

Aus der Abteilung Pädiatrie I  
mit Schwerpunkt Pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
(komm. Leiter: Prof. Dr. med. M. Lakomek)  
im Zentrum Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Generierung von Antikörper-Bibliotheken und Selektion von  
Antikörpern gegen die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  mittels  
Phagen-Display-Technologie**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Franziska Künzel  
aus  
Göttingen

Göttingen 2008

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Lakomek

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Angiogenese und Tumorwachstum . . . . .	1
1.2 Integrine . . . . .	3
1.2.1 Die Integrine $\alpha_5\beta_1$ , $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ . . . . .	5
1.3 Antikörper . . . . .	8
1.4 Antikörper-Phagen-Display . . . . .	9
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit . . . . .	13
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1 Verwendete Materialien . . . . .	14
2.2 Verwendete Geräte . . . . .	15
2.3 Verwendete Substanzen . . . . .	16
2.3.1 Reagenzien und Chemikalien . . . . .	16
2.3.2 Antikörper . . . . .	18
2.3.3 Integrine . . . . .	19
2.3.4 Bakterienstämme . . . . .	19
2.3.5 Helferphage . . . . .	19
2.3.6 Plasmide . . . . .	19
2.3.7 Vektor . . . . .	19
2.3.8 Kaninchen . . . . .	19
2.3.9 Primer . . . . .	20
2.4 Medien und Lösungen . . . . .	22
2.5 Allgemeine Methoden im Labor . . . . .	27

2.5.1	Herstellung kompetenter XL1-Blue-Zellen . . . . .	27
2.5.2	Herstellung elektrokompeter ER2738-Zellen . . . . .	28
2.5.3	Testung der Reinheit von E. coli-Bakterien . . . . .	29
2.5.4	Elektroporation von E. coli-Bakterien . . . . .	29
2.5.5	Testung der Elektrokompeter von E. coli-Bakterien . . . . .	29
2.5.6	Präparation von pComb3XSS und pAra H6HA-TT . . . . .	30
2.5.7	Plasmid-DNA-Isolation von pComb3XSS und pAra H6HA-TT . . . . .	30
2.5.8	QIAGEN Plasmid Maxi Kit für pComb3XSS und pAra H6HA-TT . . . . .	31
2.5.9	QIAGEN Plasmid Mini Kit für $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_5\beta_1$ -spezifische Fab-Klone . . . . .	31
2.5.10	Analyse und Präparation von DNA-/RNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese . . . . .	32
2.5.11	Messung der DNA . . . . .	32
2.6	Herstellung chimärer Fab-Antikörper-Bibliotheken gegen die Integrine $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$ . . . . .	33
2.6.1	Immunisierung von New-Zealand-White-Kaninchen mit den huma- nen Integrinen $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$ . . . . .	33
2.6.2	RNA-Isolation aus Milz und Knochenmark der Kaninchen . . . . .	34
2.6.3	cDNA-Synthese aus RNA . . . . .	35
2.6.4	Ethanol-Präzipitation der DNA . . . . .	36
2.6.5	DNA-Extraktion mittels 'Freeze-Squeezing' . . . . .	36
2.6.6	Herstellung chimärer $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Fragmente . . . . .	36
2.6.6.1	Erste Runde Fab-PCR, Amplifizierung variabler und kon- stanter Regionen mittels PCR . . . . .	37
2.6.6.2	Zweite Runde Fab-PCR, 'First Overlap' variabler Regio- nen (Kaninchen) mit konstanten Regionen (human) . . . . .	38
2.6.6.3	Dritte Runde Fab-PCR, 'Second Overlap', Fusion der chi- mären leichten mit der chimären schweren Kette . . . . .	39
2.6.7	SfiI-Restriktionsverdau . . . . .	40
2.6.8	Präparation des Helferphagen VCSM13 . . . . .	40
2.6.9	Test-Ligation der chimären Fab-Fragmente in den Vektor pComb3X . . . . .	41

2.6.10	Ligation der chimären Fab-Bibliothek und Transformation . . . . .	42
2.6.11	Biopanning der chimären Fab-Bibliothek . . . . .	43
2.6.12	Analyse der Fab-Fragment-exprimierenden Klone mittels ELISA . . . . .	45
2.6.13	BstOI-Verdau der Fab-Fragmente . . . . .	46
2.6.14	Sequenzierung selektierter Fab-Fragmente . . . . .	46
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
	Herstellung chimärer Fab-Antikörper-Bibliotheken gegen die Integrine $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$ . . . . .	48
3.1	Immunisierung von New-Zealand-White-Kaninchen mit den huma- nen Integrinen $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$ . . . . .	48
3.2	RNA-Isolation aus Milz und Knochenmark der Kaninchen . . . . .	50
3.3	Herstellung chimärer $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Fragmente . . . . .	51
3.3.1	Erste Runde Fab-PCR . . . . .	51
3.3.2	Zweite Runde Fab-PCR, 'First Overlap' . . . . .	53
3.3.3	Dritte Runde Fab-PCR, 'Second Overlap' . . . . .	54
3.4	Testung der Elektrokompentenz der ER2738-Zellen . . . . .	56
3.5	Klonierung der chimären Fab-Fragmente in den Vektor pComb3X . . . . .	56
3.6	Messung des Phagentiters von VCSM13 . . . . .	58
3.7	Biopanning der chimären $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Bibliothek . . . . .	58
3.8	Analyse der Fab-Fragment-exprimierenden Klone mittels ELISA . . . . .	60
3.9	BstOI-Verdau der Fab-Fragmente . . . . .	62
3.10	Sequenzierung spezifischer $\alpha_v\beta_5$ -/ $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Fragmente . . . . .	64
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>89</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Bidirektionale Signalisierung der Integrinaktivität . . . . .	4
1.2	Struktur eines IgG-Antikörpers . . . . .	8
1.3	Das Phagen-Display . . . . .	11
3.1	Antikörpertiter-Bestimmungen des $\alpha_v\beta_5$ -Kaninchens durch ELISA . . . . .	49
3.2	Antikörpertiter-Bestimmungen des $\alpha_5\beta_1$ -Kaninchens durch ELISA . . . . .	49
3.3	Analyse-Gel der Kaninchen-RNA . . . . .	50
3.4	Erste Runde Fab-PCR der variablen leichten Kette . . . . .	51
3.5	Erste Runde Fab-PCR der variablen schweren Kette . . . . .	52
3.6	Amplifikation von $C_\kappa$ und $C_{H1}$ . . . . .	52
3.7	Amplifikation der chimären leichten Kette . . . . .	53
3.8	Amplifikation der chimären schweren Kette . . . . .	54
3.9	Amplifikation des chimären Fab-Fragmentes . . . . .	55
3.10	Gelelektrophorese der Fab-Fragment-DNA . . . . .	55
3.11	Gelelektrophorese von pComb3XSS und Fab-DNA nach SfiI-Verdau . . . . .	57
3.12	ELISA Fab-exprimierender $\alpha_v\beta_5$ -Klone . . . . .	60
3.13	ELISA Fab-exprimierender $\alpha_5\beta_1$ -Klone . . . . .	61
3.14	Reaktion Fab-exprimierender $\alpha_5\beta_1$ -Klone auf das Integrin $\alpha_5\beta_1$ im ELISA . . . . .	62
3.15	BstOI-Verdau ELISA-positiver $\alpha_v\beta_5$ -Klone . . . . .	63
3.16	BstOI-Verdau ELISA-positiver $\alpha_5\beta_1$ -Klone . . . . .	63
3.17	Chromatogramm der DNA-Sequenz eines Fab-Klons . . . . .	64
3.18	Proteinsequenzen der $\alpha_v\beta_5$ -Fab-Klone . . . . .	66
3.19	Proteinsequenzen der $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Klone . . . . .	67
3.20	Sequenzalignment variabler leichter Ketten nach BLAST-Analyse . . . . .	68
3.21	Sequenzalignment variabler schwerer Ketten nach BLAST-Analyse . . . . .	69

# Tabellenverzeichnis

3.1	Biopanning der chimären $\alpha_v\beta_5$ -Fab-Bibliothek . . . . .	59
3.2	Biopanning der chimären $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Bibliothek . . . . .	59

# 1. Einleitung

## 1.1 Angiogenese und Tumorwachstum

Bei der Entwicklung neuer Gefäße werden zwei Mechanismen unterschieden. Die Vaskulogenese bezeichnet die Entstehung von Blutgefäßen aus embryonalen Endothelvorläuferzellen (Angioblasten). Als Angiogenese hingegen wird der Prozess bezeichnet, bei dem neue Blutgefäße aus bereits bestehenden gebildet werden (JOUSSEN et al. 2003).

Diese Neubildung von Gefäßen, auch bezeichnet als 'angiogene Kaskade', lässt sich in drei Phasen unterteilen. Mit der Initiation beginnend werden vaskuläre Zellen durch Gefäßverletzung, Wunden, Tumorwachstum sowie entzündliche Prozesse mit der Einwanderung von Zytokinen aktiviert. Eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie z.B. der 'basic fibroblast growth factor' (bFGF), der 'vascular endothelial growth factor' (VEGF), der 'platelet-derived endothelial-cell growth factor' (PDEC GF) und der 'tumor necrosis factor alpha' ( $\text{TNF}\alpha$ ) begünstigen die Angiogenese. Zytokine und andere angiogene Moleküle bewirken dabei eine Aktivierung des jeweiligen Gefäßendothels, indem sie an Tyrosinkinase-Rezeptoren binden. In einer zweiten Phase kommt es zu einer gesteigerten Expression von proteolytischen Enzymen und Zelladhäsionsmolekülen mit der Einleitung von Migration, Invasion und Proliferation. Anschließend folgt die dritte und letzte Phase, in der durch Interaktionen zwischen Zellen bzw. Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) die Differenzierung zu neuen Blutgefäßen eingeleitet wird (BROOKS 1996).

Angiogenese ist essentiell für physiologische Prozesse wie Reproduktion, Wundheilung und die Entwicklung neuen Gewebes. Allerdings sind viele Erkrankungen wie z.B. die diabetische Retinopathie, die rheumatische Arthritis und Neoplasien bzw. Metastasenbildung

mit einer unregulierten Angiogenese assoziiert (BROOKS 1996, FOLKMAN und SHING 1992). Dabei kommt es zu einem Ungleichgewicht von stimulatorischen und inhibitorischen Faktoren. Blutgefäße von Tumoren legen in ihrem Wachstum keine Ruhephasen ein, was konstant und unaufhörlich zu neuer pathologischer Gefäßbildung führt. Sie sind in Architektur und Verlauf abnormal und können dabei dilatiert, verwinkelt und in ihrer Form völlig unregelmäßig sein. Der Übergang von kontrollierter zu unkontrollierter Angiogenese in Tumoren, der sogenannte 'angiogenic switch', ist abhängig von der Art des Tumors und kann in jedem Tumorstadium auftreten. Dabei korreliert die angiogene Aktivität keinesfalls mit der Malignität eines Tumors, kann aber durchaus prognostisch hinweisend sein (BERGERS und BENJAMIN 2003, CARMELIET und JAIN 2000, HANAHAN und FOLKMAN 1996).

Die Hypothese, dass Tumorwachstum von Angiogenese abhängig ist, wurde erstmals im Jahre 1971 von Judah Folkman aufgestellt. Er stellte fest, dass das Wachstum neuer Gefäße in Tumoren deutlich erhöht ist, und dass Tumoren ohne Neovaskularisierung in ihrer Größe erheblich kleiner sind (FOLKMAN 1971).

Tumorzellen haben die Fähigkeit, sich gesundem Gewebe anzuschließen und von dessen Blutversorgung zu profitieren. Die vermehrte Expression von Angiopoietin-2, einem Antagonisten des angiogenen Tie-2-Rezeptors, bewirkt eine Nekrotisierung des befallenen, partiell auch des tumorösen Gewebes und leitet so die Regression bzw. Apoptose dieser Strukturen ein. Hingegen ist VEGF als proangiogener Wachstumsfaktor im Tumor hochreguliert und wirkt damit einem Absterben des Tumors entgegen (HOLASH et al. 1999). In einem humanen Melanom-Xenograft-Modell (M21) konnte gezeigt werden, dass der gleichzeitige Knockout der Endothelzellrezeptor-Tyrosinkinase VEGF-Rezeptor 2 (VEGF-R2) und Tie-2 zu einer erheblichen Inhibition von Tumorwachstum und Angiogenese führt (JENDREYKO et al. 2005).

Auch Hypoxie, die als ein potenter Trigger von Angiogenese in normalem Gewebe gilt, stellt eine zusätzliche Ursache für das kontinuierliche Wachstum von Tumoren dar. Die Freisetzung von 'hypoxia-inducible factors' (HIFs), welche durch ihre Eigenschaft als Transkriptionsfaktoren eine angiogenetische Antwort auslösen, wird dabei aktiviert (SHCHORS und EVAN 2007, HARRIS 2002). Außerdem spielt die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 in vielen Tumoren eine Rolle. Durch eine verminderte Apopto-

serate unter Hypoxiebedingungen besteht eine geringere Abhängigkeit dieser Tumorzellen vom vaskulären System (YU et al. 2002). Durch tumorinduzierte Angiogenese wird nicht nur das Wachstum neoplastischen Gewebes, sondern auch der Eintritt von Tumorzellen in den Blutkreislauf begünstigt und somit das Risiko einer Metastasierung erhöht. Die Hemmung der Blutgefäßneubildung ist daher direkt mit einer Hemmung der Fähigkeit eines Tumors, Metastasen zu bilden, assoziiert (ZETTER 1998).

Mit dem Ziel Tumorwachstum einzudämmen, werden zur Zeit mehrere Angiogenese-Inhibitoren mit jeweils unterschiedlichen Ansatzpunkten in der Tumorangiogenese in Klinik und Forschung als antiangiogene Therapie eingesetzt bzw. erprobt. Dazu zählen Inhibitoren angiogener Wachstumsfaktoren wie monoklonale Antikörper gegen VEGF (z.B. Bevacizumab), VEGFR-2 (IMC-1C11) und VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase (z.B. SU5416), Inhibitoren der Endothelzell-Proliferation (z.B. Angiostatin, Endostatin) und als angiogene Inhibitoren mit Wirkung auf die extrazelluläre Matrix (ECM) die Integrin-Inhibitoren Vitaxin® und Cilengitide® (siehe 1.2.1) (ESKENS 2004).

## 1.2 Integrine

Bei den Integrinen handelt es sich um glykosylierte heterodimere Zelladhäsionsmoleküle, welche Reaktionen zwischen Zellen vermitteln und dabei Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Zellmigration beeinflussen (VAN DER FLIER und SONNENBERG 2001). Gewöhnlich binden Integrine an Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) und die zellulären Rezeptoren 'vascular cell adhesion molecule-1' (VCAM-1) und 'intercellular cell adhesion molecule' (ICAM) (BOUVARD et al. 2001).

Integrine bestehen aus 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten, welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind und 24 unterschiedliche ligandenspezifische  $\alpha/\beta$ -Paare bilden. Die sogenannte 'inserted' (I) Domäne stellt in der Hälfte der Integrin- $\alpha$ -Untereinheiten hauptsächlich die ligandenbindende Einheit dar (LUO et al. 2007).

Jede Integrin-Untereinheit besitzt eine große extrazelluläre Domäne, eine membran-umfassende Domäne und einen kurzen nicht-katalytischen zytoplasmatischen Anteil (VAN DER FLIER und SONNENBERG 2001).

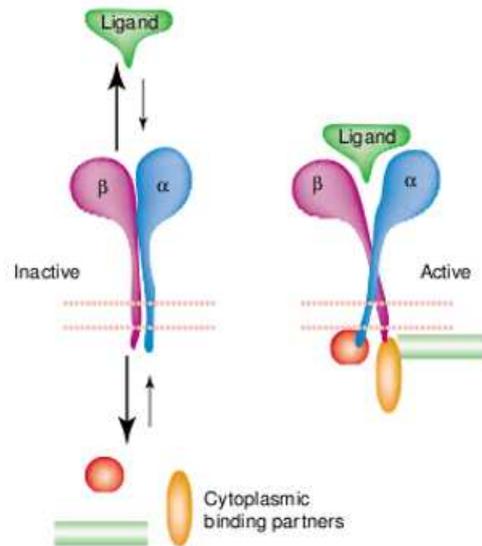


Abbildung 1.1: Bidirektionale Signalisierung der Integrinaktivität durch intra- und extrazelluläre Veränderungen (Quelle: SCHWARTZ 2001, S. 468).

Da Integrine die Verbindung der extrazellulären Umgebung mit dem Zellinneren, dem Zytoskelett, herstellen, übernehmen sie die wichtige Funktion der Signaltransduktion (VAN DER FLIER und SONNENBERG 2001). Nach Aktivierung der Integrine durch ihre Liganden kommt es zu Konformationsänderungen der Untereinheiten und damit zur festen Bindung des Liganden bzw. zur Auslösung intrazellulärer Mechanismen (GIANCOTTI 2003, SCHWARTZ 2001) (Abb. 1.1).

In diesem Zusammenhang spielt das sogenannte 'outside-in signalling' eine wichtige Rolle, bei dem Integrine neben ihrer Vermittlung der Zelladhäsion zur extrazellulären Matrix auch Signalwege im Inneren der Zelle regulieren.

Das sogenannte 'inside-out signalling' beschreibt das Ansprechen der Integrine auf Signale, die von intrazellulär kommen. So kann die Interaktion mit der extrazellulären Matrix sowie die Affinität der Integrine mit ihrem Liganden beeinflusst werden (HOOD und CHERESH 2002).

Intrazelluläre Signalwege sind u.a. die Phosphorylierung der 'focal adhesion kinase' (FAK), das Rekrutieren von Adaptorproteinen wie des SHC's ('Src homologous and collagen-like') und die Aktivierung von Kinasen der Src-Familie (SFKs) sowie GTPasen. Damit sind Integrine überlebenswichtig für eine Zelle und deren Verhalten in ihrer Umgebung (GUO

und GIANCOTTI 2004). Durch ihre vielfältige Funktion lösen Integrine überlebensfördernde Mechanismen in der Zelle aus, die eine Apoptose derselben verhindern. So lässt sich eine erhöhte Integrinexpression in malignen Tumoren und ihren Vorstufen finden. Ein vermehrtes Vorkommen des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins in Melanomzellen kann z.B. das metastatische Potential des Tumors erhöhen (HOOD und CHERESH 2002, PETITCLERC et al. 1999). Dagegen aktivieren  $\beta_1$ -Integrine Interleukin-abhängige Signalwege in Tumorzellen des Mamma-Ca's und unterstützen damit deren Zellmotilität und Metastasierung (HAN-NIGAN et al. 2005).

Das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  beschützt Zellen vor einer Apoptose, indem es Fibronectin bindet und die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 induziert. Auch eine Aktivierung von SHC durch die Integrine  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  verhindert den Zelltod (GIANCOTTI und RUOSLAHTI 1999).

### 1.2.1 Die Integrine $\alpha_5\beta_1$ , $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$

Die vermehrte Integrinproduktion durch neoplastische Zellen begünstigt also Proliferation, Überleben und Migration der Tumorzelle. Außerdem benötigen Tumoren für Wachstum und Invasion in umliegendes Gewebe den Anschluss an das Gefäßsystem. Das Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , welches als erstes  $\alpha_v$ -Integrin als Regulator in der Angiogenese entdeckt worden war, wurde bisher nur in humanem Tumorgewebe gefunden, nicht jedoch in gesundem Gewebe im Menschen (BROOKS et al. 1994).

Es liegt nahe, dass Integrine eine wesentliche Rolle in der Tumorangio-genese spielen, dabei jedoch sowohl aktiviert als auch gehemmt werden. So können die beiden Wachstumsfaktoren 'vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor' (VEGF) und 'basic fibroblast growth factor' (bFGF) ihre Expression erhöhen, während z.B. Endostatin, ein Fragment von Kollagen XVIII, mit  $\alpha_5\beta_1$  interagiert und es in seiner Wirkung hemmt (GUO und GIANCOTTI 2004).

Sowohl Blutgefäße humaner Tumoren als auch mit Wachstumsfaktoren stimuliertes Gewebe weisen eine erhöhte Expression von Fibronectin und seinem Rezeptor  $\alpha_5\beta_1$  auf, normale Blutgefäße bzw. unstimuliertes Gewebe im Menschen dagegen eine deutlich reduzierte Bil-

dung dieser Moleküle (KIM et al. 2000 b). In der Vaskulogenese und Angiogenese spielt  $\alpha_5\beta_1$  eine Schlüsselrolle.  $\beta_1$ -Integrin Knockout-Maus-Embryonen konnten aufgrund einer defekten Implantation im Uterus nicht überleben und auch der  $\alpha_5$ -Knockout führte bei Maus-Embryonen zum Tode (FÄSSLER und MEYER 1995, YANG et al. 1993).

Die Bindung von  $\alpha_5\beta_1$  an seinen Liganden Fibronectin führt zu einer verstärkten Zellproliferation. Erfolgt jedoch keine Ligation, wird die Proliferation der Zellen gehemmt (VARNER et al. 1995). Neben  $\alpha_5\beta_1$  hat auch  $\alpha_v\beta_3$  die Fähigkeit, als Fibronectinrezeptor zu wirken. Beide Integrine,  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$ , sind somit wesentlich an der durch bFGF-, 'tumor necrosis factor alpha' (TNF $\alpha$ )-, Interleukin 8 (IL-8)- und Tumor-induzierten Angiogenese beteiligt, weniger jedoch an der durch VEGF-induzierten Gefäßbildung (KIM et al. 2000 b). Das Integrin  $\alpha_v\beta_5$  dagegen aktiviert VEGF, jedoch nicht die bFGF-induzierte Angiogenese. Antikörper gegen  $\alpha_v\beta_5$  blockieren die VEGF-induzierte Angiogenese, während Antagonisten von  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  die durch bFGF-induzierte Angiogenese hemmen. Daher stellen diese Integrine wichtige Angriffspunkte in der Therapie von Tumoren und der Hemmung von Tumorwachstum dar (FRIEDLANDER et al. 1995, KIM et al. 2000 a).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass  $\alpha_5\beta_1$  mittels Regulierung der Proteinkinase A (PKA)  $\alpha_v\beta_3$  während der Zellmigration und Angiogenese von Endothelzellen in seiner Funktion beeinflusst (KIM et al. 2000 a). Die Ligation des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  kann hingegen eine durch  $\alpha_5\beta_1$  vermittelte Zellmigration und Phagozytose hemmen. Dieser Prozess, der auch als 'integrin crosstalk' bezeichnet wird, bedeutet die gegenseitige Beeinflussung der Integrine und Blockierung in ihrer Wirkung (BLYSTONE et al. 1994). Somit steuert dieser 'integrin crosstalk' Koordination und Vermittlung von Signalen zwischen Integrinen (SIMON et al. 1997).

Die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  gelten als proangiogene Faktoren. Da sie in neugebildeten Gefäßen vermehrt exprimiert werden, kann durch ihre Inhibition eine Neovaskularisation und Tumorwachstum unterdrückt werden (BROOKS et al. 1994). Sowohl der  $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper Vitaxin® als auch das  $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ -selektive Cilengitide® induzieren z.B. die Apoptose neugebildeter Endothelzellen in Blutgefäßen von Tumoren und sind antiangiogen wirksam. Als  $\alpha_5\beta_1$ -Antagonist wurde bereits Volociximab® in Phase-II-Studien bei

Erkrankungen wie dem Nierenzellkarzinom eingesetzt (GUTHEIL et al. 2000, ESKENS et al. 2003, FIGLIN et al. 2006).

Konträr dazu zeigten Knockout-Mäuse, die keine  $\beta_3$ - bzw.  $\beta_3$ - und  $\beta_5$ -Integrine bildeten, ein erhöhtes Tumorwachstum und eine vermehrte Angiogenese (REYNOLDS LE et al. 2002, TAVERNA et al. 2004). Reynolds et al. wiesen nach, dass die angiogene Antwort auf Hypoxie und VEGF in der Abwesenheit von  $\beta_3$ -Integrinen signifikant gesteigert ist. In Endothelzellen, die keinerlei  $\beta_3$ -Integrine besaßen, wurden deutlich erhöhte VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2)-Level festgestellt. Dies führte zu der Annahme, dass die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  nicht grundlegend für eine VEGF-spezifische Vaskularisierung und Tumorbildung sind (REYNOLDS LE et al. 2002).

In einer Folgestudie zeigte sich dann, dass der 'fetal liver kinase' (FLK1/VEGFR-2)-Signalweg für das vermehrte Wachstum und eine gesteigerte Angiogenese der Tumoren bei  $\beta_3$ -Knockout-Mäusen verantwortlich ist. Unter VEGF-Stimulation wiesen die Endothelzellen dieser Mäuse ( $\beta_3$ ) höhere Werte der phosphorylierten FIK1 und 'extracellular-related kinase' (ERK1/2) auf als Endothelzellen des Wildtyps. Antagonisten der FLK1 konnten die durch VEGF induzierte Migration und Proliferation von Endothelzellen in  $\beta_3$ -Knockout-Mäusen hemmen.

Die gesteigerte Aktivierung des FLK1-Signalwegs führt zu einer vermehrten VEGF-Antwort in Endothelzellen und lässt daher vermuten, dass dies die Ursache für vermehrtes Tumorwachstum und ungehemmte Angiogenese in  $\beta_3$ -Knockout-Mäusen ist (REYNOLDS AR et al. 2004).

Studien über Integrin-Antagonisten zeigten, dass  $\alpha_v$ -Integrine Angiogenese aktivieren, während dagegen der genetische Knockout dieser Integrine Hinweise dafür gibt, dass  $\alpha_v$ -Integrine die Angiogenese nicht beeinflussen. Möglicherweise stellen  $\alpha_v$ -Integrine negative Regulatoren dar, so dass durch ihre Hemmung Angiogenese auf einem anderen Wege, z.B. durch Hochregulation von VEGF, provoziert wird (AVRAAMIDES et al. 2008).

## 1.3 Antikörper

Antikörper gehören zur Gruppe der Immunglobuline und werden im Rahmen einer Immunreaktion von differenzierten B-Lymphozyten, den Plasmazellen, sezerniert. Antikörper haben die Fähigkeit, spezifisch Antigene zu binden, so dass die dadurch entstandenen Immunkomplexe gezielt eliminiert werden können.

Der am häufigsten vorkommende Isotyp in der Gruppe der Immunglobuline ist das IgG. Jedes IgG-Molekül besteht aus je zwei schweren (H='heavy chain') und zwei leichten (L='light chain') Proteinketten, wobei die beiden schweren Ketten sowie jeweils eine schwere Kette mit einer leichten Kette über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die schweren Ketten bestehen aus den drei konstanten Domänen  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$  und der variablen Region  $V_H$ . Die leichten Ketten, die in die zwei Typen lambda ( $\lambda$ ) und kappa ( $\kappa$ ) unterteilt sind, werden aus der konstanten leichten Region  $C_L$  und der variablen leichten Region  $V_L$  gebildet (Abb. 1.2).

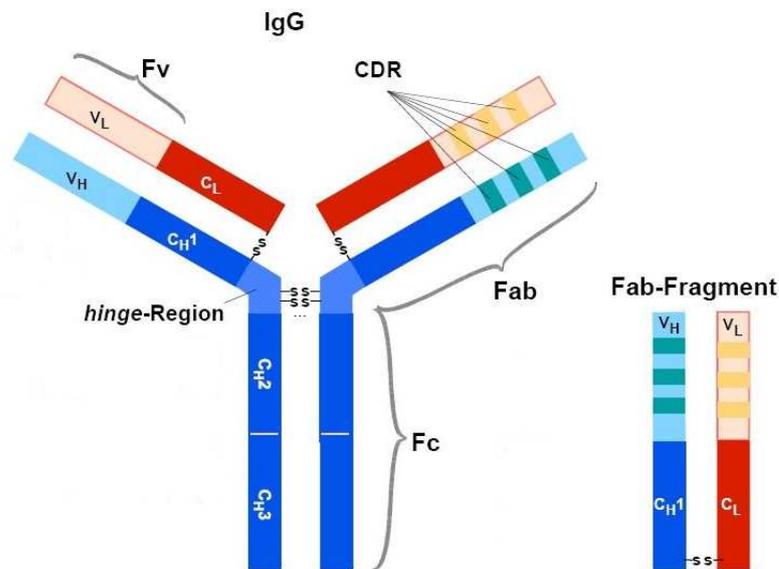


Abbildung 1.2: Struktur eines IgG-Antikörpers mit der variablen Region der leichten ( $V_L$ ) und schweren ( $V_H$ ) Kette und den konstanten Regionen der leichten ( $C_L$ ) und schweren ( $C_H$ ) Kette; rechts das antigenbindende Fragment (Fab) (Quelle: SCHMIEDL und DÜBEL 2004, S. 47).

So lässt sich ein Antikörper schematisch als eine Y-förmige Struktur darstellen, bei der die konstanten (C) und variablen (V) Domänen für die Funktion des Antikörpers verantwortlich sind. Die variablen Domänen sind an den Enden der leichten und schweren Ketten lokalisiert und bilden die Antigen-Bindungsstelle. Dabei sind die sogenannten Komplementarität-determinierten Regionen (CDR1, CDR2, CDR3) für die hohe Variabilität der Antikörperbindungsstellen zuständig, indem sie als Bestandteil der variablen Domänen ( $V_L$ ,  $V_H$ ) drei hypervariable schleifenförmige Regionen bilden und zur antigenen Determinante komplementär sind. CDR3, welches die Verbindung der variablen Domäne zur konstanten Domäne herstellt, besitzt dabei die größte Variabilität. Die zwischen den CD-Regionen lokalisierten Framework-Regionen (FR) weisen eine geringere Variabilität auf.

Die Leichtketten sowie  $V_H$  und  $C_H1$  der schweren Ketten bilden die antigenbindenden Fragmente Fab ('fragment antigen binding') (Abb. 1.2), die Domänen  $C_H2$  und  $C_H3$  hingegen werden zusammen als das kristalline Fragment Fc ('fragment crystallizable') bezeichnet und interagieren mit Zelloberflächenrezeptoren (Fc-Rezeptoren) und dem Komplementsystem zur Aktivierung des Immunsystems.

Das Fab-Fragment kann mit Hilfe des Enzyms Papain oberhalb der Disulfidbrücken vom Fc-Fragment getrennt werden, so dass zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment entstehen. Wird durch Pepsin unterhalb der Gelenkregion ('hinge region') gespalten, so erhält man ein F(ab')<sub>2</sub>-Fragment und ein Fc-Fragment. Das 'single chain variable Fragment' (scFv) wird aus den beiden Anteilen der variablen Region  $V_L$  und  $V_H$  gebildet, die über einen Polypeptidlinker miteinander verbunden sind. Fab-Fragmente (55 kDa) und scFv-Fragmente (25 kDa) werden wegen ihrer geringen Größe bevorzugt für die Therapie von z.B. Tumoren eingesetzt (ABBAS und LICHTMAN 2006, JANEWAY et al. 2005).

## 1.4 Antikörper-Phagen-Display

Bei der Phagen-Display-Technologie werden rekombinante Peptidmoleküle auf der Oberfläche von filamentösen Bakteriophagen präsentiert ('displayed'). So lassen sich komplexe Phagen-Display-Bibliotheken von z.B. Antikörpern oder ihrer Fab-Moleküle ('fragment antigen binding') isolieren, welche mit hoher Affinität und Spezifität ganz bestimmte

Zielmoleküle binden (SMITH J et al. 2005, HOOGENBOOM et al. 1998). Die Phagen-Display-Technologie löste im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte mehr und mehr die zuvor favorisierte, aber deutlich aufwendigere Hybridom-Technologie ab, in der durch Fusion antikörperproduzierender B-Zellen mit Myelomzellen (Zellen eines B-Zell-Tumors) Hybride hergestellt werden, die unbegrenzt monoklonale Antikörper produzieren (KÖHLER und MILSTEIN 1975).

Den Grundstein für das Phagen-Display legte im Jahre 1985 G. P. Smith, der den ersten Bakterienphagenvektor zum Einsatz brachte, durch den eine Expression rekombinanter Peptidmoleküle überhaupt ermöglicht wurde (SMITH GP 1985). Mit der Produktion von Antikörper-Fragmenten im periplasmatischen Raum von *E. coli* durch Skerra und Plückthun im Jahre 1988 wurde so eine Methode zur 'in-vitro'-Selektion von Antikörper-Fragmenten über ihre Bindungseigenschaften entwickelt (SKERRA und PLÜCKTHUN 1988, BARBAS et al. 1991). In nachfolgenden Studien konnte in diversen Arbeitsgruppen das Display von Antikörper-Fragmenten wie 'single chain'-Fragmenten (scFv) und Fab-Fragmenten (Fab) auf der Oberfläche von Phagen nachgewiesen sowie eine deutliche Affinitätssteigerung durch Selektion über mehrere Runden erzielt werden (McCAFFERTY et al. 1990, HOOGENBOOM et al. 1991, GARRARD et al. 1991, CHANG et al. 1991).

Bakteriophagen sind eine Gruppe von Viren, die Bakterien infizieren und ihre Phagen-DNA in die Wirtszelle injizieren. Der am weitesten verbreitete Phage zur Konstruktion kombinatorischer Bibliotheken ist der filamentöse *E. coli*-Bakteriophage M13 mit dem an seiner Oberfläche gelegenen Protein pIII ('minor coat protein'). Die DNA der rekombinanten Antikörper-Fragmente wird nach Ligation mit seinem Phagemid-Vektor (z.B. pComb3X) in *E. coli*-Zellen transformiert, welche dann mit dem Helferphagen M13 koinfiziert werden. Die Infektion des Wirtes mit dem Phagen genom erfolgt über eine spezifische Interaktion mit dem F-Pilus (F='fertility'), der von außen im Periplasma der *E. coli*-Zelle verankert ist. Der Phage hat die Fähigkeit, das genetische Material von Antikörper-Fragmenten im Inneren der *E. coli*-Zelle aufzunehmen und an seiner Oberfläche zu exprimieren. Der Phänotyp des Phagen entspricht somit seinem Genotypen. Die Expression der eingeschleusten Gene erfolgt über eines der drei Mantelproteine: Gen 3 Protein (pIII), Gen 6 Protein (pVI), Gen 8 Protein (pVIII). Neusynthetisierte Hüllprote-

ine werden wieder über die Pectatylase pelB-Leader-Sequenz ins Periplasma transloziert und in die bakterielle Membran eingebaut. Durch das oxidierende Milieu des Periplasmas erfolgt eine optimale Generierung der Antikörper-Fragmente zu funktionellen Proteinen.

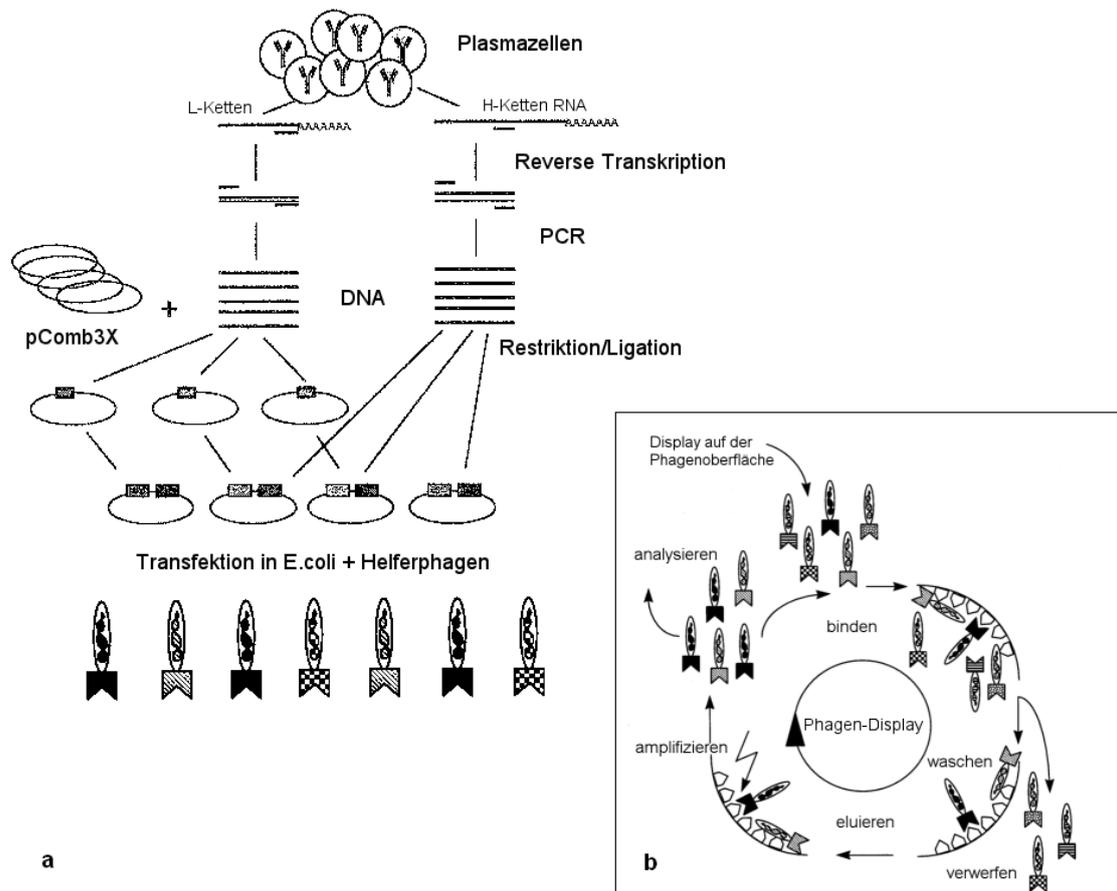


Abbildung 1.3: a) Fab-kodierende DNA wird in den Vektor (pComb3X) kloniert und in E. coli transformiert. Bildung der Phagenbibliothek nach Helferphageninfektion (adaptiert von FISCHER 1996, S. 27). b) Phagen-Display-Zyklus. Phagen, welche die Fab-kodierende DNA nach außen präsentieren, binden das immobilisierte Antigen. In mehreren Selektionsrunden werden die spezifischen Phagen durch intensives Waschen isoliert und erneut in E. coli amplifiziert (adaptiert von HOOGENBOOM et al. 1998, S. 2).

Neue Phagen werden so von der Wirtszelle freigesetzt, ohne ein Zugrundegehen dieser zu verursachen (BARBAS et al. 2001, AZZAZY und HIGHSMITH 2002, BREITLING et al. 1991, HOOGENBOOM et al. 1998, SMITH J et al. 2005). Das sogenannte Biopanning stellt das Selektionsverfahren antigenspezifischer Phagen dar, bei dem die Phagen-Bibliothek auf eine immobilisierte Zielstruktur (Antigen) gegeben wird und die nicht-gebundenen Phagen in mehreren intensiven Waschschritten isoliert werden. Die verbliebenen antigenspezifischen Phagen werden vom Zielprotein gelöst, durch Infektion von *E. coli*-Bakterien in diesen wieder vermehrt und für weitere Selektionsrunden eingesetzt (Abb. 1.3). Der jeweilige Titer der Phagenklone vor (Input) und nach (Output) der Selektion kann durch Auszählen der Kolonien bestimmt und beobachtet werden. Im Biopanning werden durch kontinuierliche Erhöhung der Waschschrritte bei gleichzeitiger Reduzierung der Antigenmenge über mehrere Runden immer spezifischere Antikörper selektiert (McCAFFERTY et al. 1990, WINTER et al. 1994). Da die rekombinanten Phagen die genetische Matrize der Fab-Fragmente enthalten, können im ELISA die Antigenbindung kontrolliert und anschließend die Immunglobulin-Gene analysiert und sequenziert werden (FISCHER 1996).

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Integrine beeinflussen in ihrer Eigenschaft als Adhäsionsmoleküle sowohl die Interaktion zwischen Zellen als auch deren Verhalten. Die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  spielen bei der Vermittlung der angiogenen Signale von Endothelzellen auf angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF eine entscheidende Rolle. Sie haben eine Schlüsselfunktion in gesundem Gewebe als auch Tumorgewebe und regulieren somit die Tumorangio-genese.

Ziel dieser Doktorarbeit ist die Herstellung chimärer Fab-Antikörper-Bibliotheken bestehend aus humanen und Kaninchen-Anteilen gegen die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  und die Selektion von spezifischen Antikörpern gegen diese Integrine mittels der Phagen-Display-Technologie. Dazu wird ein Kaninchen mit dem entsprechenden Integrin immunisiert und aus Milz und Knochenmark die kombinatorische Antikörper-Fab-Bibliothek hergestellt. In der vorliegenden Arbeit werden mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie Gensegmente, die die antigenbindende variable Domäne von Antikörpern kodieren, mit Genen für das Hüllprotein eines Bakteriophagen in einem geeigneten Expressionsvektorsystem fusioniert. Nach Transformation in *E. coli*-Zellen und Koinfektion mit Helferphagen werden die rekombinanten Antikörper-Fragmente auf der Oberfläche der neuen Phagen funktionell exprimiert. Gleichzeitig tragen sie in ihrem Inneren die genetische Matrize für das jeweilige Fab-Fragment. Dadurch ist es möglich, mittels Biopanning die relevanten Phagen über die Bindung des exprimierten Proteins an fixierte Antigene, sprich Integrine, aus zahlreichen irrelevanten Phagen zu isolieren. Durch die Phagen-Display-Technologie können Antikörper-Fragmente mit einer besonders hohen Spezifität und Affinität zu ihrem Antigen assembliert werden.

Die Herstellung von Fab-Antikörpern gegen  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  stellt die Grundlage für weitere experimentelle Ansätze dar, in denen die Wirkungsweise dieser Integrine, ihre Wechselwirkungen untereinander und ihre Rollen in der Tumorangio-genese erforscht werden können. Durch die Generierung von spezifischen Kaninchen-Fab-Fragmenten mit einem humanen Anteil besteht die Möglichkeit für einen therapeutischen Einsatz am Menschen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

Cellstar® PP-Test tubes (50 ml sterile)	Greiner bio-one, Deutschland
Cellstar® PP-Test tubes (15 ml sterile)	Greiner bio-one, Deutschland
Costar® ELISA-Platte, 96 wells	Corning Incorporated, USA
Disposable syringe 5 ml, all PP, Luer-Lock	Sigma-Aldrich®, Deutschland
ELISA-Platten, Maxi Sorp	Nunc <sup>TM</sup> , Dänemark
Eppendorf Tube 0.5 ml, 1.5 ml, 2.0 ml	Eppendorf, Deutschland
Falcon® Röhrchen 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson Labware, USA
GenePulser Cuvettes, 0.2 cm gap	BIO-RAD, Hercules, USA
KimWipes® Lite	Kimberley-Clark®, Deutschland
Küvetten, No./REF 67.742	Sarstedt, Deutschland
Minisart, 0.2 µm	Sartorius, Deutschland
Minisart plus, 0.2 µm	Sartorius, Deutschland
Oak Ridge Röhrchen (RNA), PPCO	Nalgene®, Nalge Nunc International, USA
Omnifix®, 10 ml, Luer Lock Solo	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, USA
PCR Softstrips tubes 0.2 ml, farblos	Biozym Scientific, Deutschland
PCR Softstrips caps 0.2 ml, farblos	Biozym Scientific, Deutschland
Petrischalen 100x20 mm	Greiner, Deutschland
Pipettenspitzen Safeseal Tips premium (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1.5 ml	Eppendorf Biopur, Deutschland

Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Deutschland
Stopcock, 3-way Luer-Lock (B)	Sigma-Aldrich®, Deutschland
Technocut Scalpel	HMD Healthcare Ldd., U.K.
Ultrafree®MC, Centrifuge Filter Devices	Amicon® Bioseparations, Millipore, USA
UVette®	Eppendorf, Deutschland
Wide-Mouth Centrifuge bottles 250 ml, HDPE	Nalgene®, Nalge Nunc International, USA

sowie zahlreiche andere laborübliche Verbrauchsmaterialien.

## 2.2 Verwendete Geräte

Autoklav	Tecnomara, Deutschland
3100-Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Deutschland
Brutschrank	Memmert, Deutschland
Bunsenbrenner Labogaz, 206	Campinggaz®, Frankreich
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Deutschland
Digitalwaage, Sartorius excellence	Sartorius, Deutschland
Dispensiergerät	IKA Jahnke + Kunkel KG, Deutschland
Eismaschine	Ziegra-Eismaschinen, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5415C	W. Krannich, Deutschland
Geldokumentation	INTAS, Deutschland
GenePulser® X cell <sup>TM</sup>	BIO-RAD, Deutschland
GFI® Wasserbad	W. Krannich, Deutschland
Inkubator	Memmert, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments, Deutschland
Mikrozentrifuge 5415 R	Eppendorf, Deutschland
NanoDrop®ND-1000-Spektrophotometer	Kisker-Biotech, Deutschland
PHERO-stab. 500, Elektrophoresis Powersupply	Biotec-Fischer, Deutschland

pH Monitor	Pharmacia LKB, Schweden
Photometer	Eppendorf, Deutschland
Pipetting Aid	Gilson®, USA
Schüttler, Certomat® H	Sartorius, Deutschland
Sterilisiergerät	Heraeus Instruments, Deutschland
Thermocycler TGradient	Biometra, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Deutschland
UV-Transilluminator, 302 nm	Bachofer, Deutschland
Victor®, 1420 Multilabel Counter	Wallac, USA
Vortex Genie 2 <sup>TM</sup>	Bender + Hobein AG, Schweiz
Zentrifuge Sorvall®, RC5 Superspeed	Du Pont, Deutschland

und als spezielle Computer-Software: BioEdit Sequenz-Alignment-Editor, Ibis Biosciences, USA

## 2.3 Verwendete Substanzen

### 2.3.1 Reagenzien und Chemikalien

ABTS	Roche, Deutschland
Agarose Electrophoresis Grade, Ultra Pure	Invitrogen <sup>TM</sup> , Spanien
Albumine from bovine serum	Sigma-Aldrich®, USA
Ampicillin, Natriumsalz	Carl Roth, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Delta Select, Deutschland
Bacto <sup>TM</sup> Agar	Becton Dickinson, USA
Bacto <sup>TM</sup> Tryptone	Becton Dickinson, Frankreich
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, USA
1-Bromo-3-chloro-propane	Sigma-Aldrich®, Deutschland
BstOI, Restriction Enzyme	Promega Corporation, USA

CaCl <sub>2</sub> , Calciumchlorid	Merck, Deutschland
Carbenicillin Disodium	Sigma-Aldrich®, Deutschland
Chloramphenicol	Carl Roth, Deutschland
Citric Acid	Sigma-Aldrich®, Deutschland
DEPC, Diethylpyrocarbonat	Carl Roth, Deutschland
Difco <sup>TM</sup> Yeast Extract	Becton Dickinson, Frankreich
Difco <sup>TM</sup> Trypsin 250	Becton Dickinson, Frankreich
dNTP Set, illustra <sup>TM</sup>	GE Healthcare UK limited, UK
DPBS	Lonza, Belgien
EDTA	Research Organics, USA
Essigsäure	Merck, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 1%	Carl Roth, Deutschland
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Deutschland
Gene Ruler <sup>TM</sup> , 100 bp/ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, Deutschland
D(+)-Glucose wasserfrei	Merck, Deutschland
Glycerol (Laboratory reagent grade)	Fisher Scientific, U.K.
Glycogen (from mussels)	Roche, Deutschland
Hi-Di <sup>TM</sup> Formamide	Applied Biosystems, USA
IPTG	Sigma-Aldrich®, Deutschland
Kanamycin Monosulfate from Streptomyces Kanamyceticus	Sigma-Aldrich®, Deutschland
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck, Deutschland
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth, Deutschland
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth, Deutschland
6 X Loading Dye Solution 1 ml	Fermentas, Deutschland
Magnesium-Chlorid-Hexahydrat	Merck, Deutschland
MOPS Free Acid	Sigma-Aldrich®, USA
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck, Deutschland

NaOH (Natriumhydroxid), 5 mol/l (5 N)	Merck, Deutschland
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Deutschland
PEG 8000 (Polyethylenglycol)	Sigma-Aldrich®, Deutschland
PEN-STREP, 5000U Penicillin/ml, 5000 U Streptomycin/ml	Lonza, Belgium
Perhydrol® 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Deutschland
2-Propanol	Carl Roth, Deutschland
Qiagen Maxiprep Kit	Qiagen, Deutschland
Qiaprep Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen, Deutschland
Restriction Endonuclease SfiI	Roche, Deutschland
RNAlater, RNA Stabilization Reagent	Qiagen, Deutschland
Salzsäure, Combi-Titrisol®	Merck, Deutschland
Sodium Citrate Dihydrate, Baker Analysed® Reagent	J.T. Baker, VA Deventer, Holland
SuperScript <sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen <sup>TM</sup> , USA
T4 DNA Ligase	Invitrogen <sup>TM</sup> , Deutschland
T4 DNA Ligase Buffer 5X	Invitrogen <sup>TM</sup> , Deutschland
Taq DNA Polymerase	Roche, Deutschland
Tetracycline free base	Sigma-Aldrich®, Deutschland
TiterMax® Gold Adjuvant	Sigma-Aldrich®, USA
TRI Reagent <sup>TM</sup>	Sigma-Aldrich®, USA
Tris X	GERBU Biotechnik, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich®, Deutschland

### 2.3.2 Antikörper

Anti-HA-Peroxidase High Affinity Rat monoclonal antibody (3F10): Roche, Deutschland

Fab fragment of Affinity Purified anti-Human IgG: Rockland Immunochemicals, USA

Immuno Pure® Goat Anti-Human IgG, (kappa): Pierce Biotechnology, USA

Immuno Pure® Human IgG, whole molecule: Pierce Biotechnology, USA

Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, Fc Fragment Specific: Jackson ImmunoResearch, Laboratories, Inc., U.K.

### **2.3.3 Integrine**

Human Integrin  $\alpha_5\beta_1$  Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside Formulation: Chemicon® International, Deutschland

Human Integrin  $\alpha_v\beta_5$  Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside Formulation: Chemicon® International, Deutschland

### **2.3.4 Bakterienstämme**

E.coli K12, ER 2738: New England BioLabs® Inc., U.K.

XL1-Blue Electroporation-Competent Cells: Stratagene®, Deutschland

### **2.3.5 Helferphage**

VCSM13 Interference-Resistant Helper Phage: Stratagene®, Deutschland

### **2.3.6 Plasmide**

pUC18: Fermentas Life Sciences, Deutschland

pAra H6HA-TT: bezogen von 'The Scripps Research Institute', Laboratory of Molecular Biology and Chemistry, Carlos F. Barbas III, La Jolla, Ca, USA

### **2.3.7 Vektor**

pComb3XSS: bezogen von 'The Scripps Research Institute', Laboratory of Molecular Biology and Chemistry, Carlos F. Barbas III, La Jolla, Ca, USA

### **2.3.8 Kaninchen**

New-Zealand-White-Kaninchen (NZW): Charles River, Deutschland

### 2.3.9 Primer

Die Primer wurden bezogen von Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland

#### Sense-Primer:

##### HKC-F:

5' CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC 3'

##### HIgGCH1-F:

5' GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC 3'

##### leadVH:

5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC 3'

##### ompseq:

5' AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA G 3'

##### pelseq:

5' ACC TAT TGC CTA CGG CAG CCG 3'

##### RHyVH1:

5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG TCG GTG GAG GAG TCC RGG 3'

##### RHyVH2:

5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG TCG GTG AAG GAG TCC GAG 3'

##### RHyVH3:

5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG TCG YTG GAG GAG TCC GGG 3'

##### RHyVH4:

5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG SAG CAG CTG RTG GAG TCC GG 3'

##### RSCλ 1:

5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGC TGA CTC AGT CGC CCT C 3'

##### RSC-F:

5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCG GGG CCC AGG CGG CCG AGC TC 3'

##### RSCVK1:

5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGM TGA CCC AGA CTC CA 3'

RSCVK2:

5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG ATM TGA CCC AGA CTC CA 3'

RSCVK3:

5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGA TGA CCC AGA CTG AA 3'

**Reverse-Primer:**

dp-EX:

5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC 3'

dpseq:

5' AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC 3'

gback:

5' GCC CCC TTA TTA GCG TTT GCC ATC 3'

Lead-B:

5' GGC CAT GGC TGG TTG GGC AGC 3'

RHybK1-B:

5' AGA TGG TGC AGC CAC AGT TCG TTT GAT TTC CAC ATT GGT GCC 3'

RHybK2-B:

5' AGA TGG TGC AGC CAC AGT TCG TAG GAT CTC CAG CTC GGT CCC 3'

RHybK3-B:

5' AGA TGG TGC AGC CAC AGT TCG TTT GAC SAC CAC CTC GGT CCC 3'

RHybL-B:

5' AGA TGG TGC AGC CAC AGT TCG GCC TGT GAC GGT CAG CTG GGT CCC  
3'

RHyIgGCH1-B:

5' CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA RGA GAY GGT GAC CAG GGT GCC  
3'

## 2.4 Medien und Lösungen

Alle Medien und Lösungen wurden unter Verwendung von destilliertem H<sub>2</sub>O angesetzt.

50X ABTS (2,2-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat]):

1 g ABTS (20 mg/ml), 50 ml H<sub>2</sub>O

Antibiotika:

Carbenicillin (100 mg/ml): 5 g in 50 ml H<sub>2</sub>O lösen, sterilfiltrieren

Chloramphenicol (30 mg/ml): 1,5 g in 50 ml 100%igem Ethanol lösen

Kanamycin (50 mg/ml): 2,5 g in 50 ml H<sub>2</sub>O lösen, sterilfiltrieren

Tetrazyklin (5 mg/ml): 250 mg in 50 ml 100%igem Ethanol lösen

10X Citratpuffer:

66,2 g Citronensäure

54,4 g Natrium-Citrat-Dihydrat

800 ml H<sub>2</sub>O

pH-Einstellung mit HCl auf pH 4

Endvolumen 1 l, autoklavieren

DEPC-H<sub>2</sub>O (Diethyl-Pyrocbonat):

1 ml DEPC in 1 l H<sub>2</sub>O über Nacht schütteln, autoklavieren

2,5 mM dNTP Mix:

10 µl dNTP (100 mM Stock dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

360 µl H<sub>2</sub>O

Endvolumen 400 µl

0,5 M EDTA (Ethylendiamintetraacetat), pH 8,0:

93,05 g EDTA in 400 ml H<sub>2</sub>O

pH-Einstellung auf pH 8,0, Endvolumen 500 ml, autoklavieren

1 M Glucose:

9,01 g in 50 ml H<sub>2</sub>O, sterilfiltrieren

20%ige Glucose:

200 g in 800 ml H<sub>2</sub>O

Endvolumen 1 l, sterilfiltrieren

10%iges Glycerol:

100 ml Glycerol

900 ml H<sub>2</sub>O, sterilfiltrieren

0,5 M IPTG (Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid):

5,96 g in 50 ml H<sub>2</sub>O, sterilfiltrieren

LB (Luria Broth)/Agarplatten: 16 g LB Agar in 500 ml H<sub>2</sub>O, autoklavieren

LB/Carbenicillin-Platten: + 500  $\mu$ l (100 mg/ml Stock) = 100  $\mu$ g/ml

LB/Chloramphenicol-Platten: + 500  $\mu$ l (30 mg/ml Stock) = 30  $\mu$ g/ml

LB/Kanamycin-Platten: + 500  $\mu$ l (50 mg/ml Stock) = 50  $\mu$ g/ml

LB/Tetrazyklin-Platten: + 3000  $\mu$ l (5 mg/ml Stock) = 30  $\mu$ g/ml

LB-Medium (Luria Broth):

20 g LB in 500 ml H<sub>2</sub>O

Endvolumen 1 l, autoklavieren

LB Top Agar:

0,35 g Bacto agar

1,25 g LB Medium

50 ml H<sub>2</sub>O, autoklavieren

1 M MgCl<sub>2</sub>:

40,66 g MgCl<sub>2</sub> in 200 ml H<sub>2</sub>O

autoklavieren

5 M NaCl (Natriumchlorid):

146,1 g NaCl in 400 ml H<sub>2</sub>O

Endvolumen 500 ml, autoklavieren

3 M NaOAc (Natriumacetat), pH 5,2:

40,824 g Natriumacetat

50 ml H<sub>2</sub>O

pH-Einstellung mit Essigsäure auf pH 5,2

Endvolumen 100 ml, autoklavieren

10X PBS ('phosphate buffered saline'):

80 g NaCl

2 g KCl

17 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)

1,63 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)

in H<sub>2</sub>O lösen, Endvolumen 1 l, autoklavieren

1X PBS:

100 ml 10X PBS

900 ml H<sub>2</sub>O

pH-Einstellung auf pH 7,4, autoklavieren

20% PEG (Polyethylenglycol)/2,5 M NaCl:

200 g PEG-8000

146,1 g NaCl

in 700 ml H<sub>2</sub>O, Endvolumen 1 l, sterilfiltrieren

SB-Medium (Super Broth):

40 g MOPS

120 g Trypton

80 g Hefeextrakt

in 3 l H<sub>2</sub>O

pH-Einstellung auf pH 7,0, Endvolumen 4 l, autoklavieren

SOB-Medium:

20 g Trypton

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

0,186 g KCl

mit H<sub>2</sub>O auf 950 ml

pH-Einstellung auf pH 7,0, Endvolumen 1 l, autoklavieren

vor Gebrauch: 10 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> hinzu

SOC-Medium:

vor Gebrauch: 1 ml 1 M Glucose in 50 ml SOB-Medium

50X TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer):

242 g Tris (= Tris X) in 500 ml H<sub>2</sub>O

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

57,1 ml Essigsäure

Endvolumen 1 l, autoklavieren

TBS ('tris buffered saline'), pH 7,4:

6,057 g Tris X (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) (50 mM) in 800 ml H<sub>2</sub>O

pH-Einstellung auf pH 7,4

8,766 g NaCl (150 mM)

Endvolumen 1 l, autoklavieren

TBS/BSA 1%/3%:

0,5 g/1,5 g BSA ('bovine serum albumin') in 50 ml TBS

TBS/Tween20 0,05%:

25 mg Tween20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat) in 50 ml TBS

1 M TRIS, pH 7,4:

121,1 g Tris base (Tris X) in 700 ml H<sub>2</sub>O

pH-Einstellung auf pH 7,4

Endvolumen 1 l, autoklavieren

## 2.5 Allgemeine Methoden im Labor

### 2.5.1 Herstellung kompetenter XL1-Blue-Zellen

Eine LB/Tetrazyklin (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )-Agarplatte wurde für 1 h im Brutschrank erwärmt. Von der XL1-Blue-Stammkultur wurden mit einer sterilen Pipettenspitze XL1-Blue-Zellen entnommen, zick-zack-förmig auf die LB/Tetrazyklin-Platte aufgetragen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 35 ml SB-Medium/30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Tetrazyklin in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Von der Platte wurden ca. sechs Kolonien mit einer sterilen Inokulationsöse in das Medium gegeben und alles gevortext. 5 ml der Kulturmenge wurden jeweils in zwei sterile 12 ml Röhrchen gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden je 2,5 ml der Übernacht-Kulturen in zwei 2 l-Kolben gegeben, die bereits 500 ml SB-Medium, 10 ml 20%ige Glucose sowie 5 ml 1 M  $\text{MgCl}_2$  enthielten. Die Kulturen wurden dann bei 250 rpm und 37°C geschüttelt.

Nach 2  $\frac{1}{2}$  h wurde die Optische Dichte (OD) der einzelnen Kulturen bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer (Eppendorf) gemessen. Bei Erreichen einer OD von 0,7 wurden beide Kolben für 15 min auf Eis gestellt. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle Arbeiten auf Eis. Die Kulturen wurden in vorgekühlte 250 ml Zentrifugenflaschen gegeben und bei 4000 rpm (2600 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 5 Superspeed, Rotor: GSA). Nach Abgießen des Überstandes wurden die Pellets in 25 ml 10%igem Glycerol resuspendiert, bis zu einem Endvolumen von 250 ml mit 10%igem Glycerol aufgefüllt und anschließend bei 4000 rpm (2600 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Dann wurden die Pellets in 25 ml 10%igem Glycerol resuspendiert, zusammengeführt und in ein vorgekühltes steriles 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Anschließend wurde bei 3500 rpm (2465 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf 5810 R, Rotor: A-4-81).

Nachdem der Überstand vorsichtig abgegossen worden war, blieben ca. 1-1,5 ml dickflüssige Zellsuspension übrig. Die XL1-Blue-Zellen wurden dann á 50  $\mu\text{l}$  in Eppendorf-Tubes, die im Trockeneis/Ethanolbad standen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Anschließend erfolgte die Testung der Reinheit der Zellen (siehe 2.5.3).

## 2.5.2 Herstellung elektrokompetenter ER2738-Zellen

Eine LB/Tetrazyklin (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )-Agarplatte wurde für 1 h im Brutschrank erwärmt. Von der ER2738-Stammkultur wurden mit einer sterilen Pipettenspitze Zellen entnommen, zick-zack-förmig auf die LB/Tetrazyklin-Platte aufgetragen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 35 ml SB-Medium/30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Tetrazyklin in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Von der Platte wurden ca. sechs Kolonien mit einer sterilen Inokulationsöse in das Medium gegeben und alles gevortext. 5 ml der Kulturmenge wurden jeweils in drei sterile 12 ml Röhrchen gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden je 2,5 ml der Übernacht-Kulturen in drei 2 l-Kolben gegeben, die bereits 500 ml SB-Medium, 10 ml 20%ige Glucose sowie 5 ml 1 M  $\text{MgCl}_2$  enthielten. Die Kulturen wurden dann bei 250 rpm und 37°C geschüttelt.

Nach 2  $\frac{1}{2}$  h wurde die OD der einzelnen Kulturen bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer (Eppendorf) gemessen. Bei Erreichen einer OD von 0,8-0,9 wurden die Kolben für 15 min auf Eis gestellt. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle Arbeiten auf Eis. Die Kulturen wurden in vorgekühlte 250 ml Zentrifugenflaschen gegeben und bei 4000 rpm (2600 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 5 Superspeed, Rotor: GSA). Die Pellets wurden in 25 ml 10%igem Glycerol resuspendiert, bis zu einem Endvolumen von 125 ml mit 10%igem Glycerol aufgefüllt und anschließend bei 4000 rpm (2600 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Dann wurden die Pellets erneut in 25 ml 10%igem Glycerol resuspendiert, bis zu einem Endvolumen von 250 ml mit 10%igem Glycerol aufgefüllt und bei 4000 rpm (2600 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets jeweils mit 12,5 ml 10%igem Glycerol resuspendiert und in zwei bereits vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen zusammengeführt. Dann wurde bei 3500 rpm (2465 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf 5810 R, Rotor: A-4-81).

Nach Abgießen des Überstandes blieben ca. 2-2,5 ml dickflüssige Zellsuspension übrig. Die ER2738-Zellen wurden dann á 50/300  $\mu\text{l}$  in Eppendorf-Tubes, die im Trockeneis/Ethanolbad standen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Anschließend erfolgten die Testungen von Reinheit (siehe 2.5.3) und Elektrokompetenz (siehe 2.5.5) der Zellen. Zur Testung der Elektrokompetenz wurden 1  $\mu\text{l}$  (10 pg) des Plas-

mids pUC 18 und 100  $\mu\text{l}$  Zellen verwendet. Ausplattiert wurde auf LB-Agar/Carbenicillin-Platten (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### **2.5.3 Testung der Reinheit von E. coli-Bakterien**

Die Reinheit von E. coli-Bakterien wurde getestet, indem 20  $\mu\text{l}$  Zellen auf Kanamycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -), Carbenicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -), Chloramphenicol (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -) und Tetrazyklin (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )-LB-Agarplatten verteilt und bei 37°C über Nacht inkubiert wurden. Zusätzlich wurde eine LB-Top-Agar-Platte mit 20  $\mu\text{l}$  Zellsuspension/3 ml LB-Top-Agar-Lösung beschichtet, um eine Kontamination mit Helfer-Phagen auszuschließen.

### **2.5.4 Elektroporation von E. coli-Bakterien**

Zur Elektroporation von Zellen wurden zunächst die entsprechenden Mengen des zu transformierenden Plasmids sowie der elektrokompetenten Zellen vermischt, die Zellsuspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und 1 min auf Eis inkubiert. Am Elektroporator (Biorad X Gene Pulser) wurden die Einstellungen 2,5 kV, 200  $\Omega$  und 25  $\mu\text{F}$  vorgenommen. Nach erfolgter Elektroporation wurden sofort 3 ml SOC-Medium hinzugegeben, die Zellsuspension in ein 12 ml Röhrchen gegeben und bei 250 rpm für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen, abhängig von der Resistenz des jeweiligen Plasmids, auf entsprechende LB-Agar/Antibiotikum-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.5.5 Testung der Elektrokompetenz von E. coli-Bakterien**

Nach erfolgter Elektroporation (siehe 2.5.4) und anschließendem Schütteln bei 250 rpm für 1 h bei 37°C wurden die Zellen bis zu einem Endvolumen von 10 ml mit SOC-Medium aufgefüllt. Daraufhin wurden jeweils 1  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$  und 100  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension auf LB-Agar-Platten verteilt, die, abhängig von ihrer Plasmidresistenz, mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt waren. Anschließend wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am

nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt und die Elektrokompetenz nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\text{Zellsuspension } (\mu\text{l})} \cdot \frac{10000 \mu\text{l}}{10 \text{ pg}} \cdot \frac{1 \cdot 10^6 \text{ pg}}{1 \mu\text{g}} = \text{Kolonien}/\mu\text{g pUC 18}$$

Bei einer Anzahl von  $> 1 \times 10^9$  Kolonien/ $\mu\text{g}$  Plasmid war von einer ausreichenden Elektrokompetenz auszugehen.

### **2.5.6 Präparation von pComb3XSS und pAra H6HA-TT**

Kompetente XL1-Blue-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und jeweils 50  $\mu\text{l}$  Zellen mit 1  $\mu\text{l}$  pComb3XSS- bzw. pAra H6HA-TT-DNA (100 ng) gemischt. Durch Elektroporation (siehe 2.5.4) konnte die Plasmid-DNA in die XL1-Blue-Zellen eingebracht werden. Die elektroporierten Zellen wurden auf LB-Agar/Carbenicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )-Platten für pComb3XSS und auf LB-Agar/Chloramphenicol (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )-Platten für pAra H6HA-TT ausplattiert. Danach wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert und danach bei 4°C gelagert.

### **2.5.7 Plasmid-DNA-Isolation von pComb3XSS und pAra H6HA-TT**

Jeweils 5 ml SB-Medium mit 2,5  $\mu\text{l}$  (0,25 mg) Carbenicillin (100 mg/ml) für pComb3XSS und mit 5  $\mu\text{l}$  (0,15 mg) Chloramphenicol (30 mg/ml) für pAra H6HA-TT wurden mit einer einzelnen Kolonie des jeweiligen Plasmids beimpft. Die Kulturen wurden bei 250 rpm bei 37°C geschüttelt. Nach 7 h wurden die Kulturen in jeweils 100 ml SB-Medium gegeben, welches 50  $\mu\text{l}$  (5 mg) Carbenicillin (100 mg/ml) für pComb3XSS und 100  $\mu\text{l}$  (3 mg) Chloramphenicol (30 mg/ml) für pAra H6HA-TT enthielt, und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

### **2.5.8 QIAGEN Plasmid Maxi Kit für pComb3XSS und pAra H6HA-TT**

Die pComb3XSS- und pAra H6HA-TT- Kulturen wurden in 250 ml-Polypropylen-Flaschen gegeben und bei 6500 rpm (6000 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert (Sorvall RC5 Superspeed, Rotor: GSA). Die Pellets wurden jeweils in 10 ml P1-Puffer resuspendiert, in dem bereits RNase A und Lyse Blue Reagenz enthalten waren. Nach Hinzufügen von jeweils 10 ml P2-Puffer folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Dann wurden jeweils 10 ml des vorgekühlten P3-Puffers beigefügt, durch sechsmaliges Schwenken gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 13000 rpm (20000 xg) für 30 min bei 4°C zentrifugiert (Sorvall RC5 Superspeed, Rotor: SS34). Die Überstände, in denen die DNA des Plasmids enthalten war, wurden erneut bei 13000 rpm (20000 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Nachdem jeweils ein QIAGEN-tip 500 mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert worden war, wurden die Überstände in die Säule gegeben. Es wurde zwei Mal mit jeweils 30 ml QC-Puffer gewaschen und anschließend die DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Nach Hinzugeben von 10,5 ml Isopropanol folgte eine Zentrifugation bei 11000 rpm (15000 xg) für 30 min bei 4°C . Die DNA-Pellets wurden mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen, darauf bei 11000 rpm (15000 xg) für 10 min zentrifugiert und für ca. 10 min luftgetrocknet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in Wasser gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

### **2.5.9 QIAGEN Plasmid Mini Kit für $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_5\beta_1$ -spezifische Fab-Klone**

Jeweils ein spezifischer Fab-Klon wurde in 5 ml SB, in dem 2,5  $\mu$ l (0,25 mg) Carbenicillin (100 mg/ml) enthalten waren, gegeben, über Nacht bei 37°C geschüttelt und bei 3500 rpm (2465 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf 5810 R, Rotor: A-4-81). Die Zellpellets wurden in 250  $\mu$ l P1-Puffer, in dem RNase A enthalten war, resuspendiert und in ein Eppendorf-Tube gegeben. Nach Hinzufügen von 250  $\mu$ l P2 sowie 350  $\mu$ l N3-Puffer und jeweils gründlichem Durchmischen der Lösung folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm (17900 xg) für 10 min bei RT (Mikrozentrifuge, Eppendorf). Der Überstand wurde in ein QIAprep spin column transferiert und schließlich für 60 sek zentrifugiert.

Anschließend wurde das QIAprep spin column mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen und erneut für 60 sek zentrifugiert. Nachdem der PE-Puffer verworfen worden war, folgte eine einminütige Zentrifugation, um verbliebenen Puffer zu entfernen. Um nun die DNA zu eluieren, wurde das QIAprep spin column in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube transferiert, 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O hinzugegeben und nach einminütiger Inkubation für 1 min zentrifugiert. Die DNA wurde bei 20°C gelagert.

### **2.5.10 Analyse und Präparation von DNA-/RNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese**

Zur Analyse von DNA-/RNA-Fragmenten wurde 1%- bzw. 1,5%iges, zur Aufreinigung von DNA 1,2%iges TAE/Agarosegel hergestellt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1%igen TAE-Puffer gegeben, bis zur vollständigen Auflösung erhitzt und das Gel gegossen. Es wurden 3  $\mu$ l Ethidiumbromid (1%, 10 mg/ml) pro 100 ml TAE-Puffer zur Detektion der DNA/RNA unter UV-Licht verwendet. Zur Analyse wurden die Proben mit jeweils  $\frac{1}{10}$  Volumen Ladepuffer versetzt und in die Agarosegeltaschen aufgetragen. Abhängig von der zu erwartenden Fragmentgröße wurden zusätzlich ein 1 kb DNA-Marker oder 100 bp Marker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1%igem TAE-Puffer bei 95 V für 45-90 min.

### **2.5.11 Messung der DNA**

Messungen von Konzentrationen der DNA erfolgten am Nano Drop® ND-1000-Spektrophotometer. Es wurden zunächst 1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O zur Bestimmung eines Leerwertes und darauf 1  $\mu$ l der jeweiligen DNA-Probe gemessen. Die Ergebnisse wurden in ng/ $\mu$ l angegeben.

## 2.6 Herstellung chimärer Fab-Antikörper-Bibliotheken gegen die Integrine $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$

### 2.6.1 Immunisierung von New-Zealand-White-Kaninchen mit den humanen Integrinen $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$

#### Präparation der $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Antigene und Immunisierung der Kaninchen

Die Präparation der Antigene wurde nach dem Protokoll des verwendeten Adjuvants durchgeführt (TiterMax® Gold Adjuvant, Sigma®). Nach 30 sek Vortexen wurden 0,5 ml des Adjuvants mit einer Spritze (Luer-Lock Syringe, Sigma®) aufgenommen. In eine andere Spritze wurden 0,25 ml des bereits mit PBS verdünnten Antigens ( $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$ ) aufgesogen. Beide Spritzen wurden dann über ein Adaptersystem (3-way Luer-Lock, Sigma®) miteinander verbunden. Die Antigenlösung wurde über den Adapter in das Adjuvant gespritzt, die Lösungen für 2 min durch wechselndes Aufziehen der Spritzen vermischt und die entstandene weiße Wasser-in-Öl-Emulsion anschließend in einer Spritze vereinigt. Die leere Spritze wurde nun mit weiteren 0,25 ml des Antigens gefüllt, die Lösungen erneut für 60 sek vermischt und die gesamte Emulsion in eine Spritze übertragen.

Die Immunisierungen bzw. Boosterungen der Kaninchen mit dem jeweiligen Antigen erfolgten stets nach Kontrolle des Antikörpertiters in mehrwöchigen Abständen. Die jeweiligen Immunisierungsemulsionen wurden den Kaninchen durch die Tierärztin Frau Dr. vet. Schreppler verabreicht. So fand eine erste Boosterung mit jeweils 20  $\mu\text{g}$  Antigenkonzentration für beide Kaninchen fünf Wochen nach Erstimmunisierung (20  $\mu\text{g}$ ) und eine zweite Boosterung (auch 20  $\mu\text{g}$ ) nach weiteren drei Wochen statt. Die Entnahme der Organe Milz und Knochenmark wurde zwei Wochen später durchgeführt.

## **Kontrolle des Antikörpertiters nach Immunisierung mit den Antigenen $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$ durch ELISA**

Zur Kontrolle des Antikörpertiters wurde den Kaninchen in mehrwöchigen Abständen durch die Tierärztin Frau Dr. vet. Schreppler Blut entnommen. Die Blutproben wurden bei 3500 rpm (2465 xg) für 30 min bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf 5810 R), um das Serum im nachfolgenden ELISA einsetzen zu können.

Zunächst wurde eine 96-Well Platte (Costar®, Corning) mit 100 ng Antigen/Well beschichtet, welches in 25  $\mu$ l PBS gelöst war. Als Leerwertkontrolle wurden außerdem 25  $\mu$ l TBS/BSA 3%/Well aufgetragen. Darauf wurde die Platte abgedichtet und es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde mit 150  $\mu$ l TBS/BSA 3% geblockt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurde das Serum in den Konzentrationen 1:1000 und 1:5000 in jeweils 50  $\mu$ l TBS/BSA 3%/Well aufgetragen und für 3½ h bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde zwölf Mal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, ein peroxidasekonjugierter Ziege-Anti-Kaninchen IgG Antikörper (Fc-Fragment spezifisch) (peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG) in der Konzentration 1:5000 in 50  $\mu$ l TBS/BSA 3%/Well hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach zwölfmaligem Waschen der Platte wurden 50  $\mu$ l ABTS/Well hinzugegeben und die Konzentration des Antikörpers bei einer Wellenlänge von 405 nm nach 15, 30 und 45 min im Photometer (Victor®, Wallac) gemessen.

### **Entnahme von Milz und Knochenmark der Kaninchen**

Die Entnahme der Milzen beider Kaninchen wurde von der Tierärztin Frau Dr. vet. Schreppler und die Präparation der Femurknochen zur Knochenmarksisolierung von Frau Dr. med. Kollmar durchgeführt. Das Knochenmark wurde anschließend mittels einer Spritze direkt aus der Knochenmarkshöhle des Femurs aufgezogen.

### **2.6.2 RNA-Isolation aus Milz und Knochenmark der Kaninchen**

Milz und Knochenmark der New-Zealand-White-Kaninchen wurden sofort nach Entnahme jeweils in ein mit 10 ml TRI-Reagent (Sigma®) gefülltes 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und anschließend für ca. 1 min mit einem Dispensiergerät (IKA) homogenisiert. Nach

einer Inkubationszeit von 5 min wurden zu jeder Probe weitere 20 ml TRI-Reagent hinzugegeben. Dann wurden die Proben bei 3500 rpm (2465 xg) für 10 min bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf 5810 R, Rotor: A-4-81). Der Überstand wurde in bereits 3 ml 1-Brom-3-chlorpropan (BCP) enthaltende 50 ml RNA-Röhrchen (Oak-Ridge, PPCO, Nalgene) gefüllt, 15 sek gevortext und bei RT 15 min inkubiert. Die Proben wurden darauf bei 12000 rpm (17500 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert (Sorvall RC5 Superspeed, Rotor: SS34). Die obere farblose Phase wurde in ein 50 ml RNA-Röhrchen überführt, in dem 15 ml Isopropanol enthalten waren, anschließend 15 sek gevortext und dann 10 min bei RT inkubiert. Nun wurde bei 12000 rpm (17500 xg) für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig abgegossen, das Pellet im Röhrchen belassen und jeweils 30 ml 75% Ethanol hinzugegeben, ohne das Pellet zu resuspendieren. Es wurde erneut bei 12000 rpm (17500 xg) für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgenommen, das Pellet für ca. 15 min bei RT getrocknet und darauf mit 500  $\mu$ l Aqua gelöst. Die isolierte RNA wurde im 1%igen Agarosegel analysiert (siehe 2.5.10) und anschließend im RNA-freien Eppendorf-Tube bei -80°C aufbewahrt.

### **Messung der RNA**

Zur Messung der RNA wurden 2  $\mu$ l der jeweiligen RNA in ein Eppendorf-Tube gegeben, mit 498  $\mu$ l H<sub>2</sub>O vermischt und in eine spezielle Küvette (UVette®, Eppendorf) überführt. Im Eppendorf Photometer wurde nach Messung des Leerwertes mit H<sub>2</sub>O bei einer OD von 260-280 nm die Konzentration der RNA bestimmt.

### **2.6.3 cDNA-Synthese aus RNA**

Die cDNA-Synthese wurde mittels Invitrogen Superscript First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen<sup>TM</sup>) durchgeführt. 20  $\mu$ g der isolierten RNA wurden mit 8  $\mu$ l 10 mM dNTP Mix und 8  $\mu$ l Oligo (dT) 12-18 vermischt und mit DEPC-Wasser bis zu einer Menge von 80  $\mu$ l aufgefüllt. Die Lösung wurde 5 min bei 65°C inkubiert, 1 min auf Eis gestellt und darauf kurz zentrifugiert. Dann wurden 16  $\mu$ l 10X RT Puffer, 32  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 16  $\mu$ l 0,1M DTT und 8  $\mu$ l RNaseOUT zur RNA gegeben, gefolgt von einer Inkubationszeit von 2 min bei 42°C. Anschließend wurden 8  $\mu$ l der 50 Units/ml SuperScript II Reverse

Transcriptase hinzugegeben und die Lösung bei 42°C für 50 min inkubiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 min bei 70°C wurde die Probe 1 min auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Es wurden 8  $\mu$ l 2 Units/ml E. coli RNase H hinzugegeben und bei 37°C für 20 min inkubiert. Die synthetisierte 'First-strand' cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 2.6.4 Ethanol-Präzipitation der DNA

Zu der aus der PCR gewonnenen DNA wurden jeweils  $\frac{1}{10}$  des Volumens Natriumacetat (NaOAc), das 2,2 fache des Volumens 100% Ethanol (EtOH) und 1  $\mu$ l Glycogen hinzugegeben, die Lösung gevortext und bei -20°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 13200 rpm ('full speed') für 5 min bei 4°C zentrifugiert (Mikrozentrifuge 5415 R, Eppendorf). Das Pellet wurde mit 1 ml 75% EtOH gewaschen und bei 13200 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Es wurden erneut 1 ml 75% EtOH zum Pellet hinzugegeben und bei 13200 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet luftgetrocknet, in einer entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20°C gelagert.

#### 2.6.5 DNA-Extraktion mittels 'Freeze-Squeezing'

Die durch die Ethanol-Präzipitation gereinigte DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese in 1,2%igem TAE/Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Banden mit einem sterilen Skalpell unter möglichst kurzer UV-Bestrahlung ausgeschnitten. Das DNA-Fragment wurde in einer Parafilmtüte bei -20°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurde das gefrorene Gel in der Parafilmtüte mit den Fingern zerdrückt und die gewonnene Flüssigkeit sowie das Gel in spezielle Filterröhrchen (Ultrafree®MC, Millipore) gegeben. Es wurde bei 13000 rpm ('full speed') für 5 min bei RT zentrifugiert (Mikrozentrifuge, Eppendorf) und die gesamte DNA-Lösung erneut präzipitiert (siehe 2.6.4).

#### 2.6.6 Herstellung chimärer $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Fragmente

Im Folgenden wird die Herstellung chimärer Fab-Fragmente mittels 'Overlap-Extension'-PCR beschrieben. Diese chimären Fab-Fragmente enthalten variable Regionen vom Kaninchen sowie humane konstante Regionen.

**Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Protokoll angesetzt:**

1 $\mu\text{l}$	DNA/cDNA
3 $\mu\text{l}$	Sense-Primer
3 $\mu\text{l}$	Reverse-Primer
8 $\mu\text{l}$	2,5 mM dNTP-Mix
10 $\mu\text{l}$	10x PCR Puffer 2
0,75 $\mu\text{l}$	Taq/Hifi Taq Polymerase
74,25 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O
<hr/>	
100 $\mu\text{l}$	Endvolumen

### 2.6.6.1 Erste Runde Fab-PCR, Amplifizierung variabler und konstanter Regionen mittels PCR

#### Variable Regionen:

<b>Primerkombinationen (<math>V_{\kappa}</math>):</b>		<b>Primerkombination (<math>V_{\lambda}</math>):</b>	
Sense-Primer	Reverse-Primer	Sense-Primer	Reverse-Primer
RSCVK1	RHybK1-B	RSC $\lambda$ 1	RHybL-B
RSCVK1	RHybK2-B		
RSCVK1	RHybK3-B		
RSCVK2	RHybK1-B	<b>Primerkombinationen (<math>V_H</math>):</b>	
RSCVK2	RHybK2-B	Sense-Primer	Reverse-Primer
RSCVK2	RHybK3-B	RHYVH1	RHyIgGCH1-B
RSCVK3	RHybK1-B	RHYVH2	RHyIgGCH1-B
RSCVK3	RHybK2-B	RHYVH3	RHyIgGCH1-B
RSCVK3	RHybK3-B	RHYVH4	RHyIgGCH1-B

Für die Amplifikation der variablen leichten Kette ( $V_{\kappa}$ ,  $V_{\lambda}$ ) und variablen schweren Kette ( $V_H$ ) wurden nach obigem PCR-Protokoll die Hifi Taq Polymerase sowie jeweils 1  $\mu\text{l}$  cDNA (0,5  $\mu\text{g}$ ) und 3  $\mu\text{l}$  Sense-/bzw. Reverse-Primer (20  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt.

Es wurden jeweils sechs Reaktionen für die Amplifikation der variablen leichten Kette ( $V_{\kappa}$ ,  $V_{\lambda}$ ) und jeweils drei Reaktionen für die Amplifikation der variablen schweren Kette

( $V_H$ ) pro Primerkombination angesetzt. Folgende Einstellungen wurden am Thermocycler TGradient (Biometra®) vorgenommen: 1 min bei 94°C, 15 sek bei 94°C, 1 min bei 54°C, 2 min bei 72°C, 10 min bei 72°C, Abkühlen auf 4°C. Insgesamt erfolgten 30 Zyklen. Die PCR-Produkte  $V_\kappa$  und  $V_\lambda$  wurden anschließend zu  $V_L$  gepoolt.

### **Konstante Regionen:**

Die Amplifikation der humanen konstanten Region ( $C_\kappa$ ) und der ersten konstanten Region der  $\gamma$ -Kette ( $C_{H1}$ ) erfolgte durch Einsetzen von jeweils 1  $\mu$ l (20 ng) des Plasmids pAra H6HA-TT. Für die Amplifizierung von  $C_\kappa$  wurden jeweils 3  $\mu$ l des Sense-Primers HKC-F (20  $\mu$ M) und Reverse-Primers Lead-B (20  $\mu$ M) und für  $C_{H1}$  jeweils 3  $\mu$ l des Sense-Primers HlgGCH1-F (20  $\mu$ M) und Reverse-Primers dpseq (20  $\mu$ M) eingesetzt. Für jede Primerkombination wurden 20 Reaktionen angesetzt. Folgende Einstellungen wurden am Thermocycler vorgenommen: 1 min bei 94°C, 15 sek bei 94°C, 1 min bei 54°C, 2 min bei 72°C, 10 min bei 72°C, Abkühlen auf 4°C. Insgesamt erfolgten 30 Zyklen.

Die PCR-Produkte von  $V_L$  (350 bp) und  $V_H$  (350 bp),  $C_\kappa$  (400 bp) und  $C_{H1}$  (350 bp) wurden in 1%igem TAE/Agarosegel analysiert, nach Ethanol-Präzipitation (siehe 2.6.4) in 1,2%igem TAE/Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.5.10), ausgeschnitten und mittels 'Freeze-Squeezing' (siehe 2.6.5) sowie nochmaliger Ethanol-Präzipitation aufgereinigt. Nach Messung der DNA (siehe 2.5.11) wurden die PCR-Produkte bei -20°C eingefroren.

### **2.6.6.2 Zweite Runde Fab-PCR, 'First Overlap' variabler Regionen (Kaninchen) mit konstanten Regionen (human)**

In der nachfolgenden PCR ('First Overlap') wurden die Fragmente der schweren und leichten Ketten mittels 'Overlap Extension' zwischen den PCR-Produkten der variablen Region (Kaninchen) und den PCR-Produkten der konstanten Region (human) hergestellt. Die PCR wurde mittels Taq Polymerase nach obigem Protokoll durchgeführt.

Für die Amplifikation der Fragmente der chimären leichten Kette ( $V_L + C_\kappa$ ) wurden jeweils 1  $\mu$ l (100 ng)  $V_L$ -Produkt und 1  $\mu$ l (100 ng)  $C_\kappa$ -Produkt sowie 3  $\mu$ l des Sense-Primers RSC-F (20  $\mu$ M) und Reverse-Primers Lead-B (20  $\mu$ M) eingesetzt.

Für die Amplifikation der Fragmente der chimären schweren Kette ( $V_H + C_{H1}$ ) wurden

jeweils 1  $\mu\text{l}$  (100 ng)  $V_H$ -Produkt und 1  $\mu\text{l}$  (100 ng)  $C_H1$ -Produkt sowie 3  $\mu\text{l}$  des Sense-Primers leadVH (20  $\mu\text{M}$ ) und Reverse-Primers dpseq (20  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt.

Für jede Primerkombination wurden jeweils sechs Reaktionen angesetzt. Folgende Einstellungen am Thermocycler wurden vorgenommen: 1 min bei 94°C, 15 sek bei 94°C, 1 min bei 54°C, 2  $\frac{1}{2}$  min bei 72°C, 10 min bei 72°C, Abkühlen auf 4°C. Insgesamt erfolgten 20 Zyklen.

Die PCR-Produkte der chimären leichten Kette (800 bp) und chimären schweren Kette (750 bp) wurden in 1%igem TAE/Agarosegel analysiert und anschließend nach Ethanol-Präzipitation (siehe 2.6.4) in 1,2%igem TAE/Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.5.10) und ausgeschnitten. Mittels 'Freeze-Squeezing' (siehe 2.6.5) und nochmaliger Ethanol-Präzipitation wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und nach Messung der DNA (siehe 2.5.11) bei -20°C eingefroren.

### **2.6.6.3 Dritte Runde Fab-PCR, 'Second Overlap', Fusion der chimären leichten mit der chimären schweren Kette**

In der nun folgenden PCR ('Second Overlap') wurden die chimären Produkte der leichten Ketten mit der pelB-Leader-Sequenz und die chimären Fd-Fragmente der schweren Kette durch einen zweiten 'Overlap-Extension'-Schritt zusammengeführt.

Die PCR wurde mittels Hifi Taq Polymerase nach obigem Protokoll durchgeführt. Es wurden 1  $\mu\text{l}$  (100 ng) des Produkts der chimären leichten Kette und 1  $\mu\text{l}$  (100 ng) des Produkts der chimären schweren Kette sowie 3  $\mu\text{l}$  des Sense-Primers RSC-F (20  $\mu\text{M}$ ) und Reverse-Primers dp-Ex (20  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt. Insgesamt wurden 30 Reaktionen unter folgenden Bedingungen angesetzt: 1 min bei 94°C, 15 sek bei 94°C, 1 min bei 54°C, 3 min bei 72°C, 10 min bei 72°C, Abkühlen auf 4°C. Es erfolgten 10 Zyklen.

Das PCR-Produkt des chimären Fab-Fragmentes (1500 bp) wurde in 1,5%igem TAE/Agarosegel analysiert und nach Ethanol-Präzipitation (siehe 2.6.4) in 1,2%igem TAE/Agarosegel aufgereinigt (siehe 2.5.10) und ausgeschnitten. Nach 'Freeze-Squeezing' (siehe 2.6.5) und erneuter Ethanol-Präzipitation wurde die DNA gemessen (siehe 2.5.11) und das PCR-Produkt bei -20°C eingefroren.

### 2.6.7 SfiI-Restriktionsverdau

Es wurden jeweils 12,9  $\mu\text{g}$  PCR-Produkt der chimären Fab-Fragmente  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$ , 6  $\mu\text{l}$  des Enzyms SfiI (40 U/ $\mu\text{l}$ ) und 10  $\mu\text{l}$  10x Puffer M gemischt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Endvolumen von 100  $\mu\text{l}$  gebracht. Für den SfiI-Verdau des Vektors wurden 10  $\mu\text{g}$  pComb3XSS mit 1,5  $\mu\text{l}$  SfiI (40 U/ $\mu\text{l}$ ) und 8  $\mu\text{l}$  10x Puffer M vermischt und das Endvolumen mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100  $\mu\text{l}$  erhöht. Die Proben wurden für 5 h bei 50°C in einem Thermoblock inkubiert und die Produkte auf 0,9%iges TAE/Agarosegel aufgetragen. Das verdaute Fab-Produkt wurde mit einer Größe von 1500 bp, der verdaute Vektor pComb3X mit einer Größe von 3400 bp und sein Stuffer-Fragment (SS) mit 1600 bp ausgeschnitten. Anschließend wurden die Produkte mittels 'Freeze-Squeezing' (siehe 2.6.5)/ bzw. Ethanol-Präzipitation (siehe 2.6.4) aufgereinigt, ihre DNA-Menge gemessen (siehe 2.5.11) und bei -20°C gelagert.

### 2.6.8 Präparation des Helferphagen VCSM13

Zunächst wurden 10 ml SB-Medium mit einer einzelnen Kolonie XL1-Blue-Zellen beimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3, was einer Zellzahl von ca.  $2,5 \times 10^8/\text{ml}$  entsprach, wurde die Kultur mit 50  $\mu\text{l}$  Helferphagen VCSM13 mit dem Titer  $> 1 \times 10^{11}$  pfu/ml infiziert (Phagen-Zell-Verhältnis von 20:1) und  $\frac{1}{2}$  h bei 37°C geschüttelt. Dann wurden 14  $\mu\text{l}$  Kanamycin (70  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zur Selektion der mit Phagen infizierten XL1-Blue-Zellen hinzugegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Am folgenden Tag wurde die Kultur bei 3500 rpm (2465 xg) für 15 min bei RT zentrifugiert (Eppendorf 5810 R, Rotor: A-4-81). Der Überstand wurde in neue 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, im Wasserbad für 20 min auf 70°C erhitzt und bei 3500 rpm erneut für 20 min zentrifugiert. Für die anschließende Phagen-Titerbestimmung wurden 5  $\mu\text{l}$  XL1-Blue-Zellen in 5 ml SB-Medium bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 1 bei 37°C geschüttelt.

In SB-Medium wurden Verdünnungen von  $10^6 - 10^9$  des Phagenüberstandes angesetzt. 200  $\mu\text{l}$  der XL1-Blue-Zellkultur wurden dann mit 100  $\mu\text{l}$  jeder Phagenkonzentration infiziert und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden jeweils 3 ml LB-Top-Agar, die auf 45°C temperiert waren, hinzugegeben und auf LB-Agarplatten verteilt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank konnten die kreisrunden Plaques ausgezählt werden, wobei jeder Plaque einem Phagenklon (pfu, 'plaque forming unit') entsprach. Der Phagentiter

wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Plaques (pfu)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1000 \mu\text{l/ml}}{\text{ausplattierte Menge } (\mu\text{l})}$$

Angestrebt wurde ein Phagentiter zwischen  $1 \times 10^{11}$  und  $1 \times 10^{12}$  pfu/ml.

### 2.6.9 Test-Ligation der chimären Fab-Fragmente in den Vektor pComb3X

Die Test-Ligationen wurden zum einen mit pComb3X und dem Stuffer-Fragment SS und zum anderen mit pComb3X und dem jeweiligen Fab-Fragment  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  durchgeführt, die alle zuvor mit dem Enzym SfiI verdaut worden waren. Die Ligationen wurden jeweils folgendermaßen angesetzt:

1 $\mu\text{l}$ (100 ng)	DNA pComb3X
1 $\mu\text{l}$ (100 ng)	DNA Fab $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$ /SS
4 $\mu\text{l}$	5x Ligase Puffer
1 $\mu\text{l}$	Ligase T4
13 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O
<hr/>	
20 $\mu\text{l}$	Endvolumen

Die Inkubation erfolgte über Nacht, dunkel, bei 15°C in einem Thermoblock im Kühlraum. Am nächsten Tag wurden mittels Elektroporation (siehe 2.5.4) 2  $\mu\text{l}$  des Ligationsproduktes mit jeweils 50  $\mu\text{l}$  ER2738-Zellen transformiert und 100  $\mu\text{l}$  einer 1:10 und einer 1:100 Verdünnung mit SOC-Medium auf LB-Agar/Carbenicillin-Platten (100 mg/ml) ausplattiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C konnte die Menge an transformierter DNA mittels nachfolgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Anzahl der Kolonien} \cdot \frac{\text{Kulturvolumen } (\mu\text{l})}{\text{ausplattiertes Volumen } (\mu\text{l})} \cdot \frac{\text{Ligationsvolumen } (\mu\text{l})}{\text{Transfektionsvolumen } (\mu\text{l})} \cdot 10$$

Die Menge der transformierten Fragmente pro  $\mu\text{g}$  Vektor-DNA sollte mindestens  $1 \times 10^7$  betragen, um eine ausreichend große Antikörper-Bibliothek herstellen zu können und mit der Haupt-Ligation fortzufahren.

### 2.6.10 Ligation der chimären Fab-Bibliothek und Transformation

Für die Ligation der chimären Fab-Fragmente  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  mit dem Vektor pComb3X wurden 2,8  $\mu\text{g}$  (100 ng/ $\mu\text{l}$ ) pComb3X (SfiI-verdaut), 2,8  $\mu\text{g}$  (100 ng/ $\mu\text{l}$ )  $\alpha_v\beta_5$ - und  $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Konstrukt (SfiI-verdaut), 80  $\mu\text{l}$  5xLigase-Puffer und 20  $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase (1 Unit/ $\mu\text{l}$ ) zwei Mal angesetzt und das Endvolumen jeweils mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 400  $\mu\text{l}$  erhöht. Die Ligationen wurden bei 15°C dunkel, in einem Thermoblock im Kühlraum über Nacht inkubiert.

Nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei -20°C wurden die Ligationenprodukte mittels Ethanol präzipitiert und gewaschen (siehe 2.6.4). Die Pellets wurden jeweils mit 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und zu je 15  $\mu\text{l}$  aufgeteilt.

Nach erfolgter Elektroporation der Ligationenprodukte in ER2738-Zellen (siehe 2.5.4) und anschließender Überführung in 5 ml SOC-Medium wurden die Zellsuspensionen jeweils in 50 ml Falcon-Röhrchen bei 250 rpm für 1 h bei 37°C geschüttelt. Das Gesamtvolumen der Kulturen wurde dann auf 15 ml SB-Medium mit Carbenicillin 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erhöht (+ 10 ml SB-Medium, + 3  $\mu\text{l}$  Carbenicillin (100 mg/ml)). Anschließend wurden sie bei 250 rpm für 1 h bei 37°C geschüttelt.

Die Carbenicillin-Konzentration der Kulturen wurde nochmals auf eine Menge von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erhöht und die Kulturen für eine weitere Stunde bei 250 rpm und 37°C geschüttelt. Danach wurden die vier Ligationen in einem 2 l-Kolben gepoolt und 4 ml frisch präparierte Helferphagen VCSM13 (ca.  $1 \times 10^{12}$  pfu/ml) hinzugegeben (siehe 2.6.8). Durch Zusatz von 336 ml SB-Medium und 170  $\mu\text{l}$  Carbenicillin (100 mg/ml) wurde ein Gesamtvolumen von 400 ml und eine Carbenicillin-Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erreicht und für 2 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 560  $\mu\text{l}$  Kanamycin (50 mg/ml) hinzugegeben, um eine Konzentration von 70  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zu erreichen, und bei 300 rpm über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Um die Effizienz der Transformation und die Größe der Antikörper-Bibliothek zu bestimmen, wurden 2  $\mu\text{l}$  der Kultur in 198  $\mu\text{l}$  SB-Medium gegeben und jeweils 10  $\mu\text{l}$  und 100  $\mu\text{l}$  dieser 1:100-Lösung auf LB-Agar/Carbenicillin-Platten (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) plattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Berechnung der Transformationseffizienz erfolgte durch nachstehende Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der Kolonien} \times \text{Kulturvolumen } (\mu\text{l})}{\text{ausplattiertes Volumen } (\mu\text{l})}$$

Die Anzahl der Transformationsprodukte sollte zwischen  $10^7$  und  $10^8$  betragen, um eine ausreichende Größe der jeweiligen Antikörper-Bibliothek zu gewährleisten.

Am darauffolgenden Tag wurde die Übernachtskultur in eine 250 ml Flasche überführt und bei 4000 rpm (2600 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 5 Superspeed, Rotor: GSA). Der Überstand wurde nun in eine neue 250 ml Flasche gefüllt, 1/5 des Volumens an 20%igem PEG-8000/2,5 M NaCl hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 9000 rpm (13500 xg) für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets für 10 min getrocknet. Das Phagenpellet wurde dann mit 1 ml 1% BSA/TBS resuspendiert, in ein 2 ml Eppendorf-Tube transferiert und bei 14000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert (Mikrozentrifuge 5415 R, Eppendorf). Danach wurde der Überstand über einen 0,2  $\mu\text{m}$  Filter (Minisart plus, Sartorius) für das nachfolgende Biopanning in ein steriles 2 ml Eppendorf-Tube überführt; zur Aufbewahrung bei 4°C wurde 1  $\mu\text{l}$  0,02%iges Natriumazid hinzugegeben.

### 2.6.11 Biopanning der chimären Fab-Bibliothek

Beim sogenannten Biopanning binden antikörpertragende Phagen an kompatible Antigene, die zuvor auf eine ELISA-Platte aufgetragen wurden. Über eine definierte Anzahl von Waschschrritten werden nur die spezifischen Phagen-Antikörper-Komplexe selektiert und anschließend eluiert.

Für die erste Runde des Pannings wurden zwei Wells einer 96-Well Platte (Costar®, Corning) jeweils mit 350 ng  $\alpha_v\beta_5$ - und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin, die in 25  $\mu\text{l}$  PBS gelöst waren, beschichtet und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. In der zweiten Runde wurde nochmals ein Well mit jeweils 350 ng des  $\alpha_v\beta_5$ - und  $\alpha_5\beta_1$ - Integrins verwendet, in der dritten und vierten Runde jeweils 1 x 200 ng.

An Tag 1 des Pannings wurden die Wells nach erfolgter Beschichtung mit 150  $\mu\text{l}$  3%igem

BSA/TBS geblockt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden 50  $\mu\text{l}$ /Well der zuvor präparierten Phagen-Bibliothek hinzugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde die E. coli-Kultur zur späteren Infektion angesetzt. Dafür wurden 2 ml SB-Medium, welches Tetrazyklin (5 mg/ml) in einer Konzentration von 10 mg/ml enthält, mit 2  $\mu\text{l}$  ER2738-Zellen versetzt und für 2 h bei 37°C geschüttelt.

Die Phagenlösung in der ELISA-Platte wurde kräftig ausgeschlagen, danach 150  $\mu\text{l}$  0,05%iges TBS/Tween in jedes Well gegeben und dieses zehn Mal kräftig hoch- und runterpipettiert. Nach einer Inkubation von 5 min wurde die Waschlösung ausgeschlagen und der Waschschrift wiederholt. In der ersten Runde wurde insgesamt fünf Mal gewaschen, in den nachfolgenden Runden (2. bis 4. Runde) zehn Mal. Nach dem letzten Ausschlagen der Lösung wurden 50  $\mu\text{l}$  Trypsin (10 mg/ml in TBS) in jedes Well gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde zehn Mal kräftig hoch- und runterpipettiert, das Eluat in die herangewachsene 2 ml E. coli-Kultur gegeben und 15 min bei 37°C geschüttelt. Dann wurden in die Kultur 8 ml SB-Medium und 2  $\mu\text{l}$  Carbenicillin (100 mg/ml) gegeben, um ein Gesamtvolumen von 10 ml und eine Carbenicillinmenge von 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zu erreichen. Die Kultur wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt.

Um den Output-Titer zu bestimmen, wurden 2  $\mu\text{l}$  der 10 ml-E. coli-Kultur entnommen und in 198  $\mu\text{l}$  SB-Medium gelöst. 1  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$  und 100  $\mu\text{l}$  dieser 1:100 Lösung wurden auf LB-Agar/Carbenicillin (100 mg/ml)-Platten plattiert. Um den Input-Titer zu bestimmen, wurden 50  $\mu\text{l}$  der 2 ml-E. coli-Kultur mit jeweils 1  $\mu\text{l}$  einer  $10^6$ - und einer  $10^8$ -Verdünnung der Phagenlösung infiziert und für 15 min bei RT inkubiert. Die beiden Phagen-Kulturen wurden auf LB-Agar/Carbenicillin (100 mg/ml)-Platten und 50  $\mu\text{l}$  pure E. coli-Kultur als Reinheitskontrolle auf LB-Agar/Kanamycin (50 mg/ml)-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die 10 ml-Kultur bei 250 rpm für 1 h bei 37°C geschüttelt, jeweils 3  $\mu\text{l}$  Carbenicillin (100 mg/ml) hinzugegeben und erneut für 1 h bei 37°C geschüttelt. Nachdem jeweils 1 ml des Helferphagen VCSM13 zur Kultur gegeben worden war, wurde diese in eine 250 ml Flasche überführt und das Volumen mit 89 ml SB-Medium und 44,5  $\mu\text{l}$  Carbenicillin (100 mg/ml) auf eine Gesamtmenge von 100 ml mit einer Carbenicillin-Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erhöht. Dann wurde die Kultur bei 300 rpm erneut für 2 h bei

37°C geschüttelt und jeweils 140  $\mu\text{l}$  Kanamycin (50 mg/ml) hinzugegeben. Im Folgenden wurde die Kultur bei 300 rpm über Nacht bei 37°C geschüttelt. An Tag 5 des Biopannings wurde lediglich die Phagen-Präparation durchgeführt, welche bei 4°C gelagert wurden.

### **2.6.12 Analyse der Fab-Fragment-exprimierenden Klone mittels ELISA**

Von der Output-Platte des Pannings (Tag 4) wurden elf Klone gepickt und in jeweils 5 ml SB-Medium, in dem Carbenicillin (100 mg/ml) mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  enthalten war, bei 250 rpm für 8 h bei 37°C geschüttelt. Als 'backup' wurden 1,5  $\mu\text{l}$  jeder Kultur auf eine LB-Agar/Carbenicillin (100 mg/ml)-Platte pipettiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zu den Kulturen wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  IPTG (0,5 M) gegeben und bei 250 rpm, 37°C über Nacht geschüttelt. Für den nächsten Tag wurde eine 96 Well-Platte (Costar®, Corning) beschichtet, indem für jeweils einen Klon 100 ng gelöstes Antigen in 25  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O in jedes Well gegeben wurden. Folgende Antigene wurden eingesetzt: Integrin ( $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$ ), Ziege-anti-humanes IgG-Fab (goat anti-human IgG-Fab), humanes IgG (ganzes Molekül) (human IgG whole molecule), Ziege-anti-humaner kappa-Antikörper (goat anti-human kappa-antibody) und als Negativkontrolle 3% BSA/TBS. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Übernacht-Kulturen bei 3500 rpm (2465 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf 5810 R, Rotor: A-4-81). Die am Vortag beschichtete Platte wurde mit 150  $\mu\text{l}$  3%igem TBS/BSA geblockt und für eine 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurden 50  $\mu\text{l}$  des Überstandes der zuvor zentrifugierten Kulturen in die Wells gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Platte zehn Mal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und die Wells mit 50  $\mu\text{l}$  Anti-HA-Peroxidase in einer Konzentration von 1:2000 beschichtet. Die ELISA-Platte wurde erneut zehn Mal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und es wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  ABTS (105  $\mu\text{l}$  ABTS, 5,1 ml 1X Citratpuffer, 1  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pro Well hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm im Photometer (Victor®, Wallac) die Absorption der Fab-Fragmente gemessen.

### 2.6.13 BstOI-Verdau der Fab-Fragmente

Nach Analyse der spezifischen Fab-Klone im ELISA (siehe 2.6.12) wurde die DNA mittels QIAGEN Miniprep (siehe 2.5.9) eluiert, ihre Konzentration gemessen (siehe 2.5.11) und in folgendem PCR-Ansatz eingesetzt:

1 $\mu$ l	DNA
1,5 $\mu$ l	ompseq Sense-Primer
1,5 $\mu$ l	gback Reverse-Primer
4 $\mu$ l	2,5 mM dNTP-Mix
5 $\mu$ l	10x PCR Puffer
0,375 $\mu$ l	Taq Polymerase
36,625 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
<hr/>	
50 $\mu$ l	Endvolumen

Folgende Einstellungen wurden am Thermocycler TGradient (Biometra®) vorgenommen: 30 sek bei 94°C, 15 sek bei 94°C, 30 sek bei 58°C, 1 min bei 72°C, 10 min bei 72°C, Abkühlen auf 4°C. Insgesamt erfolgten 30 Zyklen.

Für den BstOI-Verdau wurden 15  $\mu$ l des PCR-Produktes zusammen mit 4,5  $\mu$ l 10x Puffer, 0,45  $\mu$ l 100x BSA, 1,5  $\mu$ l BstOI und der entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 45  $\mu$ l für 2 h bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente im 3%igen TAE/Agarosegel analysiert (siehe 2.5.10).

### 2.6.14 Sequenzierung selektierter Fab-Fragmente

Für die Sequenzierung wurden diejenigen Fab-Fragment-Klone ausgewählt, welche in der Gelelektrophorese nach BstOI-Verdau einen unterschiedlichen Bandenverlauf aufwiesen. Eingesetzt wurde die durch QIAGEN Miniprep gewonnene DNA (siehe 2.5.9).

Die PCR wurde folgendermaßen angesetzt:

1 $\mu$ l	DNA (300 ng)
1 $\mu$ l	Terminator Ready Reaction Mix (Big Dye)
2 $\mu$ l	5x Big Dye Sequencing Buffer
1 $\mu$ l	5 pmol ompseq Sense-Primer/ pelseq Sense-Primer
5 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
<hr/>	
10 $\mu$ l	Endvolumen

Nachstehende Einstellungen wurden am Thermocycler TGradient (Biometra®) vorgenommen: 10 sek bei 96°C, 4 min bei 60°C, Abkühlen auf 10°C. Insgesamt erfolgten 25 Zyklen.

Anschließend wurden 10,8  $\mu$ l 3 M Natriumacetat (pH 4,6), 225  $\mu$ l 95%iger Ethanol und 114,2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O zu den PCR-Produkten hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen und einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde bei 13000 rpm (17900 xg) für 20 min zentrifugiert (Mikrozentrifuge Eppendorf). Die Überstände wurden verworfen, die Pellets mit 150  $\mu$ l 70%igem Ethanol gewaschen und bei 13000 rpm (17900 xg) für weitere 2 min zentrifugiert. Nachdem die Überstände vorsichtig abpipettiert worden waren, wurden die Pellets im Thermoblock bei 60°C vollständig getrocknet, in 10  $\mu$ l Hi-Di Formamid resuspendiert und anschließend bei -20°C gelagert. Gemäß den Herstellerangaben wurde die DNA der Fab-Fragmente mit Hilfe eines Sequenziergerätes (3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems) analysiert. Durch einen Sequenz-Alignment-Editor (BioEdit, Ibis Biosciences) konnten die Nukleotid- bzw. Aminosäure-Sequenzen kontrolliert werden.

## 3. Ergebnisse

### Herstellung chimärer Fab-Antikörper-Bibliotheken gegen die Integrine $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$

Die chimären Fab-Antikörper-Bibliotheken gegen die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  wurden aus den variablen Regionen des jeweils mit diesem Integrin immunisierten Kaninchens und humanen konstanten Regionen hergestellt.

In dieser Arbeit wurde das Antikörperreservoir des Kaninchens benutzt, um durch Humanisierung der Kaninchen-Antikörper-Fragmente den Grundstein für eine mögliche therapeutische Anwendung zu legen.

Da die variablen Regionen für die Antigenbindung verantwortlich sind, ist nicht davon auszugehen, dass humane konstante Regionen die Fab-Fragmente von immunisierten Kaninchen in Affinität oder Spezifität beeinflussen (BARBAS et al. 2001).

#### 3.1 Immunisierung von New-Zealand-White-Kaninchen mit den humanen Integrinen $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$

Um einen ausreichend hohen Serum-Antikörper-Spiegel zu erzielen, erhielten die New-Zealand-White-Kaninchen nach Erstimmunisierung mit den humanen Integrinen  $\alpha_v\beta_5$  bzw.  $\alpha_5\beta_1$  insgesamt zwei Boosterungen. Mittels ELISA konnte der Antikörpertiter im Kaninchen-Serum intermittierend bestimmt werden, wobei die ermittelten OD<sub>405</sub>-Werte vor der ersten Boosterung für  $\alpha_v\beta_5$  1,912 und 2,331 und für  $\alpha_5\beta_1$  1,705 und 2,277 betragen. Bis nach der zweiten Boosterung lagen die OD<sub>405</sub>-Werte bei  $\alpha_v\beta_5$  zwischen 2,843

und 2,874 und bei  $\alpha_5\beta_1$  zwischen 2,853 und 2,866. Nach zwei Boosterungen zeigten sich bei beiden Kaninchen keine Steigerungen der Antikörperspiegel mehr (Abb. 3.1, Abb. 3.2).

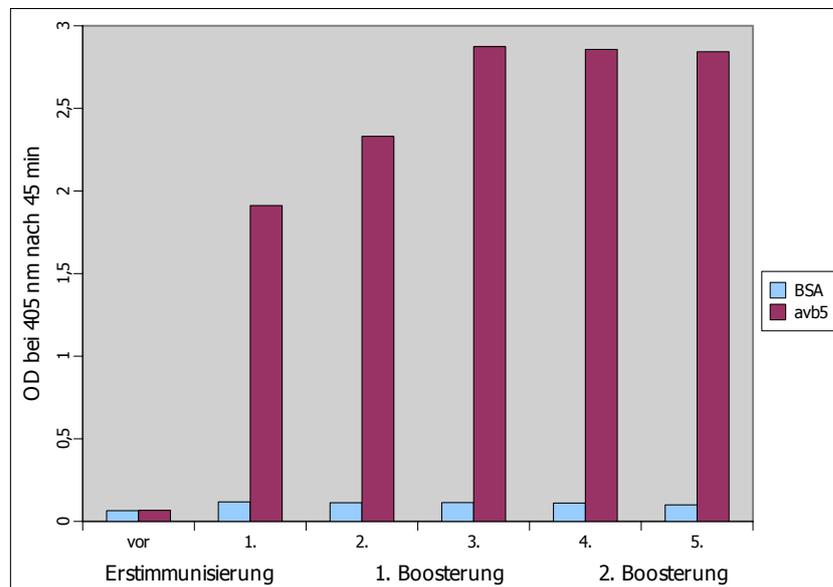


Abbildung 3.1: Bestimmungen der Antikörpertiter des  $\alpha_v\beta_5$ -Kaninchens durch ELISA. 'vor' = vor Erstimmunisierung; insgesamt fünf Messungen (1.-5.) nach Erstimmunisierung.

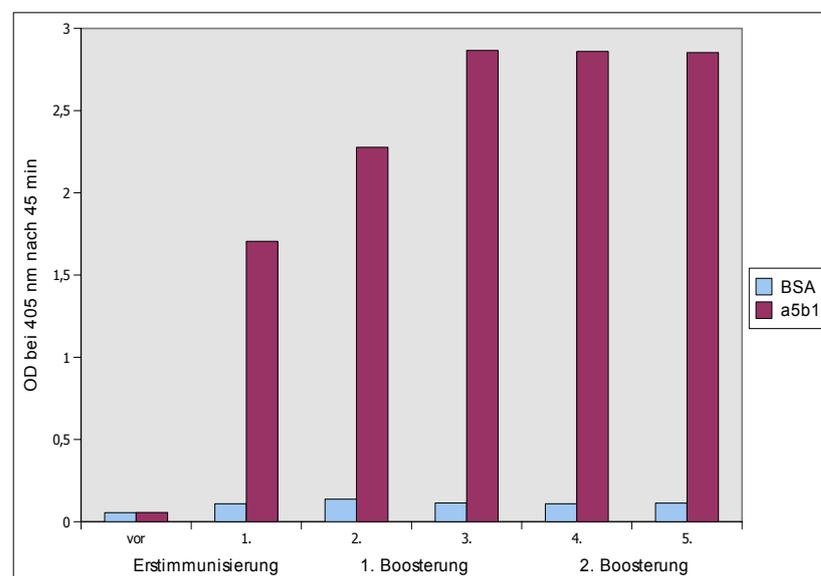


Abbildung 3.2: Bestimmungen der Antikörpertiter des  $\alpha_5\beta_1$ -Kaninchens durch ELISA. 'vor' = vor Erstimmunisierung; insgesamt fünf Messungen (1.-5.) nach Erstimmunisierung.

### 3.2 RNA-Isolation aus Milz und Knochenmark der Kaninchen

Nach Erreichen eines im ELISA nachgewiesenen Antikörpertiters gegen das Integrin  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  wurden den immunisierten Kaninchen die lymphatischen Organe Milz und Knochenmark entnommen. Die RNA wurde mittels TRI Reagent (Sigma®) isoliert und anschließend in einem 1%igen Agarosegel analysiert (Abb. 3.3). Es zeigten sich zwei voneinander abgetrennte Banden bei 28S und 18S.

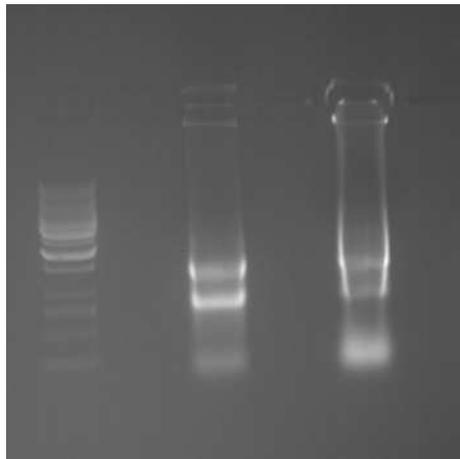


Abbildung 3.3: Elektrophoretische Auftrennung der Kaninchen-RNA. Links: Marker (1kb), Mitte: Knochenmark-RNA, rechts: Milz-RNA. Äquivalent für  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$ .

Die Messung der RNA ergab folgende Werte:

	RNA $\alpha_v\beta_5$		RNA $\alpha_5\beta_1$	
		OD: 260/280		OD: 260/280
Knochenmark:	4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,68	2,33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,70
Milz:	8,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,71	10,75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,73

### 3.3 Herstellung chimärer $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Fragmente

Die cDNA wurde mit Hilfe des Oligo(dT)-Primers und der Superscript II Reverse Transcriptase aus der RNA synthetisiert. Anschließend wurde die Kaninchen-cDNA zur PCR-Amplifizierung der variablen Regionen eingesetzt, die humanen konstanten Regionen wurden aus dem Plasmid pAra H6HA-TT amplifiziert, welches ein humanes Fab-Fragment enthielt.

#### 3.3.1 Erste Runde Fab-PCR

In der ersten Runde Fab-PCR wurden die variablen Anteile des Fab-Fragmentes, variable leichte Kette ( $V_L$ ) und variable schwere Kette ( $V_H$ ), sowie die humanen konstanten Anteile  $C_\kappa$  und  $C_H1$  amplifiziert.

Die variable leichte Kette ( $V_L$ ), bestehend aus  $V_\kappa$  und  $V_\lambda$ , und die variable schwere Kette ( $V_H$ ) wurden mit Hilfe verschiedener Primerkombinationen amplifiziert (Abb. 3.4). Die SfiI-Seite von  $V_\kappa$  und  $V_\lambda$  diente als späterer Ansatzpunkt für die Restriktionsendonuklease SfiI, die humane  $C_\kappa$ -Sequenz stellte die Verbindungsstelle mit dem humanen  $C_\kappa$ -pelB-Produkt in der zweiten Runde Fab-PCR dar.

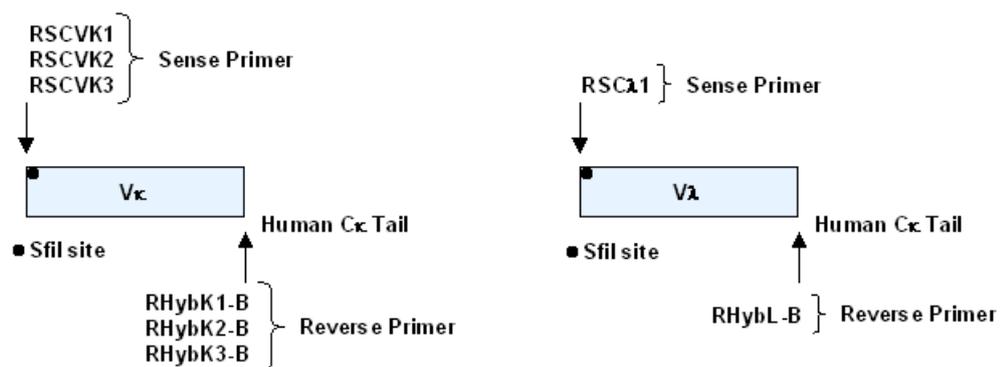


Abbildung 3.4: Erste Runde PCR der variablen leichten Kette  $V_L$ ; links  $V_\kappa$ , rechts  $V_\lambda$ . Adaptiert von 'Phage Display', Barbas et al. 2001, S. 9.69 u. S. 9.70.

Die variable schwere Kette ( $V_H$ ) beinhaltet die Ansatzstelle für die pelB-Leader-Sequenz, welche als Overlap-Region in der dritten PCR-Runde diente (Abb. 3.5). Mit Hilfe des Reverse-Primers RHyIgG-CH1-B konnte die Fusionsstelle mit  $C_{H1}$  für die zweite PCR-Runde amplifiziert werden.

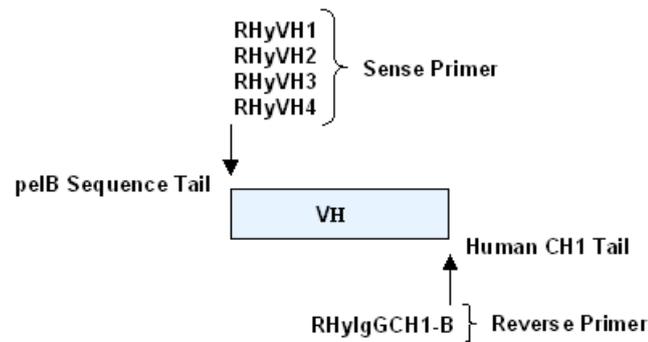


Abbildung 3.5: Erste Runde PCR der variablen schweren Kette  $V_H$ . Adaptiert von 'Phage Display', Barbas et al. 2001, S. 9.70.

Das humane  $C_\kappa$ -Fragment aus pAra H6HA-TT wurde mit den Primern HKC-F und Lead-B amplifiziert und trug die pelB-Leader-Sequenz. Die Primer HlgGCH1-F und dpseq amplifizierten das humane  $C_{H1}$  aus pAra H6HA-TT, wobei der Reverse-Primer dpseq spezifisch für die Sequenz der SfiI-Ansatzstelle war (Abb. 3.6).

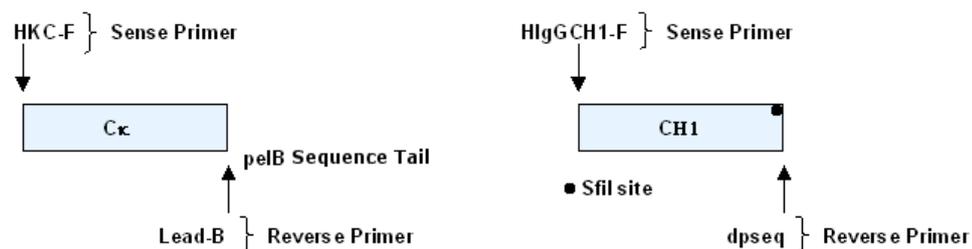


Abbildung 3.6: Amplifikation des humanen  $C_\kappa$  und  $C_{H1}$  aus pAra H6HA-TT. Adaptiert von 'Phage Display', Barbas et al. 2001, S. 9.71.

Die PCR-Produkte wurden in 1%igem TAE/Agarosegel analysiert, in dem die Fragmente  $V_{\kappa}$ ,  $V_{\lambda}$ ,  $V_H$  und  $C_H1$  eine Größe von 350 bp und  $C_{\kappa}$  eine Größe von 400 bp aufwiesen. Nach Ethanol-Präzipitation, Auftrennung in 1,2 %igem TAE/Agarosegel und Aufreinigung mittels 'Freeze-Squeezing' wurde die DNA erneut ethanolpräzipitiert.

Die DNA-Mengen der variablen leichten Kette  $V_L$  und der variablen schweren Kette  $V_H$  betragen für  $\alpha_v\beta_5$  8,2  $\mu\text{g}$  und 6,74  $\mu\text{g}$  und für  $\alpha_5\beta_1$  19,32  $\mu\text{g}$  und 15,5  $\mu\text{g}$ . Die Messung der DNA von  $C_{\kappa}$  und  $C_H1$  ergab die Werte 18,82  $\mu\text{g}$  und 14,48  $\mu\text{g}$ .

### 3.3.2 Zweite Runde Fab-PCR, 'First Overlap'

In der zweiten Runde Fab-PCR wurden die chimäre leichte und schwere Kette in einem 'First Overlap' aus der variablen Region des Kaninchens und humanen konstanten Region aus der ersten Runde Fab-PCR amplifiziert. Die chimäre leichte Kette entstand mit Hilfe des Sense-Primers RSC-F und des Reverse Primers Lead-B durch Verbindung der humanen  $C_{\kappa}$ -Sequenz der variablen leichten Kette  $V_L$  des Kaninchens mit dem humanen  $C_{\kappa}$  (Abb. 3.7).

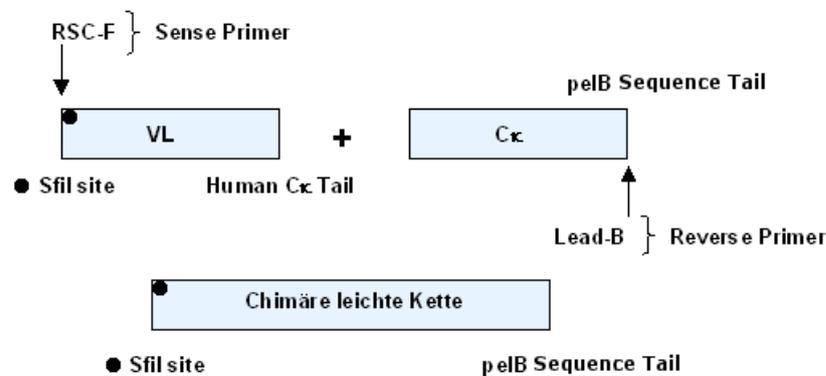


Abbildung 3.7: Amplifikation der chimären leichten Kette aus der variablen leichten Kette  $V_L$  (Kaninchen) und der konstanten leichten Kette  $C_{\kappa}$  (human). Adaptiert von 'Phage Display', Barbas et al. 2001, S. 9.73.

Für die Amplifikation der chimären schweren Kette wurden der Sense-Primer lead-VH und der Reverse-Primer dpseq eingesetzt. Dabei diente die humane  $C_H1$ -Sequenz der variablen schweren Kette als Bindungsstelle mit dem humanen  $C_H1$  (Abb. 3.8).

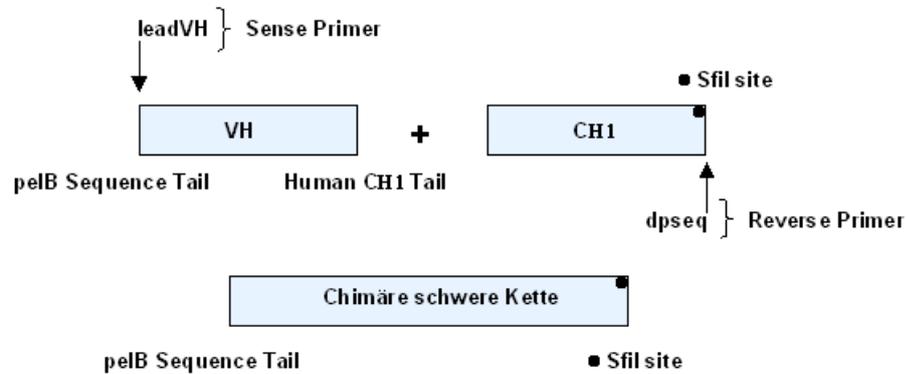


Abbildung 3.8: Amplifikation der chimären schweren Kette aus der variablen schweren Kette  $V_H$  (Kaninchen) und der konstanten schweren Kette  $C_H1$  (human). Adaptiert von 'Phage Display', Barbas et al. 2001, S. 9.73.

Die PCR-Produkte wurden in 1%igem TAE/Agarosegel analysiert, in dem die chimäre leichte Kette die Größe von 800 bp und die chimäre schwere Kette die Größe von 750 bp aufwies. Nach Ethanol-Präzipitation, Auftrennung in 1,2%igem TAE/Agarosegel und Aufreinigung mittels 'Freeze-Squeezing' wurde die DNA erneut ethanolpräzipitiert. Die DNA-Messungen ergaben für die chimäre leichte Kette von  $\alpha_v\beta_5$  9,5  $\mu\text{g}$  und von  $\alpha_5\beta_1$  16,4  $\mu\text{g}$  und für die chimäre schwere Kette von  $\alpha_v\beta_5$  13,2  $\mu\text{g}$  und von  $\alpha_5\beta_1$  12,5  $\mu\text{g}$ .

### 3.3.3 Dritte Runde Fab-PCR, 'Second Overlap'

In einem 'Second Overlap' wurde mittels PCR die chimäre leichte Kette mit der chimären schweren Kette über die pelB-Leader-Sequenz zu einem chimären Fab-Fragment amplifiziert. Dabei wurden der Sense-Primer RSC-F und der Reverse-Primer dp-Ex eingesetzt. Das chimäre Fab-Fragment trug an beiden Enden jeweils eine SfiI-Seite (Abb. 3.9).

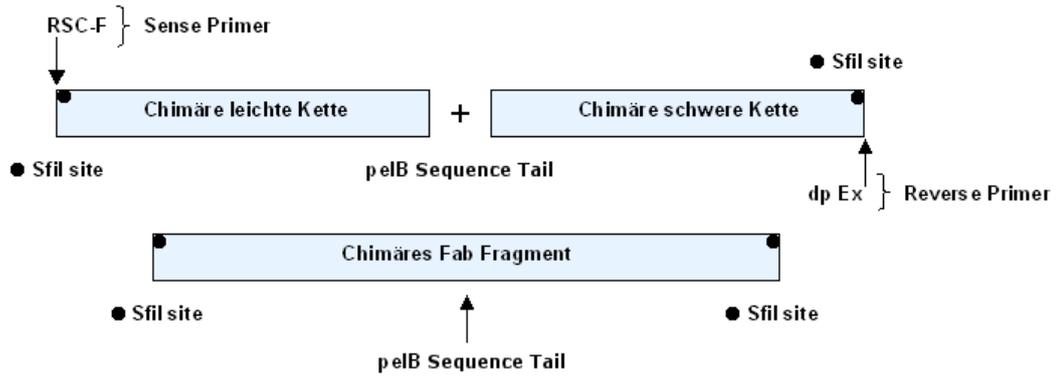


Abbildung 3.9: Amplifikation des chimären Fab-Fragmentes aus der chimären schweren Kette und der chimären leichten Kette. Die Enden des Fab-Fragmentes bilden die beiden SfiI-Schnittstellen, im Zentrum befindet sich die pelB-Leader-Sequenz. Adaptiert von 'Phage Display', Barbas et al. 2001, S. 9.75.

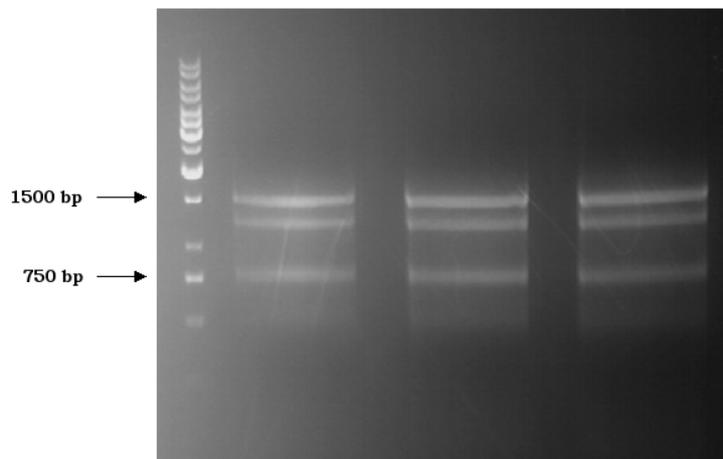


Abbildung 3.10: Elektrophoretische Auftrennung der Fab-Fragment-DNA (äquivalent für  $\alpha_5\beta_1 / \alpha_v\beta_5$ ) in 1,2%igem TAE/Agarosegel, 1500 bp=Fab-DNA, 750 bp=Restprodukt des 'First Overlaps', mittlere Bande = unspezifisches Produkt, Marker 1 kb.

Das PCR-Produkt wurde in 1,5%igem TAE/Agarosegel analysiert und wies eine Größe von 1500 bp auf (Abb. 3.10). Nach Ethanol-Präzipitation, Auftrennung in 1,2%igem TAE/Agarosegel und Aufreinigung mittels 'Freeze-Squeezing' wurde die DNA erneut ethanolpräzipitiert. Die Menge der DNA des chimären Fab-Fragmentes betrug bei  $\alpha_v\beta_5$  15,38  $\mu\text{g}$  und bei  $\alpha_5\beta_1$  12,9  $\mu\text{g}$ .

### 3.4 Testung der Elektrokompetenz der ER2738-Zellen

Um von einer ausreichenden Elektrokompetenz auszugehen und damit eine gute Transformationseffizienz zu erreichen, sollte die Anzahl der Kolonien/ $\mu\text{g}$  Plasmid  $> 1 \times 10^9$  betragen. Das Ergebnis der Testung der Elektrokompetenz der ER2738-Zellen ist im Folgenden dargestellt:

Ausplattierte Zellen	1 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
Anzahl Kolonien	$4 \times 10^9$	$1,27 \times 10^{10}$	$1,24 \times 10^{10}$

### 3.5 Klonierung der chimären Fab-Fragmente in den Vektor pComb3X

Nach Transformation von pComb3XSS in kompetente XL1-Blue-Zellen wurde die Plasmid-DNA mittels Plasmid-Maxi-Präparation isoliert. Die Menge der pComb3XSS-DNA betrug 571  $\mu\text{g}$ .

Um das Fab-Fragment mit pComb3X ligieren zu können, mussten zunächst beide Anteile mit dem Restriktionsenzym SfiI geschnitten werden. Der Vektor pComb3X wies eine Größe von 3400 bp auf, sein Stuffer-Fragment 1600 bp. Das verdaute Fab-Produkt war 1500 bp groß (Abb. 3.11). Nach anschließender Auftrennung in 0,9%igem TAE/Agarosegel wurde die jeweilige DNA mittels 'Freeze-Squeezing' aufgereinigt und ethanolpräzipitiert. Die Messung der DNA nach dem Verdau mit SfiI ergab für pComb3X 28  $\mu\text{g}$  und für das Stuffer-Fragment 15,6  $\mu\text{g}$ . Die Menge der verdauten DNA des  $\alpha_v\beta_5$ -Fab-Fragmentes betrug 6,3  $\mu\text{g}$  und des  $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Fragmentes 6,74  $\mu\text{g}$ .

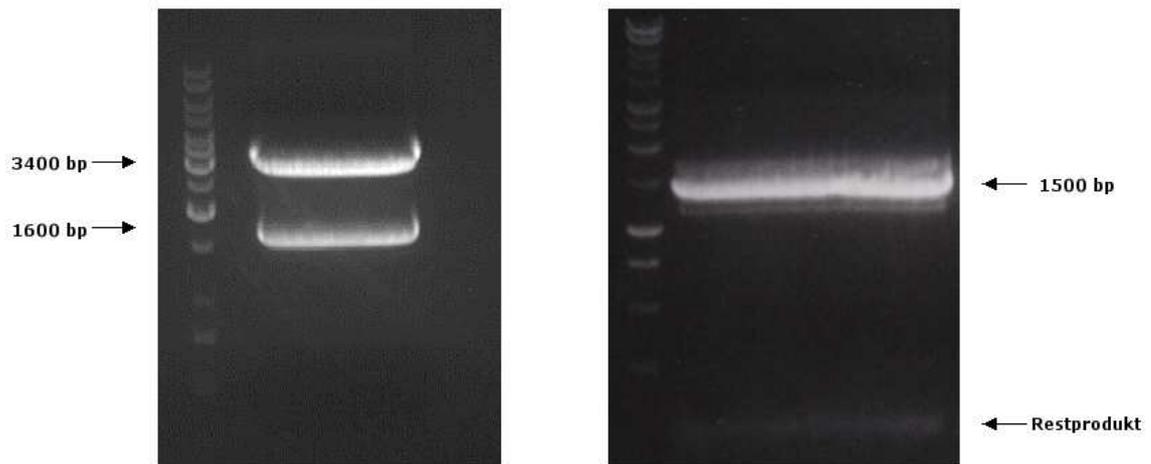


Abbildung 3.11: Bild links: Elektrophoretische Auftrennung von pComb3XSS nach SfiI-Verdau. pComb3X als obere Bande mit 3400 bp und sein Stuffer-Fragment SS als untere Bande mit 1600 bp, Marker 1 kb. Bild rechts: Elektrophoretische Auftrennung der Fab-DNA nach SfiI-Verdau. Geschnittene Fab-DNA als obere Bande mit 1500 bp, Restprodukt als untere schwache Bande.

Die Ligations- und Transformationseffizienz der Vektor- sowie Fab-DNA wurden in einer Testligation ermittelt. Dabei wurde die SfiI-verdaute Vektor-DNA pComb3X zum einen mit der Stuffer-DNA (Positiv-Kontrolle) ligiert, zum anderen mit der SfiI-verdauten Fab-DNA. Als Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O eingesetzt. Mittels Elektroporation wurden jeweils 2  $\mu$ l des Ligationsproduktes in 50  $\mu$ l ER2738-Zellen transformiert, 1 h bei 37°C geschüttelt und die Kultur in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung ausplattiert. Anschließend wurde die Menge der transformierten Fragmente pro  $\mu$ g Vektor-DNA, die mindestens  $1 \times 10^7$  betragen sollte, berechnet.

	<u>1:10</u>	<u>1:100</u>
H <sub>2</sub> O	0	0
Stuffer-DNA	$>3 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
$\alpha_5\beta_1$ -Fab-DNA	$2,9 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$
$\alpha_v\beta_5$ -Fab-DNA	$2,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$

Nach Durchführung der Testligationen wurden die Hauptligationen angesetzt und schließlich in vier verschiedenen Elektroporationsansätzen in ER2738-Zellen transformiert. Um

eine ausreichende Größe der Antikörper-Bibliothek zu gewährleisten, sollte die Anzahl der Transformationsprodukte zwischen  $10^7$  und  $10^8$  betragen. Insgesamt wurden für  $\alpha_v\beta_5$   $2,2 \times 10^8$  und für  $\alpha_5\beta_1$   $1,9 \times 10^8$  Transformationsprodukte ausgezählt und im Biopanning eingesetzt.

### 3.6 Messung des Phagentiters von VCSM13

Nach der Präparation des Helferphagen VCSM13 sollte der Phagentiter (pfu/ml) mindestens  $1 \times 10^{11}$  betragen. Die Auszählung der Phagen-Plaques ergab bei unterschiedlichen Verdünnungen folgende Werte (n.z.= nicht zählbar):

Verdünnungsfaktor	$10^6$	$10^7$	$10^8$	$10^9$
Phagentiter (pfu/ml)	n.z.	n.z.	n.z.	$1,1 \times 10^{12}$

### 3.7 Biopanning der chimären $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Bibliothek

Beim Biopanning banden  $\alpha_v\beta_5$ - bzw.  $\alpha_5\beta_1$ -Fab-tragende Phagen an das jeweilige Integrin  $\alpha_v\beta_5$ - bzw.  $\alpha_5\beta_1$ , welches als immobilisiertes Antigen auf einer ELISA-Platte haftete. Der Helferphage VCSM13 trug dabei eine Kanamycin-Resistenz, so dass in Kombination mit der Carbenicillin-Resistenz des Vektors ausschließlich die Klone selektiert wurden, die einen Fab-tragenden Phagen enthielten.

Über vier Runden wurden nur die spezifisch bindenden Klone durch Erhöhung der Waschschrirte und Reduzierung der Antigenkonzentration selektiert. Der Verlauf der Selektion und die Anzahl der reamplifizierten spezifischen Klone wurde anhand der Titerentwicklung des Outputs verfolgt (Tab.3.1, Tab.3.2).

In der ersten Runde wurden  $2 \times 350$  ng, in der zweiten Runde jeweils  $1 \times 350$  ng des jeweiligen Integrins auf der ELISA-Platte immobilisiert und in der dritten und vierten Runde nur noch jeweils 200 ng. Die Waschschrirte wurden mit fünf Mal nach der ersten Runde auf jeweils zehn Mal in den folgenden Runden erhöht. Der Input-Titer wurde durch das Ausplattieren von ER2738-Zellen, die mit der Phagenlösung infiziert worden waren, bestimmt. Zur Ermittlung des Output-Titers wurde die eluierte Phagenkultur ausplattiert.

Tabelle 3.1: Biopanning der chimären  $\alpha_v\beta_5$ -Fab-Bibliothek. Anzahl der Kolonien von Input ( $10^6$ ,  $10^8$ ) und Output (1  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l) in den Runden 1-4 mit Angabe der jeweiligen Waschschrirte und der Menge des immobilisierten Antigens. N.z.= Kolonien nicht zählbar.

	<u>1.Runde</u>	<u>2. Runde</u>	<u>3. Runde</u>	<u>4. Runde</u>
Input ( $10^6$ )	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
Input ( $10^8$ )	1116	288	327	234
Output 1 $\mu$ l	18	6	1	3
Output 10 $\mu$ l	170	66	22	56
Output 100 $\mu$ l	1305	446	192	501
Waschschrirte	5	10	10	10
Antigenmenge (ng)	2x350	350	200	200

Tabelle 3.2: Biopanning der chimären  $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Bibliothek. Anzahl der Kolonien von Input ( $10^6$ ,  $10^8$ ) und Output (1  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l) in den Runden 1-4 mit Angabe der jeweiligen Waschschrirte und der Menge des immobilisierten Antigens. N.z.= Kolonien nicht zählbar.

	<u>1.Runde</u>	<u>2. Runde</u>	<u>3. Runde</u>	<u>4. Runde</u>
Input ( $10^6$ )	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
Input ( $10^8$ )	776	373	430	175
Output 1 $\mu$ l	3	0	6	1
Output 10 $\mu$ l	56	17	29	27
Output 100 $\mu$ l	517	197	397	314
Waschschrirte	5	10	10	10
Antigenmenge (ng)	2x350	350	200	200

### 3.8 Analyse der Fab-Fragment-exprimierenden Klone mittels ELISA

Im ELISA konnten die im Biopanning selektierten  $\alpha_v\beta_5$ - bzw.  $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Klone nachgewiesen und ihre Spezifität bestimmt werden (Abb. 3.12, Abb. 3.13).

Dazu wurden elf Klone (#1-#11) von der Output-Platte des letzten Biopannings von Tag 4 zufällig gepickt, danach kultiviert, mit IPTG induziert und die Überstände im ELISA eingesetzt. Als Antigene wurden neben dem entsprechenden Integrin ( $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ) das Ziege-anti-humane IgG-Fab (goat anti-human IgG-Fab = anti-Fab), welches das humane  $C_H1$ -Fragment bindet, und der Ziege-anti-humane kappa-Antikörper (goat anti-human kappa-Antikörper = anti-kappa) zum Nachweis einer konstanten  $\kappa$ -Domäne eingesetzt. Das humane IgG (ganzes Molekül; humane IgG whole molecule = IgG) sollte Bindungen von Fab-Fragmenten mit einer Fc-Region der schweren Kette ausschließen. Die Antigenbindenden Fab-Fragmente wurden mit dem konjugierten Anti-HA-Antikörper detektiert, welcher die Hämagglutinin (HA) Decapeptid Tag im pComb3X bindet. Als Kontroll-Antigen diente 3% BSA/TBS; die Negativkontrolle für die Klone war SB-Medium.

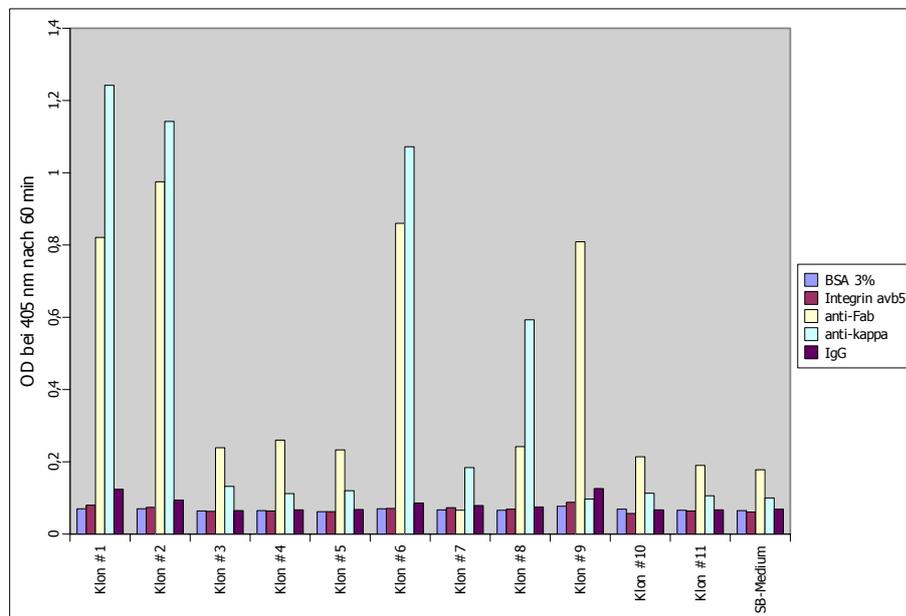


Abbildung 3.12: ELISA der Fab-exprimierenden  $\alpha_v\beta_5$ -Klone #1-#11 nach Tag 4 des Biopannings.

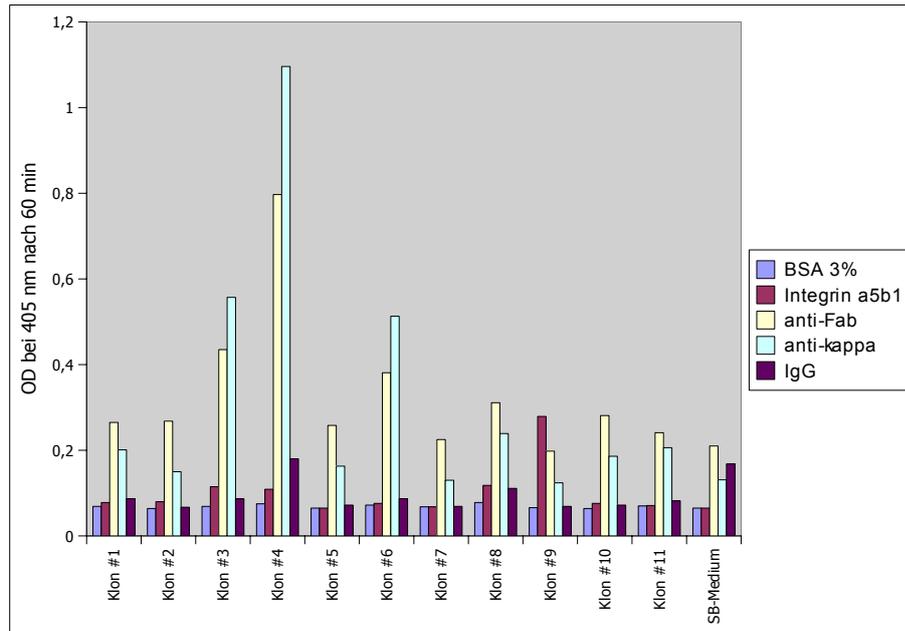


Abbildung 3.13: ELISA der Fab-exprimierenden  $\alpha_5\beta_1$ -Klone #1-#11 nach Tag 4 des Biopannings.

Pro Well wurden jeweils 100 ng Antigen verteilt.

Die Auswertung des ELISA's nach 60 min erbrachte bei der Bindung des  $\alpha_5\beta_1$ -Antigens  $OD_{405}$ -Werte zwischen 0,065 und 0,279 (Abb. 3.14) und bei der Bindung des  $\alpha_v\beta_5$ -Antigens Werte zwischen 0,062 und 0,088. Die Reaktion mit dem Ziege-anti-humanen IgG-Fab (goat anti-human IgG-Fab = anti-Fab) zeigte bei  $\alpha_v\beta_5$   $OD_{405}$ -Werte zwischen 0,066 und 0,975 und bei  $\alpha_5\beta_1$  Werte zwischen 0,198 und 0,797. Die  $OD_{405}$ -Werte der Bindung mit dem Ziege-anti-humanen kappa-Antikörper (goat anti-human kappa-Antikörper = anti-kappa) lagen bei  $\alpha_v\beta_5$  zwischen 0,097 und 1,242 und bei  $\alpha_5\beta_1$  zwischen 0,124 und 1,096. Die  $OD_{405}$ -Werte für die Bindung an das humane IgG-Molekül lagen bei  $\alpha_v\beta_5$  zwischen 0,067 und 0,126 und bei  $\alpha_5\beta_1$  zwischen 0,067 und 0,180. Die BSA-Werte überschritten sowohl bei den Klonen von  $\alpha_5\beta_1$  als auch von  $\alpha_v\beta_5$  nicht den Wert von 0,077. Die  $OD_{405}$ -Werte für das SB-Medium im jeweiligen ELISA betragen bei der Reaktion mit den Integrinen  $\alpha_v\beta_5$  bzw.  $\alpha_5\beta_1$  0,061 bzw. 0,065. Bei der Bindung des Ziege-anti-humanen IgG-Fab lagen die  $OD_{405}$ -Werte bei 0,178 bzw. 0,210, bei der Bindung des Ziege-anti-humanen kappa-Antikörpers bei 0,100 bzw. 0,131 und bei der Bindung des humanen IgG-Moleküls bei 0,069 bzw. 0,168. Die BSA-Werte betragen jeweils den  $OD_{405}$ -Wert 0,065.

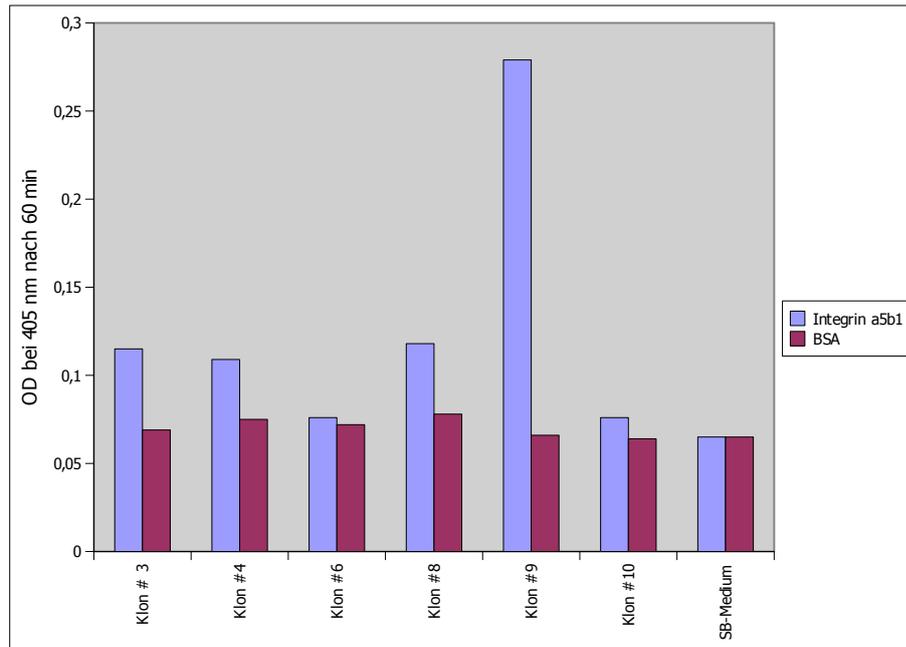


Abbildung 3.14: Exemplarische Darstellung des ELISA's der Fab-exprimierenden  $\alpha_5\beta_1$ -Klone #3, #4, #6, #8, #9 und #10 mit Reaktion auf das Integrin  $\alpha_5\beta_1$ .

### 3.9 BstOI-Verdau der Fab-Fragmente

Die DNA folgender Fab-Fragment-Klone wurde mittels Miniprep eluiert und anschließend ihre Konzentration in  $\text{ng}/\mu\text{l}$  gemessen.

$\alpha_v\beta_5$ -Klon	#2	#4	#6	#8	#9	#10
$\text{ng}/\mu\text{l}$	273,8	312,1	207,9	118,4	170,8	72,7

$\alpha_5\beta_1$ -Klon	#3	#4	#6	#8	#9	#10
$\text{ng}/\mu\text{l}$	256,8	157,6	84,5	138	118,4	186,9

Im BstOI-Verdau konnten durch das Restriktionsenzym BstOI Differenzen in der Fab-DNA-Sequenz analysiert und die Klone auf ihre Diversität geprüft werden. Die DNA der Fab-Klone wurde mit Hilfe des Sense-Primers ompseq und des Reverse-Primers gback amplifiziert, mittels BstOI verdaut und in 3%igem TAE/Agarosegel analysiert.

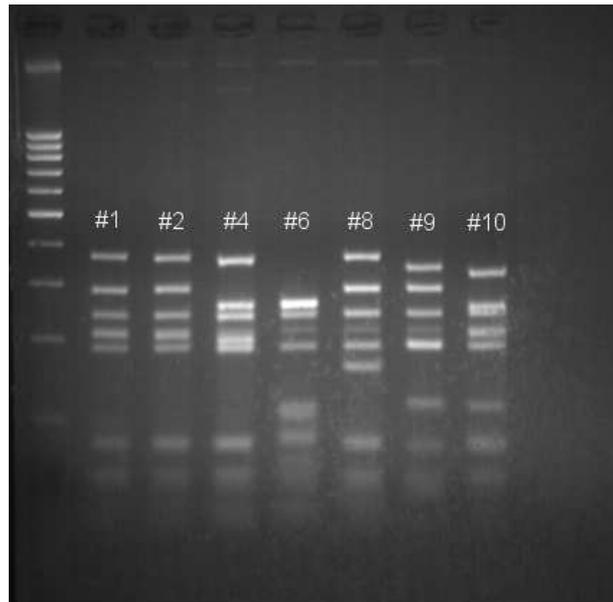


Abbildung 3.15: BstOI-Verdau ELISA-positiver  $\alpha_v\beta_5$ -Klone, Marker 1 kb, Klon #1 und #2 sind identisch, alle anderen Klone sind verschieden.

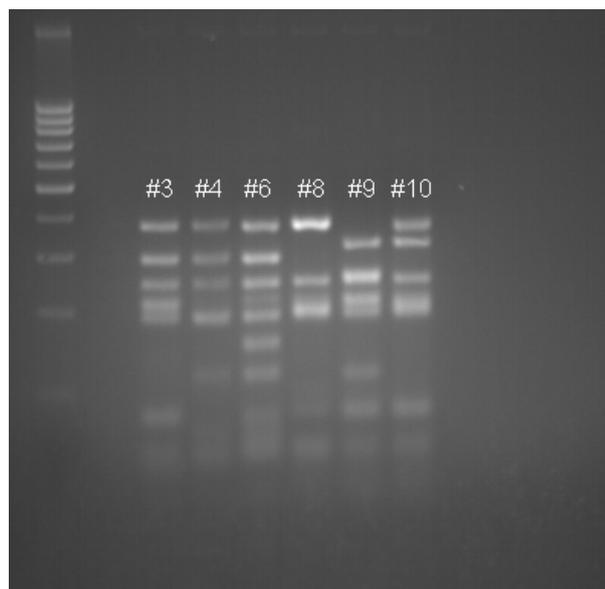


Abbildung 3.16: BstOI-Verdau ELISA-positiver  $\alpha_5\beta_1$ -Klone, Marker 1 kb, alle Klone sind verschieden.

Alle sechs Fab-Fragment-Klone gegen  $\alpha_5\beta_1$  (#3, #4, #6, #8, #9 und #10) wiesen ein unterschiedliches Bandenmuster auf und konnten somit als Klone mit jeweils eigener DNA-

Sequenz nachgewiesen werden (Abb. 3.16). Die Fab-Fragmente gegen  $\alpha_v\beta_5$  zeigten bei den Klonen #4, #6, #8, #9 und #10 ein unterschiedliches Bandenmuster; die Klone #1, #2 waren identisch (Abb. 3.15).

### 3.10 Sequenzierung spezifischer $\alpha_v\beta_5$ -/ $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Fragmente

Die DNA der Fab-Fragment-Klone wurde mittels Sequenzierung analysiert und chromatographisch dargestellt (Abb. 3.17). Dabei wurden die beiden Sense-Primer ompseq und pelseq eingesetzt, so dass variable leichte (ompseq) und variable schwere Ketten (pelseq) über ca. 400 bp analysiert werden konnten.

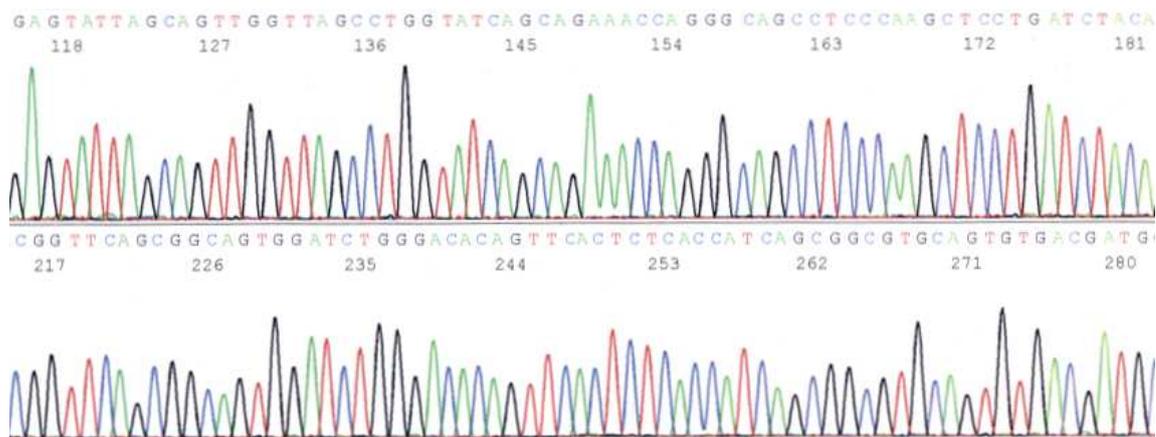


Abbildung 3.17: Beispiel-Chromatogramm zur Bestimmung und Analysierung der DNA-Sequenz eines Fab-Klons. Die verschiedenen Nukleotide sind farblich markiert.

Nachfolgend sind die Aminosäure-Sequenzen der  $\alpha_v\beta_5$ -Fab-Klone #2, #4, #6, #8, #9 und #10 und der  $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Klone #3, #4, #6, #8, #9 und #10 dargestellt (Abb. 3.18 und 3.19). Die Komplementarität-determinierten Regionen (CDR-Regionen) zeigen auf Grund ihrer hohen Variabilität bei allen Klonen die größten Unterschiede, im Besonderen die CDR3-Region. Bezüglich der  $\alpha_v\beta_5$ -Fab-Fragmente sind die CDR1-Regionen der leichten Kette (LCDR) bis auf zwei Aminosäuren identisch, die LCDR1-Regionen der anderen Klone sind verschieden. Die LCDR2-Regionen der  $\alpha_v\beta_5$ -Klone #2 und #6 sind zu 100%

identisch. Klon #9 besitzt in der LCDR1-Region zwei Aminosäuren, in der LCDR2-Region drei Aminosäuren mehr als die anderen Klone. Die LCDR3-Regionen sind bei allen Klonen in Länge und Sequenz divers. Klon #6 und #10 zeigen sich in einigen Aminosäuren identisch, wobei Klon #10 um zwei Aminosäuren kürzer ist als Klon #6. Klon #9 weist eine Sequenz auf, die sich in CDR- und Framework-(FR) Regionen von allen anderen Klon-Sequenzen am meisten unterscheidet. Die CDR1-Regionen der schweren Ketten (HCDR) der  $\alpha_v\beta_5$ -Klone #6 und #8 sind zu 100% identisch, die Klone #9 und #10 unterscheiden sich in dieser Region in nur einer Aminosäure von den Klonen #6 und #8. Klon #2 und #4 sind in der HCDR1-Region gleich lang, sind aber bis auf zwei Aminosäuren in ihrer Sequenz verschieden. Die HCDR2-Regionen der Klone #2 und #9 unterscheiden sich in drei Aminosäuren. Klon #4 besitzt in der CDR2-Region der schweren Kette eine Aminosäure mehr als die anderen Klone. Die HCDR3-Regionen unterscheiden sich bei allen Klonen neben der Sequenzabfolge vor allem in ihrer Länge. Klon #4 ist in der HCDR3-Region neun Aminosäuren kürzer als Klon #10.

Die LCDR1-Regionen der  $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Fragment-Klone #8 und #9 sind bis auf zwei Aminosäuren in ihrer Sequenz identisch, Klon #10 weist bis auf zwei Aminosäuren eine identische LCDR1-Sequenz mit Klon #8 auf. Die LCDR-Regionen der Klone #8, #9 und #10 sind insgesamt um zwei Aminosäuren kürzer als die Klone #3, #4 und #6. Die LCDR2-Regionen der Klone #3, #4, #6, #8 und #10 sind bis auf eine Aminosäure identisch, während sich Klon #9 in dieser Region mit zwei Aminosäuren von den anderen unterscheidet. Die LCDR3-Regionen aller  $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Klone sind insgesamt in Sequenz und Länge unterschiedlich; die Klone #8 und #10 zeigen bis auf vier Aminosäuren eine identische Sequenz, wobei Klon #10 mit einer Aminosäure die kürzere LCDR3-Region besitzt. Klon #3 und #9 der  $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Fragmente sind mit Ausnahme einer Aminosäure in der HCDR1-Sequenz identisch, während die anderen Klone hier nur geringfügig Ähnlichkeiten aufweisen. Bei einer Gesamtlänge von sechzehn Aminosäuren weichen die HCDR2-Regionen der Klone #6 und #9 in nur vier Aminosäuren voneinander ab. Die übrigen Klone zeigen größere Unterschiede, sind allerdings in ihrer Länge mit den Klonen #6 und #9 identisch. Bei den HCDR3-Regionen lassen sich keine Ähnlichkeiten der Sequenzen untereinander feststellen, auch die HCDR3-Längen variieren zwischen acht und vierzehn Aminosäuren.

**A) SEQUENZALIGNMENT  $\alpha_v\beta_5$ -FAB-KLONE, VARIABLE LEICHTE KETTE, OMPSEQ-PRIMER:**

	FR 1	CDR 1	FR 2	CDR 2	FR 3	CDR 3	FR 4
#2	AELDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC	QASQSITNELS	WYQOKPGQPPKLLIY	RASTL	ASGYSSRFSGSGSGTEFTLTIISGVECADAAATYYC	QQDY-SINN-VHNV	FGGGT
#4	AELVMTQTPASAEVAVGGTVTIKC	QASEDINIWLS	WYQOKPGQPPKLLIY	EASKL	ESGVP SRFKSGSGTEFTLTIISDVQCADAATYYC	LGGY-SSS-T-DNA	FGGGT
#6	AELVLTQTPASVSEPVGGTVTIKC	QASQSISSYLA	WYQOKPGQPPKLLIY	RASTL	ESGVP SRFKSGSGTEFTLTIISDVQCADAATYYC	QSYYSRSRHTADWA	FGGGT
#8	AELDLTQTPASVEAAVGGTVTIKC	QASQSISSWLS	WYQOKPGQPPKLLIY	LASTL	ASGYSSRFSGSGSGTEFTLTIISGVECADAAATYYC	QQGY-SNSD-VDNA	FGGGT
#10	AELDMTQTPASVSEPVGGTVTIKC	QASQSIYSYLS	WYQOKPGQPPKRLIY	KASTL	ASGVP SRFKSGSGSQTFLLTISDLECADAAATYYC	QNNIYS--DTSDDWA	FGGGT
#9	AELVLTQSPSLSASLDTTARLTCT	LNTGFSVGKYVIA	WYQQVPGRPRLIYLLAY	RTDDMKHQ	GSGVPSRFSGSKDDSANAGVLNISGLQFDEDEAIYYC	ATAHSGSS-FHVV	FGGGT

**B) SEQUENZALIGNMENT  $\alpha_v\beta_5$ -FAB-KLONE, VARIABLE SCHWERE KETTE, PEISEQ-PRIMER:**

	FR 1	CDR 1	FR 2	CDR 2	FR 3	CDR 3	FR 4
#2	VESGGGLVTPGGTLLTCAASGFSL	NYMN	WVRQAPGKLEWIG	FIYGD-GSTYYASWAKG	RF TISKSTTTVDLKMISLTTEDTATYFCAR	GAHSNTNTYYTM---	WGPPT
#4	EESGGRLVTPGTPLLTCTASGFSL	GYMMS	WVRQAPGKLEWIG	CIYPSDGTWVASWAKG	RF TISKSTTTVDLKMISLTAADTATYFCAR	GVG-----SDL	WGPPT
#6	VESGGRLVTPDETLTCTVSGIDL	SYAMS	WVRQAPGKLEWIG	TINIYD-TTFYATWAKG	RF TISKSTTTVDLKIITSLTTEDTATYFCAR	PGGFAN-----LDL	WGPPT
#8	EESGGRLVTPGTPLLTCTVSGFSL	SYAMS	WVRQAPGKLEWIG	IIDTIISK-TWYANLATG	RF TISKSTTTVDLKMISLTTEDTATYFCAR	GSTAW-----SDL	WGPPT
#10	MESGGGLVTPGETLLTCTASGFSL	TYAMG	WVRQAPGKLEWIG	LIDNG-GSTYYARGAKG	RF TVSRSTTTVDLKIITSLTTEDTATYFCAR	RLWSGVYANNPFDP	WGPPT
#9	EESGGRLVTPGTPLLTCTVSGIDL	SYAMG	WVRQAPGKLEWIG	FIDTG-GSTYYASWAKG	RF TISKSTTTVDLKIITSLTTEDTATYFCGG	DGG-W-----GDI	WGPPT

Abbildung 3.18: a) Proteinsequenzen der variablen leichten Kette der Fab-Klone #2,#4,#6,#8,#9 und #10 gegen das Integrin  $\alpha_v\beta_5$ . b) Proteinsequenzen der variablen schweren Kette der Fab-Klone #2,#4,#6,#8,#9 und #10 gegen das Integrin  $\alpha_v\beta_5$ .

**A) SEQUENZALIGNMENT  $\alpha_5\beta_1$ -FAB-KLONE, VARIABLE LEICHTE KETTE, OMPSEQ-PRIMER:**

	FR 1	CDR 1	FR 2	CDR 2	FR 3	CDR 3	FR 4
#3	AELDMTQTPSPVSAAVGGTVTISC	QASESVNNRRLS	WFOQKPGQPKLLIY	SASTL	ESGVPSRFKSGSGTQFTLTISEVQCDDAAATYYC	QGEFTCSNDCEFA	FGGTT
#4	AELVLIQTSPVSAAVGGTVTISC	QSSKSVASNNALA	WYQQKPGQPKLLIY	YASTL	ASGVPSRFKSGSGTQFTLTIISGVQCDDAAATYYC	AGWKS-SSTDGIA	FGGTT
#6	AELVMTQTPSPVSAAVGGTVTINC	QSSQSVANNWLS	WYRQKPGQPKLLIY	GASTL	ASGVPSRFKGGSGTQFTLTIIRDVQCDDAAATYYC	QSYDWT-TYGGA	FGGTT
#8	AELVLIQTSPASVEVAVGGTVTIKC	QASQSISS--WLA	WYQQKPGQPKLLIY	RASTL	ASGVSSRFSGSGTQFTLTIISGVQCDDAAATYYC	QQAYSVSNLDSNP	FGGTT
#9	AELVLIQTSPASVEVAVGGTVTIKC	QASQSISS--YLS	WYQQKPGQPKLLIY	AASNL	ASGVSSRFKSGSGTQFTLTIISDLECADAAATYYC	QSTYY-SS-YGNA	FGGTT
#10	AELDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC	QASQSINS--WLS	WYQQKPGQPKLLIY	RASTL	ASGVSSRFKSGSGTQYTLTIISGVECADAAATYYC	QQGYSYSNL-HNA	FGGTT

**B) SEQUENZALIGNMENT  $\alpha_5\beta_1$ -FAB-KLONE, VARIABLE SCHWERE KETTE, PELSEQ-PRIMER:**

	FR 1	CDR 1	FR 2	CDR 2	FR 3	CDR 3	FR 4
#3	EESGRLVTPGTPLLTCTVSGFSL	SYHMC	WVRQAPGKLEWIG	FISAGGSAYASWAKG	RFTISKSTSTVDLKMVSLTTEDTATYFCAG	FSYDD--YADDFSS	WGPQT
#4	EESGRLVTPGTPLSLCTVSGIDL	SNTWI	WVRQPGKLEWIG	VIGATGRYYANWANG	RFTISKSTSTVDLKIITSPTEDTATYFCAR	GDVM-----SLYP	WGPQT
#6	EESGRLVTPGTPLLTCTVSGFSL	NYAMN	WVRQAPGKLEWIG	IIGNSGSTAYATWVKG	RFTISKSTSTVALKIITSPTEDTATYFCAR	RFYPDNSYVYDFD	WGPQT
#8	EESGGIVTPIDTLLTCTVSGFSL	SIYMN	WVRQAPGKLEWIG	IMLTNGAPYYASWAKG	RFTISKSTSTVDLKIITSPTEDTATYFCGR	PAYTT-----GGGL	WGPQT
#9	EESGRLVTPGTPLLTCTVSGFSL	SIYMQ	WVRQAPGKLEWIG	IYYASGSDYASWVKG	RFTISKSTSTVDLKMVSLTFAADTATYFCAR	G-YINYGGY-ALYL	WGPQT
#10	EESGRLVTPGTPLLTCTVSGFSL	SHDMS	WVRQAPGKLEWIG	YIMSGSSTYYASWAKG	RFTISKSTSTVDLKIITSPTEDTATYFCAR	DSGNPD-----YMSL	WGPQT

Abbildung 3.19: a) Proteinsequenzen der variablen leichten Kette der Fab-Klone #3,#4,#6,#8,#9 und #10 gegen das Integrin  $\alpha_5\beta_1$ . b) Proteinsequenzen der variablen schweren Kette der Fab-Klone #3,#4,#6,#8,#9 und #10 gegen das Integrin  $\alpha_5\beta_1$ .

Des Weiteren wurde eine BLAST-Analyse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, um die Übereinstimmung mit anderen Antikörpern eines Kaninchen-Repertoires nachzuweisen, die auch mit der Phagen-Display-Technologie generiert wurden (POPKOV et al. 2003). Exemplarisch sind hier die Sequenzalignments der variablen leichten und schweren Ketten des  $\alpha_5\beta_1$ -Klons #3 mit den variablen leichten (Accession AAO06462) und schweren (Accession AAO06710) Ketten eines chimären Antikörpers demonstriert. In Abb. 3.20 werden die Sequenzen beider variablen leichten Ketten verglichen, wobei 94 von 108 Aminosäuren miteinander übereinstimmen und damit eine Identität von 87 % aufweisen. Die in Abb.3.21 dargestellten Sequenzen der variablen schweren Ketten zeigen mit 91 von 110 Aminosäuren eine 82%ige Übereinstimmung.

	FR 1	CDR 1	FR 2	CDR 2	FR 3
$\alpha_5\beta_1, \#3$	ELDMTQTPSPVSAAVGGTVTISC	QASESVYNNRLS	WFQQKPGQPPELLIY	SASTL	ESGV
	EL MTQTPSPVSAAVGGTVTI C	QAS S YNNN LS	W QQ PGQPPELLI	ASTL	SGV
AAO06462	ELVMTQTPSPVSAAVGGTVTINC	QASQSLYNNFLS	WYQQRPGQPPELLIF	DASTL	ASGV
	FR 3	CDR 3	FR 4		
$\alpha_5\beta_1, \#3$	PSRFKGS GSGTQFILTISEVQCDDAATYYC	CQGEFTCSSND CFA	FGGGT		
	PSRFKGS GSGTQFILTIS VQCDDAATYYC	CQGEF CSS DC A	FGGGT		
AAO06462	PSRFKGS GSGTQFILTISGVQCDDAATYYC	CQGEFSCSSAD CIA	FGGGT		

Abbildung 3.20: Sequenzalignment nach BLAST-Analyse. Variable leichte Kette des  $\alpha_5\beta_1$ -Klons #3 und variable Antikörper-Domäne (kappa leichte Kette) aus einem Kaninchen-Immun-Repertoire mittels Phagen-Display selektiert (Accession AAO06462). Leerstellen kennzeichnen Differenzen in der DNA-Abfolge.

	FR 1	CDR 1	FR 2	CDR 2
$\alpha_5\beta_1$ , #3	ESGGRLVTPGTPPLTLTCTVSGFSLS	SYHMC	WVRQAPGKGLEWIG	FISAGGSAYYASWAKG
	ESGGRLVTPGTPPLTLTCTVSGFSLS	Y M	WVRQAPGKGLEWIG	ISAGGS YYASWAKG
AAO06710	ESGGRLVTPGTPPLTLTCTVSGFSLS	YYAMS	WVRQAPGKGLEWIG	YISAGGSTYYASWAKG
	FR 3	CDR 3	FR 4	
$\alpha_5\beta_1$ , #3	RFTISKSTTTVDLKMSTLTEDTATYFCAG	FSYD---DYADDFSS	WGPGT	
	RFTISKSTTTVDLK TS TTEDTATYFCA	D DY F	WGPGT	
AAO06710	RFTISKSTTTVDLKITSPTTEDTATYFCAR	TDPDSSVDYMSSFNL	WGPGT	

Abbildung 3.21: Sequenzalignment nach BLAST-Analyse. Variable schwere Kette des  $\alpha_5\beta_1$ -Klons #3 und variable Antikörper-Domäne (schwere Kette) aus einem Kaninchen-Immun-Repertoire mittels Phagen-Display selektiert (Accession AAO06710). Leerstellen kennzeichnen Differenzen in der DNA-Abfolge.

## 4. Diskussion

Tumoren sind in großem Maße von der Zufuhr von Nährstoffen, Sauerstoff und wachstumsfördernden Substanzen abhängig. Durch Ausbildung von Gefäßen und folglich durch den Anschluss an das Blutgefäßsystem im Körper werden sie mit lebenserhaltenden Stoffen versorgt und können daher ungehindert wachsen und in gesundes Gewebe metastasieren (FOLKMAN 1971). Angiogenese wird hauptsächlich durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen sowie den Interaktionen zwischen den Zellen beeinflusst und reguliert (BROOKS 1996).

In der Gruppe der Wachstumsfaktoren, welche die Angiogenese, Zellmigration, Invasion und Proliferation unterstützen, spielt der vaskuloendotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) eine wichtige Rolle und gilt bereits seit langer Zeit als einer der Hauptregulatoren in der Gefäßbildung neoplastischen Gewebes.

Die Hemmung der Angiogenese ist somit ein wichtiger therapeutischer Ansatz bei diversen Tumoren und eröffnet weitere Möglichkeiten im Hinblick einer vielseitigen und gezielten Tumorbehandlung. Seit März 2008 ist der VEGF-Inhibitor Bevacizumab (Avastin®) gegen das fortgeschrittene Kolon-Karzinom, das nicht-kleinzellige Lungen-Karzinom und das Mamma-Karzinom in Verbindung mit Chemotherapie in klinischem Einsatz. Die beiden Kinase-Inhibitoren Sorafenib (Nexavar®) und Sunitinib (Sutent®) als Hemmer des VEGF-Rezeptors 2 (VEGFR2) sind bei der Behandlung des Nierenzellkarzinoms anerkannte Angiogenese-Hemmstoffe. Obgleich die medikamentöse VEGF-Blockade Erfolge zeigt, ist zu bemerken, dass nicht alle der behandelten Patienten auf die Therapie ansprechen bzw. davon profitieren. Auch ist bei einer Monotherapie die Wirkungsdauer von 3-8 Monaten relativ gering, so dass eine Resistenzentwicklung unter VEGF-Inhibition vermutet wird. In einer Reihe von experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass

adaptierende Mechanismen zu einer Hochregulation proangiogener Signale und einer daraus resultierenden Revaskularisation des Tumors führen (BERGERS und HANAHAN 2008, ELLIS und HICKLIN 2008). Im Sinne einer Optimierung der anti-angiogenetischen Therapie gilt es, neben der VEGF-Inhibition, alternative oder zusätzliche Wege einer effektiven Tumorbehandlung in Verbindung mit der konventionellen Anti-Tumorthherapie zu erforschen.

Als Zelladhäsionsmoleküle in der extrazellulären Matrix (ECM) erfüllen Integrine wichtige Aufgaben wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose von Zellen und unterstützen dabei aber auch das Wachstum von malignen Zellen. Manche Integrine werden fast ausschließlich in Tumoren gebildet und haben eine Schlüsselfunktion bei der Gefäßbildung von malignem Gewebe (VAN DER FLIER und SONNENBERG 2001, HOOD und CHERESH 2002). Zur Zeit wird der Integrin-Inhibitor Cilengitide®, ein  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_v\beta_5$ -Antagonist, in Phase-II-Studien gegen Glioblastome, nicht-kleinzellige Lungen-Karzinome, Melanome und Pankreas-Karzinome eingesetzt. Der  $\alpha_5\beta_1$ -Antagonist Volociximab® wurde bei der Behandlung des metastasierenden Melanoms, des nicht-kleinzelligen Lungen-Karzinoms und des Nierenzellkarzinoms in Phase-II-Studien getestet. In Verbindung mit einem Chemotherapeutikum konnte beim Melanom ein Rückgang der Tumoraktivität erzielt werden (AVRAAMIDES et al. 2008).

$\alpha_v\beta_5$ - und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine sind wesentliche Mediatoren in der Vermittlung und Aktivierung von Zell-Zell-Interaktionen in der Angiogenese und werden vermehrt in Gefäßen verschiedenster Tumoren vorgefunden. Die zwei Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  wurden in dieser Arbeit als Antigene ausgewählt, da sie über jeweils unterschiedliche Signalkaskaden die Gefäßneubildung induzieren und in der Hemmung von Integrinen zwei verschiedene Angriffspunkte darstellen. Das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  ist hingegen das erste  $\alpha_v$ -Integrin überhaupt, welches in Bezug zur Angiogeneseregulierung gesetzt wurde und somit schon länger bekannt ist. Durch die Herstellung einer Fab-Antikörper-Bibliothek gegen  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  soll eine Grundlage für die weitere Erforschung der Wechselwirkungen dieser Integrine geschaffen werden, um so ihre Wirkungsweisen in der Angiogenese besser erklären zu können. Für eine gezielte therapeutische Anwendung von Integrin-Inhibitoren sind weitere Kenntnisse über genaue Funktionsweisen der Integrine in und außerhalb der Zelle von grundlegender Bedeutung.

In dieser Arbeit wurden für die Herstellung der Fab-Antikörper-Bibliothek New-Zealand-White-Kaninchen mit einem für deren Organismus unbekanntem humanen Antigen ( $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ) immunisiert, so dass mittels Phagen-Display Antikörper gegen das gewünschte Zielantigen selektiert werden konnten. Die RNA von Milz und Knochenmark wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben, so dass mittels PCR chimäre Fab-Fragmente mit humanem und Kaninchen-Anteil amplifiziert wurden. Nach Transformation in *E. coli*-Bakterien und Koinfektion mit Helferphagen konnten im sogenannten Biopanning Antikörper-Fragmente gegen  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  selektiert werden.

Kaninchen besitzen, im Gegensatz zu Mäusen, eine höhere Immunantwort und werden aus diesem Grunde bevorzugt eingesetzt, so auch in dieser Arbeit. Darüber hinaus bieten chimäre Fab-Fragmente mit einer humanen konstanten Domäne im Vergleich zu anderen Fab-Formaten Vorteile wie z.B. deutlich erhöhte Expressionsraten der Fab-Fragmente in *E. coli*-Zellen sowie eine positive Beeinflussung der katalytischen Funktionsfähigkeit des Antikörpers (CARTER et al. 1992, ULRICH et al. 1995). Nicht zuletzt besteht durch die Selektion einer chimären Fab-Antikörper-Bibliothek mit humanen/Kaninchen-Fragmenten die Möglichkeit einer Humanisierung dieser Fab-Fragmente und eines späteren therapeutischen Einsatzes bei Tumorerkrankungen des Menschen (BARBAS et al. 2001, RADER et al. 1998).

Für das Display von Antikörper-Fragmenten auf Bakteriophagen eignen sich am ehesten als Antikörper-Formate das antigenbindende Fab-Fragment (Fab) und das 'single chain variable Fragment' (scFv) (BARBAS et al. 2001). Auf Grund der monovalenten Präsentation von Fab-Fragmenten auf der Phagenoberfläche können Antikörper-Fragmente mit einer erheblich höheren Affinität herausgefiltert werden. Fab-Fragmente sind strukturell stabiler, lassen sich schwieriger assemblieren, werden aber leichter in komplette IgG-Formate konvertiert als 'single chain'-Antikörper. Antikörper, die im Fab-Format generiert werden, bieten so aus vielerlei Gründen eine wesentliche Grundlage für den therapeutischen Einsatz. 'Single chain'-Antikörper werden von Bakterien besser exprimiert, neigen jedoch zu Dimerisierung und damit zur verstärkten Bildung größerer Aggregate. Werden sie in Fab-Fragmente konvertiert, zeigen sie eine deutlich geringere Bindungskraft zu ihrem Antigen als 'single chain'-Antikörper, die zunächst aus Fab-Fragmenten amplifiziert werden (RADER et al. 2000, HOLLIGER et al. 1993). Die aus chimären Fab-Antikörpern

konvertierten scFvs werden hingegen auch gezielt als 'Intradiabodies', die z.B. im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten werden, verwendet (JENDREYKO et al. 2003, JENDREYKO et al. 2005, POPKOV et al. 2005, SIDHU 2005).

Die hier angewandte Phagen-Display-Technologie wurde ursprünglich im Jahre 1985 von George Smith etabliert, dem es erstmals gelang, einen Bakterienphagenvektor für die Expression rekombinanter Peptidmoleküle zu entwickeln (SMITH GP 1985). Ziel des Phagen-Displays ist es, diejenigen Fab-tragenden Phagen zu selektieren, welche sich, im Gegensatz zu den vielen anderen unspezifischen Phagenklonen, durch ihre hohe Affinität und Spezifität zu ihrem Zielantigen hervorheben. Während der Phage die Fab-DNA in sich trägt hat er auch die Fähigkeit, das Fab-Fragment über das Mantelprotein pIII an seiner Oberfläche zu exprimieren. Über mehrere Runden Biopanning können so die hochaffinen Phagenklone wiederholt das Antigen binden, während die weniger gut bindenden Phagenklone durch mehrere Waschprozesse eliminiert werden (BARBAS et al. 2001, SMITH et al. 2005).

Im Laufe der letzten Jahre ist die Phagen-Display-Technologie zu einer etablierten 'in vitro' Methode für die Herstellung und Selektion spezifischer hochaffiner Antikörper-Bibliotheken geworden. Im Jahre 2000 wurde zum ersten Mal in einer Studie von Rader et al. die Herstellung einer chimären humanen/Kaninchen Fab-Bibliothek mittels Phagen-Display-Technologie beschrieben, in der es nach Immunisierung von Kaninchen mit dem humanen A33 gelang, hochspezifische Antikörper gegen dieses Antigen, ein Protein in Kolon-Karzinomen, zu isolieren (RADER et al. 2000). Williams et al. generierten mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie Fab-Bibliotheken nach Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit den humanen Zelllinien SW480, SW948, SW837 des Kolon-Karzinoms (WILLIAMS et al. 2002). Und die Arbeitsgruppe von Scheffer et al. selektierte durch das Fab-Display ein humanes Fab-Fragment gegen das 'major vault protein' (MVP) in Tumoren (SCHEFFER et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals erfolgreich chimäre humane/Kaninchen Fab-Antikörper-Bibliotheken gegen die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  mittels Phagen-Display-Technologie generiert und mittels Biopanning nachfolgend Antikörper isoliert.

Zunächst wurden in mehrwöchigen Abständen New-Zealand-White-Kaninchen mit den humanen Integrinen  $\alpha_v\beta_5$  bzw.  $\alpha_5\beta_1$  immunisiert und die jeweilige Immunantwort im ELISA ermittelt. Nach einem deutlichen Anstieg durch Erstimmunisierung mit dem Integrin und einer nochmaligen Titer-Erhöhung durch eine Boosterung war das Maximum der Immunantwort erreicht und auch nach einer zweiten Boosterung kein weiterer Anstieg mehr zu verzeichnen. Eine gute Immunantwort erhöhte die Chance, später hochaffine Antikörper mit einer gewissen Diversität zu selektieren, die außerdem eine hohe Bindungseigenschaft zu ihrem Antigen aufweisen sollten. Eine bedeutsame Rolle nimmt dabei die Multi-Spezifität der Antikörper ein (PERELSON und OSTER 1979, GRIFFITHS et al. 1994). Die lymphatischen Organe Milz und Knochenmark wurden den Kaninchen entnommen, anschließend die RNA gewonnen und für jede Bibliothek separat in cDNA umgeschrieben. In der ersten PCR diente diese cDNA der Amplifizierung der variablen Domänen, wobei für die Amplifizierung der humanen konstanten Domänen die DNA des Plasmids pARA H6HA-TT eingesetzt wurde. In zwei weiteren PCR-Amplifizierungsschritten wurden dann chimäre Fab-Antikörper gegen die entsprechenden Integrine generiert. Die Konzentration der Fab-Fragment-DNA beider Integrine erbrachte mit jeweils über 10  $\mu\text{g}$  die benötigte Menge, um nachfolgend, wie auch die Vektor-DNA pComb3XSS, mit dem Restriktionsenzym SfiI verdaut zu werden.

Wie in einer früheren Studie von Popkov et al. nachgewiesen werden konnte, zeigt das Vektorsystem pComb3 neben einer hohen Funktionalität in Verbindung mit Kaninchen-Antikörper-Fragmenten zusätzlich einen unterstützenden Effekt für die Produktion humanisierter Kaninchen Fab-Fragmente (POPKOV et al. 2004). Da pComb3-Vektoren das Gen für das Enzym Beta-Laktamase enthalten, tragen sie eine Resistenz gegen das Antibiotikum Carbenicillin und erlauben daher die gezielte Selektion Fab-exprimierender E. coli-Klone. PComb3X ist dabei ein neu entwickeltes Derivat der pComb-Vektoren, welches mit einer höheren Stabilität und der verbesserten Fähigkeit, die Schnittstelle SfiI einzufügen, Vorteile bietet.

In einem Testlauf wurden sowohl die Ligationseffizienz des Vektors mit der Fab-DNA als auch die Effizienz der Transformation in elektrokompente Zellen geprüft, wobei in beiden Testligationen die Menge der transformierten Fragmente beider Integrine mit  $>1 \times 10^7$  pro  $\mu\text{g}$  Vektor-DNA für das weitere Vorgehen sehr zufriedenstellend waren. Auch das

Ergebnis der Hauptligation nach Klonierung der Fab-DNA in seinen Vektor pComb3X war mit  $2,2 \times 10^8$  und  $1,9 \times 10^8$  transformierten Fragmenten pro  $\mu\text{g}$  Vektor-DNA von großer Komplexität und stellte eine gute Vorlage für das nachfolgende Biopanning dar (BARBAS et al. 2001).

Als ein wesentlicher Bestandteil des Phagen-Displays wurden im Biopanning über vier Runden durch wiederholtes Waschen die am meisten spezifischen Fab-Fragmente gegen das immobilisierte Antigen (Integrin  $\alpha_v\beta_5$  bzw.  $\alpha_5\beta_1$ ) selektiert. Dieser Selektionsprozess wurde erstmals von Parmley und Smith als Biopanning benannt und bezeichnete damals zunächst die Verbindung von Protein-tragenden Phagen mit biotinylierten Molekülen und deren anschließende Haftung an das Biotin-bindende Streptavidin, mit dem eine Platte beschichtet war. Durch wiederholte Selektionsrunden und Phagenamplifikation nach jeder einzelnen Runde wurde eine Phagen-Bibliothek erstellt. Mehrere Runden der Selektion ohne zwischenzeitliche Amplifikation der jeweils isolierten Phagen erwiesen sich als ineffektiv (PARMLEY und SMITH 1988).

Bei einer vorgegebenen Antigenmenge von zunächst  $2 \times 350$  ng und einer entsprechend niedrigen Anzahl der Waschschrte mit fünf Mal in der ersten Runde waren Eingangs- (Input) als auch Ausgangs-Titer (Output) bei beiden Integrin-Fab-Bibliotheken noch relativ hoch. Der starke Abfall der Anzahl beider Integrin-Fab-Klone nach der zweiten Selektionsrunde lässt sich mit der effektiven Selektion von spezifischen Fab-Antikörpern erklären, da zum einen die Antigenkonzentration reduziert worden war (ein Well mit 350 ng Antigen beschichtet) und zum anderen die Zahl der Waschschrte verdoppelt worden war. In der dritten Runde wurde die Antigenkonzentration erneut reduziert (200 ng), wobei die Waschschrte konstant blieben. Obgleich der Input der  $\alpha_v\beta_5$ -Klone in der letzten Runde fällt, lässt sich hier wieder ein Anstieg des Outputs im Vergleich zur Vorrunde feststellen, so dass davon auszugehen ist, dass die sich als spezifisch erwiesenen Klone vermehrt amplifiziert wurden. Bei den  $\alpha_5\beta_1$ -Klonen ist nach einem zunächst starken Abfall des Outputs ein Anstieg von In- und Output nach der dritten Runde zu erkennen, der Output-Titer bleibt bis in die letzte Runde stabil, so dass auch hier von einer Anreicherung spezifischer Phagenklone im Gegensatz zur fallenden Anzahl schwach bindender und damit unspezifischer Klone auszugehen war.

Durch Verringerung der Antigenkonzentration bei ansteigender Zahl der Waschschrte

werden spezifische, hochaffine Antikörper-Fragmente selektiert und diese qualitativ hochwertigen Klone in weiteren Runden eingesetzt und vermehrt. Von großer Notwendigkeit sind dabei die intensiven Waschvorgänge mit dem Detergenz Tween20 zur Immobilisierung nicht festbindender Antikörper/Antigen-Komplexe, um eine effektive Selektion zu gewährleisten, und um eine Anreicherung unspezifischer Klone zu vermeiden (HAWKINS et al. 1992). Dabei kommt es typischerweise nach der ersten Selektionsrunde zu einem erheblichen Abfall des Phagentiters, der jedoch im Verlauf durch Anreicherung der spezifischen und Aussonderung der unspezifischen Klone wieder ansteigt (DE KRUIF et al. 1995). Die Anzahl der Waschschritte und die Konzentration der eingesetzten Antigenmenge kann dabei individuell und Titer-abhängig angepasst werden.

Im ELISA wurde die Spezifität von jeweils elf zufällig gepickten Klonen der Output-Platten der vierten Runde analysiert. Eine Integrin-Spezifität der Fab-Klone ließ sich durch positive Werte gegen die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  nachweisen. Positive Reaktionen mit anti-humanem Fab und anti-humaner kappa-Kette bestätigten die Generierung eines Fab-Fragmentes mit einer kappa-Kette. Unspezifische Reaktionen konnten mit BSA ausgeschlossen werden und die Reaktionen mit dem humanen IgG-Molekül waren erwartungsgemäß niedrig. Die  $\alpha_v\beta_5$ -Klone zeigten zwar insgesamt niedrigere Werte in der Reaktion mit dem Integrin als die  $\alpha_5\beta_1$ -Klone, die anti-Fab- und anti-kappa-Reaktionen waren jedoch deutlich positiv. Eine verminderte Reaktion der Antikörper mit dem Antigen, in diesem Falle dem Integrin, kann die Folge einer veränderten Konformation des auf die ELISA-Platte aufgetragenen Antigens sein - im Gegensatz zur Molekülbeschaffenheit von Integrinen auf der Oberfläche von z.B. HUVEC-Zellen ('human umbilical vein endothelial cells'). Auch können sich in Lösung befindliche Antigene anders präsentieren als im nativen Zustand als Bestandteil einer Endothelzelle, so dass unter Umständen von einer besseren Antigenbindung der Antikörper auf nativen HUVEC-Zellen auszugehen ist. Dies muss aber in weiteren Studien noch nachgewiesen werden. Die  $\alpha_5\beta_1$ -Klone #3, #4, #8 und #9 zeigten die höchsten Werte in der Reaktion mit ihrem Antigen, wobei sich die anti-Fab- und anti-kappa-Reaktionen wie auch bei den Klonen #6 und #10 durch ihre Intensität hervorhoben. Damit wurde bestätigt, dass einige der ausgewählten Output-

Klone zum einen spezifisch auf das jeweilige Integrin reagierten und zum anderen auch ein anti-humanes Fab-Fragment mit einer kappa-Kette enthielten.

Die im ELISA als spezifisch detektierten Klone konnten mittels BstOI-Verdau auf ihre Diversität untereinander geprüft werden. BstOI ist ein Restriktionsenzym, welches multipel an bestimmten Stellen im Fab-Fragment schneidet, so dass sich daher bei unterschiedlicher Fab-DNA-Sequenz jeweils verschiedene Bandenverläufe im Analyse-Gel zeigen. Dabei zeigten die  $\alpha_v\beta_5$ -Fab-Fragment-Klone #1/#2, #4, #6, #8, #9 und #10 und die  $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Fragment-Klone #3, #4, #6, #8, #9 und #10 einen jeweils voneinander abweichenden Bandenverlauf.  $\alpha_v\beta_5$ -Fab-Klon #1 war mit Klon #2 im Bandenverlauf identisch. Somit waren jeweils sechs spezifische Fab-Fragment-Klone gegen die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  selektiert worden. In der Arbeitsgruppe von Rader et al. waren lediglich drei verschiedene Klone nach Generierung einer anti-A33 Fab-Bibliothek selektiert worden (RADER et al. 2000).

Durch DNA-Sequenzanalyse konnte die Diversität der ausgewählten Klone noch einmal bestätigt und deren Nukleotidaufbau genau analysiert werden. Die Sequenzierung der variablen Regionen der Fab-Fragmente erfolgte mit Hilfe der zwei Primer ompseq (variable leichte Kette) und pelseq (variable schwere Kette) für DNA-Abschnitte von jeweils ca. 400 bp. Die Aminosäure-Sequenzen der  $\alpha_v\beta_5$ - und  $\alpha_5\beta_1$ -Klone zeigten hauptsächlich Unterschiede im Bereich der Komplementarität-determinierten Regionen (CDR) und dabei vor allem in der CDR3-Region von leichter (LCDR) und schwerer Kette (HCDR). Diese CDR3-Region ist maßgeblich für die große Variabilität der Antikörperbindungsstellen verantwortlich und dabei charakteristisch für die Spezifität eines jeden einzelnen Antikörpers. Als Zentrum der antigenbindenden Seite stellt vor allem die CDR3-Region der variablen schweren Kette, dagegen nicht unbedingt die Regionen CDR1 und CDR2, die Verbindung zum Antikörper her (PINI et al. 1998, XU und DAVIS 2000). Somit weisen die CDR3-Regionen aller selektierten Fab-Klone die erwartungsgemäß höchste Variabilität im Vergleich zu den übrigen Regionen auf.

Die LCDR3-Regionen der  $\alpha_v\beta_5$ -Fab-Klone #6 und #10 sind in einigen Aminosäuren identisch, wobei Klon #10 um zwei Aminosäuren kürzer ist als Klon #6. Alle anderen Klone

zeigen hier unterschiedliche LCDR3-Sequenzen. Der Klon #9 hebt sich in der variablen leichten Kette im Gegensatz zu den anderen Klonen durch seine gesamte Länge besonders hervor und zeigt die größten Unterschiede in der Abfolge der Aminosäuren. In der LCDR3-Region weist er eine Aminosäure weniger als Klon #6 auf. Die genaue Analyse des Chromatogramms des Klons #9 ergab keine Zweifel an seiner Sequenz, und im ELISA konnte eine hohe Reaktion mit dem anti-Fab-Antikörper nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache für unterschiedliche Abfolgen in der Sequenz können Frameshift-Mutationen sein, das heißt Mutationen in der DNA-Abfolge, die zu einer Leserasterverschiebung führen. Dennoch treten in der Aminosäuresequenz dieses Klons ähnliche wie bei den anderen Klonen vorkommende Aminosäureabfolgen auf, was wiederum die Frameshift-Mutation unwahrscheinlich macht. Die HCDR3-Regionen der  $\alpha_v\beta_5$ -Fab-Fragment-Klone weisen erwartungsgemäß die größten Unterschiede bezüglich Länge und Sequenz der DNA auf und variieren zwischen einer Länge von sechs und fünfzehn Aminosäuren.

Die Klone #8 und #10 der  $\alpha_5\beta_1$ -Fab-Fragmente sind in ihrer LCDR3-Region bis auf vier Aminosäuren identisch, Klon #10 ist um eine Aminosäure kürzer. Die HCDR3-Regionen zeigen keine Analogien und sind vor allem in ihrer Länge komplett verschieden. Die große Diversität der CDR3-Regionen der Klone von  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  weist auf eine effektive Selektion von unterschiedlich spezifischen Fab-Fragmenten hin.

In einer BLAST-Analyse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit publizierten Immunglobulin-Ketten konnte die Übereinstimmung mit anderen Antikörpern eines Kaninchen-Repertoires, die auch mit der Phagen-Display-Technologie generiert wurden, nachgewiesen werden (POPKOV et al. 2003). Dabei zeigt die Aminosäure-Sequenz der variablen leichten Kette des  $\alpha_5\beta_1$ -Klons #3 eine 87%ige Übereinstimmung mit der variablen leichten Kette (kappa) des publizierten Antikörpers (Accession AAO06462) und die variable schwere Kette des Klons ist zu 82 % identisch mit der variablen schweren Kette des Antikörpers (Accession AAO06710). Die Diskrepanzen zwischen den jeweiligen Aminosäure-Sequenzen befinden sich wie erwartet hauptsächlich in den CDR-Regionen. Diese Regionen sind für die Bindung des Antikörpers an das Antigen verantwortlich. Die bereits publizierten Antikörper wurden nicht durch Immunisierung mit Integrinen hergestellt, daher sollten die CDR-Regionen auch verschieden sein. Da bisher noch keine durch Phagen-Display ge-

nerierten Antikörper gegen Integrine publiziert wurden, kann die BLAST-Analyse nur Ähnlichkeiten mit Antikörpern, die mittels Phagen-Display hergestellt wurden, in den Framework-Regionen selektieren.

Die Phagen-Display-Technologie stellt eine überaus geeignete Methode dar, um Fab-Antikörper mit einer möglichst hohen Bindungsspezifität zu isolieren. Die gleichzeitige Generierung von chimären Fab-Fragmenten mit einem humanen Anteil stellt eine wichtige Voraussetzung für die komplette Humanisierung der Antikörper im Hinblick auf den potentiellen Einsatz in klinischen Studien dar. Bezüglich einer besseren Beurteilung der Bindungsaffinität der selektierten Antikörper ist eine weitere Charakterisierung z.B. mittels Western Blot-Methodik erforderlich, mit der spezielle Proteine nachgewiesen und identifiziert werden können. Dadurch kann gezeigt werden, an welche Untereinheit der Integrine die selektierten Fab-Antikörper binden. Ferner kann das Bindungsverhalten an das native Integrin auf z.B. HUVEC-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS='fluorescence activated cell sorting') analysiert werden.

Die in dieser Arbeit selektierten chimären Fab-Fragmente gegen die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  stehen nun für die weitere Generierung von 'single chain'-Fragmenten (scFv) zur Verfügung, um damit möglicherweise in Form von bispezifischen 'Intradiabodies' das Geschehen innerhalb der Zelle durch Ausschaltung der Funktion von Proteinen direkt und unmittelbar zu beeinflussen. So können Integrine als wichtige Mediatoren in der Tumorigenese exakt in ihrer Wirkung deaktiviert, aber auch durch gleichzeitige oder alleinige Hemmung mehrerer oder einzelner Integrine ihre gegenseitige Einflussnahme ('integrin crosstalk') zueinander am Modell der Endothelzelle (HUVEC) beobachtet und kontrolliert werden (JENDREYKO et al. 2003, JENDREYKO et al. 2005, POPKOV et al. 2005, SIDHU 2005).

## 5. Zusammenfassung

Bei der Entstehung und für das Überleben von Tumoren spielt die Angiogenese, das heißt die Neubildung von Gefäßen, eine wesentliche Rolle. Im Zusammenwirken mit den unterschiedlichsten Wachstumsfaktoren und -mediatoren beeinflussen Integrine als Zelladhäsionsmoleküle dabei unmittelbar die Funktion und das Verhalten von Zellen. Obwohl Integrine auch in gesundem Gewebe vorkommen, weisen sie eine auffällige Häufung in Tumoren auf. Antiangiogenese in Form von Antikörper-Fragmenten, welche Integrine als Zielstruktur haben, ist daher in der Therapie von Tumoren ein wichtiger und viel versprechender Ansatzpunkt.

In dieser Dissertation wurden erstmals chimäre humane/Kaninchen-Fab-Fragment-Bibliotheken (Fab='antigen binding fragment') gegen die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  generiert und spezifische Fab-Antikörper mittels Phagen-Display-Technologie selektiert. Dafür wurden zum einen das Antikörper-Repertoire immunisierter Kaninchen und zum anderen die humane Fab-DNA-Vorlage des Plasmids pAra H6HA-TT genutzt, um daraus chimäre Fab-Fragmente herzustellen. Mittels Phagen-Display-Technologie wurden in vier Runden Biopanning Antikörper-Fab-Fragmente gegen die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  selektiert. Jeweils sechs Fab-Klone beider Bibliotheken konnten als spezifisch und in ihrer Sequenz unterschiedlich detektiert werden.

Die in dieser Arbeit isolierten Fab-Fragment-Klone stellen die Basis für den Einsatz verschiedenster Antikörperformate gegen die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  direkt in der Zelle dar, so dass sowohl ihre Funktion als auch deren Zusammenwirken untereinander präziser als bisher erforscht werden können. Zudem ist eine Humanisierung und damit der therapeutische Einsatz dieser Fab-Antikörper in der Zukunft möglich.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Lichtman AH: Basic Immunology, Functions and Disorders of the Immune System, 2nd edition; Saunders Elsevier Health Science, Philadelphia 2006
- Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA (2008): Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8(8), 604-617
- Azzazy HM, Highsmith WE Jr. (2002): Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 35(6), 425-445
- Barbas CF 3rd, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ (1991): Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(18), 7978-7982
- Barbas CF 3rd, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ: Phage Display - A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001
- Bergers G, Benjamin LE (2003): Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3(6), 401-410
- Bergers G, Hanahan D (2008): Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8(8), 592-603
- Blystone SD, Graham IL, Lindberg FP, Brown EJ (1994): Integrin  $\alpha_v\beta_3$  differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor  $\alpha_5\beta_1$ . *J Cell Biol* 127(4), 1129-1137

- Bouvard D, Brakebusch C, Gustafsson E, Aszódi A, Bengtsson T, Berna A, Fässler R (2001): Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Circ Res* 89(3), 211-223
- Breitling F, Dübel S, Seehaus T, Klewinghaus I, Little M (1991): A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104(2): 147-153
- Brooks PC (1996): Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer* 32A(14), 2423-2429
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA (1994): Requirement of vascular integrin  $\alpha_v\beta_3$  for angiogenesis. *Science* 264(5158), 560-571
- Carmeliet P, Jain RK (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801), 249-257
- Carter P, Kelley RF, Rodrigues ML, Snedecor B, Covarrubias M, Velligan MD, Wong WL, Rowland AM, Kotts CE, Carver ME (1992): High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. *Biotechnology (N Y)* 10(2), 163-167
- Chang CN, Landolfi NF, Queen C (1991): Expression of antibody Fab domains on bacteriophage surfaces. Potential use for antibody selection. *J Immunol* 147(10), 3610-3614
- de Kruif J, Terstappen L, Boel E, Logtenberg T (1995): Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(9), 3938-3942
- Ellis LM, Hicklin DJ (2008): VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 8(8), 579-591
- Eskens FA (2004): Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going? *Br J Cancer* 90(1), 1-7
- Eskens FA, Dumez H, Hoekstra R, Perschl A, Brindley C, Böttcher S, Wynendaele W, Drevs J, Verweij J, van Oosterom AT (2003): Phase I and pharmacokinetic study of

- continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* 39(7), 917-926
- Fässler R, Meyer M (1995): Consequences of lack of  $\beta_1$ -integrin gene expression in mice. *Genes Dev* 9(15), 1896-1908
- Figlin RA, Kondagunta GV, Yazji S, Motzer RJ and Bukowski RM (2006): Phase II study of volociximab (M200), an  $\alpha_5\beta_1$ -anti-integrin antibody in refractory metastatic clear cell renal cell cancer (RCC). *J Clin Oncol ASCO Annu Meeting Proc* 24(18S), 4535
- Fischer (1996): Expression des humanen Antikörperrepertoires mit Bakteriophagen: Techniken, Anwendungen, Perspektiven. *Biospektrum* 3, 26-29
- Folkman J (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285(21), 1182-1186
- Folkman J, Shing Y (1992): Angiogenesis. *J Biol Chem* 267(16), 10931-10934
- Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA (1995): Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha_v$ -integrins. *Science* 270(5241), 1500-1502
- Garrard LJ, Yang M, O'Connell MP, Kelley RF, Henner DJ (1991): Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. *Biotechnology (N Y)* 9(12), 1373-1377
- Giancotti FG (2003): A structural view of integrin activation and signaling. *Dev Cell* 4(2), 149-151
- Giancotti FG, Ruoslahti E (1999): Integrin Signaling. *Science* 285(5430), 1028-1032
- Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ et al. (1994): Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J* 13(14), 3245-3260

- Guo W, Giancotti FG (2004): Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10), 816-826
- Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, Watkins JD, Huse WD, Bodkin DJ, Cheresch DA (2000): Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin  $\alpha_v\beta_3$ . *Clin Cancer Res* 6(8), 3056-3061
- Hanahan D, Folkman J (1996): Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86(3), 353-364
- Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S (2005): Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer* 5(1), 51-63
- Harris A (2002): Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2(1), 38-47
- Hawkins RE, Russell SJ, Winter G (1992): Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 226(3), 889-896
- Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD (1999): New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 18(38), 5356-5362
- Holliger P, Prospero T, Winter G (1993): 'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci* 90(14), 6444-6448
- Hood JD, Cheresch DA (2002): Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2(2), 91-100
- Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G (1991): Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* 19(15), 4133-4137
- Hoogenboom HR, de Bruïne AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC (1998): Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4(1), 1-20

- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunobiology, The Immun System in Health and Disease, 6th edition; Garland Science Publishing, New York 2005
- Jendreyko N, Popkov M, Beerli RR, Chung J, McGavern DB, Rader C, Barbas CF 3rd. (2003): Intradiabodies, bispecific, tetravalent antibodies for the simultaneous functional knockout of two cell surface receptors. *J Biol Chem* 278(48), 47812-47819
- Jendreyko N, Popkov M, Rader C, Barbas CF 3rd. (2005): 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* 102(23), 8293-8298
- Joussen AM, Kirchhof B, Gottstein C (2003): Molecular mechanisms of vasculogenesis and angiogenesis. What regulates vascular growth? *Ophthalmologie* 100(4), 284-291
- Kim S, Harris M, Varner JA (2000 a): 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* 275(43), 33920-33928
- Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA (2000 b): Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin  $\alpha_5\beta_1$  with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 156(4), 1345-1362
- Köhler G, Milstein C (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497
- Luo BH, Carman CV, Springer TA (2007): Functional Consequences of Integrin Gene Mutations in Mice. *Annu Rev Immunol* 25, 619-647
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ (1990): Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348(6301), 552-554
- Parmley SF, Smith GP (1988): Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73(2), 305-18
- Perelson AS, Oster GF (1979): Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *J Theor Biol* 81(4), 645-670

- Petitclerc E, Strömblad S, von Schalscha TL, Mitjans F, Piulats J, Montgomery AM, Cheresh DA, Brooks PC (1999): Integrin  $\alpha_v\beta_3$  promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res* 59(11), 2724-2730
- Pini A, Viti F, Santucci A, Carnemolla B, Zardi L, Neri P, Neri D (1998): Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem* 273(34), 21769-21776
- Popkov M, Mage RG, Alexander CB, Thundivalappil S, Barbas CF 3rd, Rader C (2003): 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* 325(2), 325-335
- Popkov M, Jendreyko N, Gonzalez-Sapienza G, Mage RG, Rader C, Barbas CF 3rd. (2004): Human/mouse cross-reactive anti-VEGF receptor 2 recombinant antibodies selected from an immune b9 allotype rabbit antibody library. *J Immunol Methods* 288(1-2), 149-164
- Popkov M, Jendreyko N, McGavern DB, Rader C, Barbas CF 3rd. (2005): Targeting tumor angiogenesis with adenovirus-delivered anti-Tie-2 intrabody. *Cancer Res* 65(3), 972-981
- Rader C, Cheresh DA, Barbas CF 3rd. (1998): A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15), 8910-8915
- Rader C, Ritter G, Nathan S, Elia M, Gout I, Jungbluth AA, Cohen LS, Welt S, Old LJ, Barbas CF 3rd. (2000): The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies. *J Biol Chem* 275(18), 13668-13676
- Reynolds AR, Reynolds LE, Nagel TE, Lively JC, Robinson SD, Hicklin DJ, Bodary SC, Hodivala-Dilke KM (2004): Elevated Flk1 (vascular endothelial growth factor receptor 2) signaling mediates enhanced angiogenesis in  $\beta_3$ -integrin-deficient mice. *Cancer Res* 64(23), 8643-8650

- Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM (2002): Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking  $\beta 3$  integrin or  $\beta 3$  and  $\beta 5$  integrins. *Nat Med* 8(1), 27-34
- Scheffer GL, Reurs AW, Jutten B, Beiboer SH, van Amerongen R, Schoester M, Wiemer EA, Hoogenboom HR, Scheper RJ (2002): Selection and characterisation of a phage-displayed human antibody (Fab) reactive to the lung resistance-related major vault protein. *Br J Cancer* 86(6), 954-962
- Schmiedl A, Dübel S: Rekombinante Antikörper und Phagen-Display; in: *Molekulare Biotechnologie*; hrsg. v. Wink Michael; 1. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2004, 1-55
- Schwartz MA (2001): Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* 11(12), 466-470
- Shchors K, Evan G (2007): Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res* 67(15), 7059-7061
- Sidhu SS: *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery*; CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton 2005
- Simon KO, Nutt EM, Abraham DG, Rodan GA, Duong LT (1997): The  $\alpha_v\beta_3$  integrin regulates  $\alpha_5\beta_1$ -mediated cell migration toward fibronectin. *J Biol Chem* 272(46), 29380-29389
- Skerra A, Plückthun A (1988): Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240(4855), 1038-1041
- Smith GP (1985): Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228(4705), 1315-1317
- Smith J, Kontermann RE, Embleton J, Kumar S (2005): Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis. *FASEB* 19(3), 331-341
- Taverna D, Moher H, Crowley D, Borsig L, Varki A, Hynes RO (2004): Increased primary tumor growth in mice null for  $\beta 3$ - or  $\beta 3/\beta 5$ -integrins or selectins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(3), 763-768

- Ulrich HD, Patten PA, Yang PL, Romesberg FE, Schultz PG (1995): Expression studies of catalytic antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25), 11907-11911
- Van der Flier A, Sonnenberg A (2001): Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305(3), 285-298
- Varner JA, Emerson DA, Juliano RL (1995): Integrin  $\alpha_5\beta_1$  expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* 6(6), 725-740
- Williams BR, Sompuram SR, Sharon J (2002): Generation of anti-colorectal cancer fab phage display libraries with a high percentage of diverse antigen-reactive clones. *Comb Chem High Throughput Screen* 5(6), 489-499.
- Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR (1994): Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12, 433-455
- Xu JL, Davis MM (2000): Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* 13(1), 37-45
- Yang JT, Rayburn H, Hynes RO (1993): Embryonic mesodermal defects in  $\alpha_5$ -integrin-deficient mice. *Development* 119(4), 1093-1105
- Yu JL, Rak JW, Coomber BL, Hicklin DJ, Kerbel RS (2002): Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science* 295(5559), 1526-1528
- Zetter BR (1998): Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 49, 407-424

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat]
BCP	1-Brom-3-chlor-propan
bFGF	'basic fibroblast growth factor'
bp	'base pair(s)'
BSA	'bovine serum albumin'
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	'complementary' DNA
CDR	Komplementarität-determinierte Region
$C_H$	konstante Region, schwere Kette
$C_K$	konstante Region, kappa leichte Kette
$C_L$	konstante Region, leichte Kette
„chimär“	„chimär“ wird in dieser Arbeit als Adjektiv verwendet
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECM	extrazelluläre Matrix
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	'enzyme-linked immunosorbent assay'

ERK	'extracellular-related kinase'
EtOH	Ethanol
Fab	'fragment antigen binding'
FACS	'fluorescence activated cell sorting'
FAK	'focal adhesion kinase'
Fc	'fragment crystallizable'
FLK-1	'fetal liver kinase'; VEGFR-2
FR	'framework region'
g	Gramm
h	Stunde
HIF(s)	'hypoxia-inducible factor(s)'
H <sub>2</sub> O	Wasser
hrsg.	herausgegeben
HUVEC	'human umbilical vein endothelial cell'
I	'inserted'
ICAM	'intercellular cell adhesion molecule'
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
Il	Interleukin
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid
kb	'kilobase(s)'
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria Broth
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

$\mu\text{M}$	mikromolar
M	molar
mg	Milligramm
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
ms	Millisekunde
NaCl	Natriumchlorid
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
n.z.	nicht zählbar
OD	Optische Dichte
PBS	'phosphate buffered saline'
PCR	'polymerase chain reaction'
PDECGF	'platelet-derived endothelial-cell growth factor'
PEG	Polyethylenglycol
pfu	'plaque forming unit'
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKA	Proteinkinase A
PlGF	'placental growth factor'
Prod	'product'
RNase	'ribonuclease'
rpm	'rounds per minute'
RT	Raumtemperatur
S.	Seite

SB	Super Broth
scFv	'single chain variable Fragment'
sek	Sekunde
SFK	'Src family kinase'
SHC	'Src homologous and collagen-like'
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	'tris buffered saline'
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRIS X	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
v.	von
V	Volt
VCAM-1	'vascular cell adhesion molecule-1'
VEGF	Vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
$V_H$	variable Domäne, schwere Kette
$V_L$	variable Domäne, leichte Kette
xg	x-fache Erdbeschleunigung ( $g=9,80665 \text{ m/s}^2$ )
z.B.	zum Beispiel

## Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Nina Kollmar, die mich während der gesamten experimentellen Arbeit betreut hat. Ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche und bei der Fertigstellung der schriftlichen Ausarbeitung war für mich eine große Unterstützung und sorgte für eine durchgehend harmonische Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Herrn Prof. Dr. M. Lakomek für die Bereitstellung der Dissertation und für die Möglichkeit, im Labor seiner Abteilung wissenschaftlich mitgewirkt zu haben.

Frau Heidrun Ditges möchte ich ganz herzlich für ihre Fürsorge und Liebenswürdigkeit danken.

Für die Hilfe am Sequenziergerät bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Andreas Ohlenbusch.

Außerdem möchte ich Herrn Carlos F. Barbas III, PhD, danken, der mir eine Hospitation in seiner Abteilung im Scripps Research Institute, La Jolla, USA gewährte.

Herrn Stefan Birkholz danke ich vielmals für die Hilfestellung beim Umgang mit dem Textsatzsystem  $\text{\LaTeX}$ .