

Selektion endothelzellspezifischer Antikörper mittels Phage Display

— Dissertation —

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Schneider

2005

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von Mai 2002 bis Mai 2005 in der experimentellen Onkologie der Schering AG in Berlin durchgeführt. Die Dissertation wurde am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin eingereicht.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Donner
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke

Disputation am 04. November 2005

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Andreas Menrad, der mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt und mir immer aufmunternd zur Seite gestanden hat. Seine freundliche Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft gaben mir immer neue Anregungen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter Donner und Prof. Dr. Volker Haucke für die Begleitung der Arbeit und die Erstellung der Gutachten bedanken.

Für die fachliche Unterstützung während der experimentellen Durchführung möchte ich mich außerdem bei meinem Kollegen Dr. Yong-Jiang Cao, Dr. Jörg Willuda, Dr. Heike Petrul und Julia Eschenbrenner bedanken.

Die Arbeit im Labor wurde durch die freundschaftliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft vieler Mitarbeiter bei Schering erleichtert:

Doreen Lange, Kathrin Weidner, Stefan Stargard, Jörg Frauenschuh, Johanna Kaltenhäuser, Philip Denner, Stefan Prechtel, Olaf Schäfer, Alice Dittewig.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Funktion von Endothelzellen	1
1.1.1	Angiogenese	2
1.1.2	Tumorangiogenese	4
1.1.3	Antiangiogene Strategien	5
1.2	Phage Display	7
1.2.1	Phagenbiologie	8
1.2.2	Antikörper Phage Display	10
1.2.3	Antikörper Phage Display Bibliotheken	13
1.2.4	Selektionsverfahren	16
1.3	Aufgabenstellung	18
2	Material	19
2.1	Geräte und Kits	19
2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	19
2.3	Antikörper	20
2.4	Medien und Lösungen	21
2.5	Plasmide	22
2.6	Primer	22
2.7	Helferphagen und Antikörper-Fragment Phagenbibliotheken	22
2.8	Bakterienstämme und eukaryontische Zell-Linien	23
3	Methoden	24
3.1	Molekularbiologische Techniken	24
3.1.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	24
3.1.2	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i>	24
3.1.3	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	24
3.1.4	Restriktionsspaltung von DNA	25
3.1.5	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese	25
3.1.6	Sequenzierung	25

3.2	Phage Display Methoden	26
3.2.1	Anzucht der HuPhab L3 Bibliothek	26
3.2.2	Titerbestimmung	26
3.2.3	Phage Antikörper Selektionen	27
3.2.4	Infektion von TG1 und Titration der Phagen	28
3.2.5	Amplifikation, Rückgewinnung und Fällung der Phagen	29
3.2.6	Phagen-ELISA auf Zellen	29
3.2.7	Immunhistologie	30
3.2.8	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	31
3.3	Zellbiologische Techniken	32
3.3.1	Kultivierung der Zellen	32
3.3.2	Isolierung von Endothelzellen	33
3.3.3	Passagieren der Zellen	33
3.3.4	Biotinylieren von Zelloberflächen	34
3.3.5	Zytotoxizitätsassay mit saporinkoppeltem Sekundärantikörper	34
3.4	Proteinchemische Techniken	35
3.4.1	Zellaufschluss	35
3.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford	35
3.4.3	SDS-PAGE	35
3.4.4	Western Blot	36
3.4.5	Färben von Proteingelen	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Zelloberflächenselektion auf Endothelzellen	37
4.1.1	Identifikation HDMVEC-spezifischer scFv-Phagenklone	39
4.1.2	Immunohistochemische Untersuchung	41
4.1.3	Charakterisierung mittels Western Blot	44
4.2	Selektion auf Endothelzellen unter internalisierenden Bedingungen	45
4.3	Internalisierungsselektion mit einer monovalenten scFv-Phagenbibliothek	46
4.3.1	Identifikation HDMVEC-spezifischer scFv-Phagenklone	46

4.3.2	Untersuchung der Internalisierung	49
4.3.3	Charakterisierung mittels Western Blot	51
4.4	Internalisierungsselektion mit einer multivalenten scFv-Phagenbibliothek	52
4.4.1	Identifikation HDMVEC-spezifischer scFv-Phagenklone	53
4.4.2	Untersuchung der Internalisierung	56
4.4.3	Zytotoxizitätsassay mit saporinegekoppeltem Sekundärantikörper	59
4.4.4	Charakterisierung mittels Western Blot	61
5	Diskussion und Ausblick	63
5.1	Oberflächenselektion auf Endothelzellen	64
5.2	Selektion unter internalisierenden Bedingungen	67
5.2.1	Internalisierungsselektion mit der monovalenten scFv-Phagenbibliothek	67
5.2.2	Internalisierungsselektion mit der multivalenten scFv-Phagenbibliothek	70
5.3	Ausblick	75
	Zusammenfassung	77
	Summary	79
	Literatur	80
	Abkürzungen	90