

5 Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Strategien für die Isolierung von endothelzellspezifischen Antikörpern aus einer humanen scFv-Phagenbibliothek auf primären Endothelzellen entwickelt. Für Selektionen von Antikörpern aus scFv-Phagenbibliotheken gegen nativ isolierte oder rekombinant produzierte Antigene sind effektive und etablierte Phage Display Methoden bekannt [Marks et al., 1991; Griffiths et al., 1994; Winter et al., 1994; Hoogenboom et al., 1998]. Dabei werden die isolierten Proteine auf künstlichen Oberflächen (z. B. Plastikröhrchen) über hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Durch die Art der Immobilisierung über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Plastikoberfläche kann es dabei zur Exposition von Epitopen kommen, die im physiologischen Kontext nicht vorkommen. Insbesondere Membranproteine besitzen ihre optimale Konformation häufig nur in der Lipidmembran, so dass es mit dieser Methode zur Selektion von Antikörpern kommen kann, die das native Protein in seiner natürlichen Umgebung nicht mehr erkennen. Für diese Fragestellung sind in den letzten Jahren deshalb Antikörper Phage Display Selektionsmethoden auf komplexen Antigenquellen entwickelt worden. Dabei wurden meistens Zellen mit endogen stark vertretenen oder durch Transfektion überexprimierten Zielmolekülen verwendet [Pereira et al., 1997; Mutuberria et al., 1999; Peipp et al., 2001; Hegmans et al., 2002]. Ein Problem der Zellselektionen stellt die relativ hohe Hintergrundbindung unspezifischer scFv-Phagen dar, die durch die inhomogene Antigenpräsentation verursacht wird. Eine Anreicherung spezifischer Phagenantikörper gelingt hier nur mit geeigneten Subtraktionsverfahren, um Binder gegen allgemeine Zelloberflächenproteine zu entfernen. Indem die Bibliothek vor der Selektion zusätzlich mit einer Zell-Linie konfrontiert wird, die der Zielzell-Linie möglichst ähnlich ist, können unspezifische Phagenantikörper herausfiltert werden.

Die Suche nach Antikörpern gegen unbekannte Antigene, wie zell-, gewebe- oder tumorspezifischen Markern, erfordert alternative Selektionsstrategien auf isolierten Zellmembranen, primären Zellen oder Gewebeschnitten. Bis heute sind z. B. nur eine begrenzte Anzahl angiogeneseassoziiert Zielstrukturen bekannt und für die Entwicklung anti-angiogener Therapieansätze müssen entsprechende Zielstrukturen auf Endothelzellen gefunden werden. Insbesondere für Antikörper Phage Display Selektionen gegen endothelzellspezifische Zielstrukturen sind bisher in der Literatur nur wenige Beispiele bekannt [Mutuberria et al., 2004; Völkel et al., 2004b]. Da in die-

sem Fall das Zielmolekül der Selektion nicht klar definiert ist, gestaltet sich die Entfernung unspezifischer Antikörper schwieriger. Ein weiteres Problem besteht in der Handhabung primärer Endothelzellen, die im Verlauf der Kultivierung endothelzellspezifische Eigenschaften verlieren [Bouis et al., 2001; Lacorre et al., 2004]. Diese Umstände mussten bei den durchgeführten Selektionen berücksichtigt werden.

5.1 Oberflächenselektion auf Endothelzellen

Zuerst wurde eine Strategie für die Isolierung von scFv-Phagen gegen endothelzellspezifische Oberflächenmarker etabliert. Auf der Endothelzelloberfläche werden sehr viele verschiedene Epitope exprimiert, die auf mehreren Zellen vorkommen, so dass ohne Konkurrenz Antikörper gegen eine Reihe von Zelloberflächenmolekülen selektioniert werden, die nicht spezifisch für Endothelzellen sind. Eine erfolgreiche Selektionsstrategie benötigt daher Möglichkeiten, diese unspezifischen Antikörper zu entfernen. Das Protokoll wurde zu diesem Zweck durch eine Konkurrenz der Endothelzellen mit einer nicht endothelialen Zell-Linie angepasst. Die scFv-Phagenbibliothek wurde mit der Melanomzell-Linie A375 als Konkurrenzzellen im 500 bis 1000-fachen Überschuss vorinkubiert und dieser Präinkubationsmix anschließend auf den Endothelzellen (HDMVEC) inkubiert.

Neben der Konkurrenz ist die Art und Anzahl der Waschschriffe ein weiterer wichtiger Parameter bei Phage Display Selektionen. Die Anwendung intensiver Waschmethoden unter Verwendung von Detergenzien (z. B. Tween) erfordert die Immobilisierung des Antigens während aller Selektionsrunden. Bei der Selektion auf adhärenenten Zellen scheidet die Verwendung von Detergenzien jedoch aus, da hierdurch die Zellen lysiert werden. Mit einer Fixierung der Zellen lässt sich dieses Problem zwar umgehen, allerdings werden die Zelloberflächenantigene dann möglicherweise nicht mehr in ihrer nativen Form präsentiert. Die Anzahl der Waschschriffe bestimmt die Stringenz der Selektion. Sind die Waschschriffe nicht effektiv genug, kommt es im Verlauf der Selektion zur Anreicherung unspezifischer Klone, welche eine Isolierung der spezifischen Klone unmöglich macht [Hawkins et al., 1992]. Einige Arbeiten beschreiben optimale Anreicherung bereits nach vier bis sechs Waschschriffen, was jedoch stark von der verwendeten Zell-Linie und der praktischen Durchführung abhängt [Watters et al., 1997]. Beim Austesten der

Waschbedingungen auf den HDMVEC stellte sich heraus, dass sich nach sechs bis zehn Waschsritten noch eine erhebliche Menge von scFv-Phagen in der Waschlösung befanden. Erst nach 30 Waschsritten waren keine unspezifischen scFv-Phagen mehr in der Waschlösung nachweisbar. Die Zellselektion in Kombination mit der HuPhab L3 scFv-Phagenbibliothek erforderte zur Selektion hochspezifischer Endothelzellbinder offenbar sehr stringente Waschbedingungen. Für die eigentliche Selektion wurden deshalb 40 Waschschrte angewandt, um eine optimale Selektivität zu erreichen.

Der Verlauf der Selektion wird oftmals durch Analyse des Titers bestimmt. Die experimentellen Erfahrungen zeigen jedoch, dass dieser Parameter nur bedingt geeignet ist und die Selektion vor der Einzelklonanalyse eine sogenannte "*black box*" darstellt. Verfolgt man den Titer, so kommt es nach der ersten Selektionsrunde durch Entfernung unspezifischer, nicht bindender Phagen häufig zu einem deutlichen Abfall des Phagentiters. Bereits in der zweiten Runde kann der Titer durch Amplifikation der spezifisch bindenden Phagen sowie der weiteren Eliminierung unspezifischer Phagen wieder ansteigen [Kruif et al., 1995]. Bei den hier beschriebenen Selektionen ergab die Titerentwicklung von der ersten zur zweiten Runde keine Anreicherung. Trotzdem war gut die Hälfte der selektierten scFv-Phagen in der Lage, selektiv an Endothelzellen zu binden. Nach zwei Selektionsrunden auf den HDMVEC konnten 46 % von knapp 200 getesteten scFv-Klonen im Zell-ELISA als spezifisch für diese Zell-Linie eingestuft werden. Die Verwendung eines starken Überschusses von Kompetitionszellen gegenüber den Endothelzellen während der Selektion sorgte für eine effiziente Entfernung von scFv-Phagen gegen nicht endothelzellspezifische Zelloberflächenmoleküle und der prozentuale Anteil von spezifischen Bindern war deutlich erhöht.

Der Großteil der scFv-Phagen (84 %), die im Zell-ELISA eine HDMVEC-spezifische Bindung zeigten, erwies sich auch in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie als endothelzellspezifisch. Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte außerdem eine homogene Oberflächenfärbung auf den Zellen, was auf eine gleichmäßige Dichteverteilungen der erkannten Antigene hinweist. Da die Selektion auf proliferierenden Endothelzellen erfolgte, die mit angiogenen Wachstumsfaktoren stimuliert waren, wurden Antikörper gegen Antigene erwartet, die mit dem Prozess der Angiogenese zusammenhängen. Solche Antigene wären vor allem auf tumorassoziierte Endothelzellen vorhanden, die durch die Tumorzellen zur Blutgefäßneubildung angeregt werden. In

einer vergleichbaren Arbeit mit aktivierten, proliferierenden Endothelzellen der Nabelschnurvenen (HUVEC) konnte bereits eine solche Selektion gezeigt werden [Mutuberia et al., 2004]. Zur weiteren Charakterisierung der hier isolierten scFv-Phagen wurde deshalb die Erkennung von Blutgefäßen anhand der Färbung auf verschiedenen, immunhistochemischen Gewebeschnitten untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Unterscheidung von tumorassoziierten Blutgefäßen von gesunden Gefäßen mit den untersuchten scFv-Phagen nicht möglich war. Offensichtlich reichte die Aktivierung der Endothelzellen unter den verwendeten Bedingungen der Selektion nicht für eine Isolierung von Bindern aus, die spezifisch für aktiviertes Endothel waren. Durch eine Aktivierung der Endothelzellen ist zwar die Expression angiogener Marker erhöht, aber es sind noch eine Reihe anderer Oberflächenproteine vorhanden, die nicht am Prozess der Angiogenese beteiligt sind.

Die DNA-Sequenzierung diente als Maß für die Diversität der selektierten scFv-Phagen und zeigte, dass die Variabilität der untersuchten Klone bereits nach zwei Runden stark eingeschränkt war. Lediglich eine Sequenz aus 100 untersuchten Klonsequenzen konnte als endothelzellspezifisch identifiziert werden. Die begrenzte Diversität kann auf vielfältige Ursachen zurückzuführen sein. Neben der Qualität der verwendeten scFv-Phagenbibliothek spielen die technischen Details (Waschschritte) und die angewandte Selektionsstrategie eine entscheidende Rolle. Außerdem können selektionsdominante Epitope auf den proliferierenden Endothelzellen zu einer Anreicherung einzelner, besonders gut geeigneter Binder führen. Eine präferentielle Selektion von Phagenantikörpern gegen ein bestimmtes Epitop oder Antigen trotz des komplexen Angebots auf der Zelloberfläche wurde bereits für andere Zellsysteme berichtet [Hoogenboom et al., 1999]. Um Zugang zu Binderpools mit erhöhter Diversität zu erhalten, werden veränderte Selektionsstrategien benötigt. Diese können z. B. die Verwendung anderer Endothelzellquellen (direkt isoliert aus Tumorgewebe [Hannum et al., 2001]), eine Veränderung der Kulturbedingungen (Hypoxie, Kokultur mit Tumorzellen) oder die Verwendung von Stimulationsprotokollen mit Tumormedium beinhalten. Die folgenden Experimente richteten als alternative Möglichkeit ihren Fokus auf die Entwicklung einer Selektionsmethode zur Isolierung internalisierender scFv-Phagen .

5.2 Selektion unter internalisierenden Bedingungen

Die Entwicklung therapeutischer Antikörper erfordert meistens neben der spezifischen Erkennung noch eine direkte oder indirekte Effektorfunktion. Direkte Effekte werden durch die alleinige Bindung der Antikörper verursacht, welche in Signaltransduktionswege eingreifen oder die Zellproliferation beeinflussen. Zelloberflächenspezifische Antikörper können z. B. wachstumshemmende Eigenschaften besitzen, wenn sie gegen Wachstumsfaktorrezeptoren gerichtet sind [Hicklin et al., 2001]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kopplung von Effektoren an Antikörper, welche der Antikörper dann als Zielsuchsystem an seinen Wirkort bringt [Allen, 2002]. Durch dieses sogenannte "*Targeting*" erhöht sich die effektive Konzentration z. B. von Immunotoxinen am Wirkort und reduziert so das Problem der Nebenwirkungen durch eine geringere systemische Konzentration im Vergleich zu einer systemisch applizierten therapeutischen Substanz.

Mit Hilfe der Phage Display Technik wurde in ersten Studien demonstriert, dass es möglich ist internalisierende Antikörper zu isolieren [Becerril et al., 1999; Poul et al., 2000]. Dabei wurden Zellselektionssysteme verwendet, die bekannte, internalisierende Antigene wie z. B. den EGF-Rezeptor überexprimieren. Robuste Methoden für eine direkte Selektion internalisierender Antikörper würden den Entdeckungsprozess deutlich gegenüber 2-Schritt Methoden beschleunigen, bei denen zuerst oberflächenbindende Antikörper gesucht werden, die danach auf die Eigenschaft der Internalisierung überprüft werden müssen. Neben einer Verstärkung des "*Targeting*"-Effekts sind internalisierende Antikörper hochinteressant für therapeutische Ansätze mit Immunotoxinen, Immunoliposomen oder Gentherapie. Bei diesen Ansätzen müssen die Antikörper-Effektor Fusionsproteine in die Zielzellen internalisiert werden, um ihre Wirkung zu entfalten [Nielsen and Marks, 2000; Völkel et al., 2004a]. Im folgenden wurde deshalb eine Methode zur Selektion unbekannter, endothelzellspezifischer internalisierender Antikörper entwickelt.

5.2.1 Internalisierungsselektion mit der monovalenten scFv-Phagenbibliothek

Die Internalisierungsselektion erfolgte zuerst analog zur Oberflächenselektion. Dabei wurden die HDMVEC mit der scFv-Phagenbibliothek und den Kompetitionszellen bei 4 °C zusammen inkubiert, und danach die ungebundenen sowie unspezifischen Phagenantikörper und die Kompetiti-

onszellen durch intensive Waschschriffe entfernt. Um die Bedingungen für eine Internalisierung zu schaffen, wurden die HDMVEC anschließend bei 37 °C inkubiert. Die nicht internalisierten, oberflächengebundenen scFv-Phagen wurden nun durch Einwirken eines Puffers mit pH 2,2 entfernt und die internalisierten scFv-Phagen anschließend durch Lyse der Zellen mit stark basischem Puffer zurückgewonnen.

Anhand der Titerentwicklung konnte zunächst keine Anreicherung festgestellt werden. Der Titer nahm erwartungsgemäß nach der ersten Selektionsrunde stark ab, sank allerdings auch nach der zweiten Runde weiter ab. Die Analyse der Phagenantikörper nach der zweiten Runde zeigte, dass mit 24 % HDMVEC-spezifischer scFv-Phagen von 184 getesteten Klonen ein im Vergleich zur Oberflächenselektion geringerer Anteil selektiert wurde. Vermutlich enthält die scFv-Phagenbibliothek deutlich weniger Phagenantikörper, die unter diesen stringenten Bedingungen effizient und spezifisch angereichert werden können.

Die histochemische Analyse zeigte, dass ein Großteil der HDMVEC-spezifischen scFv-Phagen keine Blutgefäße in Gewebeschnitten erkannte und nur wenige eine immunhistochemische Färbung ergaben. Diese scFv-Phagen zeigten eine sehr starke Bindung an Blutgefäße auf Gewebeschnitten aus der kolorektalen Lebermetastase, während Blutgefäße auf Schnitten der normalen Vorhaut nur schwach angefärbt wurden. Im Gegensatz dazu konnten keine Gefäße auf Gewebeschnitten aus dem Kolonkarzinom angefärbt werden. Mit dieser Selektion konnten demnach Antikörper isoliert werden, mit denen eine Unterscheidung tumorassoziiertes von gesunden Blutgefäßen möglich ist. Die Spezifität für tumorassoziierte Blutgefäße scheint dabei abhängig vom Ursprungsgewebe bzw. der Tumorumgebung zu sein. Die in der Selektion verwendeten mikrovaskulären Endothelzellen wurden unter proliferierenden Bedingungen kultiviert und mit Medium versorgt, welches pro-angiogene Wachstumsfaktoren (VEGF, FGF, EGF) enthielt. Die bevorzugte Erkennung von tumorassoziierten Gefäßen könnte somit auf die verstärkte Expression proliferationsabhängiger Oberflächenmarker zurückzuführen sein. Ähnliche Beobachtungen machte bereits die niederländische Gruppe um Ricardo Mutuberria mit primären Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) [Mutuberria et al., 2004]. Die HUVEC wurden mit Medium, welches angiogene Faktoren enthielt, oder Tumorzellüberständen aktiviert, um die Umgebung eines Tumors nachzuahmen. Auch Mutuberria et al. isolierten mit diesem Verfahren scFv-Phagen,

welche überwiegend Endothelien von Tumorgewebeschnitten erkannten. Die Differenzierung der tumorassoziierten Blutgefäße in den verschiedenen Geweben kann dabei mit einer unterschiedlichen Aktivierung durch die Tumore erklärt werden.

Die Sequenzierung ergab, dass die Diversität HDMVEC-spezifischer Klone bereits nach der zweiten Selektionsrunde auf eine Sequenz reduziert war. Schon der Zell-ELISA mit seinen im Vergleich zur Oberflächenselektion geringeren Bindungssignalen deutet auf eine ineffektivere Selektion hin. Um eine größere Auswahl unterschiedlicher Antikörper zu isolieren, müssten entweder mehrere hundert Klone aus der ersten Selektionsrunde getestet werden, oder die Selektionsbedingungen weniger stringent gewählt werden, indem z. B. die Anzahl der Waschschriffe reduziert wird.

Der selektierte Phagenantikörper wurde mit der indirekten Immunfluoreszenz auf Internalisierung untersucht. Internalisierte scFv-Phagen zeigen dabei meist eine punktförmige Verteilung wie sie beispielsweise bei Lokalisation in Endosomen vorkommt [Becerril et al., 1999]. Eine intrazelluläre Lokalisation mit punktförmigem Verteilungsmuster konnte im Fall der Positivkontrolle mit anti-CD31 Antikörper beobachtet werden konnte, wohingegen der selektierte scFv-Phagenklon jedoch keine intrazelluläre Lokalisation zeigte. Auch nach verschiedenen Inkubationszeiten von 30 min bis zu 16 h konnte keine Internalisierung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass unter den gewählten Bedingungen der Selektion immer noch Klone selektioniert werden, die spezifisch an die Oberfläche binden, aber nicht internalisiert werden. Demgegenüber konnten sich keine internalisierende Klone anreichern. Dies kann seine Ursache darin haben, dass i) die Entfernung der oberflächengebundenen Phagen nicht vollständig war und sich diese durch Amplifikation in Bakterien anreichern konnten, bzw. dass ii) das monovalente scFv-Phagenformat nicht für eine Internalisierung der Phagenantikörpern geeignet ist.

Mit der in dieser Selektion verwendeten monovalenten scFv-Phagenbibliothek wären zumindest Antikörper zu erwarten gewesen, die durch konstitutionell internalisierende Rezeptoren oder ligandeninduzierte Konformationsänderung und Aktivierung von Rezeptoren, internalisiert werden. In einigen Arbeiten zur Selektion von internalisierenden scFv-Phagen konnten auch Anti-

körper aus monovalenten Phagenbibliotheken gewonnen werden. Ein direkter Vergleich von Selektionen zur Isolierung von anti-ErbB2 Phagenantikörpern zeigte jedoch, dass eine wesentlich besserer Anreicherung von internalisierenden Antikörpern mit di- oder oligomeren Antikörperformaten erreicht werden kann [Becerril et al., 1999; Poul et al., 2000]. Die Aktivierung des Rezeptors kann dabei durch Oligomerisierung mit Hilfe multivalenter Liganden zustande kommen und eine effiziente Internalisierung ermöglichen. Deshalb wurde die monovalente HuPhab L3 scFv-Phagenbibliothek in ein multivalentes Format umgewandelt und für nachfolgende Selektionsexperimente verwendet.

5.2.2 Internalisierungsselektion mit der multivalenten scFv-Phagenbibliothek

Eine Variation des Internalisierungsprotokolls erfolgte durch Verwendung einer modifizierten scFv-Phagenbibliothek, bei der theoretisch fünf scFv-Molekülen pro Phage präsentiert werden [Rondot et al., 2001]. Mit dieser multivalenten Bibliothek sollte eine Oligomerisierung der Oberflächenmoleküle auf den Endothelzellen ermöglicht werden. Unter der Voraussetzung einer ausreichenden Antigendichte sollten die multivalenten scFv-Phagen mit einer höheren effektiven Affinität (Avidität) auf der Oberfläche binden und somit effizienter selektioniert werden können [Plückthun and Pack, 1997].

Da die scFv-Fragmente als Fusionsprotein mit dem pIII des Phagen vorlagen, und dieses Protein für die Infektion von Bakterien erforderlich ist [Kay et al., 1996], wurde zuerst der Einfluss der multivalenten scFv-Phagen auf die Infektiosität getestet. Schließlich kann es durch die Besetzung aller pIII Hüllproteine zu einem signifikanten Verlust der Phageninfektiosität durch Degradation kommen [Ivanenkov et al., 1999; Molenaar et al., 2002]. Die Besetzung aller pIII-Hüllproteine der HuPhab L3 Phagenbibliothek mit scFv hatte jedoch keinen störenden Effekte auf die Infektion von Bakterien, wie ein Vergleich der monovalenten mit der multivalenten scFv-Phagenbibliothek ergab. Auch mit anderen multivalenten scFv-Phagenbibliotheken konnte keine reduzierte Infektiosität festgestellt werden, dafür aber eine erhöhte Präsentationsrate der scFv auf der Phagenhülle [Rondot et al., 2001; Soltes et al., 2003].

Bereits die Titerentwicklung während den Selektionsrunden zeigt, dass die Internalisierungsselektion mit der multivalenten scFv-Bibliothek wesentlich effizienter abläuft, als die Oberflächenselektion oder die Internalisierungsselektion mit der monovalenten Bibliothek. Der Anreicherungsfaktor stieg bereits nach der zweiten Runde und vervierfachte sich noch einmal nach der dritten Runde. Die Daten aus den Zell-ELISA-Experimenten bestätigten eine höhere Ausbeute endothelzellspezifischer scFv-Phagen. Der Anteil HDMVEC-spezifischer scFv-Phagen lag bei 95 % und auch die Signalstärke war im Vergleich zu den vorhergehenden Selektionen um den Faktor zwei bis drei höher. Dieser Effekt kann auf die erhöhte Avidität zurückzuführen sein, welche mit dem multivalenten scFv-Format einhergeht [Becerril et al., 1999]. Dadurch werden während der Waschschrte weniger scFv-Phagen von den Zellen gelöst, und es kommt zu einem höheren Chemilumineszenzsignal.

Mit Hilfe eines automatischen Mikroskopiesystems konnte die Immunfluoreszenzmikroskopie im Mikrotiterplattenmaßstab durchgeführt werden. Auf diese Weise war es möglich, mit verhältnismäßig geringem Material- und Zeitaufwand jeweils 96 Klone gleichzeitig zu behandeln und von jedem Klon mehrere Bilder aufzunehmen. Ein Vergleich mit der Bindung auf den Kompetitionszellen (A375) zeigte die Spezifität der Zellerkennung an. Interessanterweise waren von den zuvor Zell-ELISA positiven scFv-Phagen lediglich 25 % der Klone HDMVEC-spezifisch. Diese Differenz ist nicht auf eine unspezifische Bindung an den Kompetitionszellen zurückzuführen, da die Signale in der Immunfluoreszenzmikroskopie und im Zell-ELISA die Bindung auf den A375 gleichermaßen negativ anzeigte. Jedoch konnte eine im Zell-ELISA ermittelte, HDMVEC-spezifische Bindung für viele scFv-Phagen mit der mikroskopischen Beobachtung nicht bestätigt werden. Eine Erklärung könnte in der unterschiedlichen Phagenpräparation für diese beiden Testsysteme liegen. Der Zell-ELISA diene zur schnellen Erkennung der HDMVEC-Spezifität. Hierfür wurden die scFv-Phagen direkt aus den Medienüberständen der produzierenden Bakterien verwendet. Die Medienüberstände können neben den scFv-Phagen noch bakterielle Proteine enthalten, die zu unspezifischen Reaktionen im ELISA führen können. Außerdem wird mit dem Zell-ELISA die Summe aller gebundenen scFv-Phagen im gemessenen Feld der Mikrotiterplatte gemessen. Dabei geben unspezifisch an die Platte gebundene Phagenantikörper ebenfalls ein Signal. Für die mikroskopischen Untersuchungen dagegen wurden die scFv-Phagen aus den Bakterienüberständen mit Hilfe der aufwendigeren Polyethylenglykol-Fällung präpariert und an-

gereichert. Die Qualität dieser Phagenpräparation ist deutlich besser und führt zu eindeutigeren Ergebnissen. In der Immunfluoreszenzmikroskopie können somit die unspezifischen Binder und Artefakte visuell erkannt und ausgeschlossen werden. Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mit einem automatischen Aufnahmesystem erlaubt also, bei ähnlich hohem Aufwand, eine zuverlässigere Aussage über die Spezifität der Klone, als dies mit dem Zell-ELISA möglich ist.

Anhand der Immunfluoreszenzaufnahmen konnte ein Bindungsprofil mit zwei verschiedenen Färbemustern auf der Zelloberfläche beobachtet werden. Eine Gruppe von Klonen zeigte eine randständige Konzentration der gebundenen scFv-Phagen, ähnlich der Verteilung des Adhäsionsmoleküls CD31. Die zweite Gruppe von Klonen zeigte eine punktuell über die Zelloberfläche verteilte Färbung. Die unterschiedliche Oberflächenverteilung der beiden Hauptgruppen sprach dafür, dass es sich um mindestens zwei verschiedene Antikörper handelt, die eine Erkennung von unterschiedlichen Antigenen auf den HDMVEC ermöglichen. Die DNA-Sequenzierung ergab eine Gruppeneinteilung in drei verschiedene Antikörper, bei der die Klone mit der randständigen Färbung zwei Sequenzgruppen bildeten. Diese beiden Untergruppen unterschieden sich in der Stärke ihre Zell-ELISA Signale. Es ist also anzunehmen, dass die scFv-Phagen mit der randständigen Oberflächenfärbung zwei unterschiedliche Epitope erkennen. Diese Epitope können auf ein und demselben Antigen oder auch auf verschiedenen Antigenen mit der gleichen subzellulären Lokalisation vorliegen. Der dritte scFv-Phage bindet ein weiteres Antigen mit einer anderen subzellulären Verteilung.

Trotz des wesentlich höheren Anteils endothelzellspezifischer scFv-Phagen im Vergleich zu den vorherigen Selektionen zeigte die DNA-Sequenzanalyse, dass nur drei verschiedene Klone isoliert werden konnten. Es ist möglich, dass es während der Selektion durch lysosomale Degradation teilweise zum Verlust der Infektiosität der internalisierten scFv-Phagen kommt [Ivanenkov et al., 1999; Molenaar et al., 2002]. Im Verlauf der Selektion setzen sich dann durch die anschließende Amplifikation in Bakterien entweder besonders effektiv internalisierende oder weniger sensitive scFv-Phagen durch, die ihrer Infektiosität nicht verlieren. Eine Möglichkeit, auch die durch eine potentielle Degradation verlorenen Phagen zurückzugewinnen, wurde von Burg et al. mit der rollenden Ring Amplifikation beschrieben und besteht in der Rückgewinnung der Phagemid DNA anstelle der kompletten Phagen [Burg et al., 2004].

Eine Internalisierung konnte für die drei isolierten scFv-Phagenklone mit der Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Die Vergleichsserie für die Inkubation bei 4 °C nach Entfernung der oberflächengebundenen Antikörper zeigte, dass die Färbung durch den FITC-gekoppelten Sekundäntikörper bei den scFv-Phagen nicht komplett verschwand. Der monoklonale Antikörper anti-CD31 hingegen ließ sich durch die Pufferbedingungen komplett von der Zelloberfläche lösen. Die selektierten scFv-Phagen scheinen bei 4 °C eine höhere Affinität zu ihrem entsprechenden Endothelzellantigen zu besitzen, oder sich durch die Pufferbedingungen schlechter wieder lösen zu lassen. Nach Inkubation bei 37 °C ließen sich die oberflächengebundenen scFv-Phagen wieder problemlos entfernen. Es konnte eine punktuelle, perinukleäre Verteilung detektiert werden. Dieses typische Bild für internalisierte Antikörper zeigte sich auch für die Kontrolle mit dem anti-CD31 Antikörper. Ein deutlicheres Bild der Internalisierung ergab sich durch die konfokale Laserscanningmikroskopie. Die optischen Schnitte durch die Zelle erlaubten eine klare Aussage zur intrazellulären Lokalisation der scFv-Phagen nach Internalisierung bei 37 °C. Außerdem konnte mit dieser Technik die verstärkt randständige Verteilung der scFv-Phagen verdeutlicht werden. Dies spricht dafür, dass es sich bei dem Antigen um ein Adhäsionsmolekül handeln könnte, welches ähnlich wie CD31 für Zell-Zellkontakte verantwortlich ist und deshalb an diesen Kontaktstellen konzentriert auftritt.

Internalisierende Antikörper sind die Voraussetzung für die Herstellung von Immuntoxinen [Carter, 2001]. Die isolierten Phagenantikörper wurden deshalb in einem Modellsystem mit sekundäntikörpergekoppeltem Saporin für eine potentielle Verwendung als Immunotoxin getestet. Dieses ribosomeninaktivierende Protein tötet die Zellen nach Internalisierung und Freisetzung ins Zytosol durch Inaktivierung der Proteinbiosynthese. Durch das sekundäntikörpergekoppelte Saporin entfällt die aufwendige Kopplung des Toxins an den Primäntikörper und ermöglichte so ein einfaches und schnelles Testen von internalisierenden Antikörpern.

Das Saporin konnte sehr gut durch die beiden monoklonalen Antikörper CD31 und CD105 in die Endothelzellen transportiert werden und dort seine toxische Wirkung entfalten. Jedoch konnte für keinen der hier getesteten scFv-Phagen-Saporinkomplexe ein toxischer Effekt in den HDMVEC nachgewiesen werden. Da die Internalisierung der freien scFv-Phagen in den vorhergehenden Experimenten eindeutig nachgewiesen war, sind die Gründe für die fehlende Toxizität in der

Bildung der Immunkomplexe oder deren Einfluss auf die Internalisierung zu suchen. Beispielsweise kann das Ergebnis durch eine fehlerhafte Komplexbildung interpretiert werden. Da der saporinegekoppelte Sekundärantikörper gegen primäre Mausantikörper gerichtet ist, musste im Fall der scFv-Phagen noch der anti-M13-Antikörper zwischengeschaltet werden. Im Gegensatz dazu konnte der saporinegekoppelte Antikörper direkt an die Positivkontrollen anti-CD31 und anti-CD105 binden. Wenn die Komplexbildung aus scFv-Phagen, anti-M13 und sekundärantikörpergekoppeltem Saporin nicht stabil genug ist, oder dieser Komplex zu groß für eine Internalisierung ist, kann kein toxischer Effekt nachgewiesen werden. Die Größe des Immunkomplexes könnte einen negativen Effekt auf die Internalisierung haben. So konnte z. B. gezeigt werden, dass anti-CD31-Konjugate mit Streptavidin ab einer Größe von 500 nm nicht mehr von primären Endothelzellen internalisiert werden [Wiewrodt et al., 2002]. Da die scFv-Phagen bereits größer als 900 nm sind könnte der Immunkomplex die kritische Größe für eine Internalisierung überschritten haben. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass das Saporin nach Internalisierung des Immunkomplexes nicht freigesetzt wird. Es kann schließlich je nach Antigen zu unterschiedlichen intrazellulären Transportwegen und Freisetzungen kommen, wie dies bereits mit sekundärantikörpergekoppelten Auristatin E-Konjugaten nachgewiesen wurde [Klussman et al., 2004]. Da kein entsprechender CD31- oder CD105-spezifischer scFv-Phage als Positivkontrolle zur Verfügung stand, ist nicht bekannt, ob das sekundärantikörpergekoppelte Saporin für die Testung der Phageninternalisierung geeignet ist.

Die weitere Charakterisierung der selektionierten Phagenantikörper mit Western Blot Analysen von HDMVEC-Lysaten zeigte, dass die scFv-Phagen der Oberflächenselektion und der Internalisierungsselektion mit der monovalenten Bibliothek weder in den reduzierten, noch in den nicht reduzierten Zell-Lysaten HDMVEC-spezifische Proteine erkannten. Diese scFv-Phagen zeigten lediglich eine unspezifische Kreuzreaktion mit einem Protein bei 100 kD, welches sowohl in den HDMVEC-Lysaten als auch den A375-Lysaten auftauchte. Auch bei den scFv-Phagen aus der Internalisierungsselektion mit der multivalenten Bibliothek trat diese unspezifische 100 kD Bande auf. Von den drei internalisierenden Phagenantikörpern war nur einer in der Lage ein Endothelzellspezifisches Protein zu erkennen. Die anderen Phagenantikörper sind offenbar nicht für Western Blot Experimente geeignet. Mit dem scFv-Phage E10 konnte eine endothelzellspezifische Proteinbande bei 250 kD detektiert werden, die ausschließlich in der nicht reduzierten

Zell-Lysatprobe auftrat. Das Vorhandensein der Disulfidbrücken hält das entsprechende Epitope offenbar in einer Konformation, die für eine Erkennung durch die scFv-Phagen notwendig ist.

5.3 Ausblick

Die hier entwickelten Protokolle für die Selektion endothelzellspezifischer scFv-Phagen bilden eine solide Basis für die Isolierung blutgefäßgerichteter Antikörper. Um eine größere Anzahl verschiedener Antikörper zu isolieren, kann die Selektion an verschiedenen Stellen verbessert werden. Variationen, z. B. durch gelockerte Waschbedingungen oder den Einsatz einer größeren und qualitativ höherwertigen Bibliothek mit höherer Diversität könnten zu einer größeren Auswahl endothelzellspezifischer Antikörper führen. Die Verwendung anderer Endothelzellquellen (direkt isoliert aus Tumorgewebe [Hannum et al., 2001]), Veränderung der Kulturbedingungen (Hypoxie, Kokultur mit Tumorzellen) oder Stimulationsprotokolle mit Tumormedium, könnten außerdem zu weiteren, tumorendothelzellspezifischen Antikörpern führen, die für antiangiogene-therapeutische Therapieansätze einsetzbar sind. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Testsystem für die automatische Immunfluoreszenzmikroskopie kann die Spezifität von selektierten Klonen zudem schnell für eine große Anzahl von Klonen festgestellt werden, wodurch die Überprüfung einzelner Selektionsrunden deutlich beschleunigt und erleichtert wird.

Desweiteren bietet die Internalisierungsselektion eine zusätzliche Quelle für neue Antikörper, die neben ihrer Bindungsspezifität eine biologische Funktion beinhalten. Dies bietet einen vielversprechenden Ansatz für die Bildung von Immuntoxinen für antiangiogene Therapien. Das getestete Modellsystem für Immuntoxine kann dabei mit löslichen scFv-Fragmenten oder nach Klonierung mit vollständigen Immunglobulinen weiterentwickelt werden.

Zukünftige Experimente werden sich verstärkt auf die Identifizierung der endothelzellspezifischen Antigene richten. Dazu können klassische Western Blot und Immunpräzipitationsverfahren mit anschließender Massenspektrometrie mit den selektierten Antikörpern eingesetzt werden. Wie bereits mit einigen in dieser Arbeit isolierten Phagenantikörpern gezeigt, kann es dabei zu Problemen in der Erkennung der Antigene in den Zell-Lysaten kommen. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, besteht die Möglichkeit, eine Expressionsbibliothek mit Endothelzell-cDNA

in Bakterien oder Säugerzellen zu erstellen und aus diesen mit Hilfe der vorhandenen Antikörper die spezifischen Zellklone anzureichern. Die darin enthaltenen kodierenden Sequenzen werden über PCR amplifiziert und können nach Sequenzierung über Datenbankvergleiche analysiert werden. Säugerzellbibliotheken bieten dabei den Vorteil der Präsentation des Antigens in einer natürlichen Umgebung, einschließlich posttranslationalen Modifikationen, sind aber in ihrer Diversität oft nur von begrenztem Umfang. Bakterielle Expressionsbibliotheken sind diverser, präsentieren die Proteine aber nicht zwangsläufig in nativ gefalteter Form. Die verschiedenen Ansätze sind zueinander komplementär und ermöglichen wahrscheinlich den Zugang zu unterschiedlichen Antigenen.