

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Techniken

3.1.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte nach Animpfen von 2YT-Medium mit 1 % Glucose für phagemidtragende Stämme und von LB-Medium für DNA-Präparationen bei 180 rpm und 37 °C im Inkubationsschüttler. Bei plasmidtragenden Stämmen mit Selektionsmarker wurde außerdem das entsprechende Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin) zugesetzt. Das Ausplattieren auf LB-Agar diente der Anzucht von Klonen aus Transformationen. Die Platten wurden zur Anzucht umgekehrt im 37 °C Brutschrank für 18 bis 24 h inkubiert. Zur mittelfristigen Lagerung sind diese etwa 4 Wochen bei 4 °C haltbar. Vorkulturen oder Übernachtskulturen wurden ausgehend von Einzelkolonien der Platten oder aus Glycerolstocks angeimpft und wuchsen 12 bis 18 h. Das bakterielle Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Die dauerhafte Konservierung von Bakterienstämmen erfolgte durch Zusatz von 15 % Glycerol zu einer Übernachtskultur und Lagerung bei –80 °C.

3.1.2 Transformation von kompetenten *E. coli*

Die DNA-Lösung (Plasmid- oder Ligationsansatz) wurde mit 100 µl Suspension kompetenter Zellen versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte für 90 s bei 42° C, worauf eine 2-minütige Abkühlung auf Eis folgte. Nach Zusatz von 500 µl kaltem LB-Medium und Inkubation für 60–90 min bei 37° C unter Schütteln wurden die Bakterien auf einem geeignetem Selektionsmedium ausplattiert (LB-Agar mit Antibiotikum).

3.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für eine Präparation von Plasmid-DNA wurde je nach benötigter DNA-Menge der QIAprep Spin Miniprep oder Maxi Kit benutzt. Sie basieren auf einer alkalischen Lyse der Bakterien mit Denaturierung der Proteine. Die bakterielle RNA wird durch zugesetzte RNase A abgebaut. Die Isolierung erfolgte aus einer 2–5 ml Übernachtskultur für analytische und 500 ml für präparative Zwecke. Die Bakterien wurden dann gemäß Herstellerangaben (Qiagen) bearbeitet. Die Kon-

zentration der DNA wurde photometrisch bei einer Absorption von 260 nm bestimmt und die Qualität der Präparation auf einem Agarosegel kontrolliert.

3.1.4 Restriktionsspaltung von DNA

Als Restriktionsspaltung wird das Schneiden von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen bezeichnet. Für molekularbiologische Experimente werden vor allem Typ II Enzyme eingesetzt. Diese spalten die DNA an spezifischen Stellen innerhalb einer meist palindromischen Erkennungsequenz, wobei entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder überhängende Enden (*sticky ends*) entstehen können. Die Spaltung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.1.5 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäurefragmente von 0,1 bis 20 kB Größe wurden für analytische und präparative Zwecke in horizontalen 0,8–2 % (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dieses ist aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats möglich, wobei die Beweglichkeit der DNA in Richtung Anode weitgehend von der Molekülgröße abhängt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer geschmolzen und mit 5 μ l Ethidiumbromid (4 mg/ml) pro 100 ml TAE-Puffer versetzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die doppelsträngige DNA und ermöglicht eine Detektion unter UV-Licht. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Ladepuffer gemischt und in die Probentaschen eingebracht. Zur Bestimmung der Basenzahl wurde zusätzlich ein entsprechender Längenstandard aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80 bis 110 V in 1x TAE-Puffer für 45–90 min. Für präparative Zwecke wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Fragmentisolierung wurde gemäß dem QIAquick Gel Extraction Kit Protokoll (Quiagen) durchgeführt.

3.1.6 Sequenzierung

Zur Analyse selektierter scFv-Klone wurde die Phagemid-DNA aus Bakterien isoliert und je 2 μ g DNA in 20 μ l Wasser pro Reaktion und 10 pmol Primer (CAN F1, CAN R1) zum MWG-Sequenzierservice geschickt. Die Aufzeichnung und Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Vector NTI Software.

3.2 Phage Display Methoden

3.2.1 Anzucht der HuPhab L3 Bibliothek

Für neue Selektionen wurden jeweils frische Phagenpools der HuPhab L3 Bibliothek hergestellt. Dazu wurden die phagemidenthaltenen Bakterien amplifiziert und nach Infektion mit Helferphagen wieder neue Phagenpartikel erzeugt. Diese wurden mittels PEG-Fällung konzentriert und bei -80 °C aufbewahrt. Dazu wurde 2YT/Glc/Amp Medium mit einem Glycerolvorrat der Bibliothek ($5 \times 10^{10}/\text{ml}$) auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt und bei 37 °C und 180 rpm im Inkubator auf eine OD_{600} von 0,5 angezogen. Die anschließende Helferphageninfektion erfolgte mit einer MOI von 20-30 für 30 min stationär bei 37 °C . Die Bakterien wurden bei 3300 g für 10 min pelletiert und in 625 ml 2YT/Glc/Kana resuspendiert. Die Phagenproduktion fand über Nacht bei 180 rpm und 30 °C im Schüttler statt. Die Bakterien wurden für 30 min bei 6000 g pelletiert und mit 1/5 Volumen PEG-Lösung für 2-3 Stunden auf Eis gefällt. Die Lösung wurde für 30 min bei 10800 g zentrifugiert und nach vorsichtigem Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in PBS resuspendiert und erneut für 30 min mit PEG gefällt. Das Phagenpellet wurde in PBS resuspendiert und mit Glycerol auf eine Endkonzentration von 15 % eingestellt und in 1 ml Aliquots bei -80 °C eingefroren.

Modifikation der HuPhab L3 Bibliothek: Um die scFv-Phagenbibliothek in multivalenter Form zu erhalten, erfolgte die Anzucht der phagemidenthaltenen Bakterien analog wie oben beschrieben. Die Helferphageninfektion fand jedoch mit Hilfe von sogenannten Hyperphagen statt. Diese ermöglichen die Erzeugung multivalenter scFv-Phagen, bei denen fünf Kopien des pIII-scFv-Fusionsproteins auf der Oberfläche präsentiert werden [Broders et al., 2003].

3.2.2 Titerbestimmung

Um den Phagentiter der HuPhab L3 Bibliothek zu ermitteln, wurden die folgenden Methoden verwendet. Zum einen die Kolonie-Methode, bei der die ampicillinresistenten TG1-Kulturen, nach Infektion mit verschiedenen Verdünnungen der Bakteriophagen gezählt wurden. Bei der Plaque-Methode wurde der Titer durch die Zählung von durchscheinenden Plaques auf einem Bakterienrasen ermittelt.

Kolonie-Methode: 10 ml 2YT-Medium wurden mit einer TG1-Kolonie angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Von der zu bestimmenden Phagenlösung wurde eine Verdünnungsreihe in PBS hergestellt und von jeder Verdünnungsstufe je 100 µl zur Infektion von 200 µl TG1 für 30 min bei 37 °C eingesetzt. Die Verdünnungen wurden auf 2YT/Glc/Amp Agarplatten ausgestrichen und nach Inkubation über Nacht im Brutschrank die Kolonien gezählt.

Plaque-Methode: 10 ml 2YT-Medium wurden mit einer TG1-Kolonie angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Von der zu bestimmenden Phagenlösung wurde eine Verdünnungsreihe in PBS hergestellt und von jeder Verdünnungsstufe je 100 µl zur Infektion von 200 µl TG1 für 30 min bei 37 °C eingesetzt. Die infizierten Bakterien wurden auf je 3 ml geschmolzenen, 42 °C warmen Top-Agar gegeben und durch vorsichtiges vortexen gemischt. Nach Mischung wurde die Lösung auf vorgewärmte 2YT Agarplatten gegossen und gleichmäßig auf den Platten verteilt. Nachdem der Top-Agar festgeworden war, wurden die Platten über Nacht bei 37 °C im Inkubator aufbewahrt und die Plaques gezählt.

3.2.3 Phage Antikörper Selektionen

Für die Selektionen wurden ausschließlich primäre HDMVEC der Passage 3–5 verwendet, da mit zunehmender Kultivierung potentielle Endothelzellmarker verloren gehen.

Oberflächenselektionen auf HDMVEC: Einen Tag vor der Selektion wurden $2,5 \times 10^5$ HDMVEC auf 6 cm Schalen ausgelegt. Als Konkurrenzszellen dienten A375 in 1000-fachem Überschuss pro Selektion, die auf 600 cm² Platten ausgelegt wurden und am Tag der Selektion nach Trypsinierung in etwa 5 ml Präadsorptionslösung resuspendiert wurden. Dazu kam 1 ml der HuPhab L3 Phagenbibliothek ($1,5 \times 10^{11}$ cfu/ml), die zur Depletion unspezifischer Binder für 1 h bei 4 °C unter leichter Bewegung mit den Konkurrenzszellen inkubierte. Die HDMVEC wurden vor der Inkubation mit der depletierten Phagenbibliothek dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und die präadsorbierte Phagenlösung wurde für 4 h bei 4 °C auf die adhärenen Zellen gegeben. Durch 40 Waschschrte mit je 1 ml PBS⁺⁺ wurden die Konkurrenzszellen, sowie nichtgebundene Phagen, entfernt. Die HDMVEC wurden von der Platte gekratzt, in der Zentrifuge pelletiert und einmal mit 5 ml PBS gewaschen bevor sie zur Abtrennung der gebundenen scFv-Phagen mit 1,5 ml 100 mM Triethylamin für 10 min lysiert wurden. Die derart gelösten Phagen wurden mit

0,5 Volumen 1 M Tris pH 7,4 neutralisiert und bis zur Infektion von TG1 auf Eis aufbewahrt. Die Hälfte der eluierten Phagen wurde mit 15 % Glycerol bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, die andere Hälfte für die Infektion von TG1 und anschließende Titration verwendet.

Selektion unter internalisierenden Bedingungen: Die Selektion unter internalisierenden Bedingungen lief analog zur Oberflächenselektion ab und unterschied sich erst nach der Entfernung der Kompetitionszellen und der unspezifischen scFv-Phagen. Nach den intensiven Waschschritten schloss sich eine 30-minütige Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in vorgewärmten Medium an. Danach wurden die Zellen noch dreimal mit PBS gewaschen, bevor die oberflächengebundenen Phagen durch Einwirkung von Strippingpuffer für 10 min entfernt wurden. Die Zellen wurden für 10 min mit 100 mM Triethylamin lysiert und damit die potentiell internalisierte Phagen eluiert. Die gelösten Phagen wurden entsprechend der Oberflächenselektion mit 0,5 Volumen 1 M Tris pH 7,4 neutralisiert und bis zur Infektion von TG1 auf Eis aufbewahrt. Die Hälfte der eluierten Phagen wurde mit 15 % Glycerol bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, die andere Hälfte für die Infektion von TG1 und anschließende Titration verwendet.

3.2.4 Infektion von TG1 und Titration der Phagen

Zur Bestimmung des Titers wurden TG1 Bakterien mit den selektierten Phagen infiziert. Dafür wurden TG1 Bakterien in 2YT-Medium auf eine OD von 0,6-0,8 herangezogen und bis zur Infektion auf Eis aufbewahrt. Zur Kontrolle der TG1 wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ der Bakterien auf Agarplatte mit TYE/Glc/Amp und TYE/Glc/Kana ausgestrichen, um sicherzustellen dass die TG1 nicht bereits mit unspezifischen Phagen infiziert waren. Je 25 ml TG1 wurden mit ca. $1,2\text{ ml}$ Phagen für 30 min im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad infiziert. Hiervon wurden $0,1\text{-}100\text{ }\mu\text{l}$ für die Titerbestimmung ausgestrichen und der Rest 10 min bei 3300 g abzentrifugiert und in $800\text{ }\mu\text{l}$ 2YT resuspendiert. Je zweimal $400\text{ }\mu\text{l}$ wurden auf 600 cm^2 Platten mit TY/Glc/Amp-Agar ausgestrichen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Nach der 2. und 3. Selektionsrunde wurden Einzelklone in 96-Lochplatten mit 2YT/Glc/Amp gepickt und über Nacht bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 250 rpm hochgezogen. Die Masterplatten wurden mit 15 % Glycerol versetzt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.5 Amplifikation, Rückgewinnung und Fällung der Phagen

Da die selektierten scFv-Phagen lediglich das Phagemid als genetische Information tragen, ist für die Rückgewinnung der Phagen aus den infizierten TG1 eine Helferphageninfektion nötig. Die Phagemid-tragenden Bakterien wurden mit je 5 ml 2YT/Glc/15 % Glycerol/Amp von den 600 cm² Platten gelöst und Aliquots bei -80 °C eingefroren. Je 30 ml 2YT/Glc/Amp wurden mit etwa 20-50 µl infizierter Bakterien auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45-0,55 hochgezogen. Für die Produktion der Phagenproteine erfolgte eine Infektion mit Helferphagen (VCS-M13 oder Hyperphage) mit einer MOI von 20 (2x10¹¹ Helferphagen pro 25 ml TG1). Die Infektion wurde für 30 min stationär bei 37 °C und weitere 30 min bei 225 rpm und 37 °C durchgeführt. Die Bakterien wurden für 10 min bei 3300 g abzentrifugiert und das Pellet in 20 ml 2YT/Amp/Kana/0,25 mM IPTG resuspendiert und über Nacht bei 30 °C und 225 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden 10 min bei 3300 g abzentrifugiert und der Phagenüberstand mit 1/4 Volumen 20 % PEG / 2,5 M NaCl auf Eis gefällt. Die Phagen wurden für 30 min bei 10800 g pelletiert, in 10 ml PBS resuspendiert und restliche Bakterien 10 min bei 3300 g sedimentiert bevor der Überstand für weitere 20 min mit 1/4 Volumen PEG-Lösung gefällt wurde. Das Phagenpellet wurde in 1,5 ml PBS resuspendiert und in zwei Aliquots mit 15 % Glycerol bei -80 °C gelagert.

3.2.6 Phagen-ELISA auf Zellen

Der Phagen-ELISA diente zur Überprüfung einzelner Klone auf ihre spezifische Zellbindung nach der 2. oder 3. Selektionsrunde. Dabei wurden die Zielzellen als spezifisches Antigen und die Kompetitionszellen als Negativkontrolle eingesetzt.

Zellaussaat und Anzucht der Phagenklone: Die Zellen, auf denen die Phagenklone getestet werden sollten, wurden 16-24 h vor dem Test in einer Zelldichte von 1,5x10⁴ Zellen pro Loch in einem Volumen von 200 µl in einer 96-Lochplatte mit durchsichtigem Boden und lichtdichten Seitenwänden (Costar) ausgesät. Die zu testenden Phagenklone wurden ebenfalls in 96-Lochplatten (Nunc) angezogen, indem pro Loch 150 µl 2YT/Glc/Amp mit einem Replikator aus der Masterplatte je 3x angeimpft wurde und für 2-3 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert wurden. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 erfolgte die Infektion mit Helferphagen mit einer MOI von

20 stationär für 30 min bei 37 °C. Die Bakterien wurden anschließend bei 1700 rpm für 10 min pelletiert und zur Induktion in je 150 µl 2YT/Amp/Kana/0,25mM IPTG resuspendiert. Die Phagenproduktion erfolgte über Nacht bei 30 °C und 180 rpm ins Medium. Vor der Verwendung wurden die Bakterien bei 1700 rpm für 10 min pelletiert und die Phagen aus dem Überstand entnommen.

Zell-ELISA: Zum Blockieren wurde das Medium mit einem Mehrkanalsauger vorsichtig von den Zellen entfernt und durch 200 µl MB-PBS 1 (2 % Milch, 1 % BSA in PBS) ersetzt. Nach 1 h Inkubation wurde die Blockierlösung wieder entfernt und durch 80 µl MB-PBS 2 (3 % Milch /1,5 % BSA in PBS) ersetzt. Dazu kamen 40 µl Phagenüberstand, der für 2 h unter leichtem schütteln auf den Zellen inkubierte. Die Entfernung nicht gebundener Phagen erfolgte im Mikrotiterplatten-Waschgerät in vier Waschschritten mit PBS. Zur Detektion gebundener Phagen wurde der Peroxidase gekoppelte anti-M13-HRP Antikörper (1:500 in MB-PBS 1) für 1 h auf den Zellen inkubiert. Der Nachweis erfolgte nach erneutem Waschen durch Zugabe von BM Chemilumineszenz Substrat. Die Messung erfolgte 10 min nach Substratzugabe im Mikrotiter Platten Luminometer.

3.2.7 Immunhistologie

Zum Nachweis der Gewebeverteilung und spezifischen Bindung selektierter Phagenantikörper wurden Kryoschnitte aus verschiedenen Geweben (kolorektale Lebermetastase, Kolonkarzinom, normale Vorhaut u. a.) untersucht. Nach Lufttrocknung der Gefrierschnitte für mind. 20 min folgte eine Fixierung mit Formaldehydlösung oder eiskaltem Aceton für 5-10 min. Zur Rehydratisierung wurden die Schnitte dreimal 5 min mit PBS gewaschen und für 30 min mit 2 % BSA in PBS blockiert. Die Bindung von 200 µl frisch gefällten Phagen (siehe Phagenanzucht für die Immunfluoreszenz) erfolgte für 2 h bei RT. Die Schnitte wurden in dreimal 5 min Schritten mit 1 % BSA/PBS gewaschen und für 1 h mit 200 µl Maus anti-M13 Antikörper (1:500) inkubiert. Als Positivkontrolle diente anti-CD31 Antikörper (1:300). Der Nachweis erfolgte über ein Biotin-Streptavidin System (Vectastain ABC-AP Kit) mit Sigma Fast Red Substrat und Hämatoxylin zur Gegenfärbung der Kerne.

3.2.8 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Für eine morphologische Beurteilung der Oberflächenbindung oder der Internalisierungsfähigkeit selektierter scFv-Phagen wurden phagemidtragende Klone angezogen und die produzierten scFv-Phagen mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei diente die Inkubation bei 4 °C zur Unterbindung einer potentiellen Internalisierung. Um die Lokalisation innerhalb der Zelle nach Inkubation bei 37 °C zu bestätigen, wurden die Zellen mit Stripuffer von oberflächengebundenen Phagen befreit.

Zellaussaat und Anzucht von Phagenklonen: Einen Tag vor der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden 1×10^4 Zellen pro Loch einer 96-Loch Mikrotiterplatte oder 2×10^5 Zellen pro Loch einer 12-Loch Platte mit Glasplättchen ausgesät. Die Phagenklone wurden in 2YT/Glc/Amp Medium angezogen, 10 ml auf eine $OD_{600} = 0,1$ verdünnt, bis zu einer $OD = 0,45-0,55$ hochgezogen und anschließend mit Hyperphagen mit einer MOI von 20 für 30 min stationär bei 37 °C infiziert. Nach Pelletieren der Zellen für 10 min bei 3300 rpm erfolgte eine Resuspension in 10-20 ml 2YT Medium ohne Glucose mit Ampicillin und Kanamycin als Selektion auf Bakterien, welche sowohl mit Phagemid als auch mit Hyperphagen infiziert waren. Nach Produktion der Phagen über Nacht bei 30 °C wurden die Phagen mittels PEG-Fällung konzentriert. Das Pellet wurde dabei zum Schluss in 1/10 Volumen der Startkultur in PBS resuspendiert.

Oberflächenanalyse: Die Inkubation der scFv-Phagen erfolgte für 2 h bei 4 °C. Die Zellen wurden viermal mit PBS gewaschen bevor die Fixierung für 10 min mit Formaldehydlösung erfolgte. Die Zellen wurden für 30 min mit PBS/3 % BSA blockiert bevor der Primärantikörper (Maus anti-M13, 1:300 in PBS/BSA) für 1 h bei RT dazugegeben wurde. Nach drei Waschschritten erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers (Ziege anti-Maus-FITC, 1:100 in PBS/BSA) für 1 h bei RT. Schließlich wurde die Zellen noch zweimal mit PBS und einmal mit PBS/DAPI (2 µg/ml) gewaschen. Für die Bildaufnahme am automatischen Mikroskopiesystem (Discovery-1) wurden die Zellen in der Mikrotiterplatte mit PBS bedeckt gelassen. Für die Bildaufnahme am Axiphot wurden die Glasplättchen mit den Zellen auf Objektträger übertragen und mit Vectashield eingedeckelt.

Internalisierung: Die Zellen wurden 2 h vorher mit frischem Medium versorgt und auf 4 °C vorgekühlt. Die Inkubation der Phagen erfolgte für 1 h bei 4 °C bevor die Zellen in 4 Ansätze aufgeteilt wurden.

- 4 °C:** 3x mit eiskaltem PBS waschen, fixieren, permeabilisieren
- 4 °C/SP:** 3x mit eiskaltem PBS waschen,
10 min Inkubation mit Strippingpuffer (pH 2,2)
1x mit PBS waschen, fixieren, permeabilisieren
- 37 °C:** 30 min bei 37°C inkubieren,
3x mit eiskaltem PBS waschen, fixieren, permeabilisieren
- 37 °C/SP:** 30 min bei 37°C inkubieren, 3x mit eiskaltem PBS waschen,
10 min Inkubation mit Strippingpuffer (pH 2,2),
1x mit PBS waschen, fixieren, permeabilisieren

Die Fixierung wurde wie für die Oberflächenanalyse für 10 min mit Formaldehydlösung durchgeführt. Anschließend folgte eine Permeabilisierung für 5 min mit PBS/0,5 % Triton X-100. Die restliche Prozedur mit Blockierung und Sekundärantikörperinkubation wurde ebenfalls analog zur Oberflächenanalyse praktiziert. Die Mikroskopie erfolgte am Axiophot oder dem Laserscanningmikroskop LSM 510 Meta.

3.3 Zellbiologische Techniken

3.3.1 Kultivierung der Zellen

Die Haltung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Als Kulturmedium für die Zell-Linien A375 und CHO wurde DMEM mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin verwendet. Die Endothelzellen HDMVEC erhielten ein spezielles Endothelzell Medium (EBM-2) mit 5 % fötalem Hirnserum, Hydrocortison, hFGF-B, VEGF, R³-IGF-1, hEGF, Ascorbinsäure, Gentamycin und Amphotericin-B (EGM-2MV Bullet-Kit, Cambrex).

3.3.2 Isolierung von Endothelzellen

Die humanen, dermalen, mikrovaskulären Endothelzellen (HDMVEC) wurden aus der Vorhaut isoliert. Dazu wurde die Vorhaut mit PBS gewaschen, in kleine Stücke geschnitten und über Nacht mit Dispase verdaut. Mit einer Pinzette wurde das dunkle Epithel von den Stücken abgezogen und die Zellen mit einem Skalpell in EBM-2 von den weißen Gewebestücken abgeschabt. Die Zellsuspension wurde über ein $70\ \mu\text{m}$ Sieb gefiltert und die Zellen für 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Die Zellen wurden in EBM-2 resuspendiert und in mit 0,1 % Gelatine beschichtete Kulturflaschen verteilt. Der Geweberückstand im Sieb wurde mit PBS gespült, mit Trypsin für 1 h bei $37\ ^\circ\text{C}$ verdaut und die Zellen erneut über ein $70\ \mu\text{m}$ Sieb gefiltert, pelletiert und auf Kulturflaschen verteilt. Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert und das Zellwachstum visuell am Phasenkontrastmikroskop verfolgt. Als die kontaminierenden Zellen (Fibroblasten) die Endothelzellen zu überwachsen begannen, wurden die HDMVEC mit anti-human CD31-Antikörpern und anti-IgG beschichteten Dynabeads über magnetische Separation isoliert. Dazu wurden $0,5\ \mu\text{g}$ anti-CD31 mit $5\ \mu\text{l}$ Dynabeads (2×10^6 Beads) für 30 min bei $4\ ^\circ\text{C}$ auf einem über-Kopf Schüttler inkubiert. Nach drei Waschgängen mit PBS wurden die anti-human CD31-Dynabeads in PBS resuspendiert und auf die Zellen gegeben. Die Bindung konnte am Mikroskop kontrolliert werden. Nach 1 h wurden die Zellen trypsiniert und die mit CD31-Dynabeads besetzten Endothelzellen über die magnetische Separation von den Fibroblasten getrennt. Die Endothelzellen wurden erneut auf Kulturflaschen ausgesät und nach Expansion bei $-80\ ^\circ\text{C}$ eingefroren.

3.3.3 Passagieren der Zellen

Die Passagierung der Zellen erfolgte alle 2–4 Tage, wenn die Zellen eine Konfluenz von 70–90 % erreichten. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, um verbliebene Mediumreste mit FCS zu entfernen, welche die anschließende Behandlung mit Trypsin inhibieren. Das Trypsin baut proteolytisch Oberflächenproteine der Zelle ab, welche die Adhäsion zur Kulturschale vermitteln. Nach einer Einwirkzeit von 3–5 min ließen sich die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Flaschenseite ablösen. Durch die darauf folgende Medienzugabe wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen konnten nach Vereinzelnung in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:20 wieder in Zellkulturflaschen ausgelegt werden.

3.3.4 Biotinylieren von Zelloberflächen

Die subkonfluenten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 1 h mit $25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ Biotinlösung (0,2 mg/ml EZ-Link NHS-PEO₄-Biotin in PBS) inkubiert. Die Biotinylierung wurde durch dreimaliges waschen mit 30 mM Tris pH 7,4 gestoppt. Die biotinylierten Zellen wurden für weiter Experimente eingesetzt oder mit einem Zellschaber abgekratzt, 5 min bei 2300 g pelletiert und das trockene Zellpellet bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

3.3.5 Zytotoxizitätsassay mit saporinegekoppeltem Sekundärantikörper

In einer 96-Loch Mikrotiterplatte wurden 1×10^3 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach 24 h wurden das Medium abgenommen, durch $25 \mu\text{l}$ einer entsprechenden Antikörperverdünnung in Vollmedium und $25 \mu\text{l}$ des saporinegekoppelten Sekundärantikörpers ersetzt und diese für 3 Tage auf den Zellen inkubiert. Der saporinegekoppelte Ziege anti-Maus IgG Antikörper wurde in einer Endkonzentration von $0,8 \mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. Zur Kontrolle wurde anti-Human CD31 in einer Konzentration von $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Die scFv-Phagen wurden aus einer Induktionskultur mit PEG gefällt und in einer Konzentration von 1×10^{12} cfu/ml zusammen mit $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. Nach drei Tagen wurde auf die Zellen, ohne vorherige Abnahme des Überstands, eine Alamar Blue Lösung (1:35 in Vollmedium) gegeben und für 2 h auf den Zellen inkubiert. Die fluorimetrische Messung erfolgte im FLx800 mit dem Filter C 528/5 für die Extinktion und 590/35 für die Emission mit einer Sensitivität von 25.

3.4 Proteinchemische Techniken

3.4.1 Zellaufschluss

Die Zellen in einer 10 cm Schale wurden mit PBS gewaschen und mit 1,5 ml PBS abgeschabt. Die Zellen wurden bei 270 g pelletiert, in 200 μ l Lysepuffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X100, Protease Inhibitor Mix) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde mit einer Kanüle (0,4 mm) homogenisiert und der Überstand nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm weiterverwendet. Nach Proteinbestimmung (Bradford) erfolgte ein Konzentrationsausgleich und die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (reduzierend oder nicht reduzierend wie angegeben, Roth) versetzt, 3 min bei 95 °C erhitzt und direkt weiterverwendet oder bei -20 °C weggefroren.

3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford [Bradford, 1976] beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsspektrums von Coomassie Blau von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung des Farbstoffs an Proteine. Die Bildung des Farbstoffkomplexes erfolgt innerhalb von 2 min und bleibt über eine Stunde stabil. Zur Proteinquantifizierung wurden 50 μ l Bradfordreagenz mit 1-5 μ l Proteinlösung in Dreifachansätzen in einer Mikrotiterplatte verteilt und gut gemischt. Nach Inkubation wurde die Extinktion der Proben bei 595 nm gegen den Leerwert (Lysepuffer) bestimmt. Als Standard diente eine Eichreihe von Rinderserumalbumin (BSA).

3.4.3 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mit der Natriumdodecylsulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli [Laemmli, 1970]. Die Proteine wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen (reduzierend mit Roti-Load 1, welcher β -Mercaptoethanol enthält, oder nicht reduzierend mit Roti-Load 2) und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Das Einlaufen der Proben erfolgt bei 80 V für 15 min, danach wurde für die restliche Dauer der Auftrennung die Spannung auf 100 V erhöht.

3.4.4 Western Blot

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde nach dem *semi-dry*-Verfahren [Kyhse-Andersen, 1984] durchgeführt. Dazu wurde ein sogenanntes *Sandwich* aus einem Whatmanpapier, der Nitrozellulosemembran, dem SDS-Gel und einem weiteren Whatmanpapier getränkt in Towbinpuffer gebaut. Der Transfer erfolgte bei 15 V für 1 h. Zur Bestätigung des Transfers wurde die Membran wahlweise mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Für die anschließende Immunodetektion wurde die Membran für 30 min bei Raumtemperatur mit MPBST geblockt, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu besetzen. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper (in Verdünnungen von 1:200 bis 1:1000 in MPBST) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nichtgebundene Antikörper wurde durch viermaliges Waschen für je 5 min mit PBST entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2000 in MPBST) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen wurde der Blot mit ECL Reagenzien entwickelt. Die Detektion der Lichtquanten erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms.

3.4.5 Färben von Proteingelen

Zum Nachweis von Proteinmengen (größer als 30 ng) wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung gelegt, für 1 min auf 55 °C erhitzt und für 20 min gleichzeitig fixiert und gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte in 25 % Methanol/10 % Eisessig-Lösung. Zur Fixierung und anschließenden Trocknung wurden die Gele in 20 % Glycerol/20 % Methanol-Lösung gelagert und zwischen Folien eingespannt.