

2 Material

2.1 Geräte und Kits

Discovery-1 Mikroskopie System	Molecular Devices
Fluorimeter FLx800	BioTek
Laserscanning Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
Mikroskop Axioskop 40	Zeiss
Mikrotiterplatten Luminometer MLX	Dynex
Mikrotiterplatten Waschgerät PW96	Tecan
QiaPrep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Spectrophotometer SmartSpec 3000	Biorad
Vectastain ABC-AP Kit	Vector Laboratories

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

96-Loch Platten für Phagenanzucht	Nunc
96-Loch Platten für Zell-ELISA	Costar
96-Loch Platten für Masterplatten	TPP
Agarose	Promega
Alamar Blau	Gibco
Ampicillin	Roth
EZ-Link NHS-PEO ₄ -Biotin	Pierce
BM Chemilumineszenz Substrat	Roche
Bradford-Reagenz	Biorad
Coomassie	Fluka
DAB (3, 3'-Diaminobenzidine)	Sigma
Dispase	Sigma
Eisessig	Roth
ECL I/II Reagenzien	Amersham Pharmacia
Fetal bovine serum	Sigma cell culture

Formaldehydlösung (37 %)	Fluka
Glycerol	Roth
Magermilchpulver	Fluka
β -Mercaptoethanol	Sigma
MitoTracker Red CMXRos	Molecular Probes
Nitrozellulosemembran	Pharmacia
Nonidet P-40 Substitute	Fluka
PBS (Ca/Mg)	Biochrom
Ponceau S	Roth
SDS-Probenpuffer (Roti-Load 1 und 2)	Roth
Sodium Pyruvate 100 mM	Sigma cell culture
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	ICN Biochemicals
Trypsin-EDTA solution	Sigma cell culture
Tween 20	Fluka
Zellsieb, 70 μ m	Falcon

2.3 Antikörper

Ziege anti-Maus-HRP	Sigma
Ziege anti-Human IgG/M (H+L) POD-Konjugat	Jackson Immuno Research
Maus anti-Human CD31 (WM-59)	Pharmingen
Maus anti-Human CD105 (SN6h)	Dako
Maus anti-M13	Amersham Pharmacia
Maus anti-M13-HRP	Amersham Pharmacia
Maus anti-E Tag-HRP	Amersham Pharmacia
Ziege anti-Maus IgG FITC-Konjugat	Jackson Immuno Research
Schaf anti-Maus IgG Dynabeads M-450	Dynal
Ziege anti-Maus IgG Saporin (Mab-ZAP)	Advanced Targeting Systems

2.4 Medien und Lösungen

Die verwendeten Lösungen wurden mit Wasser aus einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore angesetzt und bei längerer Lagerung mit 0,8 μm Filtern sterilfiltriert oder autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten wurden die entsprechenden Medien vor dem autoklavieren mit 1,5 % Agar versetzt. Das Agarmedium wurde vor Gebrauch in der Mikrowelle verflüssigt und je nach Bedarf mit Glucose oder Antibiotika ergänzt.

2YT:	16 g/l Trypton, 10 g/l Hefe Extrakt, 5 g/l NaCl
2YT/Glc/Amp:	2YT mit 1 % Glucose, 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin
TYE:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 8 g/l NaCl
LB:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl
Formaldehydlösung:	4 % Formaldehyd, 4 mg/ml Glucose in PBS
Glucoselösung:	40 % Glucose in Aqua dest., sterilfiltriert
Lysepuffer:	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X100, Protease Inhibitor Mix
MPBST:	PBS mit 0,05 % Tween-20 und 5 % Milchpulver
PEG:	2,5 M NaCl, 20 % Polyethylenglycol 6000
Permeabilisierungspuffer:	0,5 % Triton X-100 in PBS
PBST:	PBS mit 0,05 % Tween-20
Präadsorptionslösung	PBS ⁺⁺ , 0,1 % Gelatine, 10 % FCS, 0,16 % Humanserum
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Strippingpuffer:	50 mM Glycin pH 2,2, 150 mM NaCl, 200 mM Harnstoff, 2 mg/ml Polyvinylpyrrolidon
TAE (50-fach):	242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0, ad 1 l mit aqua bidest.
Towbinpuffer:	150 mM Glycin, 20 mM Tris, 20 % Ethanol

2.5 Plasmide

VEKTOREN

BEZEICHNUNG	BESCHREIBUNG
pCANTAB 5E	Phagemid Vektor (Amersham Pharmacia)
pHPX1	Expressionsvektor für scFv mit His-tag

2.6 Primer

Folgende Primer wurden bei MWG hergestellt und zur Sequenzierung der scFv-Fragment kodierenden Sequenzen im pCANTAB 5E Vektor verwendet.

PRIMER FÜR DIE SEQUENZANALYSE

BEZEICHNUNG	SEQUENZ
CAN F1	5'-cca tga tta cgc caa gct ttg gag cc-3'
CAN R1	5'-gta aat gaa ttt tct gta tga gg-3'

2.7 Helferphagen und Antikörper-Fragment Phagenbibliotheken

HELFERPHAGEN UND SCFV-BIBLIOTHEK

NAME	BESCHREIBUNG
VCS-M13	1x10 ¹¹ pfu/ml, abgeleitet von M13 K07 Mutante, Kanamycinresistenz (Stratagene)
Hyperphage	1x10 ¹² cfu/ml, M13K07ΔpIII, Kanamycinresistenz (Progen)
HuPhab L3	Humane scFv-Phagenbibliothek mit 5,2x10 ⁹ unterschiedlichen Antikörperfragmenten, kloniert in pCANTAB 5E Derivat Ampicillinresistenz (Berlex Biosciences)

2.8 Bakterienstämme und eukaryontische Zell-Linien

Die Zellen wurden von den Firmen Stratagene oder Gibco bzw. von der American Type Culture Collection (ATCC) oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen.

BAKTERIENSTÄMME

STAMM	GENOTYP
DH5 α	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_K^- , m_K^-), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF), F $^-$, λ^-
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB lac q Z Δ M15 TN10 (TET r)]
TG1	K12, Δ lac-pro, supE, thi, hsdD5/F' traD36, proA+B+, laqIq, lacZDM15
TG1 (elektrokompetent)	supE thi-1 Δ (lac-proB) Δ mcrB-hsdSM)5 (r_{k-} m_{k-}) [F' traD36 proAB lacI q ZD/M15]

EUKARYONTISCHE ZELL-LINIEN

STAMM	BESCHREIBUNG
A375	Humane Melanoma Zell-Linie (ATCC CRL-1619)
A431	Humane epidermale Karzinomzell-Linie (ATCC CRL-1555)
HDMVEC	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzell-Linie (aus Vorhaut isoliert)