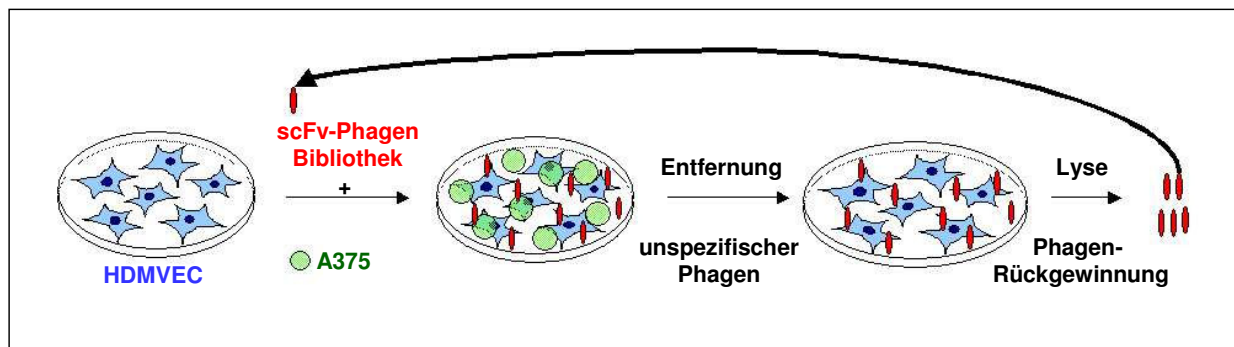


## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zelloberflächenselektion auf Endothelzellen

Eine erfolgreiche Anreicherung spezifischer Antikörperfragmente mittels Phage Display hängt von der verwendeten scFv-Phagenbibliothek, der Antigenquelle und der Selektionsmethode ab. Die folgenden Selektionen erfolgten mit der naiven, monovalenten, humanen scFv-Phagenbibliothek HuPhab L3. Als Zielzellen dienten primäre, humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMVEC), die subkonfluent und aktiviert mit Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. Das allgemeine Selektionsschema ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6:** SCHEMA DER OBERFLÄCHENSELEKTION. Für die Selektion wurde der Präinkubationsmix aus scFv-Phagenbibliothek und Konkurrenzzellen (A375) für 4 h bei 4 °C auf den HDMVEC inkubiert. Unspezifische scFv-Phagen sowie die Konkurrenzzellen wurden durch Waschschrte entfernt. Die HDMVEC-spezifischen scFv-Phagen wurden durch Lyse der Zellen zurückgewonnen und für die nächste Selektionsrunde oder nachfolgende Analysen verwendet.

Die Bibliothek wurde zur Depletion von scFv-Phagen gegen allgemeine Zelloberflächenmarker mit starkem Überschuss einer nicht endothelialen Melanomzell-Linie (A375) vorinkubiert, und dieser Präinkubationsmix anschließend bei 4 °C auf den HDMVEC inkubiert. Durch intensives Waschen wurden nicht gebundene, sowie unspezifisch auf den HDMVEC gebundene oder mit den Konkurrenzzellen assoziierte scFv-Phagen entfernt. Zur Rückgewinnung der endothelzellspezifischen scFv-Phagen wurden die Zellen unter basischen Bedingungen mit Triethylamin (TEA) lysiert und dadurch die Bindung der oberflächengebundenen scFv-Phagen gelöst.

Zum Austesten der Waschbedingungen wurden die scFv-Phagen nach den entsprechenden Waschschritten zur Infektion von empfangsbereiten TG-1 Bakterien eingesetzt. Die TG-1 Bakterien wurden durch Anzucht bei einer  $OD_{600}$  von 0,1 auf 0,5 in einen empfangsbereiten Zustand versetzt, bei dem sie ihren F-Pilus für die Infektion ausgebildet haben. Nach Infektion wurden die Bakterien ausplattiert und der Titer anhand der ampicillinresistenten Kolonien ermittelt. Die entsprechende Resistenz wurde durch das Phagemid vermittelt. Die Titration zeigte, dass nach 30 Waschschritten keine Phagen mehr detektierbar sind. Erst nach Ablösen zellgebundener scFv-Phagen mit TEA konnten wieder ampicillinresistente Kolonien gemessen werden (Tabelle 1). Für die folgenden Selektionen wurden die Waschbedingungen noch stringenter gehalten und auf 40 Waschschriffe erhöht, um eine möglichst hohe HDMVEC-Spezifität zu erhalten.

AUSTESTEN DER WASCHBEDINGUNGEN

| WASCHSCHRITT | PHAGENTITER<br>(cfu/ml) |
|--------------|-------------------------|
| 1            | $1,5 \times 10^5$       |
| 3            | $7,3 \times 10^3$       |
| 6            | $1,5 \times 10^3$       |
| 10           | $7,0 \times 10^2$       |
| 30           | -                       |
| TEA          | $1,6 \times 10^4$       |

**Tabelle 1:** STRINGENZ DER WASCHVORGÄNGE. Die optimalen Waschbedingungen wurden durch Titerermittlung der Phagen nach den einzelnen Waschschrritten ermittelt. Die Waschlösung mit den ungebundenen Phagen wurde zur Infektion von Bakterien eingesetzt, welche dann auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen wurden. Der Phagentiter wurde durch Auszählen der ampicillinresistenten Kolonien ermittelt und ist als koloniebildende Einheiten (cfu) angegeben. Nach 30 Waschschrritten sind keine Phagen mehr in der Waschlösung nachweisbar gewesen. Erst nach Ablösung der zellgebundenen scFv-Phagen mit TEA konnten wieder ampicillinresistente Kolonien ermittelt werden.

Mit den in der 1. Runde selektierten scFv-Phagen wurden Bakterien infiziert und diese auf großen Agarplatten verteilt, um eine klonale Vereinzelung zu erreichen. Die Phagemide wurden in den Bakterien amplifiziert und durch Helferphageninfektion konnten die entsprechenden

scFv-Phagen für die 2. Selektionsrunde gewonnen werden. Der Verlauf der Selektion kann anhand der Titerentwicklung verfolgt werden (Tabelle 2). Nach der ersten Selektionsrunde wurden ca. 3000 ampicillinresistente Kolonien erhalten. In der nachfolgenden 2. Runde blieb der Titer mit 4300 Kolonien in der gleichen Größenordnung. Da sich mit zunehmenden Selektionsrunden einige wenige Binder anreichern und dadurch die Diversität des selektierten scFv-Phagenpools stark abnimmt wurden nach der 2. Runde Klone gepickt und auf ihre Bindungsspezifität überprüft.

#### ENTWICKLUNG DER OBERFLÄCHENSELEKTION

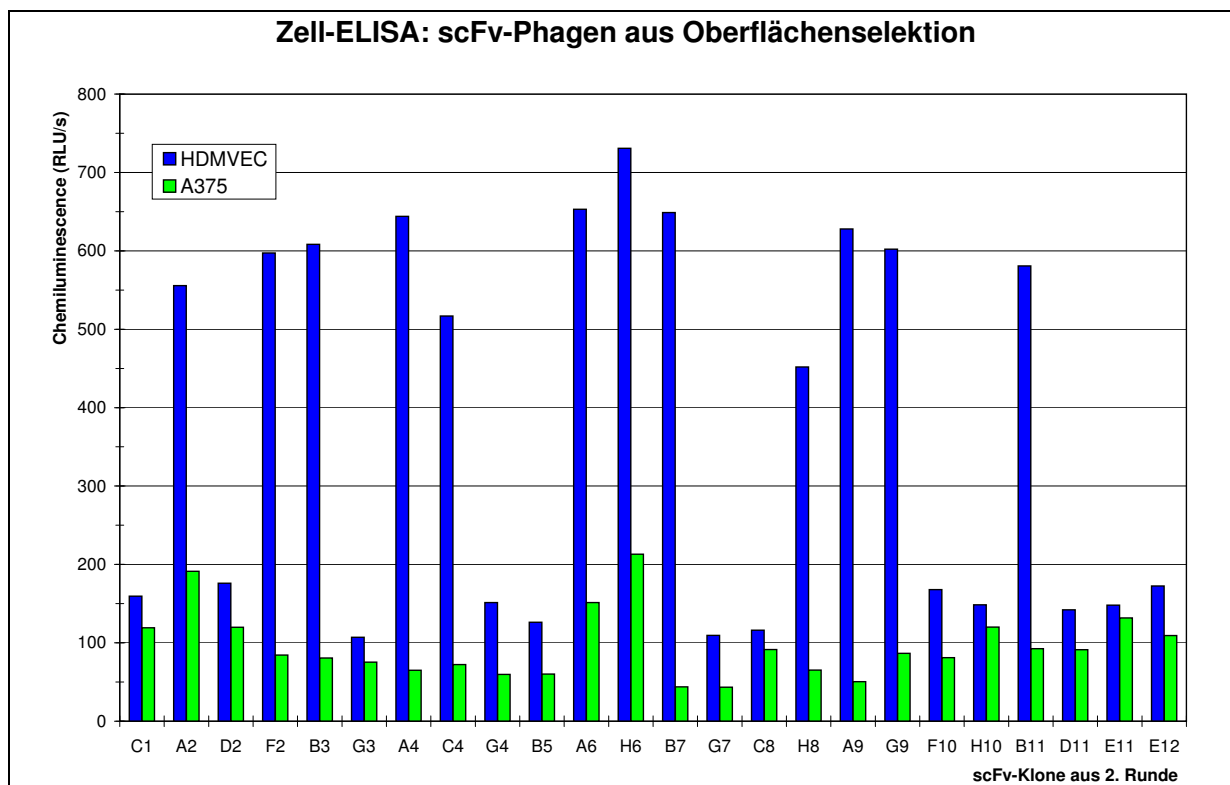
|          | EINGANGSTITER<br>(cfu/ml) | AUSGANGSTITER<br>(cfu/ml) | VERHÄLTNIS<br>AUSGANG/EINGANG | ANREICHERUNG         |
|----------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|----------------------|
| 1. Runde | $1,5 \times 10^{11}$      | $3,3 \times 10^3$         | $2,2 \times 10^{-8}$          | -                    |
| 2. Runde | $5,9 \times 10^{13}$      | $4,3 \times 10^3$         | $7,29 \times 10^{-11}$        | $3,3 \times 10^{-3}$ |

**Tabelle 2:** TITERBESTIMMUNG. Nach der entsprechenden Selektionsrunde wurde die Elutionslösung mit den isolierten Phagen zur Infektion von Bakterien eingesetzt, welche dann auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen wurden. Der Phagentiter wurde durch Auszählen der ampicillinresistenten Kolonien ermittelt und ist als koloniebildende Einheiten (cfu) angegeben. Die Phagentiter vor (Eingang) und nach (Ausgang) der Selektion sind als koloniebildende Einheiten (cfu) angegeben. Die Anreicherung ergibt sich aus dem Verhältnis Ausgang/Eingang (n. Runde)/Verhältnis Ausgang/Eingang (1. Runde)

#### 4.1.1 Identifikation HDMVEC-spezifischer scFv-Phagenklone

Die Endothelzellspezifität wurde nach zwei Selektionsrunden im Zell-ELISA getestet. Dafür wurden Bakterienklone von den Agarplatten der Selektion auf Masterplatten in 96-Lochplatten übertragen und von diesen Platten Kopien für die Phagenanzucht erzeugt. Die phagemidenthaltenen Bakterienklone wurden durch Infektion mit Helferphagen zur scFv-Phagenproduktion gebracht und die scFv-Phagen enthaltenen Bakterienüberstände für den ELISA auf HDMVEC und zur Kontrolle auf A375 eingesetzt. Die Zellen wurden nicht fixiert, um eine möglichst native Präsentation der Zelloberflächenproteine für die scFv-Phagen zu gewährleisten. Die Zellen wurden zuvor in Mikrotiterplatten angezogen und unspezifische Bindungsstellen mit MB-PBS abgesät-

tigt. Nach Phageninkubation auf den Zellen erfolgte der Nachweis mit anti-M13-HRP und Zugabe von Chemilumineszenzsubstrat und Detektion des Signals im Luminometer (Abbildung 7). Als endothelzellspezifisch wurden alle scFv-Klone gezählt, für die ein ELISA-Signal gemessen wurde, welches im Vergleich zu den Kontrollzellen (A375) 3x stärker war. Es zeigte sich, dass nach zwei Selektionsrunden von 184 getesteten scFv-Klonen 46 % HDMVEC-spezifisch sind, bei denen keine signifikante Bindung auf den Konkurrenzellen vorhanden war.

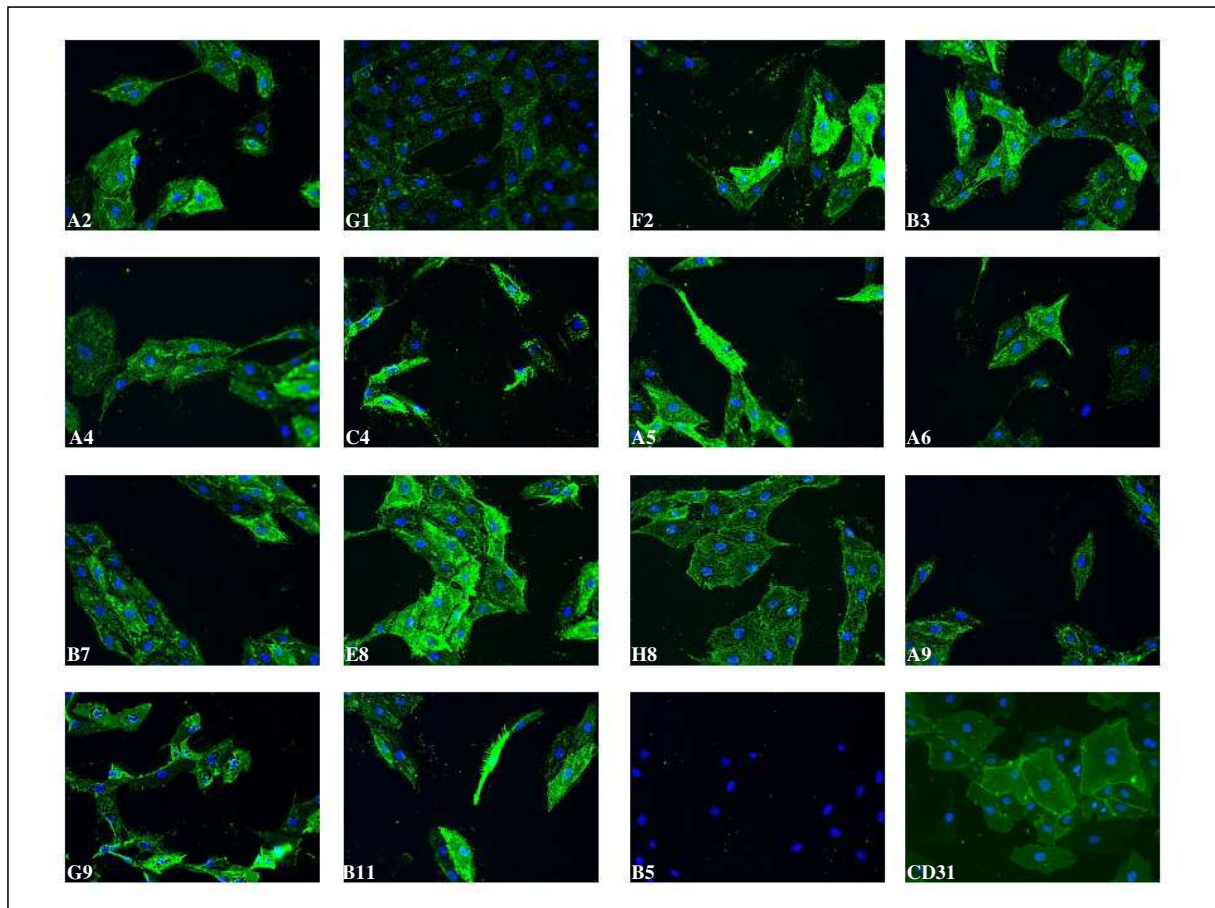


**Abbildung 7:** BINDUNGSSPEZIFITÄT DER SCFV-PHAGEN AUS DER OBERFLÄCHENSELEKTION. Nach der 2. Selektionsrunde der Oberflächenselektion auf HDMVEC mit der monovalenten scFv-Phagenbibliothek wurden 184 Klone gepickt und daraus die scFv-Phagen präpariert. Die Zellspezifität der selektierten scFv-Phagen wurde im ELISA auf HDMVEC und der Kontrollzell-Linie A375 getestet. Die Bindung der selektierten scFv-Phagen wurde mit anti-M13-HRP Antikörper nachgewiesen. Nach zwei Selektionsrunden waren 46 % der getesteten Klone HDMVEC-spezifisch (hier eine Auswahl von 24 Klonen).

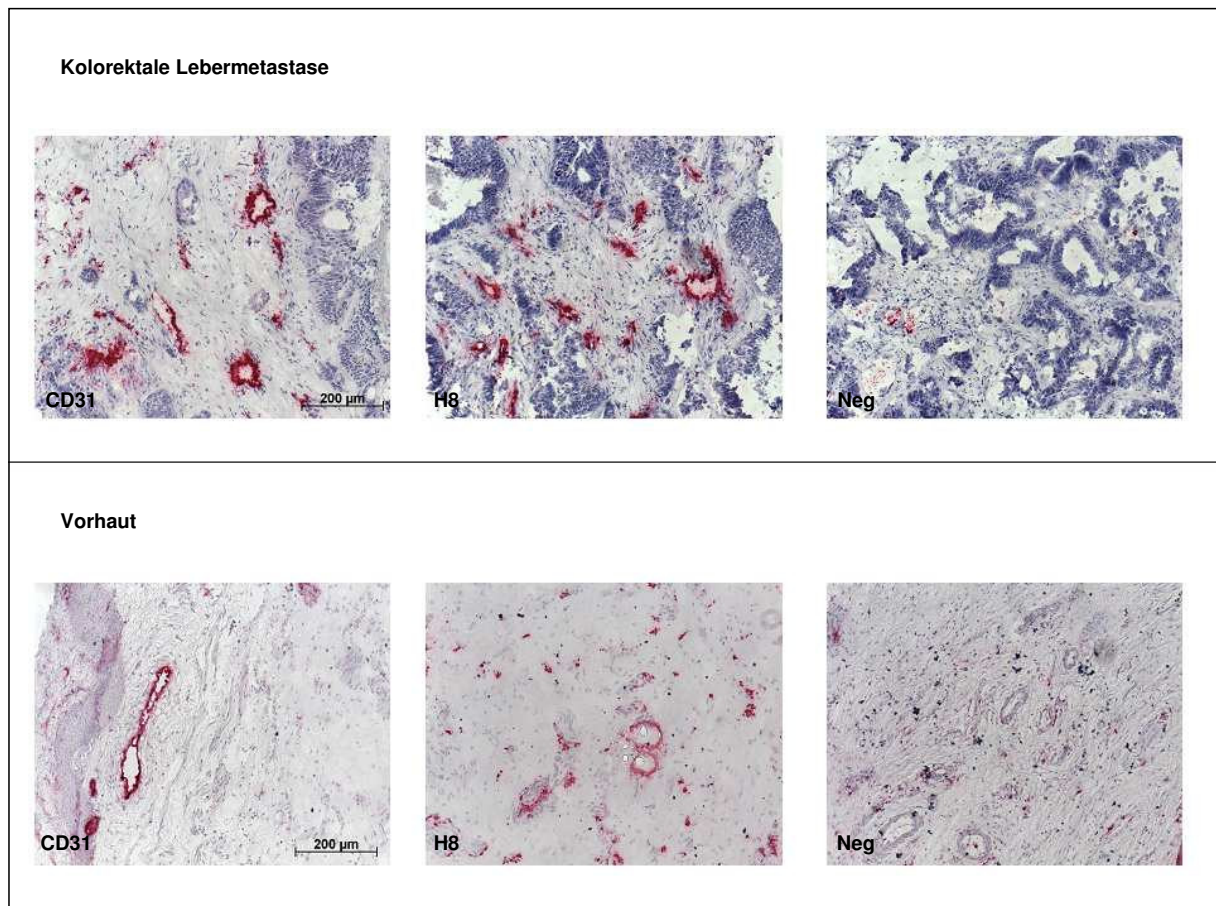
Zur Beurteilung der Vielfalt sowie der morphologischen Analyse der Oberflächenbindung wurden die scFv-Phagen mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die scFv-Phagen wurden hierfür aus einer Induktionskultur mittels PEG-Fällung gewonnen und analog zum Zell-ELISA auf unfixierten HDMVEC inkubiert. Die Detektion der oberflächengebundenen scFv-Phagen erfolgte mit primärem anti-M13 und sekundärem, FITC-gekoppeltem Antikörper. Eine DAPI-Färbung zeigt die Zellkerne an (Abbildung 8). Der Großteil der ELISA-positiven scFv-Phagen einer Masterplatte (39 %) bestätigte auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie die HDMVEC-spezifische Bindung. Das Bindungsverhalten der scFv-Phagen zeigte eine homogene Oberflächenverteilung auf den HDMVEC. Die Sequenzierung ergab, dass es sich bei allen scFv-Phagen, die sowohl im Zell-ELISA als auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie HDMVEC-spezifisch waren, um den gleichen Klon handelt.

#### **4.1.2 Immunohistochemische Untersuchung**

Zur Bestätigung der Blutgefäßspezifität und genaueren Charakterisierung des HDMVEC-bindenden scFv-Phagenklons wurde dessen Erkennung von Gefäßen auf Gewebeschnitten untersucht (Abbildung 9). Da die Selektion auf proliferierenden HDMVEC durchgeführt wurden, erfolgte ein Vergleich der Bindung auf ruhenden (Normalgewebe) mit proliferierenden (Tumorgewebe) Gefäßen. Der scFv-Phagenklon wurde nach Produktion in Bakterien mit Polyethylenglykol gefällt und auf fixierten Gewebeschnitten inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit anti-M13 Antikörper wobei die Detektion über ein Biotin-Streptavidin-System mit alkalischer Phosphatase erfolgte. Durch die Entwicklung mit Substrat und Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Gefäße rot und die Kerne blau angefärbt. Der selektierte scFv-Phagenklon erkannte sowohl Blutgefäße aus Normal- (Vorhaut) und Tumorgewebe (kolorektale Lebermetastase).



**Abbildung 8:** MORPHOLOGISCHES BINDUNGSVERHALTEN DER scFv-PHAGEN AUS DER OBERFLÄCHENSELEKTION. Aus der 2. Selektionsrunde der Oberflächenselektion auf HDMVEC mit der monovalenten scFv-Phagenbibliothek wurden 92 scFv-Phagenklone mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Das Bindungsverhalten der selektierten scFv-Phagen wurde mit Maus-anti-M13 Antikörper und anti-Maus-FITC-konjugiertem Antikörper (grün) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Bei 39 % war eine HDMVEC-spezifische, homogene Zellfärbung erkennbar (Dargestellt ist eine Auswahl von 14 Klonen). Zur Kontrolle ist die Färbung mit einem Negativklon (B5) gezeigt, mit dem auch kein ELISA-Signal auf den HDMVEC messbar war, sowie der monoklonale Antikörper gegen CD31, der eine verstärkte Verteilung an den Zell-Zellkontakten aufweist.



**Abbildung 9:** IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE AUF TUMORGEWEBE UND NORMALGEWEBE. Der ELISA- und Immunfluoreszenz-positive scFv-Phagenklon H8 aus der Oberflächenselektion wurden auf Kryogewebeschnitten von kolorektaler Lebermetastase und normaler Vorhaut getestet. Zur Kontrolle ist ein unspezifischer scFv-Klon (Neg.) sowie der endothelzellspezifische Antikörper gegen CD31 gezeigt. Die Phagen wurden mittels Maus-anti-M13 Antikörper detektiert und nachfolgend über ein System aus anti-Maus-Biotin–Streptavidin gekoppelt an alkalische Phosphatase nachgewiesen. Eine gefäßspezifische Bindung ist an der roten Färbung im Vergleich mit der Positivkontrolle (anti-CD31) zu erkennen.

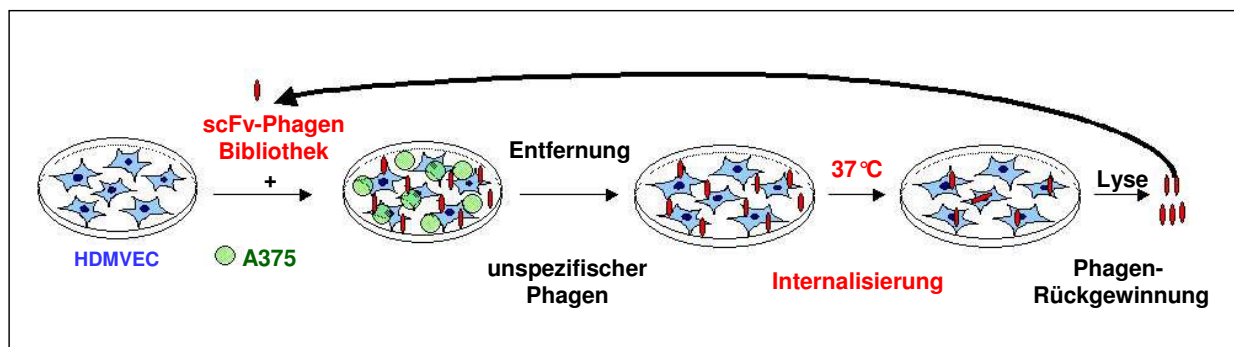
### 4.1.3 Charakterisierung mittels Western Blot

Der gefäßspezifische scFv-Phagenklon H8 wurde im Western Blot auf HDMVEC-Lysaten getestet. Dafür wurden Zell-Lysate von HDMVEC durch Lysepuffer mit 1 % Triton X-100 hergestellt und in reduzierendem (mit  $\beta$ -Mercaptoethanol) und nicht reduzierendem Probenpuffer aufgenommen. Von den Lysaten wurden je 30  $\mu\text{g}$  Protein pro Tasche auf 4-12 % SDS-Gelen elektrophoretisch getrennt und nach transferieren auf Nitrozellulosemembran ein Western Blot mit den scFv-Phagen als Primärantikörper durchgeführt. Weder in dem nicht reduzierten noch in dem reduzierten Lysat konnten HDMVEC-spezifische Banden nachgewiesen werden.



## 4.2 Selektion auf Endothelzellen unter internalisierenden Bedingungen

Als Erweiterung der Selektion auf Endothelzellen zur Identifikation von zelloberflächenspezifischen scFv-Phagen wurde ein Protokoll zur Anreicherung von scFv-Phagen entwickelt, welche nach Bindung an ein endothelzellspezifisches Oberflächenmolekül internalisiert werden (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** SCHEMA DER INTERNALISIERUNGSSELEKTION. Für die Selektion unter internalisierenden Bedingungen wurde der Präinkubationsmix aus scFv-Phagenbibliothek und Konkurrenzzellen (A375) bei 4 °C auf den HDMVEC inkubiert. Unspezifische scFv-Phagen sowie die Konkurrenzzellen wurden durch Waschschriffe entfernt. Die Zellen wurden für die Internalisierung bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung oberflächengebundener Phagen wurden die potentiell internalisierten scFv-Phagen durch Lyse der Zellen zurückgewonnen und für die nächste Selektionsrunde oder nachfolgende Analysen verwendet.

Das Protokoll verläuft analog zur Oberflächenselektion, bei der die scFv-Phagenbibliothek mit den Konkurrenzzellen bei 4 °C vorinkubiert und dann zusammen auf den HDMVEC bei 4 °C inkubiert wurden. Nach Entfernung der unspezifischen Binder wurden die HDMVEC mit den oberflächengebundenen scFv-Phagen jedoch zur Ermöglichung der Internalisierung bei 37 °C inkubiert. Die nicht internalisierten scFv-Phagen wurden nun durch einen Puffer mit niedrigem pH gelöst und durch Waschschriffe entfernt. Durch Lyse der Zellen konnten anschließend die endozytierten scFv-Phagen zurückgewonnen werden.

### 4.3 Internalisierungsselektion mit einer monovalenten scFv-Phagenbibliothek

Die Selektion unter internalisierenden Bedingungen erfolgte mit der monovalenten scFv-Phagenbibliothek, die auch für die Oberflächenselektion verwendet wurde (Abbildung 10). Die Titerentwicklung zeigte, dass nach der 1. Selektionsrunde etwa fünf Millionen ampicillinresistente Kolonien erhalten wurden. In die 2. Runde wurden durch Amplifikation der angereicherten scFv-Phagen ein ca. 10-fach höherer Eingangstiter eingesetzt. Auf den Agarplatten ließen sich jedoch nur noch  $6,1 \times 10^5$  ampicillinresistente Kolonien zählen.

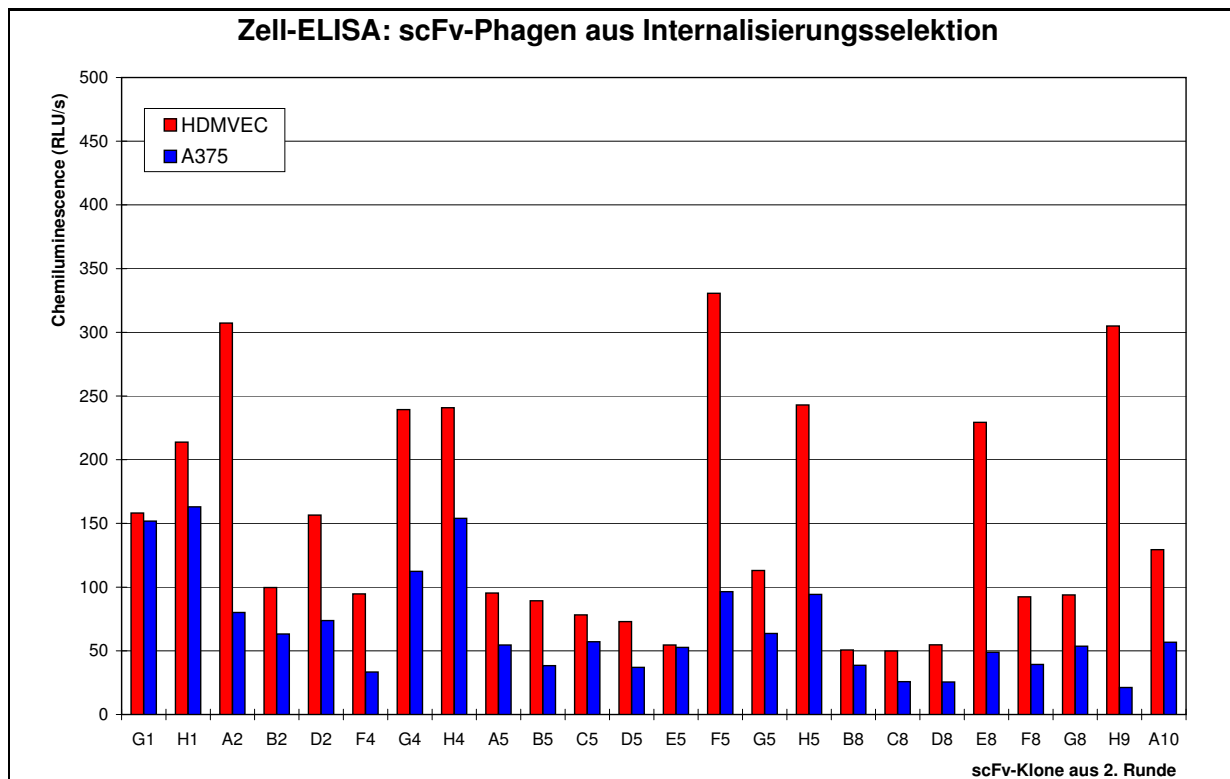
#### ENTWICKLUNG DER SELEKTION UNTER INTERNALISIERENDER BEDINGUNG

|          | EINGANGSTITER<br>(cfu/ml) | AUSGANGSTITER<br>(cfu/ml) | VERHÄLTNIS<br>AUSGANG/EINGANG | ANREICHERUNG         |
|----------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|----------------------|
| 1. Runde | $1,5 \times 10^{11}$      | $5,0 \times 10^6$         | $3,3 \times 10^{-5}$          | -                    |
| 2. Runde | $2,3 \times 10^{12}$      | $6,1 \times 10^5$         | $2,7 \times 10^{-7}$          | $8,0 \times 10^{-3}$ |

**Tabelle 3:** TITERBESTIMMUNG. Nach der entsprechenden Selektionsrunde wurde die Elutionslösung mit den isolierten Phagen zur Infektion von Bakterien eingesetzt, welche dann auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen wurden. Der Phagentiter wurde durch Auszählen der ampicillinresistenten Kolonien ermittelt und ist als koloniebildende Einheiten (cfu) angegeben. Die Phagentiter vor (Eingang) und nach (Ausgang) der Selektion sind als koloniebildende Einheiten (cfu) angegeben. Die Anreicherung ergibt sich aus dem Verhältnis Ausgang/Eingang (n. Runde)/Verhältnis Ausgang/Eingang (1. Runde)

#### 4.3.1 Identifikation HDMVEC-spezifischer scFv-Phagenklone

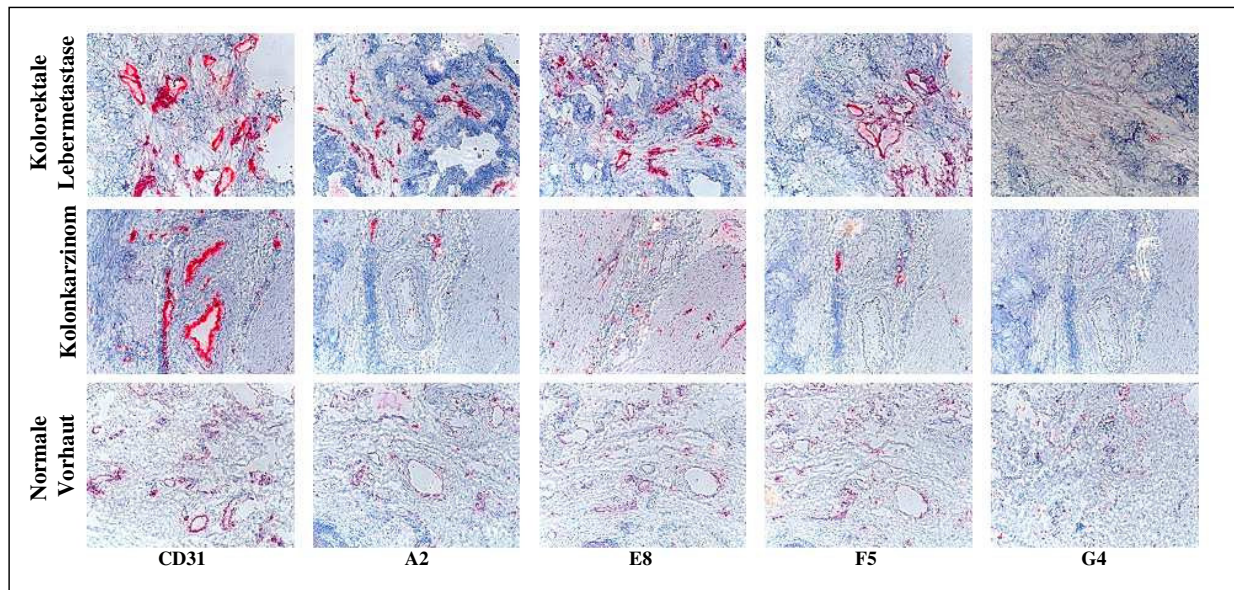
Zur Untersuchung der Bindungsspezifität wurden die scFv-Klone mittels Zell-ELISA auf HDMVEC und A375 getestet. Aus der 2. Selektionsrunde wurden scFv-Phagenklone in Bakterien produziert und aus dem Medienüberstand auf den Zellen inkubiert. Die gebundenen Phagen wurden mittels anti-M13-HRP nachgewiesen und die Menge gebundener scFv-Phagen anhand des Chemilumineszenzsignals im Luminometer gemessen. Als HDMVEC-spezifisch wurden alle Klone gezählt, die ein 2-fach stärkeres Signal über Hintergrund und A375 besaßen.



**Abbildung 11:** BINDUNGSSPEZIFITÄT VON SCFV-PHAGEN AUS DER INTERNALISIERUNGSSELEKTION. Nach der 2. Selektionsrunde auf HDMVEC unter internalisierenden Bedingungen mit der monovalenten scFv-Phagenbibliothek wurden 184 Klone gepickt und daraus die scFv-Phagen präpariert. Die Zellspezifität der selektierten scFv-Phagen wurde im ELISA auf HDMVEC und der Kontrollzell-Linie A375 getestet und die Bindung der selektierten scFv-Phagen mit anti-M13-HRP Antikörper nachgewiesen. Nach zwei Selektionsrunden waren 24 % der getesteten Klone HDMVEC-spezifisch (hier eine Auswahl von 24 Klone).

Der Zell-ELISA zeigte, dass nach der 2. Selektionsrunde trotz der geringen Anreicherung eine Endothelzellspezifität von 25 % gegenüber den Konkurrenzellen vorherrscht. Um diese Spezifität zu überprüfen wurden die HDMVEC-positiven Klone in der Immunhistochemie analysiert. Dabei wurde die Bindungsfähigkeit auf Blutgefäßen in Normalgewebe und Tumorgewebe miteinander verglichen. Es zeigte sich eine präferentielle Bindung der scFv-Phagen auf Blutgefäßen aus Tumorgewebe gegenüber Normalgewebe. Interessanterweise erkannte keiner der Klone Gefäße in Gewebeschnitte vom Kolonkarzinom, sondern ausschließlich von kolorektaler Lebermetastase.

Die scFv-Klone wurden durch Sequenzierung weiter analysiert um die Zahl der einzigartigen Antikörper zu bestimmen. Die drei interessanten scFv-Klone (A2, F5, E8), welche in den verschiedenen Testsystemen eine Endothelzellspezifität zeigten, besaßen die gleiche Sequenz, die jedoch nicht identisch mit der Sequenz aus der Oberflächenselektion ist.

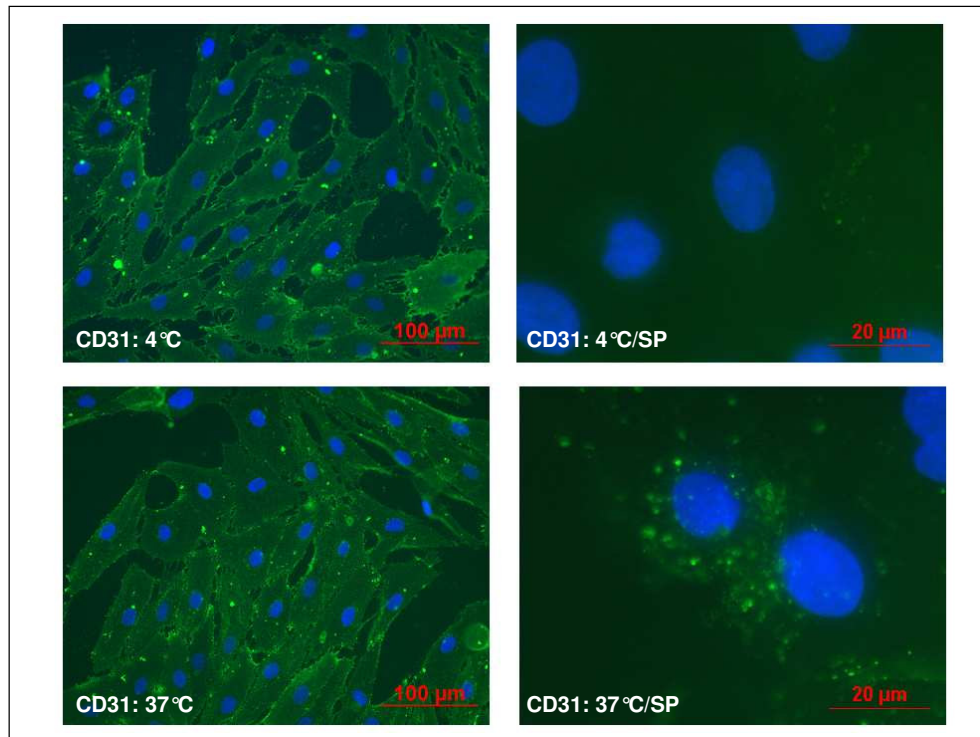


**Abbildung 12:** IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE AUF TUMORGeweBE UND NORMALGeweBE. ELISA-positive scFv-Phagenklone wurden auf Gewebeschnitte von kolorektaler Lebermetastase, Kolonkarzinom und normaler Vorhaut getestet. Zur Kontrolle ist ein unspezifischer scFv-Klon (G4) sowie der endothelzellspezifische Antikörper gegen CD31 gezeigt. Die Phagen wurden mittels Maus-anti-M13 Antikörper detektiert und nachfolgend über ein System aus anti-Maus-Biotin–Streptavidin gekoppelt an alkalische Phosphatase nachgewiesen. Eine gefäßspezifische Bindung ist an der roten Färbung im Vergleich mit der Positivkontrolle (anti-CD31) zu erkennen. Alle Klone erkennen die Blutgefäße des Tumorgewebes, während keiner die Blutgefäße im Kolonkarzinom anfärbt. Die Gefäße des Normalgewebes wurden nur äußerst schwach angefärbt.

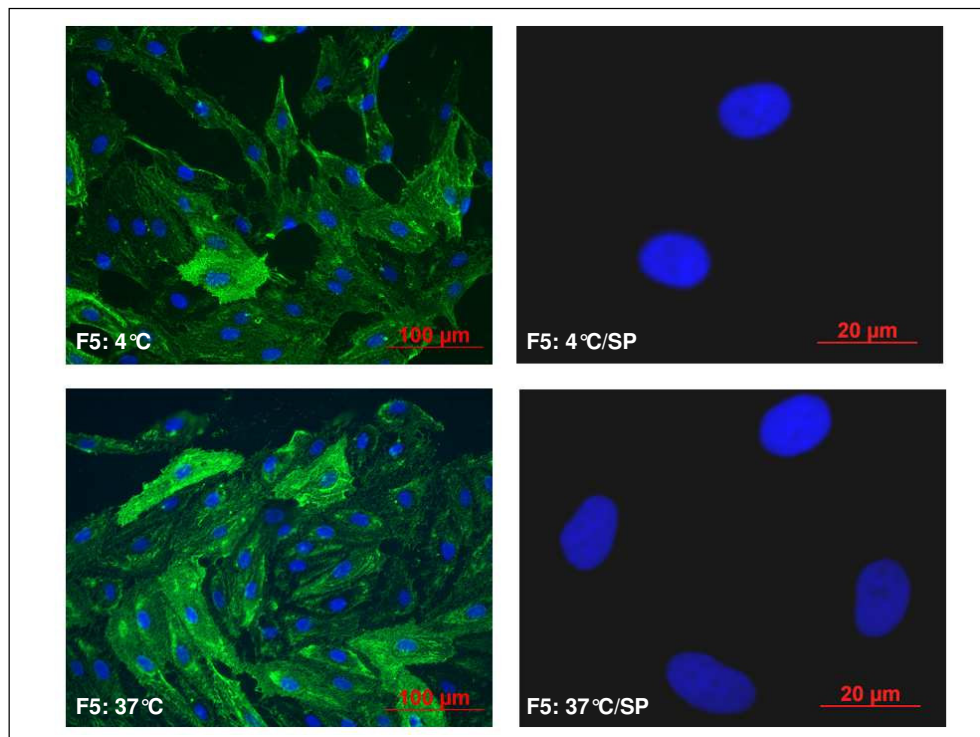
### 4.3.2 Untersuchung der Internalisierung

Der Nachweis, ob der selektierte Antikörper von den HDMVEC internalisiert wird, wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz unternommen (Abbildung 13). Die Analyse basiert darauf, dass der Prozess der Internalisierung durch Zellen nur bei physiologischen Temperaturen, also um die 37 °C, ablaufen kann. Die Zellen wurden in vier Ansätze ausgesät, von denen zwei komplett bei 4 °C gehalten wurden und zwei einem Internalisierungsschritt bei 37 °C unterworfen wurden. Die initiale Bindung des scFv-Phagen F5 fand in allen Ansätzen bei 4 °C statt. Es folgte nun eine Inkubation bei 37 °C um die Internalisierung der gebundenen scFv-Phagen zu ermöglichen bzw. zur Kontrolle bei 4 °C. Je ein Ansatz bei jeder Temperatur wurde einer Stripingprozedur (S) unterworfen, bei der ein Puffer mit niedrigem pH die oberflächengebundenen scFv-Phagen entfernt. Nach Fixierung der Zellen wurden die Zellen mit Triton X-100-Puffer permeabilisiert (P), um eine Detektion internalisierter scFv-Phagen mit anti-M13 und FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper zu ermöglichen. Die Oberflächenfärbung mit anti-CD31 und scFv-F5 ist bei beiden Temperaturen gut zu erkennen. Diese Oberflächenfärbung verschwindet nach Behandlung der Zellen mit Puffer pH 2,8. Allerdings konnte mit anti-CD31-Antikörper bei 37 °C eine punktförmige Verteilung gezeigt werden, wie sie typischerweise für Endosomen auftritt. Mit dem scFv-F5 konnte keine intrazelluläre Färbung gezeigt werden, so dass dieser Antikörper offenbar nicht internalisiert wurde. Auch nach unterschiedlichen Inkubationszeiten von 30 min bis 16 h ließ sich keine Internalisierung nachweisen.

**Abbildung 13:** SUBZELLULÄRE LOKALISATION DES SCFV-PHAGEN F5 NACH INTERNALISIERUNG. Der scFv-Klon F5 wurde unter internalisierenden Bedingungen mit der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Die Detektion erfolgte mit FITC-markiertem 2. Antikörper (grün). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt. **(a)** Kontrolle mit anti-CD31, **(b)** scFv-Phage F5. Bei beiden Temperaturen wurde eine Behandlung (Strippen und Permeabilisieren) zur Entfernung der oberflächengebundenen Antikörper durchgeführt (SP). Mit anti-CD31 ist sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C die Oberflächenfärbung erkennbar. Nach Entfernung (SP) der oberflächengebundenen Antikörper ist nur noch bei 37 °C eine punktierte Verteilung erkennbar. Mit dem scFv-Phagen F5 kann man ebenfalls die Oberflächenfärbung bei 4 °C und 37 °C erkennen. Nach Entfernung der oberflächengebundenen Phagen verschwindet die Färbung in beiden Fällen und es ist keine intrazelluläre Lokalisation bei 37 °C erkennbar.



(a) CD31



(b) scFv-Phage F5

**Abbildung 13:** SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON scFV-PHAGE F5 NACH INTERNALISIERUNG.

### 4.3.3 Charakterisierung mittels Western Blot

Der gefäßspezifische scFv-Phagenklon H8 wurde im Western Blot auf HDMVEC-Lysaten getestet. Dafür wurden Zell-Lysate von HDMVEC durch Lysepuffer mit 1 % Triton X-100 hergestellt und in reduzierendem (mit  $\beta$ -Mercaptoethanol) und nicht reduzierendem Probenpuffer aufgenommen. Von den Lysaten wurden je 30  $\mu\text{g}$  Protein pro Tasche auf 4-12 % SDS-Gelen elektrophoretisch getrennt und nach transferieren auf Nitrozellulosemembran ein Western Blot mit den scFv-Phagen als Primärantikörper durchgeführt. Weder in den reduzierten noch in den nicht reduzierten Lysaten konnten HDMVEC-spezifische Proteinbanden nachgewiesen werden.

#### 4.4 Internalisierungsselektion mit einer multivalenten scFv-Phagenbibliothek

Für die Selektion mit multivalenten scFv-Phagen wurde die HuPhab L3 Bibliothek mit Hilfe von Hyperphagen in ein multivalentes Antikörperformat überführt. Der Titer dieser Bibliothek wurde mit  $9,2 \times 10^{12}$  cfu/ml ermittelt. Da auf dieser multivalenten Bibliothek jedes pIII-Protein als Fusionsprotein mit dem scFv vorliegt, wurde zuerst überprüft ob sich, z. B. durch sterische Hinderung durch die scFv beim Andocken an den F-Pilus, eine verminderte Infektiosität ergibt. Bei Infektion mit scFv-Phagen mit monovalenten im Vergleich zum multivalenten Format ließ sich kein Einfluss auf die Infektion feststellen. Der Titer der infizierten Bakterien lag bei beiden scFv-Formaten in der gleichen Größenordnung.

Die Selektion mit der multivalenten HuPhab L3 Bibliothek auf den Endothelzellen lief analog zur Selektion mit der monovalenten Bibliothek ab. Die Anreicherung wurde durch Ermittlung der Titer verfolgt (Tabelle 4). Bereits nach der zweiten Runde ergab sich ein Anreicherungsfaktor von 15, der sich nach drei Selektionsrunden auf 58 steigerte.

##### ENTWICKLUNG DER SELEKTION UNTER INTERNALISIERENDER BEDINGUNG

|          | EINGANGSTITER<br>(cfu/ml) | AUSGANGSTITER<br>(cfu/ml) | VERHÄLTNIS<br>AUSGANG/EINGANG | ANREICHERUNG |
|----------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------|
| 1. Runde | $9,2 \times 10^{12}$      | $3,5 \times 10^4$         | $3,8 \times 10^{-9}$          | -            |
| 2. Runde | $2,7 \times 10^{12}$      | $1,5 \times 10^5$         | $5,6 \times 10^{-8}$          | 15           |
| 3. Runde | $7,7 \times 10^{12}$      | $1,7 \times 10^6$         | $2,2 \times 10^{-7}$          | 58           |

**Tabelle 4:** TITERBESTIMMUNG. Nach der entsprechenden Selektionsrunde wurde die Elutionslösung mit den isolierten Phagen zur Infektion von Bakterien eingesetzt, welche dann auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen wurden. Der Phagentiter wurde durch Auszählen der ampicillinresistenten Kolonien ermittelt und ist als koloniebildende Einheiten (cfu) angegeben. Die Phagentiter vor (Eingang) und nach (Ausgang) der Selektion sind als koloniebildende Einheiten (cfu) angegeben. Die Anreicherung ergibt sich aus dem Verhältnis Ausgang/Eingang (n. Runde)/Verhältnis Ausgang/Eingang (1. Runde)

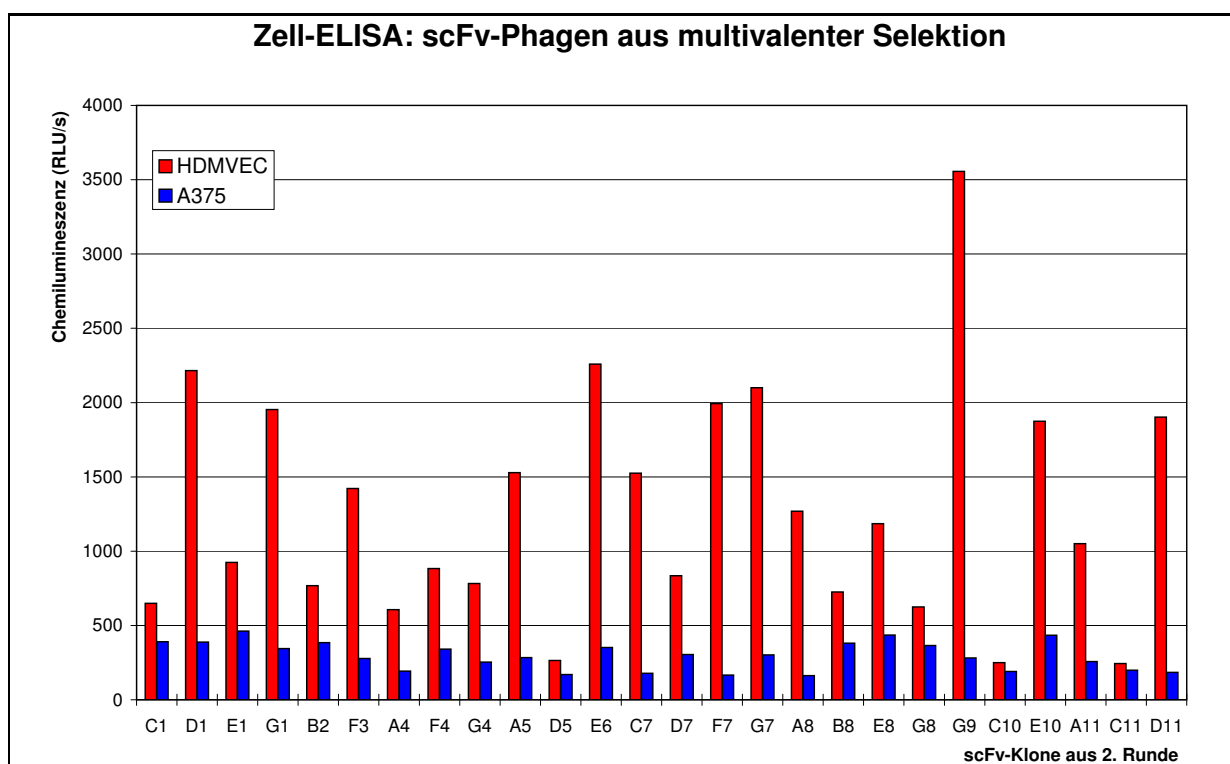
In der Selektion mit der multivalenten scFv-Phagenbibliothek auf HDMVEC zeigte sich nicht nur anhand der steigenden Titer der eluierten Phagen eine höhere Selektionseffektivität. Im Ver-



gleich mit der Oberflächenselektion und der Internalisierungselektion mit dem monovalenten Antikörperformat stiegen auch die Anreicherungsfaktoren viel stärker an.

#### 4.4.1 Identifikation HDMVEC-spezifischer scFv-Phagenklone

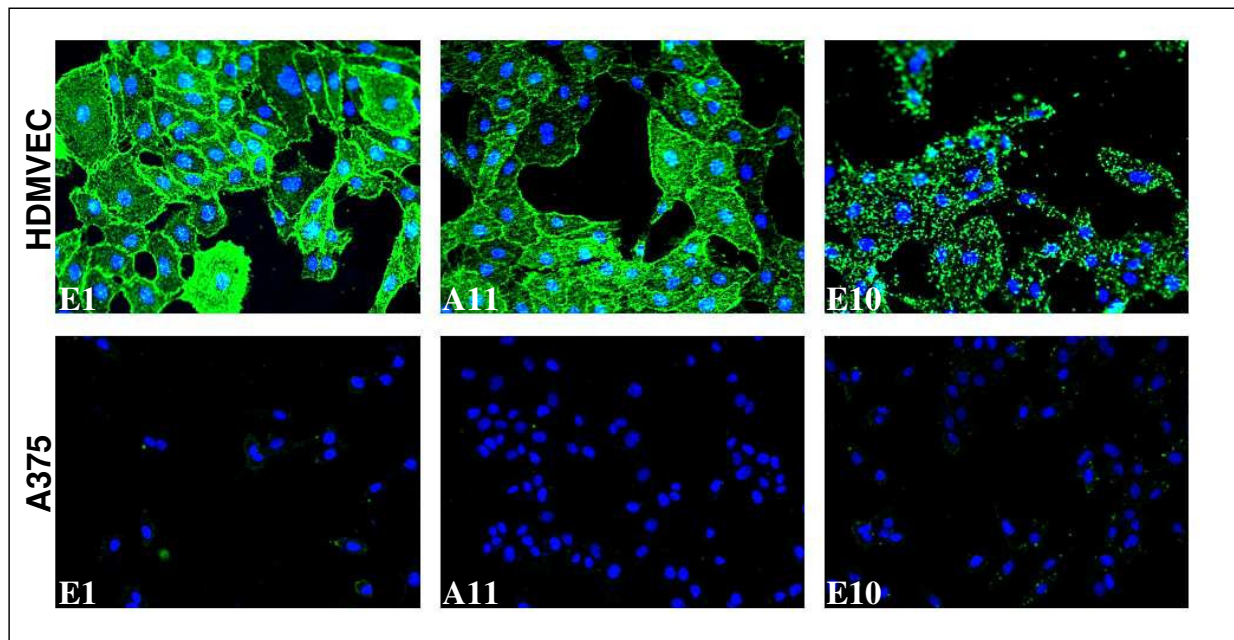
Die spezifische Endothelzellbindung der scFv-Phagenklone wurde, wie bereits bei den anderen Selektionen, im Zell-ELISA auf den Zielzellen (HDMVEC) und den Konkurrenzellen (A375) überprüft.



**Abbildung 14:** HDMVEC-SPEZIFITÄT DER SCFV-PHAGEN AUS DER SELEKTION MIT MULTIVALENTEN PHAGEN. Nach der 2. Selektionsrunde auf HDMVEC unter internalisierenden Bedingungen mit der monovalenten scFv-Phagenbibliothek wurden 184 Klone gepickt und daraus die scFv-Phagen präpariert. Die Zellspezifität der selektierten scFv-Phagen wurde im ELISA auf HDMVEC und der Kontrollzell-Linie A375 getestet und die Bindung der selektierten scFv-Phagen mit anti-M13-HRP Antikörper nachgewiesen. Nach zwei Selektionsrunden waren 95 % der getesteten Klone HDMVEC-spezifisch (hier eine Auswahl von 24 Klone).

Anhand des Zell-ELISA kann man erkennen, dass die selektierten scFv-Phagen zu 95 % spezifisch auf den eingesetzten Endothelzellen binden. Die Chemilumineszenzsignale sind im Vergleich zur Oberflächenselektion etwa um den Faktor 3 höher. Die Selektion mit der multivalenten scFv-Bibliothek brachte einen höheren Anteil HDMVEC-spezifischer scFv-Phagen hervor und ist damit im Vergleich zur Oberflächenselektion wesentlich effizienter.

Ein erster Hinweis für die Vielfalt der Phagenantikörper wurde durch Profilierungsexperimente mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz erhalten. Die Klone wurden dafür in Mikrotiterplatten im 96-Lochformat auf HDMVEC und A375 bei 4 °C inkubiert. Mit Maus anti-M13 und FITC-markiertem anti-Maus IgG erfolgte dann die Detektion der oberflächengebundenen Phagen. Eine Kernfärbung erfolgte mit DAPI. An einem automatischen Mikroskopiesystem wurden je Klon fünf Bilder pro Kanal (FITC und DAPI) aufgenommen. Die eigentliche Auswertung erfolgte mit Hilfe der MetaMorph-Software. Der Vergleich der HDMVEC mit den A375 bestätigte die Bindungsspezifität der scFv-Phagen. Von 100 Klonen zeigten allerdings nur etwa 25 % eine spezifische Bindung auf HDMVEC. Anhand der Doppelfärbung (scFv-Phagenbindung und Kernfärbung) ließ sich ein Bindungsprofil der scFv-Phagen erstellen. Die Oberflächenverteilung zeigte hauptsächlich zwei verschiedene Muster (Abbildung 15). Einerseits eine verstärkt randständige Färbung, wie sie häufig bei Adhäsionsmolekülen auftritt, und andererseits ein homogen über die Zellen verteiltes, punktförmiges Muster. Die Sequenzierung der scFv-Klone bestätigte diese Gruppierung, wobei die Klone der randständigen Färbung noch einmal in zwei Gruppen mit unterschiedlicher Sequenz aufgeteilt werden konnten (Tabelle 5).



**Abbildung 15:** BINDUNGSPROFIL VON scFv-PHAGEN AUS DER INTERNALISIERUNGSSELEKTION MIT DER MULTIVALENTEN PHAGENBIBLIOTHEK AUF HDMVEC. Selektierte scFv-Phagen wurden mit der indirekten Immunfluoreszenz auf ihre Färbemuster auf HDMVEC (obere Reihe) und zur Kontrolle auf A375 (untere Reihe) untersucht. Die Detektion erfolgte mit FITC-markiertem 2. Antikörper (grün), und Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Die scFv-Phagen zeigten in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie zwei verschiedene Färbemuster auf den HDMVEC. Die Klone E1 und A11 färbten die Endothelzellen mit einer randständigen Verteilung während Klon E10 eine punktierte Verteilung zeigte.

| SEQUENZ | scFv-KLONE                  | ELISA-SIGNAL<br>[RLU] | IF-BINDUNGSPROFIL |
|---------|-----------------------------|-----------------------|-------------------|
| S1      | E1, B2, F4, D7, B8          | Schwach (700-800)     | Randfärbung       |
| S2      | A11, A8, C7, F3             | Mittel (1000-1500)    | Randfärbung       |
| S3      | E10, D1, G7, G1, E6, F2, F7 | Stark (1900-2300)     | Punktmuster       |

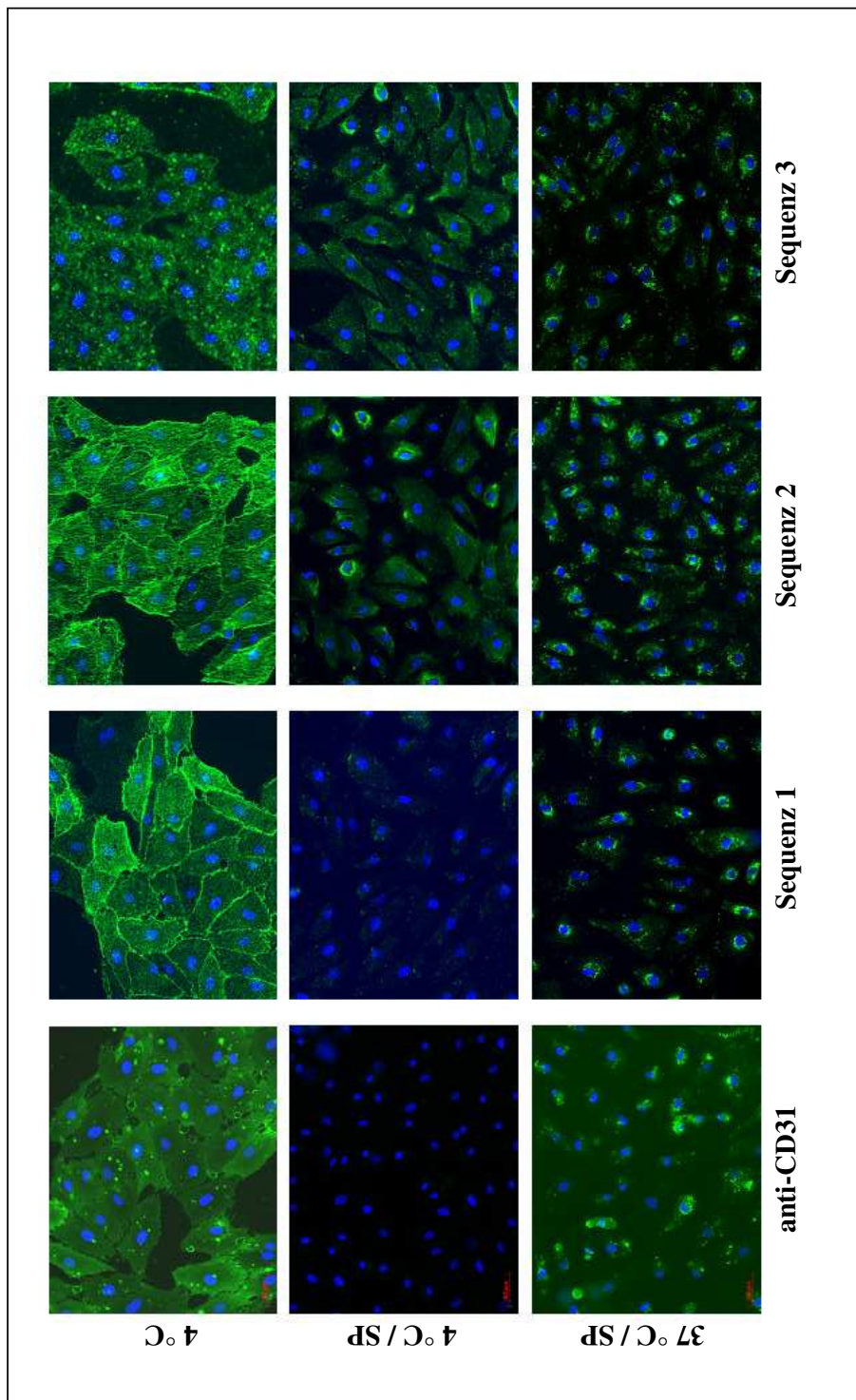
**Tabelle 5:** GRUPPIERUNG DER scFv-KLONE AUS DER INTERNALISIERUNGSSELEKTION. Die scFv-Phagen der drei Sequenzen ließen sich anhand ihrer ELISA-Signale und dem Bindungsverhalten in der Immunfluoreszenzmikroskopie charakterisieren. Dabei zeigte sich, dass die beiden Sequenzgruppen mit der randständigen Oberflächenfärbung schwache bis mittlere ELISA-Signale ergaben, während der Klon mit der punktierten Oberflächenverteilung die stärksten ELISA-Signal erzeugte.

#### 4.4.2 Untersuchung der Internalisierung

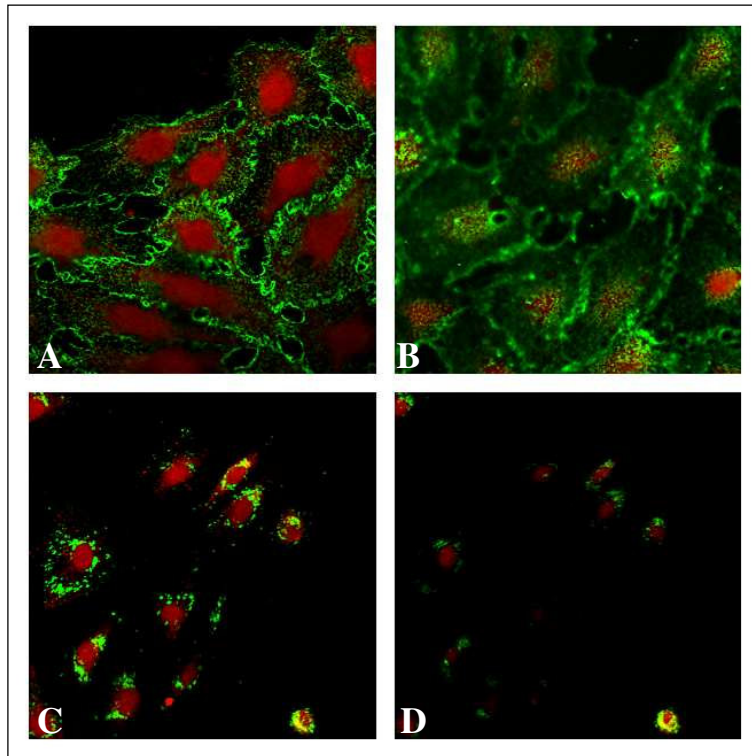
Zur Untersuchung der Internalisierung wurde die Bindung der scFv-Phagen an HDMVEC unter verschiedenen Bedingungen mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie getestet. Wie bereits bei der Analyse der Selektion mit der monovalenten Bibliothek erfolgte eine Aufteilung in vier Ansätze, von denen zwei komplett bei 4 °C und zwei mit einem Internalisierungsschritt bei 37 °C inkubiert wurden. In beiden Temperaturansätzen wurde die Oberflächenbindung allein, so wie die mögliche Internalisierung durch Entfernung der oberflächengebundenen scFv-Phagen beobachtet.

Die Bindung von anti-CD31 oder der scFv-Phagen bei 4 °C zeigte die jeweilige Oberflächenfärbung an. Im Fall von anti-CD31 war eine homogene Zellfärbung mit leichter Verstärkung an den Zell-Zellkontakten sichtbar. Die scFv-Phagen der Sequenzgruppen 1 und 2 zeigten wie bereits in Abbildung 15 eine an den Zellrändern verstärkte Verteilung während scFv-Phagen der Sequenzgruppe 3 ein punktiertes Muster ergaben. Nach Inkubation mit Puffer mit niedrigem pH verschwand die Oberflächenfärbung mit anti-CD31 komplett. Im Fall der scFv-Phagen blieb eine schwache Restfärbung erhalten. Die Versuchsreihe bei 37 °C zeigte sowohl im Fall von anti-CD31 als auch mit den scFv-Phage ein punktförmiges Färbemuster mit perinukleärer Verteilung.

Zur Bestätigung der intrazellulären Verteilung der scFv-Phagen wurden mit Hilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie optische Schnitte durch die Zelle aufgenommen. Anhand eines intrazellulären Kontrollfarbstoffes ließ sich so eine intrazelluläre Lokalisation eindeutig nachweisen. Ein optischer Schnitt durch die Zellen nach Inkubation bei 4 °C zeigt, dass die Bindung der scFv-Phagen nur an der Zellmembran stattfindet, während das Zellinnere ausgespart bleibt (Abbildung 17 A). Bei Aufnahme einer optischen Ebene an der Zelloberfläche kann man dadurch nur noch die Oberflächenbindung des gebundenen scFv-Phagen erkennen (Abbildung 17 B). Die gleichen optischen Schnitte wurden nach Inkubation der scFv-Phagen bei 37 °C und Entfernung der oberflächengebundenen scFv-Phagen gemacht. Die Aufnahme durch die Zelle zeigt diesmal eine intrazelluläre Verteilung der scFv-Phagen, die mit der mitochondrialen Färbung in einer Ebene liegt (Abbildung 17 C). Beide Färbungen verschwinden, wenn man sich optisch in Richtung der Zelloberfläche bewegt (Abbildung 17 D).



**Abbildung 16:** INTERNALISIERUNG DER SCFV-KLONE. Die scFv-Klone der Sequenzgruppen wurden unter internalisierenden Bedingungen mit der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Die Detektion erfolgte mit FITC-markiertem 2. Antikörper (grün) und die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt. In der linken Reihe ist der Kontrollantikörper anti-CD31 gezeigt. Die Bindung bei 4 °C (obere Reihe) zeigte in allen Fällen die jeweilige Oberflächenfärbung. Nach Entfernung (S) oberflächengebundener Antikörper und scFv-Phagen und Permeabilisierung (P) verschwand die Oberflächenfärbung nahezu ganz (mittlere Reihe). Bei 37 °C war nach dieser Behandlung eine punktierte, überwiegend perinukleäre Verteilung sichtbar (untere Reihe)

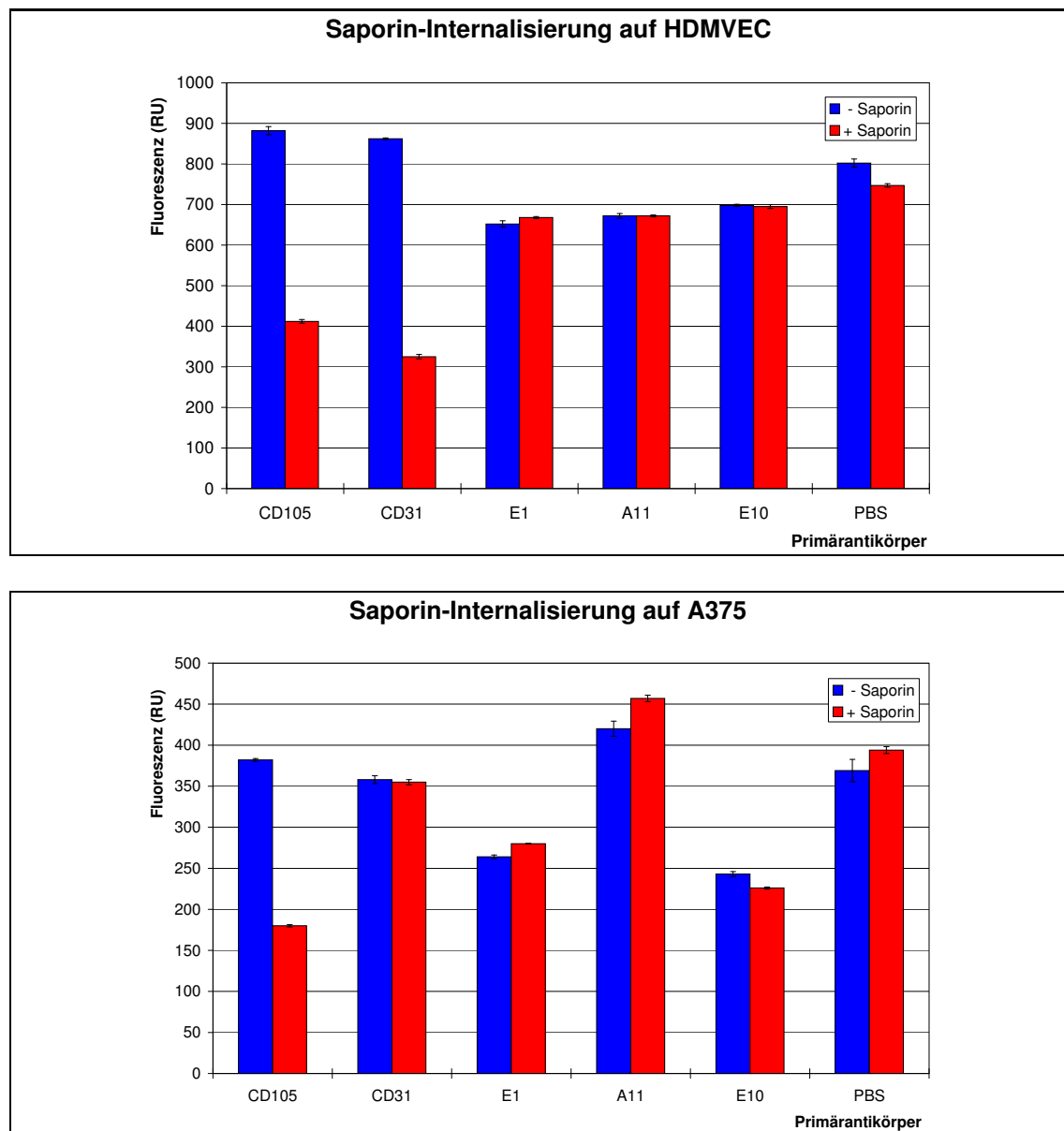


**Abbildung 17:** KONFOKALE LASERSCANNINGMIKROSKOPIE (LSM) MIT scFV-PHAGE E1 (S1). Die scFv-Phagenbindung wurde bei 4 °C (**A**, **B**) und bei 37 °C (**C**, **D**) durchgeführt und mittels LSM untersucht. Die Bindung der scFv-Phagen wurde über FITC-markierten Sekundärantikörper (grün) nachgewiesen, während der Mitochondrienfarbstoff MitoTracker Red (rot) eine intrazelluläre Verteilung anzeigt. Die Bilder zeigen je einen optischen Schnitt (**A**) durch die Zelle und (**B**) an der Zelloberfläche nach Inkubation mit scFv-Phagen bei 4 °C. Die Bilder der unteren Reihe zeigen je einen optischen Schnitt durch die Zelle (**C**) und (**D**) an der Zelloberfläche nach Inkubation der scFv-Phagen bei 37 °C und Entfernung der Oberflächenbindung.

#### 4.4.3 Zytotoxizitätsassay mit saporinegekoppeltem Sekundärantikörper

Um eine Verwendung der selektierten Antikörperfragmente in Immunotoxinen zu testen, wurde ein Zytotoxizitätsassay mit sekundärantikörpergekoppeltem Saporin durchgeführt. Dieses Testsystem basiert auf der Internalisierung eines Ziege anti-Maus IgG, welches mit dem Toxin Saporin konjugiert ist. Saporin ist ein potentes, ribosomeninaktivierendes Pflanzenprotein. Mit diesem Verfahren kann sowohl die Internalisierung primärer Antikörper bestätigt werden, als auch ihre Fähigkeit eine toxische Ladung in die Zelle zu bringen getestet werden [Kohls and Lappi, 2000]. Dadurch, dass das Saporin bereits an einen Sekundärantikörper gekoppelt ist, entfällt die aufwändige Konjugation des Toxins an den internalisierenden Primärantikörper und ermöglicht ein schnelles Durchmustern mehrere Antikörper auf ihre Effektivität. Das sekundärantikörpergekoppelte Saporin wird jedoch nicht allein von den Zellen internalisiert und ist somit nicht toxisch für die Zellen. Erst die Bindung eines internalisierenden Primärantikörpers sorgt für die Aufnahme des Saporins in die Zelle, wo es seine zytotoxische Wirkung entfalten kann.

Der Zytotoxizitätsassay wurde auf HDMVEC und zur Kontrolle auf A375 durchgeführt (Abbildung 18). Neben den selektierten scFv-Phagen wurden Antikörper gegen CD31 und Endoglin (CD105) zur Überprüfung des Systems eingesetzt. Während CD31 ein endothelzellspezifischer Marker ist kommt Endoglin sowohl auf HDMVEC als auch auf A375 vor. Die Zugabe des entsprechenden Primärantikörpers oder scFv-Phagen erfolgte zusammen mit dem sekundärantikörpergekoppelten Saporin. Nach 72 h wurde die Umsetzung des Farbstoffs Alamar Blau von lebenden Zellen fluorimetrisch gemessen. Die durch intrazellulär freigesetztes Saporin vermittelte Zytotoxizität wurde durch Vergleich mit dem Primärantikörper ohne saporinegekoppelten Sekundärantikörper gemessen. Auf den HDMVEC zeigten sowohl anti-CD105 als auch anti-CD31 eine zytotoxische Wirkung nach Zugabe des Immunotoxins. Keiner der scFv-Phagen zeigte eine toxische Wirkung durch das Immunotoxin. Auf den A375 war nur eine Wirkung mit anti-CD105, nicht aber mit anti-CD31 oder einem der scFv-Phagen messbar.

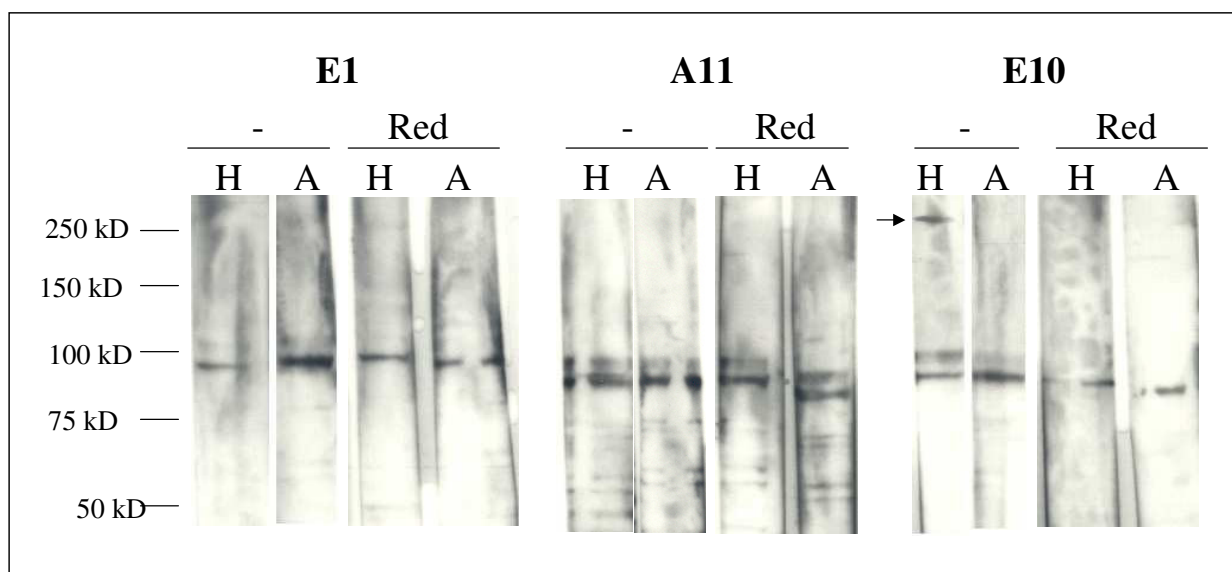


**Abbildung 18:** NACHWEIS DER *in vitro* ZYTOTOXIZITÄT DURCH INTERNALISIERUNG EINES IMMUNOTOXINS. Auf den Zellen wurden die jeweiligen Primärantikörper (scFv-Phagen oder Kontrollantikörper anti-CD31 und anti-CD105) mit oder ohne den saporinegekoppelten Sekundärantikörper für 72 h inkubiert. Nach Zugabe von Alamar Blau wurde dessen Umsetzung durch lebende Zellen fluorimetrisch gemessen. Mit den anti-CD31 und anti-CD105 Primärantikörpern konnte eine zytotoxische Wirkung in den HDMVEC durch Internalisierung des Saporin gemessen werden, jedoch mit keinem der drei internalisierenden scFv-Phagen. Auf den A375 war nur mit anti-CD105 Antikörper eine zytotoxische Wirkung nachweisbar.



#### 4.4.4 Charakterisierung mittels Western Blot

Die selektierten, internalisierenden scFv-Phagenklone E1, A11 und E10 wurde im Western Blot auf HDMVEC-Lysaten getestet. Die Zell-Lysate der HDMVEC wurden wie zuvor durch Lysepuffer mit 1 % Triton X-100 hergestellt und in reduzierendem (mit  $\beta$ -Mercaptoethanol) und nicht reduzierendem Probenpuffer aufgenommen. Von den Lysaten wurden je 30  $\mu$ g Protein pro Tasche auf 4-12 % SDS-Gelen elektrophoretisch getrennt und nach transferieren auf Nitrozellulosemembran ein Western Blot mit den scFv-Phagen als Primärantikörper durchgeführt.



**Abbildung 19:** WESTERN BLOT ANALYSE DER SCFV-PHAGEN AUF HDMVEC-LYSATEN. Zell-Lysate von HDMVEC wurden unter nicht reduzierenden (-) und reduzierenden (Red) Bedingungen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Der Immunoblot erfolgte mit den scFv-Phagen E1, A11 und E10 aus der Internalisierungsselektion mit der multivalenten scFv-Phagenbibliothek als Primärantikörper und anit-M13-HRP als Sekundärantikörper. Mit E1 konnte in der nicht reduzierten Probe ein Protein mit etwa 250 kD nachgewiesen werden wohingegen in der reduzierten Probe kein Protein detektiert werden konnte. Mit den anderen beiden scFv-Phagen (E1 und A11) waren weder in den nicht reduzierten als auch den reduzierten Zell-Lysaten HDMVEC-spezifische Proteinbanden nachweisbar.

Mit den beiden scFv-Phagen E1 und A11 konnte weder in den reduzierten noch in den nicht reduzierten Lysaten HDMVEC-spezifische Proteinbanden nachgewiesen werden. Es tauchte le-

diglich eine unspezifische Bande bei 100 kD auf, die bei den Lysaten aus den HDMVEC und A375 gleichermaßen vorkam. Der scFv-Phage E10 erkannte bei den nicht reduzierten Proben zusätzlich eine HDMVEC-spezifische Bande bei ca. 250 kD, die in den reduzierten Lysaten nicht auftrat.