 3: Programm der *first overlap extension* PCR

<i>first overlap extension</i> PCR	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	1 min	
Denaturierungs-Phase	94°C	15 s	20
Anlagerungs-Phase	60°C	1 min	
Elongations-Phase	72°C	2,5 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Tab. 4: Programm der *second overlap extension* PCR

<i>second overlap extension</i> PCR	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	1 min	
Denaturierungs-Phase	94°C	15 s	10
Anlagerungs-Phase	60°C	1,5 min	
Elongations-Phase	72°C	3 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Im Anschluss an die jeweilige PCR wurden max. vier Ansätze gepoolt und es folgte eine Ethanolpräzipitation (2.2.8).

2.2.3 *realtime* PCR

Die *realtime* PCR stellt eine Methode dar, die neben der Vervielfältigung von Nukleinsäuren zusätzlich die Möglichkeit zur Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung erfolgt über die Messung von Fluoreszenzlicht, dessen Intensität proportional zur Produktmenge ist. Eine Möglichkeit zur Erzeugung produktabhängiger Fluoreszenz bieten fluoreszierende Farbstoffe, die in doppelsträngige DNA (dsDNA) interkalieren. Auf diesem Prinzip basiert der in dieser Doktorarbeit verwendete, fluoreszierende Farbstoff SYBR Green. Er lagert sich während der PCR in doppelsträngige DNA ein, wodurch im Laufe der PCR das Fluoreszenzsignal proportional zur entstandenen DNA zunimmt. Liegt zu Beginn der PCR bereits mehr Zielsequenz vor, resultiert dies in einer stärkeren Fluoreszenz und lässt einen Rückschluss auf die ursprüngliche Menge der zu untersuchenden mRNA zu. Ab ca. 35 Zyklen setzt ein Sättigungseffekt ein, sodass entscheidend ist, bei welchem Zyklus das Signal ansteigt. Je früher der Anstieg auftritt, desto mehr Ausgangsmaterial lag vor. Das gemessene Fluoreszenzsignal der Zielsequenz wird auf das Fluoreszenzsignal eines in der Regel konstant exprimierten Gens (in diesem Fall GAPDH) bezogen, welches im selben PCR-Lauf amplifiziert wird.

Ein Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 0,5 µl des jeweiligen *sense* und *reverse primers* (10 µM), 6,5 µl H₂O, 12,5 µl iQ SYBR Green Supermix und 5 µl cDNA. Die cDNA wurde zuvor für alle Ansätze, bis auf die Ansätze für die Amplifikation von β 5, 1:40 verdünnt mit H₂O. Für die Ansätze zur Amplifikation von β 5 wurde die cDNA 1:20 mit H₂O verdünnt. Das PCR-Programm der *realtime* PCR ist in Tabelle 5 angegeben.

Tab. 5: Programm der *realtime* PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
Denaturierungs-Phase	95°C	10 s	40
Anlagerung / Elongation	55°C	30 s	
Dissoziations-Phase	95°C	1 min	
	55°C	1 min	
	55°C bis 95°C in 0,5°C Schritten	10 s	81

2.2.3.1 Auswertung der *realtime* PCR

Eine Möglichkeit der Auswertung der *realtime* PCR bietet die relative Quantifizierung mit Hilfe der delta-delta- C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$) (Livak and Schmittgen 2001). Die angewandte relative Quantifizierung stellt die Änderung der Expression des Zielgens relativ zu einem Referenzgen dar, welches in jedem PCR-Lauf mitgeführt wird. Dies wird als Normalisierung bezeichnet, wobei die C_T -Werte, gemittelter Triplikate, voneinander abgezogen werden und damit ΔC_T ermittelt wird. Zudem können Zielgene untereinander in Relation gesetzt werden, indem man ihre ΔC_T -Werte voneinander abzieht, sodass man einen $\Delta\Delta C_T$ -Wert erhält, den man dann in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ einsetzt. In dieser Arbeit wurde die Expression verschiedener Integrinuntereinheiten in nicht infizierten Zellen und in den mit rekombinanten Adenoviren infizierten Zellen ermittelt und miteinander verglichen. Die verwendeten *primer* wurden mit Hilfe des Programmes Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) auf Basis der auf der NCBI Homepage veröffentlichten Sequenzen erstellt und mit BLAST auf ihre Spezifität getestet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

2.2.4 Gezielte Mutagenese-PCR (*site-directed mutagenesis pcr*)

Mit Hilfe der Mutagenese-PCR ist es möglich in eine bekannte Sequenz gezielt Mutationen einzufügen.

In den in dieser Arbeit verwendeten Vektor pAraH6HATT mussten gezielt fünf Punktmutationen eingefügt werden, um für das Phagen Display die ursprüngliche Vektorsequenz (Barbas 2012c) zu erhalten und damit funktionsfähige Fab-Fragmente zu generieren. Ein Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 30 ng *template*-DNA, je 1 μ l *primer* (100 μ M), 5 μ l 10x Pfu-Puffer, 1 μ l dNTPs (jeweils 10 mM), 1 μ l Pfu-Polymerase und wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 μ l aufgefüllt. Das Programm der Mutagenese-PCR ist in Tabelle 6 angegeben.

Tab. 6: Programm der Mutagenese-PCR

Mutagenese-PCR	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	1 min	
Denaturierungs-Phase	95°C	50 s	24
Anlagerungs-Phase	56°C	50 s	
Elongations-Phase	72°C	5 min	
Finale Elongation	72°C	7 min	

Unmittelbar nach der Mutagenese-PCR folgte ein DpnI Verdau, der dazu dient, die parentale, methylierte DNA abzubauen. Dafür wurde dem Reaktionsansatz 1 µl DpnI zugegeben und 1,5h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Transformation von *E. coli* mit der mit DpnI verdauten DNA. Dazu wurden 20 µl chemisch kompetente BIOBlue Zellen verwendet und mit 2 µl der verdauten DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine kurze Inkubation für 30 s bei 42°C, gefolgt von 2 min auf Eis, woraufhin 500 µl vorgewärmtes SB-Medium zugegeben wurden und 1 h bei 37°C und 250 rpm geschüttelt wurde. Zum Schluss wurden der gesamte Ansatz auf Chloramphenicolplatten ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert.

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA wurden 1 %ige Agarosegele verwendet (1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer). In einer Mikrowelle wurde die Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf ca. 55°C zum Gießen eines Gels verwendet. Um die DNA im Agarosegel sichtbar zu machen, wurde das Gel mit Ethidiumbromid (EtBr, 10 mg/ml) bzw. GelRed versetzt. GelRed wurde hierbei ausschließlich bei analytischen Gelen eingesetzt, da es sensitiver ist als EtBr. Das Gel wurde direkt in eine Elektrophoresekammer gegossen und ein Taschenkamm gesetzt. Das ausgehärtete Gel wurde mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Taschenkamm gezogen. Zur Längen- und Konzentrationsbestimmung der DNA-Banden wurden zusätzlich zu den Proben DNA-Fragmentlängenstandards mitgeführt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit Sucrosefarbmarker versetzt und dann in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von ca. 96 V für 60-120 min durchgeführt. Danach wurden im UV-Durchlicht (302 nm) die aufgetrennten DNA-

Fragmente durch Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids bzw. GelRed sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.6 Gelextraktion mittels *freeze-squeeze*

Unter UV-Licht wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel (versetzt mit EtBr) geschnitten, in eine Parafilm Tasche überführt und ü. N. bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurde das gefrorene Gelstück kurz bei RT aufgetaut, bis sich Flüssigkeit bildete und anschließend mit den Fingern sorgfältig zerdrückt. Die hierbei gewonnene Flüssigkeit sowie die Gelreste wurden in spezielle Filterröhrchen (Ultrafree-MC, Millipore) überführt und zentrifugiert (16.000 x g, RT, 5 min). Dies wurde zwei- bis dreimal wiederholt, sodass die gesamte Flüssigkeit mit der darin enthaltenen DNA aus dem Gel isoliert werden konnte. Die DNA-Lösung wurde anschließend einer Ethanolpräzipitation unterzogen (2.2.8).

2.2.7 Gelextraktion mittels Elutrap

Bei dieser Möglichkeit der Gelextraktion wandert die DNA aus dem Agarosegelstück während einer Elektrophorese bei 150 V aus dem Gel in einen mit spezifischen Membranen abgesteckten Bereich. Während die erste Membran (BT2) für DNA durchlässig ist, verhindert eine weitere Membran (BT1) dies, womit die DNA in dem abgesteckten Bereich angereichert werden kann. Dafür wurden die ausgeschnittenen Agarosegelstücke in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elutrap-Vorrichtung unmittelbar vor die BT2 Membran platziert, sodass die DNA in den abgesteckten Bereich wandert und angereichert wird. Damit gewährleistet ist, dass die gesamte DNA aus dem Gelstück in den abgesteckten Bereich wandert, wurde das Gelstück nach ca. 1 h auf einem UV-Tisch angesehen und nach erfolgreichem Transfer wurde die DNA in einem bestimmten Volumen in dem abgesteckten Bereich entnommen. Die DNA-Lösung wurde im Anschluss einer Ethanolpräzipitation unterzogen (2.2.8).

2.2.8 Ethanolpräzipitation

Für die Anreicherung von Nukleinsäuren werden diese mit Alkohol und einem Salz versetzt, wodurch sie ausfallen und isoliert werden können. Bei der Ethanolpräzipitation wurde 100 %iger EtOH verwendet und als Salz 3M Natriumacetat (pH 5,2).

Der Gesamtansatz setzte sich zusammen aus der Nukleinsäure-Lösung, welcher das 2,2-fache Volumen von 100 %igem EtOH, 1/10 des Volumens von 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 µl Glykogen zugegeben wurde. Dieser Ansatz wurde gevortext und ü. N. bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (16.000 x g, 4°C, 15 min), das Pellet

mit 75 %igem EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (16.000 x g, 4°C, 10 min). Der Waschschrift wurde wiederholt, das Pellet luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen H₂O aufgenommen.

2.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren bei einer Absorption von 260 nm wurde das NanoDrop-Spektrophotometer verwendet, womit gleichzeitig die Qualität der Nukleinsäuren ermittelt werden konnte. Hierfür wurde 1 µl der unverdünnten, zu untersuchenden Nukleinsäurelösung (dsDNA oder RNA) verwendet und die Konzentration automatisch nach entsprechender Programmwahl für die jeweilige Nukleinsäure berechnet. Zusätzlich zeigt das Verhältnis der gemessenen Absorption bei 260 und 280 nm sowie bei 260 und 230 nm die Reinheit der untersuchten Probe an.

2.2.10 Sequenzanalyse

Für die Sequenzierung wurde das BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit verwendet. Das Prinzip der verwendeten nichtradioaktiven Sequenzierung basiert auf dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977). Bei diesem Verfahren liegt ein Gemisch aus dNTPs und mit BigDye™-Farbstoffen markierten, als Terminatoren dienenden Didesoxynukleotid-Triphosphate (ddNTPs) vor. Da sich die verwendeten Farbstoffe in ihren Emissionsspektren unterscheiden, ist jedes der vier ddNTPs (ddCTP, ddGTP, ddATP, ddTTP) in einer anderen Farbe sichtbar. Es kommt während der PCR zum Einbau der in geringen Mengen vorliegenden ddNTPs und somit zu einem Kettenabbruch an verschiedenen Stellen des generierten DNA-Fragments. Es entstehen somit unterschiedlich lange, basenspezifisch terminierte PCR-Produkte, die dann über eine Kapillare mit Polymermatrix ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch die verschiedenen Farbstoffe kann die Sequenz der eingesetzten DNA ermittelt werden. Die diesbezüglich notwendige Sequenz-PCR sollte im Reaktionsansatz eine Konzentration von ca. 25 ng DNA einer PCR bzw. ca. 200 ng an Plasmid-DNA enthalten. Der Gesamtansatz setzte sich zusammen aus x µl DNA-Lösung (25 bzw. 200 ng DNA), 2 µl 5x *Sequencing Buffer*, 1 µl *primer* (5 pmol/µl), 1 µl BigDye® und wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Das Programm der Sequenz-PCR ist in Tabelle 7 angegeben.

Tab. 7: Programm einer Sequenz-PCR

	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	96°C	30 s	25 Zyklen
Anlagerung	50°C	15 s	
Elongation	60°C	4 min	

Im Anschluss an die Sequenz-PCR wurden die Nukleinsäuren gefällt. Hierfür wurde der Ansatz mit H₂O auf 114,2 µl aufgefüllt und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in welchem sich 225 µl 100 %iger EtOH und 10,8 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) befanden. Nach Zentrifugation (16.000 x g, RT, 15 min) wurde das Sediment zweimal mit 150 µl 70 %igem EtOH gewaschen (16.000 x g, RT, 2 min) und anschließend bei 60°C im Heizblock getrocknet. Die DNA wurde in 10 µl Hi-Di™ Formamid gelöst und anschließend im Sequenzierer analysiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme BioEdit und Gentle.

2.2.11 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien in kleinen Mengen wurden 3 bis 5 ml einer ü. N. Kultur von plasmidtragenden *E. coli* geerntet (16.000 x g, RT, 30 s) und die Plasmid-DNA anschließend mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers isoliert und aufgereinigt.

2.2.12 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien in größeren Mengen wurde eine Maxi-Präparation mit dem Qiagen® Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dies wurde nur bei der Aufreinigung von pComb3XSS und pAraH6HATT in XL1-Blue Zellen durchgeführt.

2.2.13 Restriktionsverdau von DNA

Per Definition führt eine Einheit (U) einer Restriktionsendonuklease bei optimalen Temperatur- und Pufferbedingungen zur vollständigen Spaltung von 1 µg DNA innerhalb einer Stunde.

2.2.13.1 Restriktionsverdau mit SfiI

Der Ansatz eines Restriktionsverdaus mit SfiI setzte sich, je nachdem ob es sich bei der DNA um gereinigtes PCR-Produkt oder um Vektor-DNA handelte, unterschiedlich zusammen. Der Ansatz des Verdaus von gereinigtem PCR-Produkt der chimären Fab-Fragmente setzte sich zusammen aus der entsprechenden DNA (x µg), 16U SfiI pro µg DNA, 10 µl 10x Puffer M und wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl gebracht. Der Ansatz zum Verdau von Vektor-DNA setzte sich zusammen aus 50 µg DNA, 6U SfiI pro µg Vektor-DNA, 20 µl 10x Puffer M und wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Jeder Ansatz wurde für 5 h bei 50°C inkubiert.

2.2.14 Ligation

Bei der Ligation wurde der mit SfiI geschnittene Vektor mit der ebenfalls mit SfiI geschnittenen DNA der *second overlap extension* PCR (das Insert) ligiert, um für die Selektion von Fab-Fragmenten eine Fab-Bibliothek herzustellen. Der Ligationsansatz setzte sich zusammen aus 1,4 µg SfiI geschnittenes Insert, 1,4 µg SfiI geschnittener Vektor (pComb3XSS), 40 µl 5x Ligase Puffer, 10 µl T4 DNA Ligase und wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde ü. N. bei 15°C in einem Thermoblock im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ethanolpräzipitation, die Ligation wurde in 15 µl H₂O aufgenommen und konnte direkt für die Transformation von *E. coli* verwendet werden.

2.2.15 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Von einer 5 ml Übernachtskultur wurden 2,5 ml abgenommen und damit 500 ml SB-Medium angeimpft, welches zusätzlich 10 ml 20 %iger Glukose und 5 ml 1 M MgCl₂ enthielt. Die Zellen wurden bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 0,9 (ER2738) bzw. 0,6 bis 0,7 (XL1-Blue) angezogen und bei erreichter OD₆₀₀ für 15 min auf Eis gehalten. Anschließend wurde die Bakterienkultur zentrifugiert (2700 x g, 4°C, 15 min), das Pellet in 250 ml eiskaltem 10 %igem Glyzerin resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin in 500 ml eiskaltem 10 %igem Glyzerin resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2700 x g, 4°C, 15 min) wurde das Pellet in insgesamt 25 ml eiskaltem 10 %igem Glyzerin resuspendiert, in ein 50 ml Röhrchen überführt und ein letztes Mal zentrifugiert (2000 x g, 4°C, 15 min). Zum Schluss sind die Zellen nach Dekantieren des Überstandes im verbleibenden Glyzerin resuspendiert worden. Die elektrokompenten Zellen wurden aliquoutiert und bei -80°C gelagert. Die Elektrokompetenz der Zellen wurde mit Hilfe des Plasmids pUC ermittelt. Dazu wurden 100 µl der hergestellten elektrokompenten Zellen mit 10 pg pUC transformiert und im Anschluss 3 ml vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben.

Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C und 250 rpm wurden weitere 7 ml vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und von diesem Ansatz 1 µl, 10 µl und 100 µl auf Carbenicillinplatten ausplattiert. Die Elektrokompentenz wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$(\text{Anzahl der Kolonien/ausplattiertes Volumen } (\mu\text{l})) \times (\text{Endvolumen } (\mu\text{l})/\text{eingesetzte DNA-Menge } (\mu\text{g})) = \text{Kol./}\mu\text{g DNA}$$

2.2.16 Elektroporation

Pro Transformation wurden 300 µl der elektrokompenten Zellen verwendet, 15 µl der gereinigten DNA zugegeben und diese DNA/Zellmischung wurde in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt, 1 min auf Eis gehalten und anschließend in die dafür vorgesehene Vorrichtung des Elektroporators überführt. Die Elektroporation erfolgte am *Gene Pulser* mit folgenden Einstellungen: Spannung von 2500 V, Kapazität von 25 µF, Widerstand von 200 Ω und die Anzeige ist auf „Time Constant“ gesetzt worden. Unmittelbar danach wurden zu den Zellen 3 ml vorgewärmtes SOC-Medium gegeben. Die verdünnte Zellsuspension wurde in ein 14 ml PP Röhrchen überführt und die Proben wurden 1 h bei 37°C und 250 rpm zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz inkubiert. Danach wurde in geeigneten Verdünnungen auf Selektivplatten ausplattiert.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Gesamtzellextrakt

Für die Bestimmung verschiedener Proteinkonzentrationen mittels Western Blot wurden von infizierten und nicht infizierten humanen Nabelschnurendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC)) und humanen Melanomzellen (M21-Zellen) Zelllysate hergestellt. Die Zellen wurden dazu nach Absaugen des Mediums und Spülen mit PBS trypsiniert, in PBS aufgenommen und zentrifugiert (540 x g, RT, 5 min). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet erneut in PBS aufgenommen und wie zuvor zentrifugiert. Im Anschluss wurde auf Eis weiter gearbeitet. Das Pellet wurde in einer geeigneten Menge Lysispuffer aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert (16.000 x g, 4°C, 30 min), der Überstand aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Lowry)

Zur Bestimmung der Konzentration des Gesamtproteingehalts von Zelllysaten wurde der DC Protein Assay verwendet (Biorad), welcher dem Lowry Assay ähnlich ist (Lowry *et al.*, 1951). Zu jeder Messung wurde eine Standardreihe mit BSA gelöst in H₂O angefertigt, wobei die

BSA-Konzentration von 125 µg/ml bis 1500 µg/ml reichte. Für die Messung wurden die Proben 1 zu 10 mit H₂O verdünnt, wovon 10 µl in ein Eppendorfgefäß überführt wurden. Ebenfalls jeweils 10 µl wurden von der Standardreihe verwendet. Zu jedem Ansatz wurden nach Herstellerangaben 50 µl des Reagenzgemisches A' zugegeben und im Anschluss daran jeweils 400 µl des Reagenzes B. Die Ansätze wurden gevortext und 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden jeweils 150 µl in einer Dreifachmessung in eine Mikrotiterplatte überführt und es wurde die Absorption bei 700 nm gemessen. Ausgehend von der mitgeführten Standardkurve wurde die Proteinkonzentration berechnet.

2.3.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine über (SDS-haltige) Polyacrylamidgele ihrer Größe nach auftrennen (Laemmli 1970). Durch den Zusatz des Detergenzes SDS werden die Proteine denaturiert und zusätzlich wird eine negative Gesamtladung eingeführt, sodass die Auftrennung der Proteine nur von der Größe des Moleküls und der Porengröße des Gels abhängt. In dieser Arbeit wurden 12 %ige und 7,5 %ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet.

2.3.3.1 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Die Trenngellösung (Tab. 8) wurde angesetzt und der mit drei Klammern verschlossene Gießstand zu $\frac{3}{4}$ damit gefüllt. Das Trenngel wurde anschließend zur Ausbildung einer gleichmäßigen Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Acrylamids wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgellösung (Tab. 9) bis zur oberen Kante des Gießstandes gegossen und die Kämme wurden gesteckt. Nachdem das Sammelgel vollständig polymerisiert war, konnten die Gele sofort verwendet werden oder zur kurzzeitigen Lagerung im Kühlschrank in mit Wasser befeuchtete Papiertücher gewickelt werden.

Tab. 8: Zusammensetzung der Trenngele

Trenngellösung	2 Gele (7,5 %ig)	2 Gele (12 %ig)
Acrylamid (Rotiphorese-Gel 30)	2,5 ml	4 ml
Trenngel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml
Wasser	4,9 ml	3,4 ml
APS 10 %	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Tab. 9: Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgellösung (5 %ig)	2 Gele
Acrylamid (Rotiphorese-Gel 30)	830 µl
Sammelgel-Puffer	630 µl
Wasser	3,45 ml
APS 10 %	50 µl
TEMED	5 µl

2.3.3.2 Elektrophorese

Das Gel wurde in einer Laufkammer fixiert und die Kammer mit 1× Lämmli-Laufpuffer gefüllt. Nachdem der Kamm aus dem Gel entfernt wurde, wurden die Proteinproben je nach Proteinkonzentration verdünnt in PBS und versetzt mit $\frac{1}{4}$ Volumen des 4x Proteinladepuffers 5 min bei 95°C denaturiert, kurz zentrifugiert und in die Probentaschen gefüllt. Zusätzlich zu den Proben wurde ein SDS-PAGE Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 V durch das Sammelgel und 130 V durch das Trenngel durchgeführt. Das Gel wurde anschließend aus der Elektrophoresekammer ausgebaut und aus den Glasplatten entnommen.

2.3.4 Western Blot

Für die Analyse verschiedener Proteine mit Hilfe von Antikörpern wurden die aufgetrennten Proteine zunächst auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) überführt. Hierfür wurde die PVDF-Membran zunächst mit Methanol aktiviert und ebenso wie das benötigte Whatman-Papier und das SDS-Gel in Blotpuffer äquilibriert. Für den Transfer der Proteine mittels Semi Dry Blot-Verfahren wurden drei Lagen Whatman-Papier, die PVDF-Membran, das Gel und drei weitere Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei gestapelt. Die Übertragung der Proteine erfolgte für 1 h bei konstanter Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$, wobei die Proteine auf die Membran in Richtung Anode wanderten. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockpuffer gehalten und anschließend ü. N. bei 4°C mit einem geeigneten ersten Antikörper inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für je 5 min mit Waschpuffer gewaschen und danach für 1 h mit dem HRP-konjugierten zweiten Antikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wie zuvor wurde die Membran 1 min mit der

luminolhaltigen ECL-Lösung (Millipore) inkubiert und das dabei entstandene Licht wurde mittels Luminescent Image Analyzer detektiert. War bereits der erste Antikörper HRP-konjugiert wurde die Membran nach den ersten Waschschritten mit der ECL-Lösung inkubiert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Auftauen von Zellen

Die bei -80°C gelagerten Zellen verschiedener Zelllinien wurden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in ein 15 ml Röhrchen mit PBS überführt und zentrifugiert (540 x g, RT, 5 min). Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet je nach Zelllinie in das entsprechende Kulturmedium aufgenommen, auf Zellkulturflaschen verteilt und in den Brutschrank gestellt bei 37°C und 5 % CO₂.

2.4.2 Zählen von Zellen

Zur Bestimmung einer vorliegenden Zellzahl wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Dafür wurden von einer Zellsuspension 10 µl abgenommen und mit 10 µl einer Trypanblaulösung vermischt, um vitale Zellen zu detektieren. Ebenfalls 10 µl dieser Zelllösung wurden entnommen und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Die Zellen in den vier Quadranten, die sich nicht blau gefärbt haben und damit vital sind, wurden gezählt. Zur Berechnung der Zellzahl pro ml wurde folgende Formel verwendet: $(\sum \text{ aller gezählten Zellen} / 4) * 2 * 10^4 = \text{Zellen/ml}$.

2.4.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden je nach Konfluenz (70 % bis 90 %) passagiert bzw. eingefroren. Um Zellen in ausreichender Menge zu passagieren, wurde zunächst das jeweilige Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Anschließend wurde zum Lösen der adhärennten Zellen eine geeignete Menge vorgewärmtes Trypsin-EDTA zugegeben und für ca. 3 min bei 37°C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden in PBS aufgenommen und unmittelbar danach zentrifugiert (540 x g, RT, 5 min). Das entstandene Pellet wurde in dem für die Zellen geeigneten Medium resuspendiert, auf Zellkulturflaschen verteilt und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ gehalten. Die HUVEC wurden in EGM-2MV kultiviert, die M21-Zellen in RPMI mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep, die 293 Zellen in DMEM (4,5g/l Glukose) mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep und die MS1 Zellen in DMEM (4,5g/l Glukose) mit 5 % FCS und 1 % Pen/Strep.

2.4.4 Einfrieren von Zellen

Zur längeren Lagerung der Zelllinien wurden die jeweiligen Zellen zunächst trypsiniert, in PBS aufgenommen und zentrifugiert (540 x g, RT, 5 min). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in Einfriermedium aufgenommen und zu 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden daraufhin in ein Isopropanol Gefrierbehälter überführt und bei -80°C ü. N. gelagert, wo sie mit 1°C pro Minute einfroren. Am folgenden Tag wurden sie in ein Aufbewahrungsbehältnis bei -80°C überführt.

2.4.5 Präparation rekombinanter Adenoviren

Für die Infektion von Zellen mit rekombinanten Adenoviren, müssen diese zunächst in größerem Maßstab angereichert und aufgereinigt werden, sodass sie mit hoher Effizienz die zu untersuchenden Zellen infizieren. Dazu wird die Verpackungszelllinie 293 verwendet, die das fehlende E1-Genprodukt, welches in der viralen Transkription involviert ist, für die Replikation des Virus zur Verfügung stellt (Luo *et al.*, 2007).

2.4.5.1 Vermehrung rekombinanter Adenoviren

Für die Infektion der 293 Zellen wurden virale Lysate rekombinanter Adenoviren T2V2 (Kontrollintradiabody), JC7U (anti- $\alpha v \beta 3$ Intrabody) und #4 (anti- $\alpha v \beta 3 / \alpha 5 \beta 1$ Intradiabody) verwendet, die bereits vorlagen. Zunächst wurden 293 Zellen in kleinem Maßstab ausplattiert und infiziert, wobei die gewonnenen viralen Lysate für weitere Infektionen größerer Ansätze von 293 Zellen verwendet wurden. Vor Aussaat der 293 Zellen wurden die Flaschen für 1 h bei RT mit Poly-L-Lysin beschichtet, um eine bessere Adhäsion der 293 Zellen während der Infektion zu gewährleisten. Die Flaschen wurden anschließend mit PBS gespült und die Zellen in Nährmedium vergeben, sodass sie 24 h nach Aussaat zu ca. 70 % konfluent waren und mit den rekombinanten Adenoviren infiziert werden konnten. Die infizierten Zellen konnten per GFP-Expression mikroskopisch beobachtet werden und wurden ca. zwei Tage nach Infektion mit einem Zellschaber gelöst, zentrifugiert (480 x g, RT, 3 min) und der Überstand wurde bis auf 2 ml abgesaugt. Das Pellet wurde im verbleibenden Medium resuspendiert und nach vier Runden des Einfrierens in einem Trockeneis/Ethanol-Bad mit anschließendem Auftauen bei 37°C erneut zentrifugiert (2000 x g, RT, 10 min). Der dabei entstandene klare Überstand wurde aliquotiert und für weitere Infektionen bei -80°C gelagert. Der klare Überstand nach Präparation von infizierten 293 Zellen auf 5 x 175 cm² Flaschen wurde für die Präparation der rekombinanten Adenoviren mittels Cäsiumchlorid(CsCl)-Gradienten verwendet, um einen möglichst hohen Titer zu erhalten (*high titer preparation*).

2.4.5.2 Präparation rekombinanter Adenoviren mittels CsCl – Gradienten

Für die Präparation rekombinanter Adenoviren mittels CsCl-Gradienten wurde ausgehend von einer 15 %igen und einer 40 %igen CsCl-Lösung ein Gradient gegossen. Vom dem klaren Überstand nach Präparation von infizierten 293 Zellen auf 5 x 175 cm² Flaschen wurden 1 bis 2 ml davon vorsichtig auf den CsCl-Gradienten gegeben und in den SW41 Rotor einer Ultrazentrifuge überführt. Nach ca. 24 h Zentrifugation bei 26.000 rpm und 4°C wurde die virale Fraktion sorgfältig entnommen, in eine Slide-A-Lyzer Dialysekassette überführt und dreimal gegen eine Dialyselösung dialysiert (zweimal je 2 h und ein drittes Mal ü. N. bei 4°C). Nach der Dialyse wurden die gereinigten Viren aliquotiert, bei -80°C gelagert und konnten für *in vitro* Versuche verwendet werden. Die Virenkonzentration wurde mittels Lowry (2.3.2) ermittelt und in Viruspartikel pro ml umgerechnet. Dabei entsprechen 1 µg Protein 4 x 10⁹ Viruspartikeln. Alle Viruspräparationen wurden über das jeweils exprimierte GFP korrigiert, um die zu untersuchenden Zellen mit der gleichen Menge infektiöser viraler Partikel (MOI) zu infizieren.

2.4.6 Infektion von Zellen mit Hilfe rekombinanter Adenoviren

Für die Infektion verschiedener Zelllinien zur Expression von Intra(dia)bodies wurden rekombinante Adenoviren verwendet, um Einblicke in die physiologische und pathologische Bedeutung von Integrinen zu erhalten. Hierfür wurden HUVEC und M21-Zellen mit einer entsprechenden Multiplizität der Infektion (MOI) der Adenoviren infiziert, welche die spezifischen Intra(dia)bodies kodieren. Der optimale MOI sollte 100 % der Zellen infizieren und nicht toxisch für diese sein. Der für die beiden verwendete optimale MOI wurde bereits von Frau Dr. med. Kollmar in Vorarbeiten ermittelt. Die HUVEC wurden zu 100 % mit einem MOI von 50 infiziert, während M21-Zellen mit einem MOI von 250 infiziert wurden. Sollten eine 100 %ige Infektion dennoch nicht erreicht werden, können die Zellen mit einem Durchflusszytometer aufgrund der GFP-Expression sortiert werden.

2.4.7 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie, die sogenannte *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) - Analyse, bietet die Möglichkeit, einzelne Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität oder auch Oberflächenmoleküle zu untersuchen. Mit Hilfe eines Argonlasers werden die Zellen, welche in einem Flüssigkeitsstrahl hintereinander durch eine Messkammer (die Flusszelle) wandern, bestrahlt, was aufgrund ihrer Beschaffenheit bereits zu charakteristischem Streulicht der untersuchten Zellen führt. Sollen weitere Eigenschaften der Zellen bestimmt werden, so werden die zu untersuchenden Oberflächenmoleküle mit fluoreszierenden Antikörpern

markiert, wodurch sie beim Bestrahlen aufleuchten und das entsprechende Signal detektiert werden kann.

Die zu analysierenden Zellen wurden für die FACS-Analyse je nach Fragestellung entsprechend kultiviert und bei ausreichender Zellzahl untersucht.

Für die Oberflächenpräsentation verschiedener, nicht infizierter Zelllinien, wurden die Zellen kultiviert, für die FACS-Messung mit FITC-markierten Antikörpern inkubiert und anschließend detektiert. Sollte die Oberflächenexpression nach Infektion verschiedener Zelllinien untersucht werden, sind zunächst ausreichend Zellen infiziert worden, die an verschiedenen Tagen nach Infektion mit Hilfe biotinylierter Erst- bzw. Sekundärantikörper untersucht wurden.

2.4.7.1 FACS-Analyse mit FITC-markierten Antikörpern

Die zu analysierenden Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in PBS aufgenommen und in entsprechenden Röhrchen zentrifugiert (480 x g, RT, 3 min). Der Überstand wurde daraufhin abgesaugt und das Pellet auf Eis gehalten. Je nachdem, wie viele unterschiedliche Antikörperfärbungen mit den Zellen erfolgten, wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen FACS-Puffer resuspendiert und auf die Wells einer 96-well-Platte mit V-Boden verteilt. Anschließend wurde die Platte zentrifugiert (380 x g, 4°C, 5 min, ohne Bremse), vorsichtig ausgeschlagen und die Zellen wurden mit den gewünschten Integrin-Antikörpern (Endkonzentration 5 µg/ml), gelöst in FACS-Puffer, gefärbt. Hierfür wurden die Zellen in 100 µl pro Antikörperlösung resuspendiert und für 30 bis 60 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Danach wurde die Platte wie zuvor zentrifugiert, danach vorsichtig ausgeschlagen und die Zellen jedes Wells wurden mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (380 x g, 4°C, 5 min, ohne Bremse) wurden die Zellen mit dem geeigneten FITC-markierten Zweitantikörper (100 µl pro well) in einer 1:100 Verdünnung mit FACS-Puffer vermischt und für 30 bis 60 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen wie gehabt zentrifugiert, mit FACS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert, in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und im FACScan gemessen.

2.4.7.2 FACS-Analyse mit biotinylierten Antikörpern

Die zu analysierenden Zellen wurden analog der Durchführung (2.4.7.1) behandelt, wobei es sich entweder bereits bei dem ersten Antikörper oder bei dem Zweitantikörper um einen Biotin-konjugierten Antikörper handelte. Nach Zugabe des biotinylierten Antikörpers und nach einem Waschschriff mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit Streptavidin-APC in einer

1:100 mit FACS-Puffer gemischt und für weitere 30 bis 60 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen zentrifugiert (380 x g, 4°C, 5 min, ohne Bremse), mit FACS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert, in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und im FACSCalibur gemessen. Die Fluoreszenzintensität der untersuchten Moleküle wurde nach Abzug der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz mit Hilfe der Mittelwerte von jeweils 10000 gemessenen Zellen nach folgender Formel, beispielhaft für $\alpha_v\beta_3$, berechnet: $JC7U_{\alpha_v\beta_3}$ bzw. $\#4_{\alpha_v\beta_3}/T2V2_{\alpha_v\beta_3} * 100 \%$.

2.4.8 Zelladhäsionsassay

Zur Analyse, wie sich die veränderte Präsentation von Integrinen auf das Adhäsionsverhalten verschiedener Zelllinien auswirkt, wurden 96-well-Platten mit den für die zu untersuchenden Integrine spezifischen Glykoproteinen (Fibronektin, FN und Vitronektin, VN) der extrazellulären Matrix beschichtet. Dazu wurde eine 96-well-Platte mit 10 µg/ml FN, VN bzw. keinem Protein in PBS beschichtet und ü. N. bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung abgesaugt, mit PBS gespült und 2 h bei 37°C mit 2 % BSA/PBS geblockt. Die Platte wurde nach dem Blocken erneut mit PBS gewaschen und an der Luft getrocknet. Währenddessen wurden die zu untersuchenden Zellen trypsinisiert, in dem jeweiligen Medium resuspendiert und dreimal in serumfreien Medium gewaschen. Die Zellen wurden als Triplikate mit 1×10^4 Zellen pro well in serumfreien Medium ausplattiert und eine Stunde bei 37°C gehalten. Anschließend wurde die Zellsuspension abgesaugt, die Platte zweimal mit PBS gewaschen und pro well wurden 50 µl Substratpuffer vergeben. Nach Inkubation der Platten ü. N. bei 37°C wurden pro well 75 µl Stopp-Puffer zugegeben und die Absorption bei 405 nm gemessen.

2.4.9 Zellproliferationsassay

Die Analyse, wie sich eine veränderte Integrinpräsentation auf das Proliferationsverhalten verschiedener Zelllinien auswirkt, wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays (Promega) durchgeführt, dessen Prinzip auf der Umsetzung von Luziferin in Oxyluziferin beruht, wobei Licht freigesetzt wird. Das für die chemische Reaktion, dargestellt in Abb. 10, nötige ATP wird von den vorliegenden Zellen zur Verfügung gestellt und das gemessene Lumineszenzsignal ist proportional zu der ATP-Menge. Die vorhandene ATP-Menge wiederum ist direkt proportional zu der vorliegenden Zellzahl und spiegelt die Anzahl metabolisch aktiver Zellen wider.

Abb. 10: Quelle: Promega 2012. Die Luziferasereaktion des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays, bei der die Luziferase das Luziferin in Anwesenheit von ATP und molekularem Sauerstoff in Oxyluciferin umsetzt. Bei dieser Reaktion wird u. a. Energie in Form von Licht abgegeben wird.

Für die Proliferationsmessung wurden die zu untersuchenden Zellen in einer 96-well-Platte in einer sechsfach-Bestimmung mit 2000 Zellen pro well ausgesät und für 24, 48, 72 oder 96 Stunden bei 37°C inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden alle weiteren Schritte nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.10 Tube Formation Assay

Die Auswirkungen der Infektion von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) mit den verschiedenen Adenoviren auf deren Fähigkeit Kapillargefäße zu bilden wurde mit dem BD BioCoat™ Angiogenesis System-Endothelial Cell Tube Formation Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden dafür nicht infizierte und infizierte HUVEC zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion untersucht. Die Zellen wurden in einer Sechsfach-Bestimmung mit 2×10^4 Zellen pro well auf die mit Matrigel beschichtete, im Kit enthaltene, 96-well-Platte ausplattiert und für 16 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Bildung von Kapillargefäßen mikroskopisch untersucht und in Bildern festgehalten.

2.4.11 Chorioallantoismembran-Assay

Der Chorioallantoismembran-Assay (CAM-Assay) bietet eine Möglichkeit mit befruchteten Hühnereiern erste *in vivo* Versuche mit Tumorzellen durchzuführen und damit die Bildung von Tumoren, sowie die Angiogenese zu untersuchen. Die CAM von Hühnereiern ist eine dreischichtige, stark vaskularisierte Membran, die den Embryo umhüllt und während der Embryonalentwicklung als Gasaustausch dient (Deryugina and Quigley 2008).

Die für den CAM-Assay benötigten Geräte wurden vor jedem Gebrauch sterilisiert und während der Versuchsdurchführung mehrmals mit 70 %igem EtOH gereinigt bzw. zwischendurch kurz abgeflammt. Für erste *in vivo* Versuche mit infizierten M21-Zellen wurden die befruchteten Hühnereier am dritten Tag nach Beginn der Bebrütung bei 37°C und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit gefensteret. Dazu wurde oberhalb des Embryos ein maximal 1 cm² großes Fenster gesägt, um einen späteren Zugang zu der sich ausbildenden

Chorioallantoismembran (CAM) zu erhalten. Bevor die Eischale und die darunterliegende Eihaut entfernt werden konnte wurde sie mit Locke-Lösung befeuchtet, um die Schale leichter entfernen zu können. Zusätzlich wurde eine kleine Öffnung im Bereich der Luftblase gesägt, damit dort Luft entweichen kann, was wiederum das Absinken des Embryos begünstigte. Im Anschluss wurde beide Öffnungen mit Leukosilk S verschlossen und die Eier weiter bei 37°C und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am zehnten Tag nach Beginn der Bebrütung konnten auf die vollständig ausgebildete dreischichtige und gut durchblutete CAM Tumorzellen aufgebracht werden. Diese bildeten innerhalb der darauf folgenden sieben Tage einen Tumor aus, welcher am Ende der sieben Tage (Tag 17 nach Beginn der Bebrütung) entnommen und mittels Stereomikroskop fotografiert wurde. In diesem Versuch wurden pro befruchtetem Hühnerei 1×10^6 M21-Zellen vermisch mit Matrigel auf die CAM aufgetragen und das Tumorstadium der infizierten Zellen mit dem Tumorstadium nicht infizierter Zellen verglichen. Neben verwendeter nicht infizierter M21-Zellen wurden weitere M21-Zellen fünf Tage bevor sie auf die CAM aufgetragen wurden infiziert mit dem Kontrollintradibody T2V2, dem Intradibody JC7U (anti- $\alpha v \beta 3$) bzw. mit dem Intradibody #4 (anti- $\alpha v \beta 3 / \alpha 5 \beta 1$).

Für mögliche Kryoschnitte wurden die entnommenen CAM-Tumoren sofort für 15 min in 4 % PFA/PBS fixiert, anschließend dreimal je 15 min in PBS gespült, 1 h bei 4°C in 10 % Saccharose gehalten und danach ü. N. bei 4°C in 30 % Saccharose. Am nächsten Tag wurden die CAM-Tumoren in Tissue-Tek eingebettet und bei -20°C gelagert.

2.5 Immunhistochemische Methoden

2.5.1 Immunfluoreszenz von Zellen

Zur Untersuchung infizierter Zellen bezüglich der Lokalisation der verwendeten Intra(dia)bodies und der Integrine wurden infizierte und nicht infizierte HUVEC verwendet. Die Zellen wurden hierfür in einer ausreichenden Menge und in dem entsprechenden Medium auf eine 24-well-Platte ausplattiert, in die pro well ein Deckgläschen mit 1,2 cm Durchmesser gelegt wurde. Fünf Tage nach Infektion der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 0,3 ml eiskaltem Methanol pro well für 10 min bei -20°C inkubiert. Nach der Fixierung der Zellen wurde das Methanol abgesaugt, die Deckgläschen wurden an der Luft getrocknet und 10 min mit 0,2 % TritonX-100/PBS bei RT permeabilisiert. Anschließend erfolgte zum Blockieren unspezifischer Bindestellen eine weitere Inkubation von 1 h bei RT mit 1 % BSA in 0,2 % TritonX-100/PBS. Im nächsten Schritt wurden die Deckgläschen 1 h bei RT im Dunkeln, in einer feuchten

Kammer mit dem ersten Antikörper verdünnt in 1 % BSA in 0,2 % TritonX-100/PBS inkubiert. Die Antikörper für die Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5$ und $\beta 1$ wurden 1:100 verdünnt eingesetzt, der anti-PDI Antikörper 1:1000 für die Lokalisation des ER und der anti-HA Antikörper 1:500. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit 0,2 % TritonX-100/PBS gewaschen und für eine weitere Stunde bei RT im Dunkeln, in einer feuchten Kammer mit dem Zweitantikörper inkubiert. Der Zweitantikörper für die Integrine und das ER (Alexa Fluor 594 anti-maus Antikörper) wurde 1:200 und der Zweitantikörper für HA (FITC-markierter anti-Ratte Antikörper) wurde 1:500 verdünnt in 1 % BSA in 0,2 % TritonX-100/PBS eingesetzt. Nach drei weiteren Waschschritten wie zuvor erfolgte eine Färbung mit DAPI 1:10000 verdünnt in PBS für 10 min bei RT im Dunkeln, in einer feuchten Kammer. Zum Schluss wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und mit Fluoromount G auf Objektträger eingedeckt und ü. N. getrocknet. Die weitere Lagerung erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

2.5.2 Immunfluoreszenz von CAM-Tumoren

Die in Tissue-Tek eingebetteten CAM-Tumoren wurden für Fluoreszenzfärbungen zunächst in einem Kryostat mit einer Schnittdicke von 16 μm pro Schnitt geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und für weitere Untersuchungen bei -20°C gelagert.

Die zu färbenden Schnitte wurden zu Beginn für 45 min bei RT getrocknet und anschließend für 45 min mit 1 % BSA/PBS geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper MEP21 1:1000 verdünnt in 1 % BSA/PBS ü. N. im Dunkeln, in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (KPP) gewaschen und für 1 h bei RT im Dunkeln, in einer feuchten Kammer mit dem Zweitantikörper (*donkey anti-mouse*, Alexa Fluor 594) 1:200 verdünnt in 0,1 M KPP inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wie zuvor, folgte eine Färbung mit DAPI 1:40000 verdünnt in 0,1 M KPP für 10 min bei RT im Dunkeln, in einer feuchten Kammer. Zum Schluss wurden die Schnitte viermal mit 0,1 M KPP gewaschen und für mikroskopische Aufnahmen mit Fluoromount G eingedeckelt. Nachdem die eingedeckten Schnitte ü. N. bei RT, im Dunkeln getrocknet sind, wurden sie für eine längere Lagerung bei 4°C, im Dunkeln aufbewahrt.

2.6 Methoden des Phagen Display

Diese erstmals 1985 durch Smith eingeführte Technologie des Phagen Display bezeichnet die Präsentation fremder (Poly-)Peptide auf der Oberfläche von Phagenpartikeln (Smith 1985). Dazu wird das zu präsentierende Peptid auf genetischer Ebene mit einem Hüllprotein verbunden. Bei einem Antikörper Phagen Display werden Antikörperfragmente (*single chain variable fragment*, scFv oder *antigen binding fragment*, Fab) auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen präsentiert. Da es sich dabei um eine Vielzahl verschiedener Antikörperfragmente handelt, welche eine unterschiedlich hohe Affinität und Spezifität zu einem bestimmten Antigen aufweisen, bezeichnet man diese als Antikörper-Bibliothek (Hoogenboom *et al.*, 1998, Smith *et al.*, 2005).

2.6.1 Helferphagenpräparation

Der Einbau des Phagemid-Genoms kann jedoch nur nach Superinfektion mit einem Helferphagen erfolgen, da dieser die dafür fehlenden viralen Gene zur Verfügung stellt. In dieser Arbeit wurde der Helferphage VCSM13 verwendet, wobei über eines der Hüllproteine p3 jeweils ein Fab-Fragment präsentiert wird.

Es wurden 10 ml SB-Medium, versetzt mit Tetrazyklin (10 µg/ml), mit *E. coli* ER 2738 beimpft, für eine Stunde bei 37°C und 250 rpm inkubiert und im Anschluss 50 µl bereits vorhandene Helferphagen (VCSM13) zugegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C und 250 rpm wurden 500 ml SB-Medium, versetzt mit Tetrazyklin (10 µg/ml) und Kanamyzin (70 µg/ml), mit der 10 ml Kultur beimpft und ü. N. bei 37°C und 250 rpm erneut inkubiert. Am folgenden Tag wurde die 500 ml Kultur zentrifugiert (2700 x g, RT, 15 min), der Überstand aliquotiert (a 50 ml) und für 20 min bei 70°C erhitzt. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (2000 x g, RT, 20 min), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und der Titer bestimmt.

2.6.2 Titerbestimmung einer Phagenlösung

Damit der Titer einer Phagenlösung bestimmt werden konnte, wurden zunächst 10 ml SB-Medium, versetzt mit Tetrazyklin (10 µg/ml), mit *E. coli* ER 2738 beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 wachsen gelassen. Währenddessen wurde eine Verdünnungsreihe der zu bestimmenden Phagenlösung angesetzt (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9}), von der bei erreichter OD₆₀₀ jeweils 1 µl mit 50 µl der *E. coli* Kultur versetzt wurden. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden die Ansätze mit 3 ml vorgewärmten LB-Top-Agar vermischt, auf vorgewärmte Agarplatten ohne Antibiotikum verteilt und ü. N. im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die entstandenen Plaques gezählt und der Titer der Phagenlösung mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Anzahl der Plaques (pfu)} \times \text{Verdünnungsfaktor/ausplattiertes Volumen (ml)} = \text{pfu/ml}$$

2.6.3 Biopanning

In den letzten Schritten des Phagen Display werden *E. coli*-Zellen mit den pComb3XFab-Fragment Vektoren transformiert und die hoch affinen und spezifischen Fab-Fragmente mittels Biopanning (Abb. 11) selektiert und isoliert. Hierbei werden die *E. coli*-Zellen mit Helferphagen infiziert und die daraufhin auf der Oberfläche von Phagen präsentierten Fab-Fragmente sollen an das entsprechende immobilisierte Antigen binden. Durch mehrere Waschschrte innerhalb des Biopannings werden lediglich bindende Phagen isoliert, diese in *E. coli* amplifiziert und weiteren Runden eines Biopannings unterzogen (in der Regel erfolgen vier Runden).

Abb. 11: Quelle: Galanis *et al.*, 2001. Biopanning im Überblick zur Selektion hoch affiner und spezifischer Fab-Fragmente. Transformation der Antikörperbibliothek in *E. coli*, Infektion mit Helferphagen, Präsentation und Bindung der Fab-Fragmente an das gewünschte immobilisierte Antigen, Waschen zum Entfernen nicht gebundener Fab-Fragmente, Elution gebundener Fab-Fragmente, Amplifikation dieser und erneuter Beginn einer Biopanning Runde.

Zu Beginn eines Biopannings wurde zunächst die mit SfiI geschnittene DNA zusammen mit dem SfiI verdauten Vektor (pComb3X) ligiert und einer Ethanolpräzipitation unterzogen. Bei diesem Schritt wurden für eine Phagenbibliothek mindestens 7 µg geschnittener DNA eingesetzt, um eine möglichst große Variabilität zu gewährleisten. Anschließend wurden elektrokompenten *E. coli* ER2738 mit den gereinigten Ligationen transformiert (300 µl *E. coli* mit 1,4 µg DNA), in 5 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde das Gesamtvolumen mit SB-Medium, versetzt mit Carbenicillin (20 µg/ml), auf 15 ml erhöht und erneut 1 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Von diesem Ansatz wurde eine 1:100 Verdünnung mit SB-Medium angesetzt, wovon 10 und 100 µl auf Carbenicillinplatten ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert wurden. Bei dem restlichen Ansatz wurde die Carbenicillinkonzentration auf 50 µg/ml erhöht und ein weiteres Mal für 1 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Gesamtvolumen mit SB-Medium, versetzt mit Carbenicillin (50 µg/ml), auf 100 ml pro Ligation erhöht. Ebenfalls wurde pro Ligation 1 ml des Helferphagen VCSM13 zugegeben, die Ansätze gepoolt und in 500 ml Zentrifugenbecher überführt. Nach 2 h Inkubation bei 37°C und 300 rpm wurde Kanamycin mit einer Endkonzentration von 70 µg/ml zugegeben und der gesamte Ansatz ü. N. bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Für jede Selektionsrunde wurde am Vortag eine 96-well-Platte mit der entsprechenden Antigenkonzentration beschichtet und ü. N. bei 4°C inkubiert. Dabei wurde die Antigenkonzentration pro Selektionsrunde verringert. Angefangen bei 2x 250 ng/well in 25 µl PBS bis hin zu 1x 100 ng/well.

2.6.3.1 Selektionsrunden eines Biopannings

Die Übernachtskultur einer Phagenbibliothek wurde zentrifugiert (2700 x g, 15 min, 4°C) und der Überstand in einen neuen Zentrifugenbecher überführt. Dem Überstand wurden 1/5 des Gesamtvolumens 20 % PEG-8000/2,5 M NaCl zugegeben, dieses Gemisch wurde kurz geschwenkt und 30 min auf Eis gehalten. Während der Inkubation wurde die mit dem entsprechenden Antigen beschichtete 96-well-Platte ausgeschlagen. Zum Blocken wurden pro well 150 µl 3 % BSA/TBS vergeben und die Platte wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10.800 x g, 4°C, 30 min) des Ansatzes wurde der Überstand verworfen, das Pellet für 10 min bei RT getrocknet, in 1 % BSA/TBS resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert (16.000 x g, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde mit einer sterilen Spritze aufgezogen und über einen sterilen Filter (0,2 µm) in ein Eppendorfgefäß gegeben. Von dieser Phagenlösung wurden auf die beschichtete 96-well-Platte pro well 50 µl vergeben und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die restliche Phagenlösung wurde mit 0,02 %igem Natriumazid versetzt und bei 4°C gelagert. Während der zweistündigen

Inkubation wurde eine 2 ml *E. coli* (ER2738) Kultur vorbereite, wobei 2 ml SB-Medium mit Tetrazyklin (10 µg/ml) versetzt wurden. Diese Kultur wurde zwei bis zweieinhalb Stunden bei 250 rpm und 37°C geschüttelt. Nach der Inkubation der 96-well-Platte wurde diese ausgeschlagen und mit 0,05 %igem Tween/TBS gewaschen. Hierbei wurden 150 µl der Lösung pro well vergeben, damit sorgfältig gespült und nach 5 min ausgeschlagen. Wie oft dieser Waschvorgang während eines Biopannings wiederholt wird hängt vom Selektionsdruck ab, wobei am ersten Tag des Biopannings stets fünfmal gewaschen wurde. Zum Ende des Waschvorganges wurde einmal vorsichtig mit Wasser gespült. Die nun gebundenen Phagen wurden mit 50 µl/well frisch hergestelltem Trypsin (10 mg/ml) gelöst, wofür die 96-well-Platte 30 min bei 37°C gehalten wurde. Um einen Vergleich zu erhalten in Bezug auf die eingesetzten Phagen und denen die gebunden haben wurde der sogenannte Input bestimmt. Hierfür wurden eine 10^{-6} und 10^{-8} Verdünnung der eingesetzten Phagenlösung hergestellt und mit 50 µl der 2 ml *E. coli* Kultur 15 min bei RT inkubiert. Diese wurden danach auf Carbenicillinplatten ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert. Die trypsinierten Phagen wurden zu der verbliebenen *E. coli* Kultur gegeben und 15 min bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden 8 ml vorgewärmtes SB-Medium zugegeben, versetzt mit Carbenicillin (20 µg/ml), dieser Ansatz in ein 50 ml Röhrchen überführt und eine Stunde bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Zusätzlich wurde zur Bestimmung des sogenannten Output, den gebundenen Phagen, eine 10^{-2} Verdünnung angesetzt. Davon wurden 1 µl, 10 µl und 100 µl ebenfalls auf Carbenicillinplatten ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert. Nach einstündiger Inkubation der Kultur wurde die Carbenicillinkonzentration auf 50 µg/ml erhöht und erneut eine Stunde bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der Gesamtansatz auf 100 ml erhöht, wobei die Carbenicillinkonzentration erhalten bleibt und zusätzlich 1 ml des Helferphagen VCSM13 zugegeben wurde. Der gesamte Ansatz wurde in einen neuen Zentrifugenbecher überführt und zwei Stunden bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Zum Schluss wurde diesem Ansatz Kanamyzin (70 µg/ml) zugegeben und ü. N. bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Diese Selektionsrunde wurde insgesamt viermal durchgeführt, wobei sich die eingesetzte Menge des Antigens verringert und die Anzahl der durchgeführten Waschschrte erhöht hat, um eine entsprechende Selektion spezifisch bindender Phagen zu erreichen.

2.6.4 ELISA mit präsentierten Fab-Fragmenten

Für die Analyse einzelner Phagenklone bzw. oberflächenpräsentierter Fab-Fragmente wurde ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt, mit dessen Hilfe über eine Enzymreaktion die Bindung an ein spezifisches Antigen untersucht werden konnte.

2.6.4.1 ELISA mit einzelnen Phagenklonen

Für die Untersuchung einzelner Phagenklone auf deren Fähigkeit das entsprechende Antigen spezifisch zu binden, wurde eine 5 ml Kultur (SB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin) für jeden Klon angesetzt und mit diesem beimpft. Nach 8 h Inkubation bei 37°C und 250 rpm wurden pro Klon 1,5 µl abgenommen und als Back-Up auf Carbenicillinplatten ausplattiert. Dem restlichen Ansatz wurden jeweils 5 µl 0,5 M IPTG zugegeben und der gesamte Ansatz wurde ü. N. bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Zur Analyse der Klone wurde eine 96-well-Platte mit 100 ng des entsprechenden Antigens in einem Volumen von 25 µl PBS pro well vergeben und ü. N. bei 4°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Platten pro Klon mit einem anti-Fab Antikörper, einem anti-kappa Antikörper und einem IgG-Molekül mit 100 ng/well beschichtet. Als Kontrolle diente in diesem Versuch BSA. Am nächsten Tag wurde zunächst die beschichtete Platte ausgeschlagen und mit 150 µl 3 % BSA/TBS pro well 1 h bei 37°C inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Phagenklone zentrifugiert (2000 x g, RT, 15 min), vom Überstand jeweils 2 ml abgenommen und bei 4°C gelagert. Die Platte wurde anschließend dreimal mit deionisiertem H₂O gespült und es wurden pro well 50 µl eines IPTG induzierten Phagenklons vergeben. Als Negativkontrolle diente dabei das SB-Medium. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurde die Platte erneut ausgeschlagen und zehnmal mit deionisiertem H₂O gespült. Zur Detektion gebundener Klone wurden pro well 50 µl eines Peroxidase gekoppelten anti-HA Antikörpers (1:2000 verdünnt in 1 % BSA/TBS) vergeben und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde ein weiteres Mal ausgeschlagen und wie zuvor mit deionisiertem H₂O gespült. Zum Schluss wurden pro well 50 µl einer ABTS-Lösung vergeben und die Messung bei 405 nm erfolgte nach 1 h Inkubation bei RT am Multilabel Counter Wallac 1420.

2.6.4.2 Phagen ELISA

Für die Untersuchung mehrerer Phagen mit den auf ihrer Oberfläche präsentierten Fab-Fragmenten wurden die während einer Selektionsrunde eines Biopannings (2.6.3.1) gewonnene Phagenlösungen verwendet. Diese wurden vor Vergabe auf die 96-well-Platte 1:3 verdünnt in der Blocklösung und für 5 bis 60 min bei RT inkubiert. Wie in 2.6.4.1 beschrieben, wurde eine 96-well-Platte beschichtet, auf welche am folgenden Tag nach dem Blocken mit 3 % BSA/TBS 50 µl der Phagenlösung vergeben wurde. Für die Detektion mit Hilfe des Peroxidase gekoppelten anti-HA Antikörpers wurde wie in 2.6.4.1 fortgefahren. Des Weiteren konnten die Phagen mit Hilfe des bereits HRP-konjugierten anti-M13 (1:5000 verdünnt in 1 % BSA/TBS) Antikörpers detektiert werden oder des anti-g3p Antikörpers. Bei letzterem wurde mit 150 µl 5 % Milch/PBS geblockt, der anti-g3p Antikörper wurde 1:1000 verdünnt in

5 % Milch/PBS eingesetzt und zur Detektion erfolgte eine weitere Inkubation mit einem Peroxidase konjugierten anti-maus Antikörper (1:5000 verdünnt in 5 % Milch/PBS).

3 Ergebnisse

Die für die Infektion von humanen Nabelschnurendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC)) und humanen Melanomzellen (M21-Zellen) verwendeten Adenoviren sind zum 1.) ein Adenovirus, welches den Kontrollintradibody T2V2 kodiert, 2.) ein Adenovirus, der den Intrabody JC7U (anti- $\alpha v\beta 3$) kodiert und 3.) ein Adenovirus, der den Intradibody #4 (anti- $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$) kodiert. Im Folgenden wird die adenovirale Infektion als Infektion mit dem Kontrollintradibody T2V2, dem Intrabody JC7U und dem Intradibody #4 bezeichnet.

3.1 Die Infektion mit dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha v\beta 3$) und dem Intradibody #4 (anti- $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$) führt zu einer reduzierten Oberflächenpräsentation von Integrinen

Die sich auf der Zelloberfläche befindenden Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ sollten mit Hilfe verschiedener Intra(dia)bodies im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten werden, sodass sie auf der Zelloberfläche vermindert bzw. gar nicht präsentiert werden. Dazu wurden humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) mit einem MOI (*multiplicity of infection*) von 50 und humane Melanomzellen (M21) mit einem MOI von 250 mit rekombinanten Adenoviren infiziert. Die verwendeten Adenoviren kodierten für einen unspezifisch bindenden Kontrollintradibody T2V2, einen Intrabody gegen $\alpha v\beta 3$ (JC7U) und einen Intradibody gegen $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ (#4). Um die Funktionalität der Intra(dia)bodies zu überprüfen wurde die Oberflächenpräsentation der Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5$ und $\beta 1$ mittels Durchflusszytometrie untersucht. In Abb. 12 ist exemplarisch die Oberflächenpräsentation von $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5$ dargestellt.

Abb. 12: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenpräsentation der Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5$. A und B: HUVEC drei Tage nach Infektion. C und D: M21-Zellen fünf Tage nach Infektion. Die Infektion erfolgte mit dem Kontrollintradibody T2V2, mit dem Intradibody JC7U (anti- $\alpha v\beta 3$) und dem Intradibody #4 (anti- $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$) mit einem MOI von 50 bzw. 250. Schwarz: keine Färbung von $\alpha v\beta 3$ bzw. $\alpha 5$ von HUVEC bzw. M21-Zellen, grau: Färbung von $\alpha v\beta 3$ bzw. $\alpha 5$ von HUVEC bzw. M21-Zellen infiziert mit T2V2, blau: Färbung von $\alpha v\beta 3$ bzw. $\alpha 5$ von HUVEC bzw. M21-Zellen infiziert mit JC7U, grün: Färbung von $\alpha v\beta 3$ bzw. $\alpha 5$ von HUVEC bzw. M21-Zellen infiziert mit #4. Pro Messung wurden 10000 Zellen gezählt. Die Histogramme zeigen die Bindung biotinylierter Sekundärantikörper gegen die anti- $\alpha v\beta 3$ und anti- $\alpha 5$ Antikörper. Für die Detektion wurde Streptavidin-APC verwendet. Auf der Ordinate sind die gezählten Zellen in linearem Maßstab aufgetragen und auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität in logarithmischem Maßstab angegeben.

In der Abb. 12 ist die Präsentation von $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5$ auf der Oberfläche infizierter HUVEC und M21-Zellen zu sehen. Während die mit T2V2 infizierten Zellen eine hohe Fluoreszenzintensität bei $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5$ aufweisen, zeigt sich für $\alpha v\beta 3$ sowohl bei den mit JC7U infizierten Zellen, als auch bei den mit #4 infizierten Zellen eine stark verminderte Fluoreszenzintensität und somit eine herabgesetzte Oberflächenpräsentation von über 95 %. In Hinblick auf $\alpha 5$ ist bei den mit JC7U infizierten Zellen die Fluoreszenzintensität nicht vermindert, wohingegen diese bei den mit #4 infizierten Zellen deutlich herabgesetzt ist. Allgemein zeigt sich je nach verwendetem Intra(dia)body eine verringerte Oberflächenpräsentation der Moleküle gegen die sie gerichtet sind, wobei der Effekt bei dem Integrin $\alpha v\beta 3$ stärker ausgeprägt ist als bei $\alpha 5$.

Die Oberflächenpräsentation aller untersuchten Integrine ($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5$ und $\beta 1$) nach Infektion mit den Intra(dia)bodies JC7U und #4 aus jeweils fünf unabhängigen Versuchen ist für beide verwendeten Zelllinien (HUVEC und M21-Zellen) in den Abbildungen 13 und 14 zusammenfassend dargestellt.

Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse aus fünf unabhängigen Untersuchungen von HUVEC drei Tage (A), fünf Tage (B) und sieben Tage (C) nach Infektion mit dem Kontrollintradibody T2V2 (grau), dem Intradibody JC7U (anti- $\alpha v\beta 3$, blau) und dem Intradibody #4 (anti- $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$, grün) mit einem MOI von 50. Die Fluoreszenzintensität der untersuchten Moleküle $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5$ und $\beta 1$ wurde nach Abzug der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz mit Hilfe der Mittelwerte von jeweils 10000 gemessenen Zellen berechnet.

In Abb. 13 ist die Oberflächenpräsentation der Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$, sowie der Integrinuntereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$ drei, fünf und sieben Tage nach Gentransfer der Intra(dia)bodies mit den rekombinanten Adenoviren auf den HUVEC dargestellt. Im Vergleich zu den T2V2 infizierten Zellen, ist die Oberflächenpräsentation der Integrine nach Infektion mit JC7U und #4 reduziert. Das Integrin $\alpha v\beta 3$ ist sowohl bei den mit JC7U infizierten, als auch bei den mit #4 infizierten Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten mit maximal 1,7 % der Kontrolle auf der Oberfläche detektierbar. Bei dem Integrin $\alpha v\beta 5$ ist die Präsentation drei Tage nach Infektion auf ca. 50 % im Vergleich zur Kontrolle gesunken, fällt an Tag fünf nach Infektion erneut ab (ca. 20 % der Kontrolle) und steigt sieben Tage nach Infektion wieder leicht an (ca. 35 % der Kontrolle). Diese verminderte Präsentation von $\alpha v\beta 5$ ist bei den mit JC7U infizierten Zellen an allen drei untersuchten Tagen geringfügig stärker als

bei den mit #4 infizierten HUVEC. Die Integrinuntereinheit $\alpha 5$ ist bei den mit JC7U infizierten Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten leicht vermindert detektierbar (Präsentation zwischen 84 % und 96 % der Kontrolle), wohingegen drei Tage nach Infektion der Zellen mit #4 nur 33 % im Vergleich zur Kontrolle präsentiert werden. Am Tag sieben nach Infektion mit #4 ist $\alpha 5$ mit 58 % wieder vermehrt auf der Oberfläche detektierbar. Bei der Integrinuntereinheit $\beta 1$ zeigt sich drei und fünf Tage nach Infektion mit JC7U eine verminderte Oberflächenpräsentation (55 % bzw. 36 % der Kontrolle), die am Tag sieben wieder auf 52 % ansteigt. Der gleiche Effekt ist bei den mit #4 infizierten Zellen zu sehen. Am Tag drei nach Infektion finden sich auf der Zelloberfläche 55 % der Integrinuntereinheit $\beta 1$, fünf Tage nach Infektion 45 % und sieben Tage nach Infektion 68 %.

Das Integrin $\alpha \nu \beta 3$ ist demnach durch die Expression des Intrabodies JC7U auf der Zelloberfläche fast nicht detektierbar, sodass ein phänotypischer Knockout erzielt werden konnte. Neben diesem Knockout ist ebenfalls das Integrin $\alpha \nu \beta 5$ vermindert auf der Oberfläche präsentiert, sowie die Integrinuntereinheit $\beta 1$ und in geringem Maße die Integrinuntereinheit $\alpha 5$ und damit das gesamte Integrin $\alpha 5 \beta 1$, da $\alpha 5$ nur mit $\beta 1$ ein funktionelles Integrin bildet. Der phänotypische Knockout von $\alpha \nu \beta 3$ wird auch durch den verwendeten Intradiabody #4 induziert, ebenso wie die verminderte Oberflächenpräsentation des Integrins $\alpha \nu \beta 5$. Das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ ist durch die Verwendung des Intradiabodies #4 mit 33 % der Kontrolle auf der Oberfläche detektierbar, sodass ein phänotypischer Knockdown erzielt wurde.

Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse aus drei unabhängigen Untersuchungen von M21-Zellen fünf Tage nach Infektion mit dem Kontrollintradiabody T2V2 (grau), dem Intradiabody JC7U (anti- $\alpha \nu \beta 3$, blau) und dem Intradiabody #4 (anti- $\alpha \nu \beta 3 / \alpha 5 \beta 1$, grün) mit einem MOI von 250. Die Fluoreszenzintensität der untersuchten Moleküle wurde nach Abzug der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz mit Hilfe der Mittelwerte von jeweils 10000 gemessenen Zellen berechnet.

Die Oberflächenpräsentation der untersuchten Integrine fünf Tage nach Infektion der M21-Zellen, dargestellt in Abb. 14, zeigt sowohl bei den mit JC7U infizierten, als auch bei den mit #4 infizierten Zellen eine herabgesetzte Präsentation der jeweiligen Integrine. Die verminderte Oberflächenpräsentation ist bei den mit #4 infizierten Zellen bei allen analysierten Integrinen ausgeprägter als bei den mit JC7U infizierten Zellen. Entsprechend findet man bei $\alpha v\beta 3$ eine verminderte Präsentation von ca. 1,9 % (JC7U) bzw. 1 % (#4) der Kontrolle, bei $\alpha v\beta 5$ ca. 92 % bzw. 79 %, bei $\alpha 5$ ca. 92 % bzw. 43 % und bei $\beta 1$ ca. 87 % bzw. 78 % der Kontrolle.

Durch die Infektion der Zellen mit dem Intrabody JC7U und dem Intradiabody #4 lässt sich demnach ein phänotypischer Knockout von $\alpha v\beta 3$ erzielen, sowohl in humanen Nabelschnurendothelzellen, als auch in humanen Melanomzellen M21. Mit Hilfe des Intradiabodies #4 lässt sich zusätzlich ein phänotypischer Knockdown von $\alpha 5\beta 1$ in Nabelschnurendothel- und Melanomzellen erzielen. Verglichen mit den Endothelzellen ist die Oberflächenpräsentation des Integrins $\alpha v\beta 5$, sowie der Integrinuntereinheit $\beta 1$, auf den Melanomzellen nur geringfügig reduziert.

3.2 Die Expression der Intra(dia)bodies führt zur Lokalisation der Integrine im Endoplasmatischen Retikulum

Der verwendete Intrabody JC7U (anti- $\alpha v\beta 3$) und der Intradiabody #4 (anti- $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$) sollen ihre Zielintegrine aufgrund der angefügten KDEL-Sequenz im Endoplasmatischen Retikulum (ER) binden, den Transport zur Zelloberfläche verhindern und somit ihre Oberflächenpräsentation unterbinden. Zur Überprüfung der korrekten Funktion dieser Intra(dia)bodies wurde die subzelluläre Lokalisation der Integrine untersucht. Um die Lokalisation der Intra(dia)bodies und der entsprechenden Integrine zu bestimmen, wurden die mit verschiedenen Adenoviren infizierten HUVEC auf einem Deckgläschen fixiert, permeabilisiert und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Dabei wurden sowohl die Intra(dia)bodies, als auch die untersuchten Integrine detektiert. Zusätzlich wurde das Lumen des ER mit einem anti-PDI Antikörper angefärbt um eine Kolokalisation sichtbar zu machen. Für die Intra(dia)bodies wurde ein anti-HA Antikörper verwendet, der den HA-tag detektiert, welcher den Intra(dia)bodies angefügt ist. Die Detektion der Integrine erfolgte mit Hilfe von Antikörpern gegen $\alpha v\beta 3$, $\alpha 5$ bzw. $\beta 1$, die parallel mit dem anti-HA Antikörper inkubiert wurden, um gleichzeitig die Intra(dia)bodies zu detektieren. Die Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgten an einem konfokalen Mikroskop bei einer 630-fachen Vergrößerung. Die repräsentativen Bilder sind in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt.

Abb. 15: Koimmunfluoreszenz von HUVEC fünf Tage nach Infektion mit dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha v \beta 3$) bzw. dem Kontrollintradiabody T2V2 mit einem MOI von 50. Die Zellen wurden auf Deckgläschen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gefärbt. Die Detektion des Intrabodies erfolgte mit einem anti-HA Antikörper (grün). Für die Detektion des ER wurde ein anti-PDI Antikörper (rot) verwendet und für das Integrin ein anti- $\alpha v \beta 3$ (LM609, rot) Antikörper. Die Überlagerung der beiden Färbungen ist auf der rechten Seite der Abbildung in gelb dargestellt.

Abb. 16: Koimmunfluoreszenz von HUVEC fünf Tage nach Infektion mit dem Intradiabody #4 (anti- $\alpha v \beta 3 / \alpha 5 \beta 1$) mit einem MOI von 50. Die Zellen wurden auf Deckgläschen fixiert und permeabilisiert. Die Detektion des Intradiabodies erfolgte mit einem anti-HA Antikörper (grün), die Detektion des ER mit einem anti-PDI Antikörper (rot) und für die Integrine wurden ein anti- $\alpha v \beta 3$ (rot), ein anti- $\alpha 5$ (rot) bzw. ein anti- $\beta 1$ (rot) Antikörper verwendet. Die Überlagerung der beiden Färbungen ist auf der rechten Seite der Abbildung in gelb dargestellt.

In Abb. 15 ist die Lokalisation des Intrabodies JC7U (grün), des Lumens des ER (rot) und die des Integrins $\alpha\text{v}\beta 3$ (rot) an mit JC7U infizierten HUVEC, sowie die Lokalisation des Kontrollinradiabodies T2V2 und des Integrins $\alpha\text{v}\beta 3$ in mit T2V2 infizierten HUVEC dargestellt. Das Integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ und der Kontrollinradiabody T2V2 sind dabei unterschiedlich lokalisiert. Das Integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ befindet sich vorwiegend auf der Zelloberfläche, während der Intradiabody T2V2 innerhalb der Zelle lokalisiert ist. Der Intrabody JC7U hingegen kolokalisiert mit dem ER bzw. mit $\alpha\text{v}\beta 3$ innerhalb der infizierten Zellen (gelb). Eine Kolokalisation mit #4 infizierten HUVEC liefert ein ähnliches Ergebnis. Hier liegt eine Kolokalisation des Intradiabodies #4 (grün) und des Lumens des ER (rot), sowie von $\alpha\text{v}\beta 3$ (rot) und des Intradiabodies #4 vor (Abb. 16). Zusätzlich sieht man eine Kolokalisation des Intradiabodies mit der Integrinuntereinheit $\alpha 5$. Die $\beta 1$ -Integrinuntereinheit kolokalisiert in geringem Maß mit dem Intradiabody #4, wird jedoch zusätzlich auch auf der Zelloberfläche detektiert.

Die Abbildungen 15 und 16 zeigen, dass das Integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ mit Hilfe des Intrabodies JC7U bzw. des Intradiabodies #4 im ER lokalisiert vorliegt. Zudem liegt nach Expression des Intradiabodies #4 die Integrinuntereinheit $\alpha 5$ im ER vor, wohingegen sich die $\beta 1$ -Integrinuntereinheit auch auf der Zelloberfläche befindet.

Die Ergebnisse aus 3.1 und 3.2 zeigen, dass es durch die verwendeten Intra(dia)bodies möglich ist, die Integrine gegen die sie gerichtet sind im ER zurückzuhalten, was zu einer verminderten Oberflächenpräsentation der entsprechenden Integrine führt ($\alpha\text{v}\beta 3$ bzw. $\alpha 5\beta 1$) und zu einer ebenfalls verminderten Oberflächenpräsentation des Integrins $\alpha\text{v}\beta 5$ und der Integrinuntereinheit $\beta 1$. Damit erfüllen die Intra(dia)bodies die gewünschte Funktion, sodass weitere Untersuchungen zur Funktion der Integrine durchgeführt werden können.

3.3 Die Infektion mit dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha\text{v}\beta 3$) und dem Intradiabody #4 (anti- $\alpha\text{v}\beta 3/\alpha 5\beta 1$) hat keinen Einfluss auf die mRNA-Menge der Integrine

Die Infektion der HUVEC und M21-Zellen mit den rekombinanten Adenoviren könnte möglicherweise einen Einfluss auf die mRNA-Menge der untersuchten Integrine $\alpha\text{v}\beta 3$, $\alpha\text{v}\beta 5$, $\alpha 5$ und $\beta 1$ haben. Inwieweit dies zutrifft, wurde mit Hilfe der *realtime*-PCR untersucht. Neben nicht infizierten Zellen beider Zelllinien wurden mit dem Kontrollinradiabody T2V2, dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha\text{v}\beta 3$) und dem Intradiabody #4 (anti- $\alpha\text{v}\beta 3/\alpha 5\beta 1$) infizierte

Zellen fünf Tage nach Infektion mittels quantitativer *realtime*-PCR untersucht. Von jeder Zelllinie wurde die mRNA-Menge der Integrinuntereinheiten α_v , β_3 , β_5 , α_5 und β_1 mit spezifischen *primern* bestimmt. Die Untersuchung erfolgte pro Zelllinie mit jeweils drei biologischen Replikaten. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt.

Abb. 17: Quantitative Analyse der mRNA in HUVEC (links) und M21-Zellen (rechts). Die Zellen wurden fünf Tage nachdem sie mit dem Kontrollinradiabody T2V2 (grau), dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha_v\beta_3$, blau) und dem Intradiabody #4 (anti- $\alpha_v\beta_3/\alpha_5\beta_1$, grün) mit einem MOI von 50 bzw. 250 infiziert wurden untersucht. Zur Kontrolle wurde die mRNA-Menge in nicht infizierten Zellen untersucht. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Infektionen mit jeweils einer dreifach-Bestimmung der Integrinuntereinheiten α_v , β_3 , β_5 , α_5 und β_1 sind angegeben. Dargestellt sind die ΔC_T -Werte der jeweiligen Integrinuntereinheit in Bezug auf die ΔC_T -Werte des Referenzgens von GAPDH.

In der Abbildung 17 ist die relative mRNA-Menge infizierter HUVEC und M21-Zellen und der entsprechend nicht infizierten Zellen zu sehen. In beiden Zelllinien liegt die mRNA der β_5 -Untereinheit nur in geringen Mengen vor, wohingegen deutlich mehr mRNA der Untereinheiten α_5 und β_1 vorhanden ist. Bei den mit T2V2 infizierten HUVEC wurde bei allen Integrinuntereinheiten eine etwas höhere mRNA-Menge gemessen. Die mRNA-Menge der α_v -Untereinheit ist im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen ca. 2,7-fach erhöht und damit am stärksten durch die Infektion beeinflusst. Die M21-Zellen zeigen bei den mit T2V2 infizierten Zellen bis auf die mRNA-Menge von β_5 ebenfalls einen Anstieg der mRNA-Menge aller Integrinuntereinheiten im Vergleich mit nicht infizierten Zellen. Hier wurde bei der α_5 -Untereinheit die höchste mRNA-Menge gemessen (dreifach erhöht). Insgesamt wurde bei der adenoviralen Infektion der Zellen nur ein geringer Einfluss auf die mRNA-Menge gemessen. Die Infektion scheint dementsprechend keinen relevanten Einfluss auf die vorliegende

mRNA-Menge der untersuchten Integrine in humanen Nabelschnurendothelzellen und humanen Melanomzellen M21 zu haben.

3.4 Die herabgesetzte Oberflächenpräsentation von Integrinen hemmt die Proliferation der Endothelzellen

Da Integrine u. a. den Prozess der Proliferation regulieren (van der Flier and Sonnenberg 2001), wurde in einem Proliferationsassay mit dem CellTiterGlo Kit das Proliferationsverhalten von HUVEC und M21-Zellen nach Infektion mit den rekombinanten Adenoviren untersucht. Die zu untersuchenden Zellen wurden dafür drei Tage nach Infektion mit dem Kontrollintradibody T2V2, dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha v\beta 3$) und dem Intradibody #4 (anti- $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$) in einer sechsfach-Bestimmung in einer 96-well-Platte ausgesät und für bis zu 96 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das angegebene Lumineszenzsignal ist proportional zu der vorliegenden Zellzahl und wurde mit einem Luminometer zu den gewünschten Zeitpunkten gemessen. Bei den HUVEC wurden vier biologische Replikate untersucht und bei den M21-Zellen zwei biologische Replikate. Die Proliferationsmessungen sind in Abb. 18 dargestellt.

Abb. 18: Proliferationsassay mit HUVEC und M21-Zellen, die drei Tage nach Infektion mit dem Kontrollintradibody T2V2, dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha v\beta 3$) und dem Intradibody #4 (anti- $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$) in einer sechsfach-Bestimmung mit jeweils 2000 Zellen pro well ausgesät wurden. Das Lumineszenzsignal wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aussaat mit Hilfe eines Luminometers gemessen. Dieses gemessene Licht wird bei der Umsetzung von Luziferin in Oxyluziferin durch die Luziferase in Anwesenheit von zelleigenem ATP und molekularem Sauerstoff freigesetzt.

Die mit JC7U und #4 infizierten Nabelschnurendothelzellen zeigten eine signifikant ($p \leq 0,05$) verminderte Proliferation im Vergleich zu den Zellen, die mit dem Kontrollintradiabody T2V2 infiziert wurden. Über den Messzeitraum zeigt sich bei den Kontrollzellen zunächst ein deutlicher Anstieg des Lumineszenzsignals, das nach 48 h ein Maximum erreicht hat. Im Vergleich dazu zeigt das Lumineszenzsignal bei den mit JC7U bzw. mit #4 infizierten Zellen über den Zeitverlauf keinen Anstieg. Bei den M21-Zellen hingegen zeigte sich ein allgemeiner Proliferationsanstieg aller infizierten Zellen, wobei die mit JC7U infizierten Zellen im gemessenen Zeitraum das höchste Signal zeigen.

Der Knockout von $\alpha v \beta 3$ mittels JC7U führt bei den Nabelschnurendothelzellen zu einer deutlich verminderten Proliferation, wohingegen der zusätzliche Knockdown von $\alpha 5 \beta 1$ mittels #4 einen geringeren Einfluss auf die Proliferation hat. Die Melanomzellen M21 hingegen proliferieren bei dem Knockout von $\alpha v \beta 3$ geringfügig besser als kontrollinfizierte Zellen, wohingegen die Kombination des Knockouts von $\alpha v \beta 3$ und des Knockdown von $\alpha 5 \beta 1$ zu einer leicht verminderten Proliferation führt. Durch die veränderte Oberflächenpräsentation der untersuchten Integrine kommt es zu einem zellspezifischen Effekt, bei dem die Nabelschnurendothelzellen kaum in der Lage sind zu proliferieren. Die Proliferation der Melanomzellen M21 bleibt dabei uneingeschränkt.

3.5 Die Reduktion der Integrinpräsentation vermindert die Adhäsionskapazität von Endothel- und Melanomzellen

Eine der Hauptfunktion der Integrine als Zelladhäsionsmoleküle ist die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion (van der Flier and Sonnenberg 2001), wobei die Fähigkeit von Zellen zur Adhäsion essentiell für das Überleben ist. Inwieweit die verminderte Oberflächenpräsentation der untersuchten Integrine einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von Endothel- und Melanomzellen hat, wurde in einem Adhäsionsassay untersucht. Dafür wurden infizierte HUVEC und M21-Zellen fünf Tage nach Infektion mit dem Kontrollintradiabody T2V2, dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha v \beta 3$) und dem Intradiabody #4 (anti- $\alpha v \beta 3 / \alpha 5 \beta 1$) in serumfreien Medium auf beschichtete Kulturplatten zur Adhäsion ausgesät. Die bei 405 nm gemessene Absorption, dargestellt in Abb. 19, präsentiert die Enzymaktivität des endogenen Enzyms β -Hexosaminidase bei der Hydrolyse von p-nitrophenyl N-acetyl-beta-D-glucosaminid und ist umso höher je mehr Zellen adhären.

Abb. 19: Adhäsionsassay mit HUVEC und M21-Zellen fünf Tage nach Infektion mit dem Kontrollintradibody T2V2, dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha v \beta 3$) und dem Intradibody #4 (anti- $\alpha v \beta 3 / \alpha 5 \beta 1$). Eine 96-well-Platte wurde mit je 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronectin (FN) bzw. Vitronectin (VN) beschichtet, sowie mit BSA als Kontrolle. In Triplikaten wurden pro well 1×10^4 Zellen in serumfreiem Medium ausplattiert und für 60 min bei 37°C inkubiert. Dargestellt sind die Werte aus vier unabhängigen Experimenten.

Der Adhäsionsassay in Abb. 19 zeigt das Adhäsionsvermögen infizierter HUVEC und M21-Zellen an Fibronectin (FN) und Vitronectin (VN), sowie als Kontrolle an BSA. Sowohl die mit dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha v \beta 3$), als auch die mit dem Intradibody #4 (anti- $\alpha v \beta 3 / \alpha 5 \beta 1$) infizierten Zellen zeigen eine verminderte Adhäsion an Fibronectin und Vitronectin verglichen mit Zellen, die mit dem Kontrollintradibody T2V2 infiziert wurden und eine geringe, unspezifische Adhäsion an BSA. Die Adhäsion ist bei den HUVEC insgesamt stärker herabgesetzt als bei den M21-Zellen. Bei den mit JC7U infizierten HUVEC ist die Adhäsion an die beiden Matrixmoleküle Vitronectin und Fibronectin mit 65 % bzw. 67 % ähnlich reduziert. Nach Infektion mit dem Intradibody #4 ist die Adhäsionskapazität an Vitronectin um ca. 73 % reduziert, wohingegen der Effekt auf die Adhäsionskapazität an Fibronectin mit ca. 60 % der Kontrolle etwas schwächer ist.

Betrachtet man die M21-Zellen, so findet man bei den mit JC7U infizierten Zellen bezüglich des Vitronectins eine verminderte Adhäsion von ca. 16 % und eine um 19 % herabgesetzte Adhäsion an Fibronectin. Bei den mit #4 infizierten Zellen zeigt sich eine verminderte Adhäsion an Vitronectin um ca. 23 % und an Fibronectin um ca. 40 % der Kontrolle.

Demnach sind Endothel- und Melanomzellen durch die verminderte Oberflächenpräsentation der untersuchten Integrine weniger in der Lage an die beiden Matrixmoleküle Fibronectin und Vitronectin zu binden. Insgesamt ist die Adhäsionskapazität an Fibronectin und Vitronectin bei den Endothelzellen stärker eingeschränkt als bei den Melanomzellen. Dies bestätigt die durch die Integrine $\alpha v \beta 3$ und $\alpha 5 \beta 1$ vermittelte Adhäsion an Fibronectin und Vitronectin und deren Rolle bei der Vermittlung von Zell-Matrix-Interaktionen.

3.6 Das Potential zur Gefäßbildung der Endothelzellen wird durch eine herabgesetzte Integrinpräsentation aufgehoben

Endothelzellen und Perizyten besitzen jegliche Voraussetzung, um Kapillaren oder sogar komplexe Netzwerke von Kapillaren zu bilden (Folkman and Shing 1992). Zur Untersuchung, welchen Einfluss die Integrine auf die Kapillarbildung durch Endothelzellen haben, wurde ein *tube formation assay* als Modell für eine *in vitro* Angiogenese durchgeführt. Hierbei wurden humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) eingesetzt, die mit rekombinanten Adenoviren infiziert wurden. Mit Hilfe des verwendeten Kits (BD BioCoat™ Angiogenesis System-Endothelial Cell Tube Formation Assay) ist es möglich, die dreidimensionale Organisation von Endothelzellen zu kapillarähnlichen Strukturen zu beobachten. Die im Kit mitgeführte schwarze 96-well-Platte ist mit einer speziellen Matrigel Matrix beschichtet, die für die endotheliale Bildung von gefäßähnlichen Strukturen optimiert worden ist. Für den Versuch wurden zwei verschiedene Chargen von HUVEC mit den drei vorliegenden Intra(dia)bodies (Kontrollinradiabody T2V2, anti- $\alpha v \beta 3$ Intrabody JC7U und anti- $\alpha v \beta 3 / \alpha 5 \beta 1$ Intradiabody #4) mit einem MOI von 50 infiziert und drei bzw. fünf Tage nach Infektion neben nicht infizierten Zellen in einer sechsfach-Bestimmung ausgesät. Die Untersuchung der Kapillarbildung erfolgte innerhalb von 16h und wurde mit einem Lichtmikroskop dokumentiert. In Abb. 20 ist die Bildung von Kapillaren exemplarisch für alle Zellen dargestellt. Zusätzlich wurden die vollständig gebildeten Verbindungen zwischen zwei Abzweigungen gezählt und untereinander verglichen.

A

B

Abb. 20: (A) *Tube formation assay* mit nicht infizierten HUVEC (n.i.) und infizierten HUVEC, die drei bzw. fünf Tage nach Infektion mit dem Kontrollintradibody T2V2, dem Intradibody JC7U bzw. dem Intradibody #4 auf eine 96-well Platte ausgesät wurden. Pro Ansatz erfolgte eine sechsfach-Bestimmung mit zwei verschiedenen Chargen der HUVEC, die 16h bei 37°C auf einer Platte mit Matrigel inkubiert wurden. (B) Dargestellt sind vollständig ausgebildete Verbindungen zwischen zwei Abzweigungen innerhalb der untersuchten Fläche.

Während die mit dem Kontrollintradibody T2V2 infizierten Zellen sich ähnlich wie die nicht infizierten Zellen verhalten und in der Lage sind Kapillaren zu bilden, ist dieses Verhalten bei den anderen beiden Intra(dia)bodies nur eingeschränkt bzw. nicht zu beobachten. Drei Tage nach Infektion sind die mit JC7U und #4 infizierten Zellen weniger fähig Kapillaren auszubilden als nicht infizierte oder mit T2V2 infizierte Zellen, wobei der Effekt bei #4 deutlicher ist als bei JC7U. Fünf Tage nach Infektion ist die Kapillarbildung bei den mit JC7U infizierten Zellen noch deutlicher reduziert, wohingegen sich bei den mit #4 infizierten Zellen ein ähnliches Bild zeigt wie schon drei Tage nach Infektion.

Durch den Knockout des Integrins $\alpha_v\beta_3$ bzw. den zusätzlichen Knockdown von $\alpha_5\beta_1$ sind Endothelzellen nicht mehr in der Lage gefäßähnliche Strukturen zu bilden, wobei die Kombination von zwei Integrinen größere Auswirkungen hat als das Fehlen eines Integrins. Den Endothelzellen ist somit die Fähigkeit der dreidimensionalen Anordnung zur Bildung von kapillarähnlichen Strukturen fast vollständig verloren gegangen, womit die essentielle Rolle der untersuchten Integrine für die Fähigkeit der Ausbildung von Blutgefäßen unterstrichen wird.

3.7 Das Tumorwachstum ist durch die veränderte Integrinpräsentation nicht beeinflusst

Die Relevanz der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ für das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese ist bekannt, jedoch wurden widersprüchliche Ergebnisse (Eliceiri and Cheresh 1999, Kumar *et al.*, 2001, Reynolds *et al.*, 2009, Reynolds *et al.*, 2002) hinsichtlich ihrer genauen Funktion in diesen Prozessen publiziert. Aufgrund dieser vorliegenden Ergebnisse wurde der Einfluss der veränderten Oberflächenpräsentation der untersuchten Integrine auf Melanomzellen für die Tumorbildung, das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese untersucht. Um dies zu analysieren, wurden für erste *in vivo* Versuche mit M21-Zellen befruchtete Hühnereier verwendet. Am zehnten Tag nach Beginn der Bebrütung der befruchteten Eier werden auf die vollständig ausgebildete dreischichtige und gut durchblutete Chorioallantoismembran (CAM) Tumorzellen aufgebracht. Diese bilden innerhalb der darauffolgenden sieben Tage einen Tumor aus, welcher am Ende der sieben Tage entnommen und untersucht werden kann. In diesem Versuch wurden nicht infizierte M21-Zellen, sowie mit dem Kontrollintradiabody T2V2, dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha_v\beta_3$) und dem Intradiabody #4 (anti- $\alpha_v\beta_3/\alpha_5\beta_1$) infizierte Zellen verwendet. Pro befruchtetem Hühnerei wurden 1×10^6 Zellen auf die CAM aufgetragen. Abschließend wurde das Tumorwachstum der infizierten Zellen untereinander, sowie mit dem Tumorwachstum nicht infizierter Zellen verglichen. Das Ergebnis des CAM-Assays ist in Abb. 21 exemplarisch dargestellt.

Abb. 21: CAM-Tumoren von nicht infizierten M21-Zellen und M21-Zellen die mit dem Kontrollintradibody T2V2, dem Intrabody JC7U (anti- $\alpha v \beta 3$) und dem Intradibody #4 (anti- $\alpha v \beta 3 / \alpha 5 \beta 1$) infiziert wurden. Pro befruchtetem Hühnerei wurden zehn Tage nach Beginn der Bebrütung jeweils 1×10^6 Zellen fünf Tage nach Infektion dieser Zellen auf die CAM von Hühnereiern aufgebracht. Am Tag 17 wurden die Tumoren entfernt und in 4 % PFA fixiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Fluoreszenz-Stereomikroskop bei achtfacher Vergrößerung.

In Abbildung 21 sind exemplarisch vier Tumoren, von nicht infizierten M21-Zellen und M21-Zellen abgebildet, die mit T2V2, JC7U oder #4 mit einem MOI von 250 infiziert wurden. Die entstandenen Tumoren unterscheiden sich in ihrer Größe nur minimal, allerdings fallen Unterschiede hinsichtlich der Blutgefäße auf, die sie umgeben bzw. durchziehen. Die Größe der gebildeten Tumoren nicht infizierter Melanomzellen liegt bei 4 mm und die Größe der Tumoren ausgehend von Melanomzellen infiziert mit dem Kontrollintradibody T2V2 liegt zwischen 3 und 4,5 mm. Bei den Tumoren von Melanomzellen infiziert mit JC7U oder #4 liegt die Tumorgöße zwischen 2,5 und 4,5 mm. Insgesamt sind die Tumoren mit einer maximalen Größe von 4,5 mm sehr klein und bei den Tumoren aus Melanomzellen, die mit JC7U oder #4 infiziert wurden, wurde eine relativ große Volumenvarianz gemessen.

Der phänotypische Knockout des Integrins $\alpha v \beta 3$ allein, sowie in Kombination mit einem zusätzlichen Knockdown von $\alpha 5 \beta 1$, beeinflussen das Tumorwachstum in diesem Versuchsaufbau nur in geringem Maß. Allerdings scheint die Durchblutung der Tumoren,

denen nur das Integrin $\alpha v \beta 3$ fehlt, beeinträchtigt zu sein. Dies trifft aber nicht für die Kombination mit einer verminderten Präsentation des Integrins $\alpha 5 \beta 1$ zu.

3.8 Die beeinträchtigte Tumorangiogenese bei mit JC7U (anti- $\alpha v \beta 3$) infizierten Melanomzellen führt zu einer eingeschränkten Durchblutung der Tumoren

Um die Blutversorgung der CAM-Tumoren genauer zu untersuchen, wurden von den in 3.7 beschriebenen Tumoren Kryoschnitte angefertigt und nachfolgend immunhistochemisch untersucht. Mit Hilfe des anti-MEP21 Antikörpers (megakaryozytär-erythrozytäre Progenitorzellen, MEP), der das zur CD 34-Familie (Endothelzellmarker) zugehörige Podocalyxin bindet, wurden Blutkapillaren innerhalb der CAM-Tumoren detektiert. Diese Färbung liefert einen Hinweis darauf, wie stark die jeweiligen Tumoren durchblutet sind. In Abb. 22 ist für die in 3.7 beschriebenen Tumoren exemplarisch die MEP21-Färbung dargestellt.

Abb. 22: MEP21-Färbung von CAM-Tumoren (200-fache Vergrößerung), bei der reife Endothelzellen detektiert werden. Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt aus der Tiefe eines Tumors, in dem sich neue Blutgefäße detektieren lassen.

Mit Hilfe des anti-MEP21 Antikörpers konnten reife Endothelzellen innerhalb der Tumoren detektiert werden, wobei die in der Tiefe des Tumors dargestellten Endothelzellen neu

gebildete Blutgefäße sind. Die MEP21-Färbung zeigt bei den Tumoren, gebildet aus mit JC7U infizierten M21-Zellen, fast ausschließlich viele kleine Blutgefäße und nur vereinzelt ein größeres Blutgefäß. Bei den Tumoren aus kontrollinfizierten Zellen und den Tumoren aus mit #4 infizierten Zellen hingegen sind neben wenigen kleinen Blutgefäßen zusätzlich größere Blutgefäße zu sehen, welche innerhalb der Tumoren vorliegen.

Es scheint den Tumoren trotz veränderter Oberflächenpräsentation der untersuchten Integrine möglich zu sein, Angiogenese zu induzieren, allerdings unterscheiden sich die neu gebildeten Blutgefäße in deren Größe und Durchmesser, was auf eine unterschiedliche Durchblutung des Tumors hindeutet.

3.9 Die herabgesetzte Integrinpräsentation führt bei Endothelzellen zur veränderten Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden

Die Übertragung von Signalen über Integrine ist bekannt und für verschiedene Signalwege von großer Bedeutung. Eine durch Adhäsion induzierte Signalweiterleitung über Integrine reguliert beispielsweise das Überleben von Endothelzellen und die Angiogenese über den PI3K/Akt Signalweg (Shiojima and Walsh 2002). Dabei spielt die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt eine entscheidende Rolle für das Überleben von Zellen. Die Adhäsion von Endothelzellen über Integrine an die extrazelluläre Matrix (EZM) kann z. B. auch zur Aktivierung von p44/42 (Erk1/Erk2) des MAPK Signalweges führen und somit zur Proliferation, Migration und Angiogenese (Davis and Senger 2005, Hood *et al.*, 2003). Inwiefern die veränderte Oberflächenpräsentation einen Einfluss auf die Übermittlung von Signalen bei Endothelzellen hat, welche Proteine involviert sind und ob möglicherweise der *crosstalk* von Integrinen untereinander beeinträchtigt ist, wurde mit Hilfe von Western Blot Analysen untersucht. Dazu wurden zunächst humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) jeweils mit den drei vorliegenden rekombinanten Adenoviren (Kontrollintradiabody T2V2, anti- $\alpha\text{v}\beta 3$ Intrabody JC7U und anti- $\alpha\text{v}\beta 3/\alpha 5\beta 1$ Intradiabody #4) mit einem MOI von 50 infiziert. Fünf Tage nach Infektion wurde von diesen Zellen Proteinlysate hergestellt und jeweils 20 μg Proteinlysate aufgetragen (Abb. 23).

Abb. 23: Western Blot Analyse von Proteinlysaten infizierter HUVEC. Die Zellen wurden jeweils mit den drei rekombinanten Adenoviren (Kontrollinradiabody T2V2, anti- α v β 3 Intrabody JC7U und anti- α v β 3/ α 5 β 1 Intradiabody #4) mit einem MOI von 50 infiziert. Fünf Tage nach Infektion wurden die jeweiligen Proteinlysate hergestellt. Eingesetzt wurden Antikörper gegen PI3K, p44/42, phospho p44/42, Akt, phospho Akt und als Referenz Aktin.

Die Western Blot Analyse zeigt, dass bei den mit JC7U und #4 infizierten Endothelzellen im Vergleich mit kontrollinfizierten Endothelzellen (T2V2) eine Veränderung der Proteinmenge bei der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) vorliegt, sowie eine unterschiedliche Phosphorylierung von p44/42 (phospho p44/42) und Akt (phospho Akt). Im Vergleich zu kontrollinfizierten Zellen liegt bei den mit JC7U infizierten Zellen weniger PI3K vor, etwas mehr phospho p44/42 und deutlich mehr phospho Akt. Bei den mit #4 infizierten Zellen hingegen liegt im Vergleich zu kontrollinfizierten Zellen mehr PI3K vor und deutlich mehr phospho Akt, wohingegen bei phospho p44/42 die Proteinmenge gleich ist.

Somit führt der Knockout von α v β 3 zu einer verminderten Proteinmenge von PI3K, während eine vermehrte Phosphorylierung von p44/42 (phospho p44/42) und Akt (phospho Akt) erfolgt. Der zusätzliche Knockdown von α 5 β 1 führt zu einer vermehrten Proteinmenge von PI3K und zur Phosphorylierung von Akt (phospho Akt), während p44/42 unverändert vorliegt. Die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt erfolgt beim Knockout von α v β 3 im gleichen Ausmaß wie bei dem zusätzlichen Knockdown von α 5 β 1, während die Aktivierung von p44/42 nur bei dem Knockout von α v β 3 allein erfolgt. Diese Integrine scheinen demnach die untersuchten Signalwege unterschiedlich zu regulieren und jedes Integrin ist womöglich nicht in jedem Signalweg involviert.

3.10 Etablierung und Anwendung des Phagen Display

Das Phagen Display mit Antikörperfragmenten ermöglicht es, Fab-Fragmente zu generieren und aus diesen spezifisch bindende Fab-Fragmente gegen ein bestimmtes Antigen zu isolieren. Die Selektion eines spezifisch bindenden Antikörperfragmentes, ausgehend von einer Vielzahl verschiedener Fab-Fragmente, stellt die Grundlage zur Generierung neuer Intrabodies bzw. Intradiabodies dar und sollte daher zunächst als Methodik im Rahmen dieser Arbeit etabliert und anschließend angewendet werden.

3.10.1 Immunisierung der Kaninchen gegen die Integrine $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ bzw. $\alpha 5 \beta 1$

Mittels Phagen Display sollen spezifisch bindende Fab-Fragmente gegen die Integrine $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ bzw. $\alpha 5 \beta 1$ generiert und isoliert werden. Zur Selektion spezifischer Fab-Fragmente, die an diese Integrine binden sind bereits Kaninchen mit dem jeweiligen Integrin erfolgreich immunisiert worden, was mit Hilfe eines ELISA untersucht wurde und in Abb. 24 dargestellt ist. Das von den Kaninchen gewonnene Serum wurde zusammen mit dem entsprechenden Antigen inkubiert und die gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörpers detektiert. Zusätzlich wurde das Serum in einer durchflusszytometrischen Analyse mit humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) und Mausendothelzellen (MS1) untersucht, wobei bindende Antikörper mit Hilfe FITC-markierter Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) detektiert werden konnten. Das Ergebnis ist in Abb. 24 dargestellt.

Abb. 24: (A) ELISA mit den Seren von Kaninchen, die mit dem Antigen $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ oder $\alpha 5 \beta 1$ immunisiert wurden. Die wells einer 96-well-Platte wurden pro well mit 100 ng des jeweiligen Antigens in 25 μ l PBS ü. N. bei 4°C beschichtet. Als Negativkontrolle wurde die Bindung an BSA untersucht. Die verdünnten Seren wurden 2 h bei 37°C mit dem spezifischen Antigen bzw. BSA inkubiert und mit Hilfe eines Peroxidase gekoppelten anti-Kaninchen Antikörpers wurden die gebundenen Antikörper bei 405 nm nach Zugabe einer ABTS-Lösung detektiert. (B) Durchflusszytometrische-Analysen der Seren mit humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) und murinen Endothelzellen (MS1). Schwarz: keine Färbung der HUVEC bzw. MS1-Zellen mit einem Serum, grün: Färbung des $\alpha v \beta 3$ von HUVEC bzw. MS1-Zellen inkubiert mit dem $\alpha v \beta 3$ -Serum, rot: Färbung von $\alpha v \beta 5$ von HUVEC bzw. MS1-Zellen inkubiert mit dem $\alpha v \beta 5$ -Serum, blau: Färbung von $\alpha 5 \beta 1$ von HUVEC bzw. MS1-Zellen inkubiert mit dem $\alpha 5 \beta 1$ -Serum. Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe FITC-markierter anti-Kaninchen Antikörper detektiert.

Der in Abb. 24 (A) dargestellte ELISA mit den verwendeten Seren immunisierter Kaninchen gegen die Integrine $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ bzw. $\alpha 5 \beta 1$ zeigt für jedes gewonnene Serum ein hohes Signal bei dem entsprechenden spezifischen Antigen, mit welchem das Kaninchen immunisiert worden ist. Die Negativkontrolle mit BSA zeigt bei allen eingesetzten Seren einen sehr geringen Hintergrundwert. Die durchflusszytometrischen Analysen (Abb. 24 (B)) mit humanen und murinen Endothelzellen zeigen bei beiden Zellarten eine Bindung an das native Antigen und vermutlich eine Kreuzreaktivität.

Somit sind durch die Immunisierung von Kaninchen mit den Integrinen $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ bzw. $\alpha 5 \beta 1$ polyklonale Antikörper gegen diese Integrine gebildet worden, die das jeweilige native Integrin sowohl auf humanen als auch auf murinen Endothelzellen binden und demzufolge kreuzreaktiv sind. Dementsprechend liegen spezifisch bindende Antikörper vor, sodass die Grundlage zur Anwendung des Phagen Display erfolgreich geschaffen werden konnte.

3.10.2 Etablierung des Phagen Display und Generierung einer Positivkontrolle gegen VEGF-R2

Zur Etablierung der Methodik des Phagen Display wurde auf Grundlage eines bereits vorliegenden Vektors, der ein chimäres Fab-Fragment gegen den Wachstumsrezeptor VEGF-R2 kodiert (Jendreyko *et al.*, 2003), eine Positivkontrolle hergestellt. Ausgehend von diesem Vektor wurden zunächst die variablen Regionen des Fab-Fragmentes gegen VEGF-R2 amplifiziert und zusammen mit den konstanten Domänen, generiert aus dem im Labor verwendeten Vektor pAraH6HATT, in einer *first overlap extension* PCR im Sequenzkontext zusammengefügt. In einer *second overlap extension* PCR wurde anschließend das chimäre Fab-Fragment generiert, gereinigt und mit SfiI verdaut. Nach Ligation mit dem ebenfalls mit SfiI verdauten Vektor pComb3XSS wurden *E. coli* (ER2738) mit dem gereinigten Ligationsansatz transformiert und es folgten vier Selektionsrunden eines Biopannings. Der *E. coli* Kultur wurden zusätzlich im Überschuss Phagen anderer Bibliotheken als Negativkontrollen zugegeben, die entsprechend nicht gegen VEGF-R2 gerichtet waren. Bei den Selektionsrunden wurde die eingesetzte Antigenkonzentration von 500 ng, über 250 ng bis auf 100 ng pro Selektionsrunde herabgesetzt und gleichzeitig wurden die durchgeführten Waschschrte von fünf, über zehn auf 15 Waschschrte pro Selektionsrunde erhöht. In der letzten Selektionsrunde wurde die Antigenkonzentration von 100 ng, sowie die Anzahl der durchgeführten Waschschrte von 15 beibehalten. Die Bindung der bei jeder Selektionsrunde gewonnenen Phagen wurde unmittelbar nach deren Isolation mittels Phagen ELISA untersucht. Die gebundenen Phagen wurden mit dem HRP-konjugierten anti-M13 Antikörper detektiert, welcher an das Hüllprotein p8 von Phagen bindet. Nach 60 min Inkubation mit einer ABTS-Lösung bei RT wurde die Absorption bei 405 nm gemessen, womit die relative Bindungsstärke der Phagen an VEGF-R2 angegeben wird. Das Ergebnis der Phagen ELISA ist in Abb. 25 dargestellt.

Abb. 25: Phagen ELISA des Biopannings mit einem Fab-Fragment gegen VEGF-R2. Dargestellt ist die Bindung unselektierter Phagen zu Beginn des Biopannings (Selektionsrunde 0) und nach den jeweiligen Selektionsrunden nach Beginn des Biopannings (Selektionsrunden 1 bis 4). Die gebundenen Phagen wurden mit dem HRP-konjugierten anti-M13 Antikörper detektiert. Nach 1 h Inkubation bei RT mit einer ABTS-Lösung wurde die Absorption bei 405 nm als Maß für die relative Bindungsstärke gemessen.

In Abb. 25 kann man einen typischen Verlauf der Selektion eines Fab-Fragmentes gegen das Antigen VEGF-R2 über mehrere Runden nachvollziehen. Vor Beginn der Selektion (Selektionsrunde 0) liegt die Absorption bei 2,085 und sinkt nach den ersten beiden Selektionsrunden bis auf einen Wert von 0,104 ab. Nach der dritten Selektionsrunde ist ein deutlicher Anstieg des Wertes auf 2,695 zu verzeichnen, welcher sich nach einer weiteren Selektionsrunde auf einen Wert von 2,646 stabilisiert.

Von den unselektierten Klonen zu Beginn und den selektierten Klonen nach Abschluss des Biopannings wurden jeweils zehn Klone mittels ELISA untersucht und zusätzlich sequenziert, um das Ergebnis des Biopannings zu analysieren (Daten nicht gezeigt). Im ELISA zeigte lediglich ein Klon der zehn unselektierten Klone ein positives Signal bei der Bindung an VEGF-R2, während dies bei allen zehn selektierten Klonen nach Abschluss des Biopannings zu verzeichnen war. Zudem zeigte die Sequenzanalyse für die unselektierten Klone unterschiedliche Sequenzen, wohingegen nach Abschluss des Biopannings ausschließlich eine Sequenz für alle Klone vorlag. Ein selektierter Klon nach Abschluss des Biopannings wurde daraufhin mittels ELISA, durchflusszytometrischer Analyse und Western Blot auf die Bindung an den Wachstumsrezeptor VEGF-R2 untersucht. Für die Analyse mit Hilfe des ELISA wurde der Klon zum einen in *E. coli* mit IPTG induziert und zum anderen auf Phagen präsentiert untersucht. In der durchflusszytometrischen Analyse und im Western Blot wurde der mit IPTG induzierte Klon verwendet. Die Ergebnisse sind in der Abb. 26 dargestellt.

Abb. 26: (A) ELISA mit dem Fab-Fragment gegen VEGF-R2 nach Induktion mit IPTG (links), detektiert mit einem anti-HA Antikörper bzw. präsentiert auf der Oberfläche von Helferphagen (rechts), detektiert mit einem anti-M13 Antikörper. (B) Untersuchung des mit IPTG induzierten Klonen gegen VEGF-R2 mittels durchflusszytometrischer Analyse und (C) Western Blot. (A): Es wurde eine 96-well-Platte mit je 100 ng des Antigens, eines anti-Fab und anti-kappa Antikörpers, sowie eines IgG Moleküls beschichtet, als Negativkontrolle diente BSA. (B): Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) mit dem Überstand des IPTG induzierten Klonen inkubiert (rot). Zusätzlich wurden die HUVEC mit einem spezifischen anti-human VEGF-R2 Antikörper (R&D Systems) inkubiert (blau) bzw. ohne Erstantikörper (schwarz). Als Sekundärantikörper diente ein FITC-konjugierter anti-maus Antikörper. Auf der Ordinate sind die gezählten Zellen in linearem Maßstab aufgetragen und auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität in logarithmischem Maßstab angegeben. (C): Beim Western Blot wurden 100 ng des Antigens VEGF-R2 auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem IPTG induzierten Klon gegen VEGF-R2 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper anti-HA.

In Abbildung 26 (A) ist die relative Bindungsstärke des isolierten Fab-Fragmentes an das Antigen VEGF-R2 dargestellt. Die Bindung des mit IPTG induzierten Fab-Fragmentes zeigt eine relative Bindungsstärke von 0,805. Das gleiche Fab-Fragment zeigt präsentiert auf der Oberfläche eines Helferphagen, eine relative Bindungsstärke von 1,05. Zudem zeigen die vier Kontrollen einen hohen Wert des Fab-Fragmentes für die relative Bindungsstärke an den anti-

Fab- (0,824 bzw. 0,973) und anti-kappa-Antikörper (0,869 bzw. 1,56), sowie einen sehr geringen Wert bei dem IgG Molekül (0,063 bzw. 0,087) und bei BSA (0,061 bzw. 0,067). In der durchflusszytometrischen Analyse (Abb. 26 (B)) sieht man für das induzierte Fab-Fragment die gleiche Verschiebung wie bei dem spezifischen anti-human VEGF-R2 Antikörper von R&D Systems. Im Western Blot ist eine Bande bei ca. 170 kDa und damit im Größenbereich des Wachstumsrezeptors VEGF-R2 zu sehen.

Mit Hilfe der im Labor verwendeten Vektoren und dem Vektor, welcher das chimäre Fab-Fragment gegen VEGF-R2 enthält, konnte die Methodik des Phagen Display etabliert werden. Das Fab-Fragment, das spezifisch an den Wachstumsrezeptor VEGF-R2 bindet, wurde im Weiteren als Positivkontrolle eingesetzt.

3.10.3 Generierung einer $\alpha\beta 5$ -Bibliothek

Im Anschluss an die erfolgreiche Etablierung des Phagen Display sollte die Methode eingesetzt werden, um ein spezifisch bindendes Fab-Fragment gegen $\alpha\beta 5$ zu erhalten. Nachdem die dafür notwendige Immunisierung von Kaninchen erfolgreich war (3.10.1), wurde allen immunisierten Kaninchen zur Gewinnung der B-Zellen, sowohl die Milz als auch das Knochenmark entnommen. Aus den B-Zellen erfolgte die RNA-Isolation, die für die folgende *overlap extension PCR* (2.2.2, Abb. 9) in cDNA umgeschrieben wurde. Ausgehend von der cDNA des mit $\alpha\beta 5$ immunisierten Kaninchens wurden zunächst die Sequenzen der variablen Region der leichten (V_L) und schweren Kette (V_H) mittels spezifischer *primer* amplifiziert, wohingegen für die konstanten Regionen C_K und C_H1 der im Labor verwendete Vektor pAraH6HAT^T genutzt wurde. In der folgenden *first overlap extension PCR* wurden aus den Sequenzen V_L und C_K die chimären leichten Ketten und aus den Sequenzen V_H und C_H1 die chimären schweren Ketten hergestellt. In der *second overlap extension PCR* wurden anschließend chimäre Fab-Fragmente generiert, anschließend gereinigt und mit SfiI verdaut. Nach Ligation mit dem ebenfalls mit SfiI verdauten Vektor pComb3XSS wurden *E. coli*-Zellen (ER2738) mit dem gereinigten Ligationsansatz transformiert und es folgten vier Selektionsrunden eines Biopannings. Die hierbei entstandene $\alpha\beta 5$ -Fab-Bibliothek weist eine Diversität auf, welche zum einen in den variablen Regionen und zum anderen in der zufälligen Kombination der variablen Regionen lag, die durch die PCR-Reaktionen gewonnen werden konnten. Ausgehend von dieser zu Beginn vorliegenden Variabilität von ca. $7,87 \times 10^6$ Klonen wurden exemplarisch für die $\alpha\beta 5$ -Bibliothek 30 Klone sequenziert. Die Aminosäuresequenzen der variablen Regionen der leichten und schweren Kette der 30 Klone sind in den Abb. 27 und 28 zusammengefasst.

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1 ELVLITQTPGT LSLSPGERAT LSC	RASHSVS RA-YLAWYQQ	KPGQAPRLLI YGTSSRATSI	PDRFSGSGSG TDFTLTISRL	EPEDFAVYYC	QQYGGG----	---PWFQGQTE VVVK
2AS VEVAV.GTV. IK.Q.Q.I. N--		R.K..V VRA.TL.S.V .S.....	..Q....V.DV QCD.A.T...	LGNYDC-SST DCNA..G.DR GGGQ		
3 ...M....SP V.AAV.GTV. I..QS.Q..W NNDF..F..		P.KQ...R..KL.S.V .S.....	..Q....GV QCD.A.T...	.GDF.---DW IR-T..G....		
4SS V.AAV.GTV. IN.Q.Q..Y KNN..S.F..		P.K...TA.TL.S.V .S..K.....	..E.A....GV QCD.A.T...	.GEFSC-SSA DCFA..G....		
5 ...M....SS V.AAV.GTVS I..QS.Q..Y S-N..S....		P.K...E..KL.S.V .S..K.....	..Q....GV QCD.A.T...	.GTYW.-SGW YL-P..G....		
6SS VEAAY.GTV. IN.Q.Q.I. T--A.S....		P.Q...VSA.GL.S.V .S..K.....	..Q....DV QCD.A.T...	AGGY---STT SDNT..G....		
7 ...M....SS VEAAY.GTV. IK.Q.Q.IN S--W.....		P.K...KA.TL.S.V SS..K.....	..E.....D..CA.A.T...	RSHA.--SAI N---.G....		
8 ...M....AS VDAPV.GTV. IK.Q.Q.IG SS--		R.K...Y..TL.S.V .S..K.....	D..CA.A.T...	.SNY..SSSS YGGA..G....		
9 ...M....AS VEVAV.GTV. IN.QS.Q..Y SNS-.S....		P.K...S..TL.S.V .S..K.....	..Q....D..CA.A.T...	.CT.YG-SSV VGGA..G....		
10AS V.EPV.GTV. IK.Q.QNIG DN--		P.K...A.TL.S.V .S.....	..E.....D..CA.A.T...	AGG.NG-NIY ---S..G....		
11 ...M....SS V.AAV.GTV. IN.QS.Q..Y SDNW.....		P.K...TA.TL.S.V .S..K.....	..E.....D..CA.A.T...	.S.YY--PSG RSWA..G....	LEIL	
12SS K.VPV.DTV. IN.Q..E.IY SG--R.....		P.K...A.TL.S.V .S..K.....	..Q....DV VCD.A.T...	AG.KS--STT DGIA..G....	I.	
13 ...M....AS VEVAVRGTV. IK.Q.Q.I. S--.S....		P.K...EA.KL.S.V .S..K.....	..E.....D..CA.A.T...	.INYAW-SDN ----.G....		
14 ...M....SP V.VAV.GTV. IN.Q.Q..Y NNNW.....		P.K...A.TL.S.V .S..K.....	..Q....DV QCD.AGT...	AGAYS--SSS E-NA..G....		
15SS V.AAV.GTV. IN.QSGQ..R ENNQ.S....		P.K...QA.KL.S.V .S..K.....	..Q....GV QCD.A.T...	.GSYY.-SGW YG-A..G....		
16 ...M....AS V.AAV.GTV. IK.Q.GETI. NN--		P.K...AV.NL.S.V .S.....Y..E.....	..D..CA.G.T...	.CTDYG-SSY VE-A..G....		
17 ...M....SS T.AAV.GTV. IN.QS.Q..Y NNNNE.S.F..		P.K...A.TL.S.V .S..K.....	..Q....DV QCA.A.T...	.CTY.G-SSY VV-A..G....		
18 ...M....SS V.AAV.GTV. I..Q.Q..Y GNN..S....		P.K...DA.KL.S.V .L.....	..Q....GV .CA.A.T...	.GYS--GSN VDNT..G....		
19 ...M....AS VEAAY.GTV. IG.Q.QKI. T--		..S..R.Q...RA.TLES.V .S..K.....	..X.....D..CA.A.T...	.T.YY.TSSN Y-IT..G....		
20SS V.APV.GTV. IN.QP.R..G NNNL..F..		P.K...RA.TL.S.V .S.....	..E.....GV QCD.A.T...	R.GWS--ESV DKGA..G....		
21 ...M....SSS.....				..R.....		
22 ...M....SP V.AAV.GTV. IK.Q.QNIY SN--		P.K...RA.NLPS.V .S..K.....	..R.....EV QCV.A.T...	.G.YA---G DIAA..G....		
23 ...M....SS V.AAV.GTV. IK.Q.Q.IN S--W.S....		P.K...AA.NL.S.V .S..K.....	..EY.....D..DCA.A.T...	.S.YD--VGH YGNA..G....		
24AS V.EPV.GTV. IK.Q.QTIY SN--		..RP.KP...E..KLTS.V SS..K..R..EY..V.D..	..CA.V.T...	.CTYYD-SPY GG-T..G....		
25AS VEVAV.GTV. IK.Q.Q.I. S--.S....		P.K...RA.TL.S.V SS.....	..E.....GV QCD.A.T...	.GCY-W-DSS SSFA..G....		
26 ...M....AS VEAAY.GTV. IK.Q.EDI G NN--		..S..P.K..M.SA.TL.S.V SS..K..R..EY.....	..D..CD.A.T...	.CVYYG-TSA IG-A..G....		
27 ...M....SP V.AAV.GTV. I..QS.Q..W NGNW.S....		P.KP...E..KLES.V .S..K.....	..Q....EV QCD.A.T...	.G.Y---GW IR-T..G....		
28 ...M....SS K.VPV.DTV. IN.Q..E..Y GNNN.....		P.K...YA.TL.S.V .S..K.....	..Q....DV VCD.A.T.S.	AG.KS--SS- D-FA..G....		
29 ...M....SP V.AAV.GTVS I..Q.Q..- GNN..S.F.K		P.P....RA.TL.S.V .S..K.....	..Q....TD..CD.A.T...	.GWYS--GS- -TNT..G....		
30 ...M....SS V.AAV.GTV. I..QS.Q..Y NQIA.S.F..		P.KQ...SA.TL.S.V .S..K.....	..Q....DV QCD.ATT...	AGAWS---GW MH-A..G....		
30 **:*:*:*.. . : : *	 : * : : *	* : * : * : *	. * : * : *	. : * : * : * : *	* : * *	* * *

Abb. 27: Proteinsequenzen der variablen Region der leichten Kette von 30 $\alpha\beta 5$ Fab-Klonen einer $\alpha\beta 5$ -Bibliothek vor der Selektion. Die Aminosäuresequenzen der Klone sind eingeteilt in die vier Framework Regionen (FR) und die drei hypervariablen Regionen (CDR, *Complementarity Determining Regions*). Die Punkte stellen dieselbe Aminosäure an der Position dar im Vergleich zu Klon 1.

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1	QSV EES -GGR LVTPGTPLTL TCTVSGIDLS SYAISWVRQA PGKGLEWIGI IV--GSGSTY -YASWAKSR S TISKTS-TTA DLKMTSLTTE DTATYFCVRG YDPNWGL--- -YFHIWGP GT LVTISS						
2	-.....-.....A.FS...YM.....-.....Y.N--TG.G.S-.....G.F...R.A.VA...P.....A.E NYWHGN--- --.NP.....V..						
3	-.....-.....A.FS.I.HDM.....-.....E.....V.N--TG.T.-...N.G.F.....-V.R.R.....A.PR..PNLSSS-D--DN.....						
4	-.....-.....A.FS.G.DNV.....-.....L.Y.W--SD.NAD-...N.G.F.....S.V.R.....H.AG--.....G--AS.....V..						
5	-R.....A.FS...N.....A.FS...T--NNHI.-PT.STG.F.....P-V...I.P.....A.D-PTTP.DGY--D.....V..						
6	...K.....A.FTI...YM.....-.....L.S--SG.G.G.G.F.V.....V.I.P.....A.S...GESG.YATF--.YL.....V..						
7	-.....A.FS...MT.....-.....D-S.N.-...G.F...R.-...V.I.P.....AMS IRYGNAPYA--ND.....						
8	-.....A.FP.I N.YMT.....-.....K-SG..VV-...N.G.F.....-AV N..I.P..A.A.D.QIWTSSGDSW E.....V..						
9	-R.....A.FS...MG.....-.....W SD--VN.Y.-...G.F...X.-...V.I.P.....A..GGYI.DG---DL.....						
10	...K.....A.FS...DMQ.....-.....--TI.N.-...G.F.....-V.I.P.....A.S--AVS.TNG--.YI.....						
11	..L.K.-.....Y.FS...DM.....-.....V.W--SYD.AS-...NG.F.....-I.V.I.P.....A.E L.AGGNWG--A.SI.....						
12	-.....A.FS.N.WV.....-.....Y.F.T--HG..A.-...G.F.....-V.I.P.....A..D--GIYYD--R.N.....V..						
13	..L.....A.FS.N.NMA.....-.....E.YL.F.D--TY.VA.-...G.F...R.-...V.A.E V-VGG--.....DL.....						
14	-.....K.DES.....A.FS...PMI.....-.....E.....H--P.-...G.F.....S.V.A.W SES.G.G---YD.....V..						
15	PVGGG-...K.....A.FS...DMI.....-.....Y.F.SYGD..N.-...G.F.....-V.I.P.....AKN AAGGNYPY--NL.....						
16	PV.....A.FS...TM.....-.....T.S--S.-...R.G.F.....-AV..L.P.....A..-RTDIT YLD--N.....						
17	-.....A.FS...M.....-.....N--SYDN.-...N.G.F.....S.V.I.P.....A.-...DR-----D.....HHLL.						
18	P.RWR.P.....A.FS...N.M.....-.....Y-A.-...G.F.....-V.I.P.....A..S.SG-----YKI.....						
19	-.....A.FS.N.MI.....-.....G.....T--SNDN.-...TG.F.....-V.I.P.....A..-SFRY-WND--A.DF.....V..						
20	-E.....A.FS...MG.....-.....R--TN.D.-...G.F.....S.-...V.I.P.....G.S--YLDSSGG--KSN.....						
21	-.....A.FS...WM.....-.....T-S..N.W-...G.F.....-V.....PI.....A..KST.N.Y--DYD.....V..						
22	-.....A.FS...MG.....-.....E.....T.I--S..R.-...G.F.....-V.I.P.....A..YDSYVYAY--A.NI.....V..						
23	-.....A.FTI...YMM.....-.....HW--SD..W-...G.F.....-V.QIA.P.I.....A.----V.YNT--LL.....WSPSPQ						
24	-.....A.FS.T..L.....-.....D.....T--NA.R.D-...G.F...F..S.V..I.NP...G.....ASE LGVAG-----KL.....APQ						
25	-.....A.FS.I.T.YM.....-.....Y.V.T--TG..A.-...G.F...R.-...V.I.P.....P-----YYG--AIT.....V..						
26	-R.....A.FS.N.HMA.....-.....Y.D--QT.TNI K...V.G.F...A..M.....G.C A--SSGD.TW--LEL..Q.....						
27	-R.....K.DQT.....A.FS.N.DMN.....-.....Y.W--SG.NA.-...T.G.F...R.-...V.A..-VPGSY--SY.....V..						
28	-.....A.FS...WMM.....-.....Y..S--TI.Y.-...G.F.....-V.I.P.....A.S--YGSDIT--T.NI.....						
29	-.....A.FS...YMN.....-.....M VN--SGAT.W-...G.F.....-V.I.P.....A.N--IHTTSSTG--NI.....V..						
30	-.....A...VMG.....-.....R.....T.H--TD..R.-...G.F.....V H.....AKE--FYG-----DE.....V..						
	* ** ** *	* : :	***** ** * : : *	* . . *	* : : :	* : : *	** **

Abb. 28: Proteinsequenzen der variablen Region der schweren Kette von 30 $\alpha\beta 5$ Fab-Klonen einer $\alpha\beta 5$ -Bibliothek vor der Selektion. Die Aminosäuresequenzen der Klone sind eingeteilt in die vier Framework Regionen (FR) und die drei hypervariablen Regionen (CDR, *Complementarity Determining Regions*). Die Punkte stellen dieselbe Aminosäure an der Position dar im Vergleich zu Klon 1.

3.10.4 Selektion von zehn bindenden Fab-Fragmenten gegen $\alpha\text{v}\beta 5$

Nachdem die $\alpha\text{v}\beta 5$ -Bibliothek generiert worden ist, wurden *E. coli*-Zellen (ER2738) mit dieser transformiert und es folgte ein Biopanning zur Selektion spezifisch bindender Klone. Bei den Selektionsrunden wurde die bereitgestellte Antigenkonzentration von 500 ng, über 250 ng bis auf 100 ng pro Selektionsrunde herabgesetzt und gleichzeitig wurden die durchgeführten Waschschrtte von fnf, ber zehn auf 13 Waschschrtte pro Selektionsrunde erhht. In der letzten Selektionsrunde wurde die Antigenkonzentration von 100 ng, sowie die Anzahl der durchgefhrten Waschschrtte von 13 beibehalten. Whrend des Biopannings wurde zustzlich mit den frisch isolierten Phagen an jedem Selektionstag ein Phagen ELISA durchgefhrt, um die Bindungsstrke der vorliegenden Fab-Fragmente, prsentiert auf Phagen, an das Integrin $\alpha\text{v}\beta 5$ nachvollziehen zu knnen. Das Ergebnis der Phagen ELISA fr die Bindungsstrke an das Integrin $\alpha\text{v}\beta 5$ ist in Abb. 29 dargestellt.

Abb. 29: Phagen ELISA des Biopannings mit einer Fab-Bibliothek gegen das Antigen $\alpha\text{v}\beta 5$. Dargestellt ist die Bindung unselektierter Phagen zu Beginn des Biopannings (Selektionsrunde 0) und nach den jeweiligen Selektionsrunden nach Beginn des Biopannings (Selektionsrunden 1 bis 4). Die gebundenen Fab-Phagen wurden mit dem HRP-konjugierten anti-M13 Antikrper detektiert, welcher an das Hllprotein p8 von Phagen bindet. Nach 60 min Inkubation bei RT mit einer ABTS-Lsung wurde die Absorption bei 405 nm als Ma fr die relative Bindungsstrke gemessen.

In Abb. 29 ist der Verlauf der Selektion von bindenden Fab-Fragmenten, die auf der Oberflche von Phagen prsentiert werden, gegen das Antigen $\alpha\text{v}\beta 5$ nachvollziehbar. Vor Beginn der Selektion (Selektionsrunde 0) liegt die Absorption bei 1,45 und sinkt nach den ersten beiden Selektionsrunden bis auf einen Wert von 0,218 ab. Nach der dritten

Selektionsrunde ist ein Anstieg des Wertes auf 1,648 zu verzeichnen, welcher nach einer weiteren Selektionsrunde bis auf einen Wert von 2,893 deutlich ansteigt.

Somit konnten mittels Phagen Display innerhalb von vier Selektionsrunden Fab-präsentierende Phagen angereichert werden, die das Integrin $\alpha v \beta 5$ binden.

Um die Bindungseigenschaften einzelner Klone an das Integrin $\alpha v \beta 5$ nach der vierten Selektionsrunde zu untersuchen, wurden einige Klone selektiert und weiter analysiert. Es konnten im Anschluss an das Biopanning zehn Klone isoliert werden, die sowohl im ELISA (Abb. 30), als auch im Western Blot eine Bindung an das Integrin $\alpha v \beta 5$ zeigen (Abb. 30). Zusätzlich zu der Bindung im ELISA wurden die Klone sequenziert, wobei die Aminosäuresequenzen in Abb. 31 zu sehen sind.

Im Western Blot sieht man bei allen untersuchten Klonen eine Bande bei ca. 150 kDa. Im Vergleich zu den beiden Banden, die man bei dem $\alpha v \beta 5$ -Serum sieht, liegt diese Bande auf gleicher Höhe wie die obere Bande des Serums und kennzeichnet die αv -Untereinheit. Im ELISA sind sechs der zehn bindenden $\alpha v \beta 5$ -Klone dargestellt, wobei Klon 6 auch den sequenzidentischen Klon 5 repräsentiert. Klon 10 repräsentiert die ebenfalls sequenzidentischen Klone 7, 8, 9 und 10. Im ELISA liegen die Werte für die relative Bindungsstärke dieser Klone an das Integrin $\alpha v \beta 5$ zwischen 0,96 und 1,62, wohingegen die Werte für die Bindung an BSA mit 0,063 bis 0,077 sehr gering sind.

Demnach ist es gelungen, mittels Phagen Display Fab-Fragmente zu isolieren, die an das Integrin $\alpha v \beta 5$ bzw. die Untereinheit αv binden. Diese Fab-Fragmente können zur Generierung neuer Intrabodies bzw. Intradiabodies verwendet werden.

Unter diesen zehn Klonen wurden sechs verschiedene DNA-Sequenzen (nicht gezeigt) gefunden, diese kodieren sechs unterschiedliche Aminosäuresequenzen. Bei den untersuchten DNA-Sequenzen wiesen die Klone 1 bis 4 jeweils eine individuelle DNA-Sequenz auf, während die DNA-Sequenzen der Klone 5 und 6 (weiterhin als Klongruppe 1 bezeichnet), sowie der Klone 7 bis 10 (weiterhin als Klongruppe 2 bezeichnet) untereinander identisch waren. Einen Überblick wie ähnlich sich die untersuchten Klone in ihren Aminosäuresequenzen sind, zeigt die Tabelle 10.

Tab. 10: Übersicht der Identität der vorliegenden Aminosäuresequenzen aller untersuchten Klone

Klon	Klon	Identität	Klon	Klon	Identität
1	2	89 %	2	Klongruppe 2	91 %
1	3	88 %	3	4	97 %
1	4	87 %	3	Klongruppe 1	94 %
1	Klongruppe 1	88 %	3	Klongruppe 2	99 %
1	Klongruppe 2	88 %	4	Klongruppe 1	95 %
2	3	91 %	4	Klongruppe 2	97 %
2	4	91 %	Klongruppe 1	Klongruppe 2	94 %
2	Klongruppe 1	90 %			

Die geringste Abweichung in der Aminosäuresequenz zeigt sich zwischen dem Klon 3 und der Klongruppe 2. Die beiden Sequenzen unterscheiden sich in drei Aminosäuren (AS) innerhalb der variablen Region der leichten Kette und in zwei AS innerhalb der variablen Region der schweren Kette und sind damit zu 99 % identisch. Die größten Unterschiede in der Aminosäuresequenz zeigen die beiden Klone 1 und 4, sie unterscheiden sich in 30 AS innerhalb der variablen Region der leichten Kette und in 34 AS innerhalb der variablen Region der schweren Kette und sind zu 87 % identisch. Generell unterscheiden sich die untersuchten Klone sehr wenig voneinander und zeigen identische Aminosäuresequenzen zwischen 87 % und 99 %.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Phagen Display erfolgreich etabliert werden und neben einer Positivkontrolle gegen den Wachstumsrezeptor VEGF-R2 konnten zehn $\alpha\beta 5$ -Klone selektiert werden, die an das Integrin $\alpha\beta 5$ binden. Zudem zeigt die hohe Identität zwischen den einzelnen $\alpha\beta 5$ -Klonen, dass es möglich war, bestimmte Sequenzen anzureichern und spezifisch bindende Klone aus dem Pool aller vorliegenden Fab-Fragmente zu isolieren.

4 Diskussion

Angiogenese bezeichnet die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Blutgefäßen und ist für verschiedene physiologische Prozesse wie der Wundheilung essentiell. In mehreren Krankheitsbildern, wie z. B. dem Tumorwachstum, findet ein pathologischer Prozess statt, bei dem die Angiogenese fehlerhaft reguliert ist. Die darin involvierten Moleküle, wie z. B. die Integrine, liegen daher im Fokus der medizinischen Forschung. Neben Brusttumoren oder dem Glioblastom (Hirntumor) ist das Integrin $\alpha v \beta 3$ auch verstärkt auf der Zelloberfläche von Melanomzellen präsentiert und macht sie zu einem attraktiven Modell zur Untersuchung des Einflusses von $\alpha v \beta 3$ auf die Angiogenese (Desgrosellier and Cheresh 2010), zumal Melanome durch ein schnelles Tumorwachstum gekennzeichnet sind und zu den stark metastasierenden Tumoren gehören (Ria *et al.*, 2010). Die ebenfalls vermehrte Oberflächenpräsentation der Integrine $\alpha v \beta 3$ und $\alpha 5 \beta 1$ auf aktivierten Endothelzellen, sowie der Einfluss von $\alpha v \beta 5$ in einer durch VEGF-vermittelten Angiogenese, machen auch die Endothelzellen zu einem geeigneten Untersuchungsmodell in der Angiogenese. Die komplexe und nicht eindeutige Funktionsweise der Integrine $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ und $\alpha 5 \beta 1$ zeigt sich in den Ergebnissen zwischen Experimenten mit Integrin-Knockout-Mäusen (Reynolds *et al.*, 2002) im Kontrast zu Untersuchungen mit RGD-Peptiden und Antikörpern (Eliceiri and Cheresh 1999, Kumar *et al.*, 2001). Während Integrin-Knockout-Mäuse ein verstärktes Tumorwachstum und eine verstärkte Angiogenese zeigen (Reynolds *et al.*, 2002), führt der Einsatz von RGD-Peptiden und Antikörpern gegen diese Integrine zu einem verminderten Tumorwachstum und einer eingeschränkten Angiogenese (Eliceiri and Cheresh 1999, Kumar *et al.*, 2001). Nanomolare Konzentrationen von RGD-Inhibitoren hingegen führen zu verstärktem Tumorwachstum und verstärkter Tumorangiogenese (Reynolds *et al.*, 2009). Dies unterstreicht die komplexe Funktionsweise dieser Integrine in der Angiogenese.

Eine neuartige Methode Zielmoleküle in ihrer Funktionsweise zu beeinflussen, bietet die Anwendung von Intrabodies. Intrabodies binden als intrazellulär exprimierte scFvs (*single chain variable fragment*) posttranslational an ein bestimmtes Antigen und hemmen somit seine Funktion. Durch geeignete Signalsequenzen können Intrabodies nicht nur im Endoplasmatischen Retikulum (ER), sondern auch im Zytoplasma oder im Zellkern lokalisiert werden. Da die Spezifität von Intrabodies auf ein Antigen beschränkt ist, wurden Intradiabodies entwickelt, die als bispezifische, tetravalente Antikörperfragmente zwei Antigene gleichzeitig binden können (Jendreyko *et al.*, 2003). Die Intradiabodies ermöglichen damit ein größeres Wirkungsspektrum und zeigen aufgrund ihres Molekulargewichtes eine

längere Halbwertszeit, wodurch sie den Intrabodies überlegen sind (Jendreyko *et al.*, 2003, Jendreyko *et al.*, 2005). Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe verschiedener Intrabodies bzw. Intradiabodies (Intra(dia)bodies) die auf der Zelloberfläche lokalisierten Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ im Endoplasmatischen Retikulum zurückzuhalten, sodass diese Integrine auf der Zelloberfläche in verringerter Anzahl bzw. gar nicht präsentiert werden. Durch Anwendung der Intra(dia)bodies sollten die Funktionen der genannten Integrine, wie die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix (EZM) und die damit verbundenen Prozesse (Proliferation, Invasion, Migration, Angiogenese) gestört werden. Da es möglich ist die Funktion einzelner Integrine separat, simultan oder in verschiedenen Kombinationen zu hemmen, kann auch das Zusammenspiel von Integrinen (Integrin crosstalk) untersucht werden. Die durch die Intra(dia)bodies hervorgerufenen Veränderungen der Integrinpräsentation auf der Zelloberfläche und die damit verbundenen Auswirkungen wurden in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) und den humanen Melanomzellen M21 untersucht. Die Verwendung bispezifischer, intrazellulärer Antikörper bietet ein bisher in der Untersuchung der Integrine noch nicht angewandtes Modellsystem und eröffnet neue Einblicke in die Funktion der Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ und $\alpha 5\beta 1$ bezüglich ihrer Aufgaben in der Angiogenese.

4.1 Eine durch Intra(dia)bodies herabgesetzte Integrinpräsentation von $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ vermindert die Oberflächenpräsentation von $\alpha v\beta 5$ und $\beta 1$

Die Funktion der Intra(dia)bodies JC7U (anti- $\alpha v\beta 3$) und #4 (anti- $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$) wurden in dieser Arbeit an HUVEC und Melanomzellen M21 untersucht. Mit durchflusszytometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass ein phänotypischer Knockout von $\alpha v\beta 3$ in beiden Zelllinien mit den Intra(dia)bodies erzielt werden konnte. Zudem zeigten beide Zelllinien einen phänotypischen Knockdown der $\alpha 5$ -Untereinheit, erzielt durch den Intradiabody #4, und damit des gesamten Integrins $\alpha 5\beta 1$, da die $\alpha 5$ -Untereinheit ausschließlich mit der $\beta 1$ -Untereinheit ein funktionelles Integrin bildet. Zusätzlich konnte eine deutlich herabgesetzte Oberflächenpräsentation des Integrins $\alpha v\beta 5$ auf den Nabelschnurendothelzellen nach Anwendung der Intra(dia)bodies gezeigt werden. Eine verminderte Oberflächenpräsentation auf den HUVEC konnte ebenfalls bei der $\beta 1$ -Untereinheit, erzielt durch den Intrabody JC7U, gezeigt werden. Bei den Melanomzellen hingegen zeigten sich diese herabgesetzten Präsentationen von $\alpha v\beta 5$ und $\beta 1$ nur in geringem Ausmaß. Für den phänotypischen Knockout des Integrins $\alpha v\beta 3$ wurde in dieser Arbeit der Intrabody JC7U verwendet. Wie bereits beschrieben, bindet dieser spezifisch an das Integrin $\alpha v\beta 3$ (Jendreyko *et al.*, 2003, Rader *et al.*, 1998, Rader *et al.*, 2002). Da die variablen Regionen des verwendeten Intradiabodies #4

gegen $\alpha v\beta 3$ dieselben sind wie bei JC7U, bindet auch dieser spezifisch an $\alpha v\beta 3$. Ebenfalls spezifisch sind die zur Detektion der Integrine (Immunfluoreszenzfärbungen, durchflusszytometrische Analysen) herangezogenen monoklonalen Antikörper anti- $\alpha v\beta 3$ (LM609) (Cheresh and Spiro 1987) und anti- $\alpha v\beta 5$ (P1F6) (Weinacker *et al.*, 1994). Daher ist die reduzierte Oberflächenpräsentation von $\alpha v\beta 5$ auf den phänotypischen Knockout von $\alpha v\beta 3$ bzw. den Knockout/Knockdown von $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$ zurückzuführen und ist nicht die Folge einer unspezifischen Wirkung der verwendeten Intra(dia)bodies. Somit legt dieses Ergebnis einen Integrin crosstalk zwischen den Integrinen $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ und $\alpha 5\beta 1$ nahe. Ein Integrin crosstalk ist bekannt für $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$, die sich gegenseitig in ihren Funktionen beeinflussen können. Es wurde gezeigt, dass $\alpha v\beta 3$ eine über $\alpha 5\beta 1$ vermittelte Migration (Simon *et al.*, 1997), sowie die phagozytäre Funktion von $\alpha 5\beta 1$ (Blystone *et al.*, 1994), die beispielsweise für Makrophagen von Bedeutung ist, inhibiert. Weiterhin ist bekannt, dass $\alpha 5\beta 1$ die Funktion von $\alpha v\beta 3$ *in vitro* und *in vivo* über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) reguliert (Kim *et al.*, 2000b) und das Überleben von Endothelzellen während der Angiogenese *in vivo* fördert, indem es die Aktivierung der Proteinkinase A unterdrückt (Kim *et al.*, 2002). Eine andere Art des Integrin crosstalk findet zwischen $\beta 1$ und αv Integrinen statt, wobei die vorhandene Oberflächenpräsentation der Integrine reguliert wird (Retta *et al.*, 2001). Dabei reguliert $\beta 1$ die Menge an $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$, indem $\beta 1$ einerseits durch Destabilisierung der $\beta 3$ mRNA eine verminderte Oberflächenpräsentation von $\alpha v\beta 3$ bewirkt und andererseits translationale oder posttranslationale Ereignisse zu einer vermehrten Präsentation von $\alpha v\beta 5$ führen. In dieser Arbeit führte der phänotypische Knockout von $\alpha v\beta 3$ zu einer deutlich herabgesetzten Oberflächenpräsentation von $\alpha v\beta 5$ und einer verminderten Präsentation der $\beta 1$ -Untereinheit. Damit unterstützen diese Ergebnisse die Untersuchungen von Retta *et al.* (2001), da dort durch das verstärkte Vorhandensein von $\beta 1$ vermehrt $\alpha v\beta 5$ auf der Zelloberfläche vorliegt. Somit ist die in dieser Arbeit gezeigte verminderte Oberflächenpräsentation von $\alpha v\beta 5$, hervorgerufen durch die Anwendung der Intra(dia)bodies, auf den Endothelzellen womöglich primär auf den Einfluss von $\alpha v\beta 3$ zurückzuführen. Durch den Knockout von $\alpha v\beta 3$ kam es in dieser Arbeit zu einer reduzierten Präsentation der $\beta 1$ -Untereinheit auf humanen Nabelschnurendothelzellen, wodurch die durch Retta *et al.* (2001) gezeigte Regulation von $\alpha v\beta 5$ eventuell beeinträchtigt wird. Weiterhin könnte es durch $\alpha v\beta 3$ oder die $\beta 3$ -Untereinheit allein zu einer Stabilisierung der $\beta 5$ mRNA oder zu translationalen

bzw. posttranslationalen Ereignissen kommen, die unter normalen Umständen die Präsentation von $\alpha v\beta 5$ gewährleisten.

Diese verminderte Präsentation des Integrins $\alpha v\beta 5$ und der $\beta 1$ -Untereinheit auf Endothelzellen (im Vergleich zu Melanomzellen) bei dem Knockout von $\alpha v\beta 3$ bzw. dem zusätzlichen Knockdown von $\alpha 5\beta 1$ lässt eine deutlich stärker beeinträchtigte Interaktion der Endothelzellen mit der extrazellulären Matrix (EZM) vermuten. Dies kann zur Inhibition von Prozessen wie Adhäsion, Proliferation, Migration oder Invasion der Endothelzellen führen, während Melanomzellen M21 weniger davon beeinflusst sind.

4.2 Reduktion der Integrinpräsentation vermindert die Adhäsionskapazität von Endothel- und Melanomzellen

Eine der wichtigsten Aufgaben von Integrinen ist die Vermittlung der Adhäsion, hier werden durch die Weiterleitung von Signalen verschiedene Ereignisse wie Proliferation, Migration, Invasion und somit Überleben von Zellen reguliert. Ein Verlust der Adhäsion führt dazu, dass davon abhängige Signalwege nicht eingeleitet werden können, die Kommunikation mit der extrazellulären Matrix oder anderen Zellen unterbunden wird und letztlich z. B. Apoptose eingeleitet wird (Huveneers *et al.*, 2007). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der phänotypische Knockout von $\alpha v\beta 3$ bei Endothelzellen dazu führt, dass sie deutlich schlechter an Vitronektin und Fibronektin binden, wobei der zusätzliche Knockdown des Integrins $\alpha 5\beta 1$ keine weitere Beeinträchtigung des Adhäsionsvermögens an diese Liganden bewirkt. Das herabgesetzte Adhäsionsvermögen der Endothelzellen an Vitronektin durch den fast vollständigen Verlust von $\alpha v\beta 3$ ist im Einklang mit Untersuchungen sowohl mit RGD-Peptiden oder Antikörpern gegen diese Integrine, als auch mit Experimenten mit Integrin-Knockout-Mäusen (Kumar *et al.*, 2001, Reynolds *et al.*, 2002). Das Integrin $\alpha v\beta 3$ gilt als Vitronektin-Rezeptor, bindet jedoch weitere Liganden wie z. B. das Fibronektin (Hodivala-Dilke *et al.*, 2003), weshalb die in dieser Arbeit gezeigte verminderte Adhäsion der Endothelzellen an Fibronektin auf eine fehlende Interaktion von $\alpha v\beta 3$ mit Fibronektin zurückgeführt werden kann. Allerdings wäre eine deutlich verminderte Adhäsion an Fibronektin eigentlich erst nach dem Knockdown von $\alpha 5\beta 1$ zu erwarten gewesen, da dieses Integrin sehr spezifisch an Fibronektin bindet (Kim *et al.*, 2000a, Mould *et al.*, 1997). Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich bei den Endothelzellen nach dem zusätzlichen Knockdown von $\alpha 5\beta 1$ sogar tendenziell eine verbesserte Adhäsion an Fibronektin. Ein Intrabody, der spezifisch gegen $\alpha 5\beta 1$ gerichtet ist, würde Aufschluss darüber geben, ob es

durch einen Knockout von $\alpha 5\beta 1$ zu einer verminderten Adhäsion an Fibronectin kommt oder nicht. Eventuell kommt es durch den Verlust von $\alpha v\beta 3$ allein auch zu einer Konformationsänderung von $\alpha 5\beta 1$, wodurch die bindende Domäne für Fibronectin nicht mehr zugänglich ist und die Adhäsion an Fibronectin unterbunden wird. Konformationsänderungen bei Integrinen sind bekannt und können sehr schnell erfolgen, um beispielsweise die Affinität für einen Liganden zu erhöhen (Faull and Ginsberg 1996, Hynes 2002). Der zusätzliche Knockdown von $\alpha 5\beta 1$ bewirkt dann womöglich ergänzend, dass ein anderes Integrin mit sonst geringer Affinität für Fibronectin mit höherer Affinität an diesen Liganden binden kann, sodass es zu einer tendenziell verbesserten Adhäsion kommt.

Der Knockout von $\alpha v\beta 3$ bzw. der Knockout/Knockdown von $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$ führt bei den Melanomzellen M21 zu einer leicht herabgesetzten Adhäsion, sowohl an Fibronectin als auch an Vitronectin. Die Auswirkungen auf die Adhäsion sind bei den Tumorzellen insgesamt deutlich geringer als bei den Endothelzellen. Dies liegt vermutlich auch daran, dass $\alpha v\beta 5$ durch den phänotypischen Knockout von $\alpha v\beta 3$ bzw. Knockout/Knockdown von $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$ nur leicht herabgesetzt auf der Oberfläche der Melanomzellen, im Gegensatz zu den Endothelzellen, präsentiert wird. Somit kann z. B. die Bindung an Vitronectin über $\alpha v\beta 5$ weiterhin erfolgen und die adhäsionsabhängigen Funktionen der Integrine bei Melanomzellen sind weiter intakt.

4.3 Die verminderte Oberflächenpräsentation von Integrinen hemmt die Proliferation der Endothelzellen

Die Proliferation der Endothelzellen ist eng mit deren Adhäsion an die extrazelluläre Matrix über Integrine verbunden. Die Adhäsion führt z. B. zur Aktivierung von p44/42 (Erk1/Erk2) des MAPK Signalweges und somit zur Proliferation und Angiogenese (Davis and Senger 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Knockout des Integrins $\alpha v\beta 3$ allein, sowie in Kombination mit einem Knockdown von $\alpha 5\beta 1$ dazu führt, dass Endothelzellen nicht mehr proliferieren können. Hierbei scheint der zusätzliche Verlust von $\alpha 5\beta 1$ keine weiteren Auswirkungen auf die Proliferation zu haben und eine Kompensation bei Verlust von $\alpha v\beta 3$ allein scheint ebenfalls nicht aufzutreten. Eine mögliche Kompensation über das Integrin $\alpha v\beta 5$ ist praktisch auszuschließen, da der Knockout von $\alpha v\beta 3$ bzw. der Knockout/Knockdown von $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$ zu einer deutlich verminderten Oberflächenpräsentation von $\alpha v\beta 5$ führt. Für die Situation *in vivo* ist zu vermuten, dass die Bildung neuer Kapillaren inhibiert wird, da neben Adhäsion und Migration auch die

Proliferation für diese Aufgabe essentiell ist. Dies wiederum kann bei Tumoren zu einer verminderten Tumorangiogenese führen, die das Tumorwachstum unterbindet.

Es konnte gezeigt werden, dass der MAPK Signalweg über $\alpha v\beta 3$ oder $\alpha v\beta 5$ induziert wird, was u. a. zur Proliferation der Endothelzellen führt (Hood *et al.*, 2003). Dieser Signalweg steht bei Verlust der Integrine nicht bzw. nur eingeschränkt zur Verfügung und unterstützt damit die Inhibition der Proliferation. Der phänotypische Knockout von $\alpha v\beta 3$ hat zwar zu einer geringen Aktivierung von p44/42 (Erk1/Erk2) geführt, dies scheint aber in einer adhäsionsunabhängigen Weise zu funktionieren und bewirkt keine stärkere Proliferation der untersuchten Endothelzellen. Zudem kam es durch den induzierten Knockout von $\alpha v\beta 3$ bzw. den Knockout/Knockdown von $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$ zu einer deutlich verstärkten Aktivierung von Akt in den HUVEC. Die durch Phosphorylierung aktivierte Kinase Akt reguliert vor allem das Überleben von Zellen, das über Integrine vermittelt wird (Legate *et al.*, 2009, Shiojima and Walsh 2002) und spielt eine Rolle beim Zellwachstum, der Differenzierung und der Zellbeweglichkeit (Chetty *et al.*, 2009). Aufgrund des Verlustes der Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ und auch $\alpha v\beta 5$ in Endothelzellen ist zu vermuten, dass hierbei eine Signalweiterleitung erfolgt, in der die untersuchten Integrine nicht involviert sind oder eine Kompensation über andere Integrine erfolgt. Vermutlich versuchen die Endothelzellen einer Apoptose entgegenzuwirken, indem Akt aktiviert wird und damit eine Apoptose verhindert wird.

Für Melanomzellen M21 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sie auch ohne Integrine weiter proliferieren und von dem phänotypischen Knockout bzw. Knockdown von $\alpha v\beta 3$ bzw. $\alpha 5\beta 1$ offenbar unbeeinflusst sind. Die Melanomzellen scheinen den Verlust dieser Integrine kompensieren zu können, was ihre Fähigkeit, sich an veränderte Umstände anpassen zu können, unterstreicht. Zusätzlich kann eine über die Adhäsion vermittelte Proliferation bei diesen Tumorzellen weiterhin erfolgen, da die Adhäsion bei den Melanomzellen im Vergleich zu den Endothelzellen nur geringfügig eingeschränkt ist. Dieses unbeeinflusste Proliferationsverhalten weist darauf hin, dass es *in vivo* zwar zu einem Tumorwachstum kommt, die Kommunikation mit der extrazellulären Matrix über die untersuchten Integrine jedoch beeinträchtigt ist und möglicherweise ab einer gewissen Tumorgroße das Wachstum nicht mehr gewährleistet ist. Ein Mausmodell gibt Hinweise darauf, dass besonders $\alpha v\beta 3$ eine bedeutende Rolle für das Überleben beim humanen Melanom M21 *in vivo* spielt und es bei Melanomzellen, denen das Integrin $\alpha v\beta 3$ fehlt, zu einer ausgedehnten Apoptose kommt (Petitclerc *et al.*, 1999). Ein reduziertes Tumorwachstum wird hierbei auf die fehlende

Interaktion von $\alpha v\beta 3$ mit der EZM zurückgeführt, die für das Überleben notwendig ist und nicht auf Veränderungen in der Proliferation der Tumorzellen.

4.4 Die Gefäßbildung von Endothelzellen ist durch eine verminderte Integrinpräsentation aufgehoben

Die Regulation von Proliferation und Adhäsion gehört zu den Aufgaben von Integrinen. Durch eine veränderte Oberflächenpräsentation der untersuchten Integrine auf humanen Nabelschnurendothelzellen wurden die Prozesse nahezu vollständig inhibiert. Die in dieser Arbeit gezeigte, stark verminderte Adhäsion der Endothelzellen an Fibronektin und Vitronektin, hervorgerufen durch den Knockout von $\alpha v\beta 3$ und den Knockdown von $\alpha 5\beta 1$, schränkt die Kommunikation über Integrine stark ein. Dies führt dazu, dass über diese beiden Integrine verschiedene Signale nicht mehr vermittelt werden können. Da der Verlust von $\alpha v\beta 3$ bzw. $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ auch zu einer deutlich herabgesetzten Oberflächenpräsentation von $\alpha v\beta 5$ bei Endothelzellen geführt hat, ist die Kommunikation zusätzlich eingeschränkt. Beispielsweise kann dies letztendlich zur Apoptose von Endothelzellen führen und verhindert vermutlich *in vivo* eine zielgerichtete Kommunikation der Endothelzellen mit der extrazellulären Matrix, wodurch u. a. die Bildung von Kapillaren gestört oder unterbunden ist. Diese Vermutung wird durch den durchgeführten *tube formation assay* unterstützt. Dieser *in vitro* Angiogenese Assay verdeutlicht, dass die veränderte Oberflächenpräsentation der untersuchten Integrine zu einem Verlust der Kapillarbildung führt. Die Kommunikation der Endothelzellen mit der extrazellulären Matrix scheint verändert zu sein, sodass es den Endothelzellen nicht möglich ist, die Matrix umzugestalten und sich dreidimensional anzuordnen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Fähigkeiten wie Migration und Invasion der Endothelzellen nahezu komplett inhibiert worden sind, wodurch Angiogenese und Tumorwachstum *in vivo* inhibiert werden. Diese Vermutung steht im Einklang mit Untersuchungen an Endothelzellen, bei denen $\alpha v\beta 3$ die Produktion der Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) induziert und mit dieser auch interagiert, um die Invasion der Zellen zu unterstützen (Silletti *et al.*, 2001). Matrix Metalloproteinasen katalysieren die Degradation der extrazellulären Matrix und erleichtern somit *in vivo* die Migration und Invasion von Zellen, was für die Angiogenese von enormer Bedeutung ist (Brakebusch *et al.*, 2002). Ein Verlust von $\alpha v\beta 3$ führt somit zur fehlenden Interaktion mit der MMP-2 und resultiert in einer unterdrückten Angiogenese, gefolgt von vermindertem Tumorwachstum (Silletti *et al.*, 2001).

Die stärkste Beeinträchtigung der dreidimensionalen Anordnung der gefäßähnlichen Strukturen wurde bei den Endothelzellen gefunden, denen die beiden Integrine $\alpha v\beta 3$ und

$\alpha 5\beta 1$ fehlen. Der zusätzliche Knockdown des Integrins $\alpha 5\beta 1$ scheint den inhibitorischen Effekt des $\alpha v\beta 3$ -Knockouts auf die Kapillarbildung zu verstärken. Die Zellen sind bei nahezu vollständigem Verlust von $\alpha v\beta 3$ drei Tage nach Infektion noch in geringem Maße in der Lage Kapillaren zu bilden und zeigen hier fünf Tage nach Infektion eine nahezu vollständige Inhibition. Liegt das Integrin $\alpha 5\beta 1$ drei Tage nach Infektion ebenfalls deutlich vermindert auf der Zelloberfläche vor, inhibiert es zusätzlich die Kapillarbildung der Endothelzellen. Die einhergehende herabgesetzte Präsentation von $\alpha v\beta 5$ trägt sehr wahrscheinlich auch einen Teil zur eingeschränkten Fähigkeit der Kapillarbildung bei, denn auch hier ist eine Kommunikation von $\alpha v\beta 5$ mit seiner Umgebung nur in geringem Umfang möglich. Für die Situation *in vivo* bedeutet dies wahrscheinlich, dass sowohl eine durch bFGF induzierte Angiogenese, in die $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ involviert sind, als auch eine durch VEGF induzierte Angiogenese, in die $\alpha v\beta 5$ involviert ist, nicht eingeleitet werden kann. In Hinsicht auf die Situation *in vivo* führt der Verlust der Integrine auf den Endothelzellen wahrscheinlich zu einer mangelnden Versorgung des Tumors bzw. zu einer vollständigen Inhibition der Angiogenese und damit zu einem Absterben der Tumorzellen.

Die Inhibition der Angiogenese *in vitro* und des Tumorstwachstums *in vivo* konnte z. B. durch Einsatz des anti- $\alpha 5\beta 1$ Antikörpers Volociximab gezeigt werden, der sich bereits im klinischen Einsatz befindet (Desgrosellier and Cheresch 2010). Volociximab führte bei Untersuchungen mit Endothelzellen dazu, dass HUVEC nicht mehr in der Lage waren zu proliferieren und die Bildung von Kapillaren in einem *in vitro* Angiogenese Assay inhibiert wurde (Ramakrishnan *et al.*, 2006).

4.5 Der Knockout von $\alpha v\beta 3$ bei Melanomzellen führt zu einer beeinträchtigten Durchblutung der Tumoren

Tumorbildung und -angiogenese stellen ein komplexes Zusammenspiel zwischen den Tumorzellen und ihrer Umgebung dar. Tumorzellen interagieren mit ihrer Umgebung z. B. über Wachstumsfaktoren die sie aussenden, um die Bildung neuer Blutgefäße zu induzieren und damit ihre Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. Der Verlust von Interaktionspartnern während dieses Prozesses kann für die Blutversorgung des Tumors schwerwiegende Folgen haben und damit dessen Überleben und Wachstum gefährden.

Ein Modellsystem, mit dem die Rolle der Integrine bei der Tumorbildung durch die Melanomzellen M21 untersucht werden kann, bietet der Chorioallantoismembran(CAM)-Assay. Hierbei werden Tumorzellen auf die vollständig ausgebildete dreischichtige und gut

durchblutete Chorioallantoismembran aufgetragen, die innerhalb der darauffolgenden sieben Tage einen Tumor ausbilden. Bei diesem Versuch sind lediglich die Melanomzellen von dem Knockout von $\alpha v\beta 3$ allein bzw. dem zusätzlichen Knockdown von $\alpha 5\beta 1$ betroffen, da diese, bevor sie auf die CAM gegeben wurden, mit den rekombinanten Adenoviren infiziert worden sind und somit nur diese Tumorzellen die Intra(dia)bodies exprimieren. Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass sich die Größen aller gebildeten Tumoren nur minimal voneinander unterscheiden. Dies bedeutet, dass die Melanomzellen M21 auch ohne $\alpha v\beta 3$ bzw. in Kombination mit einem Knockdown von $\alpha 5\beta 1$, in der Lage sind Tumoren zu bilden. Dies spiegelt auch das Ergebnis des Proliferationsassays wider, bei dem die Melanomzellen *in vitro*, trotz veränderter Integrinpräsentation, weiterhin proliferieren können. In Untersuchungen mit $\alpha v\beta 3$ -negativen Melanomzellen (M21-L) findet sich dieses Ergebnis ebenfalls. Dort proliferieren diese Melanomzellen (M21-L) *in vitro* genauso wie $\alpha v\beta 3$ -positive Melanomzellen (M21), wohingegen sie jedoch *in vivo* in ihrer Proliferation eingeschränkt zu sein scheinen (Felding-Habermann *et al.*, 1992). Trotz ähnlicher Tumorgroße scheint eine Beeinträchtigung der im CAM-Assay gebildeten Tumoren dennoch vorzuliegen, da die Tumoren, denen nur das Integrin $\alpha v\beta 3$ fehlt, den Eindruck erwecken, schlechter durchblutet zu sein. Die Kontrolltumoren und die Tumoren aus Melanomzellen, die einen phänotypischen Knockout bzw. Knockdown von $\alpha v\beta 3$ bzw. $\alpha 5\beta 1$ haben, zeigen Blutgefäße, die sie umschließen bzw. durchziehen und sind anscheinend gut durchblutet. Die Tumoren hingegen, die aus Melanomzellen hervorgegangen sind, die nur einen phänotypischen $\alpha v\beta 3$ -Knockout tragen, weisen nur wenige sichtbare Blutgefäße auf und scheinen fast gar nicht durchblutet zu sein. Möglicherweise führt das Fehlen des Integrins $\alpha v\beta 3$ dazu, dass der anwachsende Tumor nicht ausreichend mit Blut versorgt wird. Daher wird er ungenügend mit Wachstumsfaktoren und Nährstoffen versorgt, was dazu führen kann, dass der Tumor abstirbt. Der durch den Intrabody JC7U bewirkte phänotypische Knockout von $\alpha v\beta 3$ hat *in vitro* sogar eine leicht verstärkte Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen zur Folge, was in Bezug auf das Verhalten der Melanomzellen beim CAM-Assay möglicherweise ebenfalls zutrifft. Eventuell kommt es dadurch zu einem anfänglich schnell wachsenden Tumor, dem es jedoch nicht gelingt in der gleichen Weise Angiogenese zu induzieren. Dies wäre eine Erklärung für die beobachtete, unzureichende Durchblutung des Tumors, der zwar in der Lage ist die Bildung neuer Blutgefäße per se zu induzieren, dem es aber nicht gelingt, eine ausreichende Blutversorgung zu gewährleisten. Somit scheint die Kommunikation mit der extrazellulären Matrix und/oder den Endothelzellen gestört, wodurch die Proliferation der Tumorzellen einerseits gefördert und die Angiogenese andererseits inhibiert wird. Im Gegensatz zu den

Beobachtungen des phänotypischen Knockouts von $\alpha v\beta 3$ allein, scheint der phänotypische Knockout von $\alpha v\beta 3$ und der zusätzliche Knockdown von $\alpha 5\beta 1$ die Unterversorgung auszugleichen und eine effiziente Angiogenese induzieren zu können. Damit ist bei diesen Tumoren eine ausreichende Blutversorgung offenbar gewährleistet. Dies steht im Widerspruch zu einigen anderen Untersuchungen, bei denen in Tiermodellen mit anti- $\alpha 5\beta 1$ Antikörpern gezeigt werden konnte, dass das Tumorstadium und die Tumorangienese inhibiert werden (Bhaskar *et al.*, 2008, Bhaskar *et al.*, 2007). Somit wäre eigentlich eine deutliche Verschlechterung des Tumorstadiums und der Tumorangienese bei Verlust des Integrins $\alpha 5\beta 1$ erwartet worden.

Durch mangelnde Blutversorgung von Tumoren kann es im weiteren Verlauf möglicherweise zur Apoptose der Tumorzellen kommen, womit insgesamt ein vermindertes Tumorstadium denkbar ist. Diesbezüglich ist ein anderes Modell notwendig, da bei dem CAM-Assay die Zeit der Tumorbildung auf sieben Tage beschränkt ist. In einem Mausmodell z. B. ist der Zeitraum, in dem das Tumorstadium und die Tumorangienese untersucht werden können, deutlich länger und bietet die Möglichkeit diese Hypothese zu bestätigen oder zu widerlegen. Hinweise darauf, dass diese Hypothese der Tumorrückbildung zutreffen könnte, zeigten *in vivo* Mausversuche mit den $\alpha v\beta 3$ -negativen M21L12 Zellen, die im Vergleich zu $\alpha v\beta 3$ -positiven M21 Zellen nur sehr kleine Tumoren bilden und bei denen erst 20 Tage nach Injektion der Zellen messbare Tumoren vorlagen (Petitclerc *et al.*, 1999). Dies wurde auf eine fehlende Interaktion der Tumorzellen über $\alpha v\beta 3$ mit seinen spezifischen Liganden (z. B. Collagen) zurückgeführt, die für deren Überleben, aber nicht deren Proliferation wichtig ist. Auch bei Untersuchungen in einem Mausmodell mit einer humanen Kaposi-Sarkomzelllinie (SLK) konnte mit Hilfe des intravenös verabreichten anti- $\alpha v\beta 3$ Antikörpers (JC-7U IgG) ein vermindertes Tumorstadium gezeigt werden (Rader 2002). Da dieser Antikörper ausschließlich an humanes $\alpha v\beta 3$ bindet, ist diese Beobachtung auf die direkte Bindung an $\alpha v\beta 3$ der Tumorzellen zurückzuführen und nicht auf einen antiangiogenen Effekt. Der in dieser Arbeit verwendete Intrabody JC7U basiert auf JC-7U IgG und besitzt dieselben variablen Regionen. Der Intrabody JC7U hält $\alpha v\beta 3$ jedoch intrazellulär in den Melanomzellen zurück und verhindert damit, im Vergleich zu JC-7U IgG, die Kommunikation mit der zytoplasmatischen Domäne von $\alpha v\beta 3$. Dennoch zeigt sich hier ein vermindertes Tumorstadium, welches wahrscheinlich auf die unzureichende Kommunikation des $\alpha v\beta 3$ Integrins der Tumorzellen mit seiner Umgebung zurückzuführen ist und anscheinend nicht von den $\alpha v\beta 3$ Integrinen der Endothelzellen ausgeht.

Um die makroskopischen Eindrücke der gebildeten Tumoren genauer zu untersuchen, wurden neu gebildete Endothelzellen innerhalb der Tumoren detektiert. Dies wurde durch eine Färbung mit dem MEP21 Antikörper in Kryoschnitten durchgeführt, der reife Endothelzellen detektiert. Die Ergebnisse zeigten, dass bei allen untersuchten CAM-Tumoren von den mit Intra(dia)bodies behandelten Melanomzellen eine Angiogenese induziert wurde. Dies unterstützt die Aussage von Reynolds *et. al* (2002) dass $\alpha v \beta 3$ und $\alpha v \beta 5$ für die Tumorangio-genese nicht essentiell sind (Reynolds *et al.*, 2002). Jedoch scheint die jeweils induzierte Angiogenese in einer unterschiedlichen Blutversorgung der Tumoren zu resultieren. Die entstandenen Kapillaren innerhalb der Tumoren, denen das Integrin $\alpha v \beta 3$ allein fehlt, scheinen im Durchmesser überwiegend kleiner zu sein als die Kapillaren bei den Tumoren, die zusätzlich weniger $\alpha 5 \beta 1$ auf ihrer Oberfläche tragen bzw. den Kontrolltumoren. Diese dünneren Blutgefäße führen eventuell dazu, dass die relativ großen Erythrozyten von Hühnern (ca. 12 μm Durchmesser) die neu gebildeten Blutgefäße nur unzureichend bzw. gar nicht passieren können. Sollte dies der Fall sein, kommt es zwar per se zur Angiogenese, allerdings mit stark oder vollständig eingeschränkter Funktionalität. Zunächst könnte diese Unterversorgung keinen wesentlichen Einfluss auf das Tumorwachstum haben, da die Melanomzellen in der Lage sind ungehindert zu proliferieren. Allerdings ist ein langfristiger Rückgang des Tumorwachstums durchaus denkbar, da der Tumor nach einem längeren Wachstum ohne ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung womöglich allmählich abstirbt. Eine mangelnde Durchblutung erschwert den Tumorzellen den Zugang zum Blutgefäßsystem, wodurch die Bildung von Metastasen wahrscheinlich eingeschränkt oder sogar verhindert wird. Bei Untersuchungen zu dem invasiven Verhalten von Melanomzellen *in vitro* wurde eine verstärkte Invasion beobachtet, wenn die Melanomzellen mit Antikörpern gegen $\alpha v \beta 3$ behandelt wurden (Bafetti *et al.*, 1998). Hierbei führt die Ligation von $\alpha v \beta 3$ zu einer MMP-2 Produktion, womit die Invasion der Zellen begünstigt wird. Bei dem phänotypischen Knockout von $\alpha v \beta 3$ ist die induzierte MMP-2 Produktion nicht zu erwarten, da keine Ligation an $\alpha v \beta 3$ erfolgen kann, was *in vivo* womöglich zu einer verminderten Invasion der Melanomzellen führt.

4.6 Generierung bindender $\alpha v \beta 5$ -Fab-Fragmente

Intrabodies bzw. Intradiabodies, die gegen andere Integrine als $\alpha v \beta 3$ und $\alpha 5 \beta 1$ gerichtet sind, ermöglichen zusätzliche Untersuchungen zur Charakterisierung der Funktion von Integrinen. Neue Intra(dia)bodies können dann hergestellt werden, wenn die dafür notwendigen variablen Regionen für das gewählte Antigen etabliert werden konnten. Mit Hilfe des Antikörper Phagen

Display (Bratkovic 2009, Smith *et al.*, 2005) können solche Regionen aus einer generierten Antikörper-Bibliothek selektiert werden, die zufällig kombinierte variable Regionen enthält und damit ein großes Repertoire unterschiedlicher Antikörperfragmente aufweist. Diese Bibliothek wird durch Amplifikation der variablen Regionen der leichten und schweren Ketten von Antikörpern, ausgehend von der gesamt-RNA von B-Lymphozyten immunisierter Kaninchen, generiert. Sie enthält einzigartige Antikörperfragmente, von denen ein Großteil nicht natürlich vorkommt. Mit guter Wahrscheinlichkeit befinden sich darunter Antikörperfragmente, die eine hohe Affinität für ein spezifisches Antigen besitzen und möglicherweise eine höhere Affinität aufweisen als natürlich vorliegende Antikörper. Aus solch einer diversen Bibliothek mit mehr als 10^9 Klonen können relativ schnell und effektiv spezifische Antikörperfragmente selektiert werden. Auf Grundlage der von Smith (Smith 1985) vorgestellten Präsentation fremder Proteine auf der Oberfläche von filamentösen Phagen sind die Präsentationsmöglichkeiten weiter etabliert worden (Bratkovic 2009). Neben der Auswahl des verwendeten Hüllproteins für die Oberflächenpräsentation (bevorzugt p3), spielt ebenfalls die Verwendung eines Phagen- oder Phagemid-Vektors eine entscheidende Rolle. Der Vorteil von Phagemid-Vektoren liegt in den kombinierten Eigenschaften aus Plasmiden und Phagen-Vektoren. Phagemide vermitteln eine Antibiotika-Resistenz, ermöglichen die Replikation der doppelsträngigen DNA und erst nach Superinfektion mit einem Helferphagen ist die Verpackung der Einzelstrang-DNA in den Phagen möglich. Die Expression des rekombinanten p3 Fusionsproteins erfolgt somit unter kontrollierten Bedingungen. Der in dieser Arbeit verwendete pComb3X-Vektor ist eine Weiterentwicklung des ursprünglichen Phagemid-Vektors pComb3 (Barbas *et al.*, 2001), der neben den eingefügten SfiI-Schnittstellen, die das Klonieren der gewünschten Gensequenz ermöglichen, einen His6-tag, sowie eine HA-tag zur einfacheren Detektion besitzt. Die Induktion des Antikörperfragmentes mit dem damit verbundenen, verkürzten Hüllprotein p3 ist mit IPTG möglich und erleichtert somit die Anwendung dieser Methode und Analyse einzelner Klone. Weiterhin ist es möglich, die Bildung des gewünschten Proteins ohne das Hüllprotein zu induzieren. Dies wird erreicht durch Verwendung eines *non-suppressor E. coli* Stammes, wodurch das ebenfalls vorliegende Amber-Stopp-Codon auch als solches gelesen wird und nur das Antikörperfragment translatiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine neue Fab-Bibliothek hergestellt werden, die gegen das Integrin $\alpha v \beta 5$ gerichtet ist. Aus dieser Bibliothek konnten zehn Klone isoliert werden, die jeweils ein Fab-Fragment enthalten, welches an $\alpha v \beta 5$ bindet. Obwohl die Größe der Fab-Bibliothek mit ca. $7,87 \times 10^6$ Klonen relativ klein war, konnte dennoch für einige der

selektierten Klone im ELISA und im Western Blot eine Bindung an $\alpha v \beta 5$ gezeigt werden. Die zehn isolierten $\alpha v \beta 5$ -Klone zeigen im Western Blot eine Bande auf gleicher Höhe wie die αv -Bande des Serums, was darauf hinweist, dass diese Klone an die αv -Untereinheit binden. Ein weiteres Biopanning mit einer neu hergestellten Fab-Bibliothek gegen $\alpha v \beta 5$, die eine größere Diversität aufweist, resultiert möglicherweise in der Selektion weiterer Fab-Fragmente, die entweder an die $\beta 5$ -Untereinheit binden oder sogar an das gesamte Integrin $\alpha v \beta 5$. Dies ist zu erwarten, da Untersuchungen des Serums im Western Blot ebenfalls eine Bande auf Höhe der $\beta 5$ -Untereinheit zeigen. Diese unterschiedlich bindenden Fab-Fragmente würden das Spektrum zur Untersuchung der Integrine mittels Intrabodies bzw. Intradiabodies erweitern. Die Herstellung von verschiedenen Intrabodies, die gegen die $\beta 5$ - oder αv -Untereinheit gerichtet sind wäre möglich, sowie ein Intrabody gegen das gesamte Integrin $\alpha v \beta 5$. Die variablen Regionen dieser Intrabodies wiederum können verwendet werden, um sie für neue Intradiabodies zu verwenden, die eine Kombination mit den bereits vorliegenden variablen Regionen gegen $\alpha v \beta 3$ bzw. $\alpha 5 \beta 1$ darstellen. Somit könnte sich das Wirkungsspektrum gegen die Integrine deutlich erweitern, wodurch weitere Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Integrine ermöglicht werden.

5 Zusammenfassung

Die Angiogenese ist ein essentieller Prozess bei physiologischen Vorgängen und verdeutlicht in verschiedenen pathologischen Prozessen das sensible Zusammenspiel pro- und antiangiogener Faktoren. Neben Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren beeinflussen Integrine, als Adhäsionsmoleküle, unmittelbar die Funktionen von Zellen. Die Integrine $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ und $\alpha5\beta1$ spielen bei der Vermittlung angiogener Signale offenbar eine entscheidende Rolle. Zwar liegen Integrine auch auf Zellen in gesundem Gewebe vor, allerdings zeigen die Integrine $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ bzw. $\alpha5\beta1$ auf verschiedenen Tumorzellen und/oder Gefäßen, die die Tumorzellen ernähren, eine verstärkte Oberflächenpräsentation. Dies macht sie zu interessanten Zielmolekülen zur therapeutischen Inhibition des Tumorwachstums und der Tumorangiogenese. Trotz zahlreicher Untersuchungen zur Funktionsweise dieser Integrine in der Angiogenese, gibt es bislang noch immer kontroverse Ergebnisse bezüglich ihrer Rolle als pro- oder antiangiogene Moleküle. Die Verwendung von Intrabodies bietet einen neuen Ansatzpunkt zur Untersuchung dieser Integrine und ermöglicht mit Hilfe bispezifischer Intradiabodies eine umfassendere Untersuchung, besonders in Hinsicht auf den Integrin crosstalk.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von Intra(dia)bodies, sowohl bei humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC), als auch bei humanen Melanomzellen (M21), ein phänotypischer Knockout von $\alpha\beta3$ erzielt werden, sowie ein gleichzeitiger Knockout/Knockdown von $\alpha\beta3/\alpha5\beta1$. Es konnte bei Endothelzellen gezeigt werden, dass der Verlust der Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha5\beta1$ Auswirkungen auf die Oberflächenpräsentation von $\alpha\beta5$ und die $\beta1$ -Untereinheit hat, welche dadurch in verringerter Anzahl auf der Oberfläche von Endothelzellen detektierbar sind. Die Endothelzellen sind durch den Verlust der genannten Integrine weder in der Lage, die Matrixmoleküle Fibronectin und Vitronectin zu binden, noch ist es ihnen möglich, weiter zu proliferieren. Zudem sind diese Endothelzellen *in vitro* nicht mehr in der Lage, sich dreidimensional anzuordnen und kapillarähnliche Strukturen auszubilden. Der gezielte Knockdown von $\alpha5\beta1$ bewirkt bei Endothelzellen offensichtlich eine zusätzliche Inhibition dieser Fähigkeiten. Dies deutet auf den Verlust weiterer, notwendiger Eigenschaften wie Invasion und Migration der Endothelzellen hin, was Hinweise auf eine fehlregulierte oder gänzlich inhibierte Angiogenese *in vivo* liefert.

Für die Melanomzellen M21 konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass der Verlust der Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha5\beta1$ eine verminderte Oberflächenpräsentation von $\alpha\beta5$ und der

$\beta 1$ -Untereinheit hervorruft, wenn auch nur in geringerem Maß. Durch den Verlust der Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ können die Melanomzellen zwar etwas schlechter an die Matrixmoleküle Fibronectin und Vitronectin binden, allerdings ist ihre Proliferation *in vitro* nicht beeinträchtigt. In dem mit den Melanomzellen durchgeführten CAM-Assay zeigen diese Zellen, dass sie den Verlust der Integrine weitestgehend tolerieren können. Das Tumorstadium scheint von den fehlenden Integrinen unbeeinflusst zu sein und steht im Einklang mit den *in vitro* Ergebnissen der Proliferationsuntersuchungen. Allerdings scheinen die Melanomzellen für eine funktionelle Tumorangio-genese nicht auf jedes Integrin gleichermaßen verzichten zu können. Durch den phänotypischen Knockout von $\alpha v\beta 3$ kommt es zwar zu einer induzierten, aber eventuell unzureichenden Angiogenese.

Sowohl der phänotypische Knockout von $\alpha v\beta 3$ allein, als auch der zusätzliche Knockdown von $\alpha 5\beta 1$, beeinträchtigen die Endothelzellen im Vergleich zu den Melanomzellen deutlich mehr in deren Adhäsions- und Proliferationsvermögen, sowie daraus resultierende beeinträchtigte Zellfunktionen, die für die Angiogenese essentiell sind. Dies macht Endothelzellen zu einem vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkt für Integrine, da sie sich in jeder Tumorangio-genese, unabhängig von der Tumorart, wiederfinden.

Um das Wirkungsspektrum zur Untersuchung der Integrine in der Angiogenese zu erweitern, konnten in dieser Arbeit, nach erfolgreicher Etablierung des Phagen Display, erstmals bindende Fab-Fragmente gegen das Integrin $\alpha v\beta 5$ selektiert werden. Es ist gelungen, zehn Fab-Fragmente zu selektieren, die sowohl im ELISA, als auch im Western Blot an das Integrin $\alpha v\beta 5$ binden. Diese können, nach Umwandlung in scFvs und genauerer Charakterisierung, als Intrabodies verwendet werden oder aber in Kombination mit einem scFv gegen $\alpha v\beta 3$ bzw. gegen $\alpha 5\beta 1$ als Intradiabodies Verwendung finden. Somit werden weitere Möglichkeiten eröffnet, die Funktion der Integrine in der Angiogenese zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: **Molecular Biology of the cell.** Garland Science, New York 2002.
- Bafetti LM, Young TN, Itoh Y, Stack MS: **Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells.** *J Biol Chem* 1998, **273**:143-149.
- Barbas CF: **pComb3X Family** Internetadresse:
www.scripps.edu/mb/barbas/content/pcomb_images/updatepcomb_image.htm, 2012a
- Barbas CF: **pComb3H Family.** Internetadresse:
www.scripps.edu/mb/barbas/content/pcomb_images/updatepcomb_image.htm, 2012b
- Barbas CF: **pAraH6HATT Sequenz.** Internetadresse:
www.scripps.edu/mb/barbas/content/pcomb_images/pcomb_images_files/pComb_Text_Files/pAraH6H6TT.txt, 2012c
- Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ: **Phage Display: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001.
- Bhaskar V, Fox M, Breinberg D, Wong MH, Wales PE, Rhodes S, DuBridge RB, Ramakrishnan V: **Volociximab, a chimeric integrin alpha5beta1 antibody, inhibits the growth of VX2 tumors in rabbits.** *Invest New Drugs* 2008, **26**:7-12.
- Bhaskar V, Zhang D, Fox M, Seto P, Wong MH, Wales PE, Powers D, Chao DT, Dubridge RB, Ramakrishnan V: **A function blocking anti-mouse integrin alpha5beta1 antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo.** *J Transl Med* 2007, **5**:61.
- Blystone SD, Graham IL, Lindberg FP, Brown EJ: **Integrin alpha v beta 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1.** *J Cell Biol* 1994, **127**:1129-1137.
- Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fassler R: **Integrins in invasive growth.** *J Clin Invest* 2002, **109**:999-1006.
- Bratkovic T: **Progress in phage display: evolution of the technique and its applications.** *Cell Mol Life Sci* 2009.
- Brooks PC: **Role of integrins in angiogenesis.** *Eur J Cancer* 1996, **32A**:2423-2429.
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA: **Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis.** *Science* 1994, **264**:569-571.
- Caswell PT, Vadrevu S, Norman JC: **Integrins: masters and slaves of endocytic transport.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**:843-853.

- Cheresh DA, Spiro RC: **Biosynthetic and functional properties of an Arg-Gly-Asp-directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor.** *J Biol Chem* 1987, **262**:17703-17711.
- Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P, Rao JS: **MMP-2 alters VEGF expression via alphaVbeta3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells.** *Int J Cancer* 2009, **127**:1081-1095.
- Davis GE, Senger DR: **Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization.** *Circ Res* 2005, **97**:1093-1107.
- Deryugina EI, Quigley JP: **Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis.** *Histochem Cell Biol* 2008, **130**:1119-1130.
- Desgrosellier JS, Cheresh DA: **Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities.** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**:9-22.
- Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O: **Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis.** *Q J Nucl Med* 2003, **47**:149-161.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM: **Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis.** *Am J Pathol* 1995, **146**:1029-1039.
- Eliceiri BP, Cheresh DA: **The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development.** *J Clin Invest* 1999, **103**:1227-1230.
- Eskens FA: **Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going?** *Br J Cancer* 2004, **90**:1-7.
- Faull RJ, Ginsberg MH: **Inside-out signaling through integrins.** *J Am Soc Nephrol* 1996, **7**:1091-1097.
- Felding-Habermann B, Mueller BM, Romerdahl CA, Cheresh DA: **Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity.** *J Clin Invest* 1992, **89**:2018-2022.
- Folkman J, Shing Y: **Angiogenesis.** *J Biol Chem* 1992, **267**:10931-10934.
- Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA: **Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins.** *Science* 1995, **270**:1500-1502.
- Galanis M, Irving RA, Hudson PJ: **Bacteriophage library construction and selection of recombinant antibodies.** *Curr Protoc Immunol* 2001, **Chapter 17**:Unit 17 11.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B: **A simplified system for generating recombinant adenoviruses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:2509-2514.

- Hodivala-Dilke KM, Reynolds AR, Reynolds LE: **Integrins in angiogenesis: multitasking molecules in a balancing act.** *Cell Tissue Res* 2003, **314**:131-144.
- Hood JD, Frausto R, Kiosses WB, Schwartz MA, Cheresh DA: **Differential α_v integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis.** *J Cell Biol* 2003, **162**:933-943.
- Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC: **Antibody phage display technology and its applications.** *Immunotechnology* 1998, **4**:1-20.
- Huveneers S, Truong H, Danen HJ: **Integrins: signaling, disease, and therapy.** *Int J Radiat Biol* 2007, **83**:743-751.
- Hynes RO: **Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.** *Cell* 2002, **110**:673-687.
- Jendreyko N, Popkov M, Beerli RR, Chung J, McGavern DB, Rader C, Barbas CF, 3rd: **Intradiabodies, bispecific, tetravalent antibodies for the simultaneous functional knockout of two cell surface receptors.** *J Biol Chem* 2003, **278**:47812-47819.
- Jendreyko N, Popkov M, Rader C, Barbas CF, 3rd: **Phenotypic knockout of VEGF-R2 and Tie-2 with an intradiabody reduces tumor growth and angiogenesis in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:8293-8298.
- Joussen AM, Kirchhof B, Gottstein C: **[Molecular mechanisms of vasculogenesis and angiogenesis. What regulates vascular growth?]**. *Ophthalmologe* 2003, **100**:284-291.
- Kim S, Bakre M, Yin H, Varner JA: **Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A.** *J Clin Invest* 2002, **110**:933-941.
- Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA: **Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin $\alpha_5\beta_1$ with the central cell-binding domain of fibronectin.** *Am J Pathol* 2000a, **156**:1345-1362.
- Kim S, Harris M, Varner JA: **Regulation of integrin $\alpha_v\beta_3$ -mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin $\alpha_5\beta_1$ and protein kinase A.** *J Biol Chem* 2000b, **275**:33920-33928.
- Kumar CC, Malkowski M, Yin Z, Tanghetti E, Yaremko B, Nechuta T, Varner J, Liu M, Smith EM, Neustadt B *et al.*: **Inhibition of angiogenesis and tumor growth by SCH221153, a dual $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrin receptor antagonist.** *Cancer Res* 2001, **61**:2232-2238.
- Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
- Legate KR, Wickstrom SA, Fassler R: **Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling.** *Genes Dev* 2009, **23**:397-418.
- Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951, **193**:265-275.

- Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, Sharff KA, Luu HH, Haydon RC, Kinzler KW *et al.*, : **A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system.** *Nat Protoc* 2007, **2**:1236-1247.
- Marasco WA: **Intrabodies: turning the humoral immune system outside in for intracellular immunization.** *Gene Ther* 1997, **4**:11-15.
- Mould AP, Askari JA, Aota S, Yamada KM, Irie A, Takada Y, Mardon HJ, Humphries MJ: **Defining the topology of integrin alpha5beta1-fibronectin interactions using inhibitory anti-alpha5 and anti-beta1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the alpha5 subunit.** *J Biol Chem* 1997, **272**:17283-17292.
- Mullis KB, Faloona FA: **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.** *Methods Enzymol* 1987, **155**:335-350.
- Petitsclerc E, Stromblad S, von Schalscha TL, Mitjans F, Piulats J, Montgomery AM, Cheresch DA, Brooks PC: **Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival.** *Cancer Res* 1999, **59**:2724-2730.
- Popkov M, Mage RG, Alexander CB, Thundivalappil S, Barbas CF, 3rd, Rader C: **Rabbit immune repertoires as sources for therapeutic monoclonal antibodies: the impact of kappa allotype-correlated variation in cysteine content on antibody libraries selected by phage display.** *J Mol Biol* 2003, **325**:325-335.
- Promega: **Protokoll des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays.** Internetadresse: www.promega.com, 2012
- Rader C, Cheresch DA, Barbas CF, 3rd: **A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:8910-8915.
- Rader C, Popkov M, Neves JA, Barbas CF, 3rd: **Integrin alpha(v)beta3 targeted therapy for Kaposi's sarcoma with an in vitro evolved antibody.** *FASEB J* 2002, **16**:2000-2002.
- Ramakrishnan V, Bhaskar V, Law DA, Wong MH, DuBridge RB, Breinberg D, O'Hara C, Powers DB, Liu G, Grove J *et al.*, : **Preclinical evaluation of an anti-alpha5beta1 integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent.** *J Exp Ther Oncol* 2006, **5**:273-286.
- Retta SF, Cassara G, D'Amato M, Alessandro R, Pellegrino M, Degani S, De Leo G, Silengo L, Tarone G: **Cross talk between beta(1) and alpha(V) integrins: beta(1) affects beta(3) mRNA stability.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**:3126-3138.
- Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG, Robinson SD, Da Violante G, Gourlaouen M, Salih M, Jones MC *et al.*, : **Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors.** *Nat Med* 2009, **15**:392-400.
- Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM: **Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins.** *Nat Med* 2002, **8**:27-34.

- Ria R, Reale A, Castrovilli A, Mangialardi G, Dammacco F, Ribatti D, Vacca A: **Angiogenesis and progression in human melanoma.** *Dermatol Res Pract* 2010, **2010**:185687.
- Ribatti D, Vacca A, Dammacco F: **The role of the vascular phase in solid tumor growth: a historical review.** *Neoplasia* 1999, **1**:293-302.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science* 1988, **239**:487-491.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:5463-5467.
- Schirrmann T, Hust M, Dübel S: **Die Antikörperfabrik: Antikörper für jedes Protein.** *Biologie in unserer Zeit* 2007, **37**:348-351.
- Shiojima I, Walsh K: **Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis.** *Circ Res* 2002, **90**:1243-1250.
- Silletti S, Kessler T, Goldberg J, Boger DL, Cheresch DA: **Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha v beta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:119-124.
- Silva R, D'Amico G, Hodiola-Dilke KM, Reynolds LE: **Integrins: the keys to unlocking angiogenesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, **28**:1703-1713.
- Simon KO, Nutt EM, Abraham DG, Rodan GA, Duong LT: **The alphavbeta3 integrin regulates alpha5beta1-mediated cell migration toward fibronectin.** *J Biol Chem* 1997, **272**:29380-29389.
- Smith GP: **Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.** *Science* 1985, **228**:1315-1317.
- Smith J, Kontermann RE, Embleton J, Kumar S: **Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis.** *Faseb J* 2005, **19**:331-341.
- van der Flier A, Sonnenberg A: **Function and interactions of integrins.** *Cell Tissue Res* 2001, **305**:285-298.
- Weinacker A, Chen A, Agrez M, Cone RI, Nishimura S, Wayner E, Pytela R, Sheppard D: **Role of the integrin alpha v beta 6 in cell attachment to fibronectin. Heterologous expression of intact and secreted forms of the receptor.** *J Biol Chem* 1994, **269**:6940-6948.
- Weis SM, Cheresch DA: **alphav Integrins in Angiogenesis and Cancer.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011, **1**:a006478.
- Weis SM, Cheresch DA: **Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets.** *Nat Med* 2011, **17**:1359-1370.

Danksagungen

Als Erstes möchte ich mich bei meiner Anleiterin Frau Dr. med. N. Kollmar für die Einarbeitung im Labor bedanken, sowie für die Möglichkeit an dieser Thematik zu arbeiten. Vielen Dank auch für die vielen zuversichtlichen Worte, die klare und zielstrebige Arbeitsweise und den vermittelten Optimismus.

Frau Prof. Dr. S. Hoyer-Fender und Herrn PD Dr. W. Kramer möchte ich für die Übernahme des Referats bzw. Korreferats bedanken, sowie für die Fragen, kritischen Worte und Diskussionen in den Thesis Committees.

Ein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. J. Gärtner, die es mir letztendlich ermöglicht hat meine Doktorarbeit zu beenden. Zudem möchte ich Herrn Dr. R. Krätzner danken, dass er sich in dem letzten Jahr meiner Doktorarbeit zusätzlich eingebracht hat und damit einen entscheidenden Teil zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen hat. Vielen Dank auch an Marc Ziegenbein, der mir im Labor zur Seite stand.

Bei Herrn Prof. Dr. Wilting, Dr. Kerstin Buttler und Sonja Schwoch möchte ich mich für die Unterstützung bei den CAM-Assays bedanken.

Frau Prof. Dr. Hoyer-Fender, Herrn PD Dr. Kramer, Herrn Prof. Dr. Heinrich, Herrn Dr. Prpic-Schäper, Herrn Dr. Fink und Herrn Prof. Dr. Wimmer danke ich, dass sie die Prüfungskommission für meine Verteidigung gebildet haben.

Bei Herrn Dr. Hennecke möchte ich mich für die Diskussionen und Hilfestellungen während meiner Doktorarbeit bedanken und auch dafür, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Büromädels Dr. Nathalie Zatula, Dr. Alexandra Schrader, Dr. Julia Bode und Maria Wiese für die gemeinsame Zeit als Doktoranden beruflich wie privat. Eure Unterstützung, besonders in den letzten Monaten meiner Doktorarbeit, weiß ich sehr zu schätzen und vielen Dank für die gemeinsamen Abende!

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich aus tiefstem Herzen, dass sie einfach immer da sind und an mich glauben. Ganz besonders danke ich meinem Vater, der mir jederzeit, kompromisslos geholfen hat und für mich da war. Vielen Dank, das bedeutet mir sehr viel!

Hindernisse und Schwierigkeiten sind Stufen, auf den wir in die Höhe steigen.
(Friedrich Nietzsche)