

**Entwicklung retroviraler *scFv display* Bibliotheken  
und Expression therapeutischer Proteine durch  
replikationskompetente retrovirale Vektoren**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich für  
Biologie und Informatik  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Carsten Finger  
aus Frankfurt

Frankfurt (2005)

vom Fachbereich für Biologie und Informatik der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Rüdiger Wittig  
Gutachter: PD Dr. Christian Buchholz  
Prof. Dr. Annegret Starzinski-Powitz

Datum der Disputation: .....

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Gentherapie</b>	<b>1</b>
1.1.1	Anwendungsgebiete der somatischen Gentherapie	3
1.1.2	Gentransfer-Vektoren	4
1.1.2.1	Adenoviren	4
1.1.2.2	Adeno-assoziierte Viren	5
1.1.2.3	Andere virale Vektoren	5
1.1.2.4	Nicht virale Vektoren	6
1.1.2.5	Retroviren und retrovirale Vektoren	6
1.1.3	Zelltargeting retroviraler Vektoren	9
<b>1.2</b>	<b>Molekulare Evolution</b>	<b>12</b>
1.2.1	Phagen <i>display</i> Bibliotheken	13
1.2.2	Der Vorgang des <i>pannings</i>	13
1.2.3	Anwendungsgebiete und Limitierung des Phagen <i>displays</i>	14
<b>1.3</b>	<b>Kenntnisstand zu Beginn der Arbeit und Aufgabenstellung</b>	<b>16</b>
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien und Methoden der Molekularbiologie</b>	<b>20</b>
2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.1.2	Verwendete Oligonukleotide	21
2.1.3	Plasmide und Vektoren	22
2.1.4	Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	23
2.1.5	TA-Klonierung von PCR Amplifikaten	24
2.1.6	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen	24
2.1.7	Plasmid-DNA Präparation mittels QIAGEN-Säulen	25
2.1.8	Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen	26

2.1.9	Isolierung viraler RNA .....	26
2.1.10	Reverse Transkription und RT-PCR .....	26
2.1.11	Agarose-Gelelektrophorese .....	27
2.1.12	Elution von DNA aus Agarosegelen .....	28
2.1.13	Polyacrylamidgele und Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	28
2.1.13.1	Comassie-Färbung von SDS-Gelen.....	31
2.1.14	Proteinnachweis mittels Western-Blotting .....	31
2.1.14.1	Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Detektionssystem.....	32
2.1.15	Aufreinigung von Proteinen mit His-tag .....	34
<b>2.2</b>	<b>Methoden der Zellbiologie und Virologie.....</b>	<b>35</b>
2.2.1	Zellen, Zelllinien und Medien .....	35
2.2.2	Einfrieren und Lagerung von Zellen .....	36
2.2.3	Auftauen von Zellen .....	36
2.2.4	Transfektion mittels Lipofektamin™ .....	37
2.2.5	Transduktion von Zelllinien .....	37
2.2.6	Immunperoxidase-Test (IPA).....	38
2.2.7	Test auf Aktivität viraler Reverser Transkriptase.....	39
2.2.8	<i>Enzyme-Linked-Immuno-Sorbant-Assay</i> (ELISA) .....	39
2.2.8.1	GM-CSF ELISA .....	40
2.2.9	Analytische Durchflußzytometrie (FACS, „ <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> “.....)	41
2.2.10	Verfahren zur Dekontamination .....	42
<b>2.3</b>	<b>Methoden der Proteinbiochemie .....</b>	<b>43</b>
2.3.1	<i>ScFv</i> Phagen <i>display</i> Bibliothek .....	43
2.3.1.2	Immunisierung von Mäusen .....	45
2.3.1.3	Präparation von RNA aus Maus-Milzen .....	45
2.3.1.4	Aufreinigung von mRNA .....	45
2.3.2	Herstellung beschichteter Zellkulturplatten zur Selektion .....	45
2.3.3	<i>Panning</i> der retroviralen <i>scFv display</i> Bibliothek.....	46
<b>2.4</b>	<b>Elektronische Datenverarbeitung (EDV) .....</b>	<b>46</b>

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung einer retroviralen <i>scFv display</i> Bibliothek .....</b>	<b>48</b>
3.1.1	Klonierungen von L36-Xa-Mo und 7A5-Xa-Mo .....	49
3.1.2	Etablierung des Selektionsverfahrens mittels definierter <i>scFv</i> tragender MLV.....	50
3.1.2.1	Geplante Vorgehensweise .....	51
3.1.2.2	Bindung von L36-Xa-Mo und 7A5-Xa-Mo an Laminin.....	52
3.1.2.3	Simulation einer Bibliothek mittels definierter <i>scFv</i> tragender MLV....	53
3.1.3	Klonierung einer retroviralen $\alpha$ HUVEC <i>scFv display</i> Bibliothek.....	59
3.1.4	Überprüfung der Diversität anhand Sequenzvergleich.....	61
3.1.5	Amplifikation eines definierten <i>scFv</i> 's aus der retroviralen $\alpha$ HUVEC Bibliothek .....	62
3.1.6	<i>Panning</i> der retroviralen $\alpha$ HUVEC Bibliothek gegen <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> (VEGFR).....	64
3.1.7	Sequenzieller Abgleich VEGFR-bindender <i>scFv</i> -Viren .....	67
<b>3.2</b>	<b>Produktion therapeutischer Proteine</b>	
	<b>durch Replikationskompetente Retroviren.....</b>	<b>69</b>
3.2.1	Klonierung von pL36-furin-A und p7A5-furin-A .....	70
3.2.2	Expressionskontrolle der Konstrukte .....	71
3.2.3	Quantifizierung der produzierten L36-Menge.....	74
3.2.4	Aufreinigung von L36 mittels <i>His-tag</i> .....	75
3.2.5	Tropismus der rekombinanten Viren und <i>scFv</i> -Produktion in unterschiedlichen Zelllinien.....	76
3.2.6	Kontrolle der Antigenerkennung der therapeutischen Proteine .....	79
3.2.7	Stabilität der L36/ 7A5-furin-A Viren.....	82
3.2.8	Produktion anderer therapeutischer Proteine.....	83

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>86</b>
<b>4.1</b>	<b>Etablierung einer retroviralen <i>scFv display</i> Bibliothek</b> .....	<b>86</b>
4.1.1	Simulation einer retroviralen Bibliothek mittels definierter <i>scFv</i> 's .....	88
4.1.2	<i>Panning</i> der retroviralen $\alpha$ HUVEC Bibliothek gegen <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> (VEGFR) .....	90
<b>4.2</b>	<b>Produktion therapeutischer Proteine durch Replikations kompetente Vektoren</b> .....	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>123</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>124</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>125</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>127</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Genterapie

Der Begriff *genetical breeding*, genetische Erzeugung, wurde erstmals 1932 auf dem 6. internationalen Kongress der Genetik in New York verwendet und beinhaltete die Anwendung genetischer Regeln hinsichtlich der Erzeugung von Tieren und Pflanzen.

Erst später wurde, um sich von diesem weiten Gebiet abzugrenzen, der Begriff Genterapie verwendet. Die Genterapie umfasst die Behandlung von humanen Krankheiten durch den Transfer von therapeutisch wirksamen genetischen Materials in definierte somatische Zellen des Patienten (Wolff & Lederberg, 1994). Das Erbgut, die DNA, stellt bei diesem Verfahren also das Medikament dar.

Meilensteine in der Entwicklung der Genterapie waren somit die Entdeckung der DNA-Struktur durch Watson & Crick im Jahre 1953, die erste erfolgreiche *in vitro* Replikation von DNA durch Kornberg & Grave und der Beweis der Aufnahme genomischer DNA durch Säugerzellen in Kultur (Wolff & Lederberg, 1994).

Nachdem in den 60'er Jahren die Basis der molekularen Genetik und des Gentransfers in Bakterien geschaffen wurde, schien die genetische Veränderung von tierischen und menschlichen Zellen möglich. Dies gelang Mitte der 70'er Jahre durch die Kombination von ursprünglichen Transfektionsprotokollen mit Selektionstechniken für kultivierte Zellen und rekombinanter DNA-Technologie (Graham & Van der Eb, 1973). In seinen Grundzügen hat sich dieses Verfahren seither nur unwesentlich verändert.

Mit der Entwicklung retroviraler Vektoren wurde aus der Idee der Genterapie eine reale Anwendungsmöglichkeit hinsichtlich des Transfers von Fremdgenen in das Erbgut von Säugerzellen (Dubensky et al., 1984; Wilson et al., 1988). Darüber hinaus wurden die anzuwendenden Techniken verfeinert und letztlich das humane Genom sequenziert. Derzeit konnten 19599 Protein-kodierende Gene identifiziert werden, bei weiteren 2188 DNA-Segmenten wird eine Proteinkodierung vermutet (Human Genome Projekt Information). Zusammen bilden diese Fortschritte die Basis der heutigen Genterapie (Crystal, 1995a).

Der erste Gentransfer in den Menschen wurde im Jahre 1990 von Blaese & Anderson durchgeführt. Hierbei wurde das Gen der Adenosin-Deaminase (ADA) erfolgreich in T-Lymphozyten eines ADA-defizienten Patienten integriert (Blaese, Anderson et al., 1990). Erste Gentherapie-Versuche unter Verwendung von retroviralen Vektoren wurden 1993 unternommen (Rosenberg et al., 1993; Wivel & Walters, 1993).

Bis Ende des Jahres 1999 wurden daraufhin mehr als 300 verschiedene gentherapeutische klinische Studien durchgeführt, in der Mehrzahl in den USA (Morgan & Anderson, 1993; Oldfield et al., 1993; Crystal et al., 1995b; Sobol & Scanlon, 1995; Tursz et al., 1996; Zabner et al., 1996; Imai & Isaka, 1998; Laitinen et al., 1998; Human gene marker/therapy clinical protocols 1999).

Ihre Erfolge waren mitunter spektakulär, z.B. hinsichtlich der klinischen Gentherapie-Studie der X-chromosomalen Form der schweren kombinierten Immundefizienz (X-SCID) unter der Leitung von Professor Dr. Alain Fischer am Hospital Necker in Paris. SCID ist eine genetische Erkrankung mit einem schweren Defekt in der T-Zell- und B-Zell-Immunität (Fischer, 2000). Ohne Behandlung verläuft diese Erkrankung meist in den ersten Lebensjahren aufgrund verschiedener schwerer und wiederkehrender Infektionen tödlich. Die optimale Behandlung der SCID-Erkrankung ist eine Knochenmarkstransplantation von einem Verwandten- oder Fremdspender. Steht kein geeigneter Spender zur Verfügung, kann die Erkrankung nur durch Gentherapie geheilt werden, also durch den künstlichen Transfer "gesunder" Gene in die Blutstammzellen der Erkrankten. Dieses Vorhaben gelang unter Verwendung eines retroviralen Vektors, der einen intakten Interleukin-Rezeptor übertrug. Die Methode wurde seit 1999 mehrfach in Europa und in den USA eingesetzt. Auf diese Weise wurde z.B. in der Pariser Arbeitsgruppe um Prof. Dr. A. Fischer eine nachhaltige Besserung des Immunstatus in 9 von 11 der behandelten Kinder erzielt. Die Kinder konnten ein normales Leben führen und waren nicht mehr gezwungen, in einem keimarm gehaltenen Isolationszelt zu leben. Einer der behandelten Patienten entwickelte jedoch drei Jahre nach dem Gentransfer eine unkontrollierte T-Zell-Wucherung, die wie ein akuter Blutkrebs (Leukämie) auftritt und somit eine lebensbedrohliche Erkrankung darstellt. Im Januar 2003 wurde ein zweiter Leukämie-Fall einer behandelten Person bekannt, welcher ein sofortiges Abbrechen ähnlicher Studien in Deutschland rechtfertigte (Kaiser, 2003).

Erste ernsthafte Zweifel an der Durchführbarkeit von gentherapeutischen Versuchen am Menschen kamen allerdings schon Ende 1999 auf. Der damals bekannt gewordene Todesfall in den USA stand nachweislich im direkten Zusammenhang mit der versuchten Gentherapie. Ziel dieser Versuche, bei denen Adenoviren eingesetzt wurden, war es, die Leberzellen von Menschen mit Ornithintranscarbamylase (OTC)-Mangel so zu verändern, dass sie das fehlende oder in zu geringer Menge gebildete Enzym OTC verstärkt bilden. 17 von 18 Personen zeigten die bei Versuchen mit Adenoviren üblichen Nebenwirkungen wie Fieber und Schmerzen, ohne dass sich Unterschiede in der Dosis-Wirkung-Beziehung zeigten. Jesse Gelsinger, dem als letzter Proband die höchste Dosis von  $3,8 \times 10^{13}$  Partikeln gespritzt wurden, starb innerhalb von vier Tagen an Multiorganversagen (Raper et al., 2002).

### **1.1.1 Anwendungsgebiete der somatischen Gentherapie**

Einige Krankheiten sind Kandidaten für die somatische Gentherapie. Hierbei handelt es sich um vererbte genetische Krankheiten wie Cystische Fibrose, Hämophilie A und B, Duchenne Muskeldystrophie, ADA-Mangel, Phenylketonurie und familiäre Hypercholesterinämie. Sie entstehen durch einen einzelnen Gendefekt (Verma und Somia 1997). Aber auch entzündliche Krankheiten wie rheumatoide Arthritis, Arthrosis oder erworbene multifaktorielle Krankheiten wie Diabetes, Krebs und HIV sind mögliche Anwendungsgebiete für die Gentherapie (Jorgensen et al., 1997, Apparailly, 1998).

Das Ziel der Gentherapie in den genetisch bedingten Krankheiten ist es, den Phänotypus zu beheben, indem ein funktionell normales Genexemplar in eine betroffene somatische Zelle eingebracht wird, die einen veränderten Genotypus enthält. Hierbei wird das defekte Gen selbst physikalisch nicht ersetzt, ein Vorgang der Genduplikation genannt wird (Chang & Wu, 1994).

Im Fall der erworbenen Krankheiten zielt die Gentherapie darauf ab, die entzündliche Antwort der Einzelperson zu verändern, indem sie anti-inflammatorische oder antiproliferative Gene liefert. Gerade hinsichtlich von Krebserkrankungen konzentriert man sich auf den Transfer von Tumorsuppressorgenen, modifizierten Onkogenen oder Genen mit immunstimulatorischer Wirkung (Curiel et al., 1996).

Neuerdings erfolgsversprechend sind Ansätze unter Verwendung von Angiogenese-hemmenden Wirkstoffen (Sanz et al., 2002).

## 1.1.2 Gentransfer-Vektoren

Die grundlegende Voraussetzung aller verwendeten genterapeutischer Methoden ist die Genübertragung, also der Transport des therapeutischen Proteins auf Nukleinsäure-Ebene zu den Zielzellen. Die zu übertragende DNA besteht aus einem oder mehreren Genen, nebst den Steuerelementen, die deren Expression in den Zielzellen steuern. Ihr Transport geschieht unter Verwendung von unterschiedlichsten Vehikeln, die die zu übertragenden Gene umkapseln und allgemein als Vektoren bezeichnet werden.

Der Vektor bindet an die Membran der Zielzelle und wird internalisiert. Die zu übertragenden Gene werden dann, abhängig vom verwendeten Vektortyp, in das Genom der Zelle integriert, oder verbleiben außerhalb des Zell-Genoms als Episom im Zellkern. Die geläufigsten Vektoren werden nachfolgend dargestellt.

### 1.1.2.1 Adenoviren

Wegen ihres natürlichen Tropismus für Lungenepithelzellen wurden Adenoviren ursprünglich als Vektoren für die Genübertragung von CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) verwendet. In der Natur existieren Adenoviren in mehr als 40 Serotypen, die die geläufigen klinischen Syndrome, von Pharyngitis bis zu Diarrhöe reichend, verursachen. Die Infektionen sind normalerweise nicht bedrohlich und gelten als nicht karzinogen.

Adenoviren sind Doppelstrang-DNA Viren, die ein 36 kb großes Genom enthalten. Die Verwendung von rekombinanten adenoviralen Vektoren als *in vivo* Genfähren ist detailliert untersucht und beschrieben worden (Wilson, 1996).

Der Vorteil des Adenovirus zur Genübertragung ist, dass hohe Titer (bis  $10^{12}$  infektiöse Partikel pro ml) erreicht werden können. Darüber hinaus kann eine Vielzahl von ruhenden Zellen effektiv transduziert werden (Curiel et al., 1996).

Ein Nachteil besteht darin, dass das virale Genom nicht stabil in das der Wirtszelle integriert wird. Die viralen Gene liegen als Episom im Zellkern vor, wodurch lediglich eine transgene Expression von einigen Tagen bis Wochen erzielt werden kann. Ein

weiterer Nachteil ist die hohe Immunität innerhalb der Bevölkerung gegen diese Art von Vektoren, die ebenfalls nur eine kurzfristige Expression therapeutischer Gene zu Stande kommen lässt (Yang et al., 1994; Zsengeller et al., 1995; Otake, 1998).

### **1.1.2.2 Adeno-assoziierte Viren**

Adeno-assoziiertes Virus (AAV), ein menschliches Parvovirus, ist ein kleines einzelsträngiges DNA Virus und kann sich teilende und sich nicht-teilende Zellen infizieren. Der Wildtyp AAV kann nahezu alle Zelllinien infizieren und sich effektiv vermehren, vorausgesetzt, dass ein passendes Helfervirus (wie Adenovirus) anwesend ist. In Abwesenheit eines Helfervirus bleibt AAV im Genom der Zielzelle latent.

Die Verpackungskapazität von rekombinanten AAV beträgt 4.9 kb, daher wird das Verpacken großer therapeutischer Fremdgene (z.B. das CFTR-Gen) erschwert.

Die Integration des Wildtyp-Virengensoms geschieht normalerweise an einer spezifischen Stelle im menschlichem Chromosom 19. Aber auch unspezifische Integration konnte in immortalisierten Zelllinien beobachtet werden (Flotte & Carter, 1995; Moullier, 1997).

Der Vorteil von AAV sind ihre niedrige Pathogenität und Immunogenität, was eine lange Expressionsdauer der Transgene ermöglicht (Flotte et al., 1993; Koeberl et al., 1997; Fisher et al., 1997).

### **1.1.2.3 Andere virale Vektoren**

Andere virale Vektoren sind weniger eingehend studiert worden. Herpes simplex virus (HSV) Typ I hat ein 150 kb großes Genom und ist in der Lage bis zu 50 kb große Gene zu übertragen (Robbins, 1998). HSV wurde für die Genübertragung in Neuronen, in Gehirntumoren (Kennedy, 1997), in verschiedene Tumorzellen und in B-Zellen (Levatte et al., 1998) verwendet. Ein wesentlicher Nachteil von HSV besteht darin, dass es in den neuralen Zellen latent werden kann und es bis jetzt wenig Informationen über den Verbleib und die Stabilität des Vektors gibt.

#### 1.1.2.4 Nicht virale Vektoren

Eukaryontische Zellen können, unter entsprechenden Bedingungen, exogene DNA aufnehmen. Deutlicher Nachteil dieser Methode ist die von Zelltyp zu Zelltyp stark schwankende Transfektionseffizienz, die fehlende Zellspezifität, der mangelnde Schutz der DNA vor lysosomalem Abbau und die transiente Expression der übertragenen Gene. Der Prozess ansich ist somit nur selten in gentherapeutischen Ansätzen verwendbar. Deswegen wurde eine Vielzahl von Genübertragungs-Methoden entwickelt, die zwar nicht auf immunogenen viralen Vektoren beruhen, aber dennoch zumeist auf einen Träger der DNA angewiesen sind.

Darunter fallen Liposomschmelzverfahren, Kalziumphosphat, Mikroinjektion, Elektroporation, Partikelbombardierung und Zielzellrezeptor-vermittelte Methoden (Felgner et al., 1987).

Meist werden bei diesen Verfahren natürlich vorkommende Mechanismen der Zellen benutzt, die das Aufnehmen und den intrazellulären Transport von Makromolekülen bewerkstelligen. Hierzu werden multimolekulare Komplexe mit der zu übertragenden Plasmid DNA gebildet, die an die Zelloberfläche binden, Endozytose auslösen und nachfolgend den Transport des Transgens in den Zellkern induzieren.

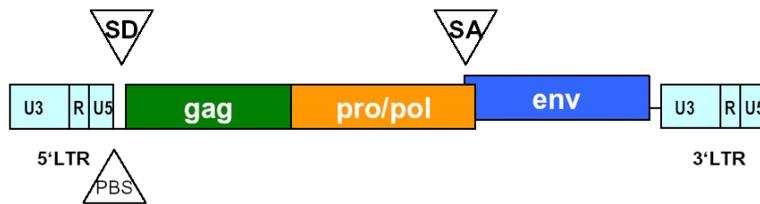
Der Hauptvorteil dieser Methoden ist, dass sie eine sehr geringe Immunogenität besitzen. Ausnahme ist die mögliche Immunantwort, die das Transgen selbst in dem Empfänger auslösen kann.

Dennoch stellt die Verwendung von Viren, insbesondere von Retroviren, eine der effektivsten und am meisten erforschte Möglichkeit des Gentransfers dar.

#### 1.1.2.5 Retroviren und retrovirale Vektoren

Das Virusgenom der Retroviren ist im einfachsten Fall aus vier Abschnitten aufgebaut (siehe Abbildung 1.1). Die drei Gene *gag* (*group specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*) werden von den *LTR*-Bereichen (*long terminal repeats*) flankiert. Diese repetitiven Sequenzen sind für die Integration des Virusgenoms in das Genom der Wirtszelle notwendig und enthalten Steuerungselemente wie Promotor-, Transkriptionsaktivator- und Repressor-Sequenzen (Vogt, 1997).

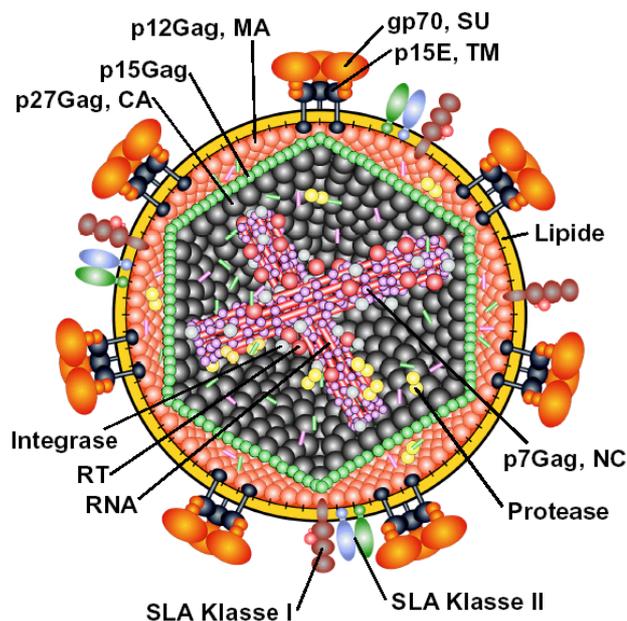
Der Aufbau eines Retrovirusgenoms ist nachfolgend schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.1 Schematisierter Aufbau eines Retrovirusgenoms**

Dargestellt sind die drei Hauptstrukturgene (*gag*- gruppenspezifisches Antigen, *pro/pol*- Protease/ Polymerase, *env*- Hüllproteine) sowie die flankierenden, repetitiven Regionen (*ltr*- direkte terminale Sequenzwiederholungen). Die Bindungsstelle für die tRNA (*pbs*- Primerbindungsstelle) sowie die Donor (SD)- und Akzeptor (SA)-Stellen für die Prozessierung der *messenger* RNA sind markiert (modifiziert nach Czauderna et al., 2000).

Die schematische Struktur eines C-Typ Retroviruspartikels ist nachfolgend dargestellt.



**Abbildung 1.2 Schematische Darstellung eines C-Typ Retroviruspartikels**

Beschriftet sind neben anderen die Strukturproteine Matrix-Protein (MA), p15Gag-Protein, Kapsid-Protein (CA) und das Nukleokapsid-Protein (NC), sowie die Enzyme virale Protease (Protease), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase. (Abbildung aus Tacke, 2001).

Nach Aktivierung des viralen Promotors innerhalb der *LTR* kommt es zur Expression der viralen Gene, wobei zunächst Polyproteine gebildet werden. Sie werden im Verlauf des *processings* proteolytisch in die einzelnen funktionsfähigen Proteine unterteilt. Dies geschieht durch die virale Protease, welche im Pol-Protein kodiert ist und sich selbst

von der Polymerase (Reverse Transkriptase, RT) und der Integrase abspalten kann. Sie spaltet das Gag-Polyprotein in die folgenden Strukturproteine: Matrix-Protein (MA), p15Gag-Protein, Kapsid-Protein (CA) und das Nukleokapsid-Protein (NC) (Swanstrom & Wills, 1997). Das Hüll-Protein (Env) wird in das endoplasmatische Retikulum exportiert, wobei der transmembrane Teil des Proteins in die Membran inseriert. Anschließend erfolgt die Trennung von Oberflächen-(SU-) und Transmembranen-(TM-) Untereinheit durch eine zelluläre, Subtilisin-ähnliche Protease wie z.B. Furin (Garten et al., 1994).

Zunächst hat man die Retroviren nach ihrer Morphologie in verschiedene Gruppen (Typ A- bis Typ D-, Lenti-, Lymphotrope Retroviren sowie Spumaviren) eingeteilt (Gelderblom, 1991). Dabei diene insbesondere die Form des Kapsids als Kriterium zur systematischen Einteilung. Mittlerweile werden auch die Morphogenese und die Struktur des retroviralen Genoms als Merkmale herangezogen (siehe Abbildung 1.1).

Viele Retroviren zeichnen sich durch die Typ C-Morphologie aus. Sie haben ein regelmäßiges, ikosaedrisch geformtes Kapsid (siehe Abbildung 1.2) und in der Regel eine einfache Genomstruktur. In diese Gruppe gehören insbesondere die Leukämieviren der Maus (*murine leukemia virus*, MuLV oder MLV) und der Katze (*feline leukemia virus*, FeLV). Da sehr viele Vertreter dieser Gruppe Tumore induzieren, werden sie auch als Onkoviren bezeichnet (Leib-Mösch et al., 1990).

### **Retrovirale Vektoren**

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen replikationskompetenten, RCR's (*replication competent retroviruses*) und replikationsinkompetenten retroviralen Vektoren. Bei replikationsinkompetenten Vektoren wurden die viralen Gene, die für die Strukturproteine Gag, Pol und Env kodieren, durch therapeutische Gene oder Markergene (heterologe Gene) substituiert. Weiterhin vorhanden sind das Verpackungssignal ( $\Psi$ ) und die flankierenden LTR's. Dieses "engineering" von Wildtyp-Retroviren hat zur Folge, dass ihre Vermehrungsfähigkeit in eukaryontischen Zellen gestoppt ist. Sie sind einmalig in der Lage eine Zelle zu infizieren und das gewünschte genetische Material zu übertragen. Die Produktion retroviraler Vektoren erfolgt in sogenannten Verpackungszellen, welche sowohl die notwendigen

Strukturgene (Gag, Pol und Env) in trans zur Verfügung stellen als auch das retrovirale Vektorkonstrukt enthalten (Markowitz et al., 1988a; b).

Retrovirale Vektoren können mit bis zu 8 kb großem exogenem Material (RNA) versehen werden (Cichutek et al., 2001). Ein Umstand, der die Integration zusätzlicher therapeutischer Gene erleichtert. Begrenzt wird die Addition zusätzlicher Gene lediglich durch das Volumen des Kapsids, welches das retrovirale Genom umkapselt. Problematisch hingegen ist der Ort der Integration akzessorischer Gene in das Virusgenom, der je nach gewünschter Funktion neu evaluiert werden muss.

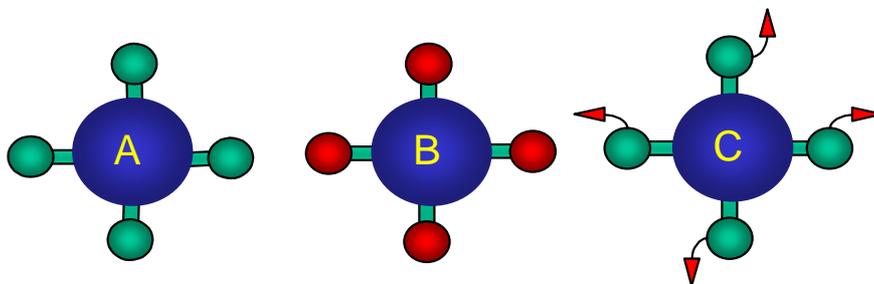
### **1.1.3 Zelltargeting retroviraler Vektoren**

Die Mehrheit der bisher entwickelten retroviralen Vektoren wurden vom MLV abgeleitet. Man unterscheidet aufgrund ihres Wirtszellspektrums zwei Typen von MLV-Vektoren. Das Wirtszellspektrum (Tropismus) wird durch die Interaktion des viralen Oberflächenglykoproteins (SU) mit einem spezifischen zellulären Oberflächenrezeptor bestimmt (Battini et al., 1992). Vektoren, die vom ecotropen MLV abgeleitet sind, benutzen den murinen kationischen Aminosäuretransporter Rec1 als zellulären Rezeptor (Kim et al., 1991; Wang et al., 1991). Dieses beschränkt ihren Wirtszellbereich auf murine Zellen (Kavanaugh et al., 1994; Miller, 1996). Die zur Gentherapie am Menschen eingesetzten Vektoren werden vom amphotropen MLV (aMLV) abgeleitet und besitzen ein weites Wirtszellspektrum für murine und humane Zellen, da sie das in fast allen humanen Zellen exprimierte Phosphat-Transporterprotein Ram1 als Rezeptor benutzen (Miller et al., 1994; van Zeijl et al., 1994). MLV abgeleitete retrovirale Vektoren werden seit Ende der 80'er Jahre hinsichtlich ihrer Verwendung für gentherapeutische Zwecke erforscht.

Im Zuge dessen wurden vielfältige Pseudotypisierungen vorgenommen. Unter Pseudotypisierungen versteht man die Verwendung eines heterologen Env-Proteins. Die hergestellten Pseudotypvektoren besitzen im Idealfall den Tropismus des verwendeten heterologen Env-Proteins und verändern demnach den Tropismus des verwendeten Vektors. Dieses Vorgehen zeigt eine effiziente Zielzell-spezifische Transduktion und könnte eine *in vivo* Applikation ermöglichen. Zelltypspezifische MLV Vektoren konnten erstmals durch Pseudotypisierung mit dem Hüllprotein des HIV-1 generiert

werden. Der resultierende Vektor des Typs [MLV(HIV-1)] zeigte den Tropismus des HIV-1, also transduzierte spezifisch CD4-positive Zellen (Schnierle et al., 1997; Stitz et al., 2000).

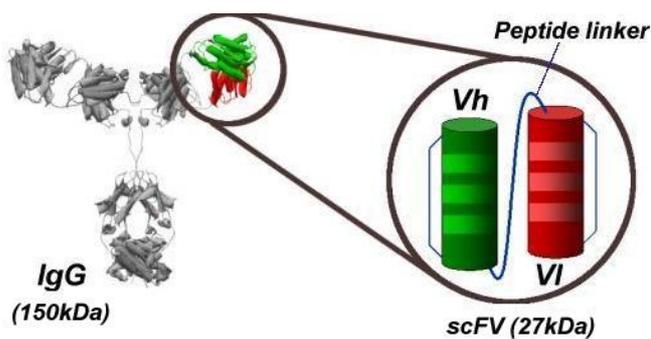
Eine weitere Strategie, den Wirtszellbereich retroviraler Vektoren zu verändern, besteht darin, das homologe Env-Protein mit Polypeptiden von Wachstumsfaktoren, Hormonen, Chemokinen oder Antikörpern zu modifizieren. Der Zelleintritt bzw. die Anbindung der Vektoren an die Zielzelle soll dann über die Interaktion dieser *targeting*-Motive mit deren jeweiligen Liganden erfolgen. Abbildung 1.3 verdeutlicht die beschriebenen Modifikationen schematisch.



**Abbildung 1.3 Strategien des retroviralen Zelltargetings**

- (A) Wildtyp (wt)-Vektor mit homologem Env-Protein; (B) Pseudotyp-Vektor mit heterologem Env-Protein; (C) N-terminale Modifikation des homologen Env-Proteins

Viele Modifikationen des ecotropen MLV Env-Proteins wurden in den letzten Jahren beschrieben. So wurden z.B. Env-Modifikationen mit Proteindomänen des Erythropoietins (Kasahara et al., 1994), des Heregulins (Han et al., 1995), des *Epidermal Growth Factors*, EGF (Cosset et al., 1995b) und des *Stem Cell Factors*, SCF (Fielding et al., 1998) hergestellt. In fast allen Fällen konnte der Einbau des *targeting*-Motives gezeigt werden. Diese Vektoren konnten dadurch an ihre Zielzelle binden, jedoch blieb eine effiziente Transduktion aus. Eine weitere Möglichkeit zur N-terminalen Modifikation des Env-Proteins besteht in der Verwendung von einkettigen Antikörperfragmenten (*scFv*, *single chain variable Fragment*). Abbildung 1.4 zeigt den Ursprung und den Aufbau von *scFv*'s.



**Abbildung 1.4** Schematische Darstellung eines scFv's

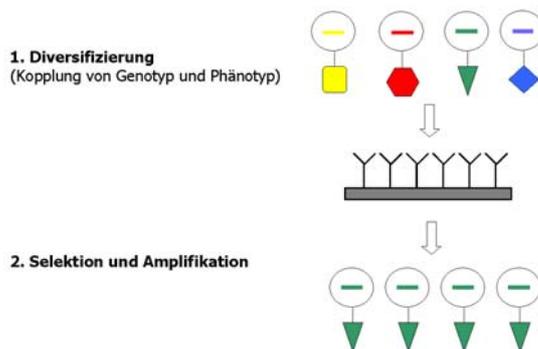
Links ist Struktur und Aufbau eines vollständigen Immunglobulins dargestellt. Rechts die Antigenbindungsstellen der schweren (Vh) und der leichten Kette (Vl), welche durch einen Peptidlinker verknüpft werden und als scFv bezeichnet werden.

Durch die Präsentation von scFv's auf dem Env-Protein des ecotropen MLV war die Anbindung an den scFv-spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche zu beobachten. Die erzielten Transduktionsraten waren jedoch sehr unterschiedlich. (Russell et al., 1993; Ager et al., 1996; Marin et al., 1996; Zhao et al., 1999; Benedict et al., 1999; Martin F et al., 1999 ; Karavanas G et al., 2002).

Die meisten der genannten Zelltargeting-Strategien unter Verwendung von Liganden wie scFv's oder Wachstumsfaktoren zielen auf überexprimierte Rezeptoren auf der Oberfläche von Tumorzellen. Nicht entartete Zellen besitzen diese Ziel-Rezeptoren ebenfalls, aber in sehr viel geringeren Konzentrationen. Demnach kann ein absolut zellspezifischer Gentransfer -gerade im Hinblick auf eine *in vivo* Applikation- nur durch die Identifikation von einzigartigen Liganden einer bestimmten Tumorzellart gewährleistet werden. Eine mögliche Lösung dieses Problems ist die Anwendung von Techniken, die eine Identifikation zellspezifischer Liganden erlaubt, ohne die daran bindenden Moleküle zu kennen. Im Speziellen bedeutet dies z.B. die Verwendung von *random peptide* Bibliotheken, präsentiert auf Phagen (*phage display*). Allgemein fasst man dieses Themengebiet unter dem Begriff „Molekulare Evolution“ zusammen.

## 1.2 Molekulare Evolution

Der Begriff der molekularen Evolution umfasst heutzutage nicht mehr „nur“ die phylogenetische Entwicklung der Gene. Er beschreibt gleichzeitig eine Vielzahl von Techniken, die sich evolutiver Mechanismen bedienen. Grundsätzlich bedeutet dies, dass aus einem *pool* von Genen bzw. Proteinen diejenigen selektiert werden, die dem angelegten Selektionsdruck am besten entsprechen. Man spricht hierbei auch von gerichteter Evolution. Die Grundbedingung dieses Prozesses ist die Kopplung zwischen Genotyp und Phänotyp. Nachfolgende Abbildung verdeutlicht den Vorgang der gerichteten Evolution schematisch.



**Abbildung 1.5 Prinzip der molekularen Evolution**

Die prinzipielle Vorgehensweise ist hier dargestellt. Allen Ansätzen im gesamten Feld ist folgendes Prinzip gemein: Genotyp und Phänotyp liegen gekoppelt vor. Dadurch ist nach dem Selektionsschritt eine Amplifikation der selektierten Varianten möglich.

Erstmalig anwendbar wurde dieser Prozess durch die Verwendung von Bakteriophagen (Smith, 1985). Entsprechend modifiziert beinhalten die Phagen das Gen und präsentieren gleichzeitig das jeweilige Genprodukt, auf dessen Eigenschaften selektiert werden soll. Dieses Verfahren des Phagen *displays* stellt in seinen Grundzügen bis heute eine der grundlegenden und erfolgreichsten Techniken der molekularen Evolution dar.

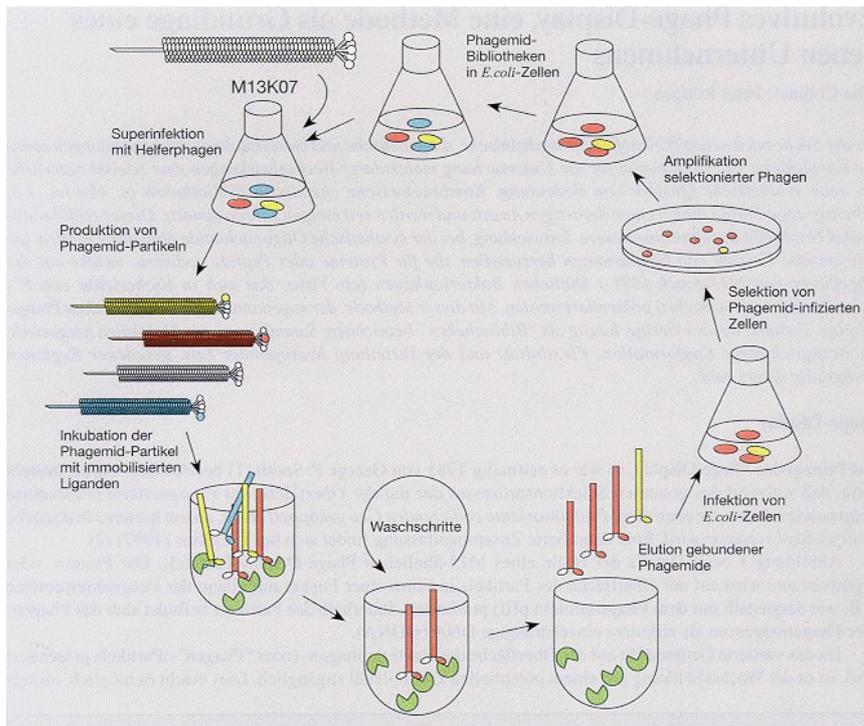
### 1.2.1 Phagen *display* Bibliotheken

Die Methode des Phagen *displays* beruht auf der Verwendung von M13 oder fd/f1 ähnlichen Bakteriophagen. Als Wirtsorganismus dient diesen Viren *E. coli*<sup>F+</sup>.

Die notwendige Kopplung zwischen Genotyp und Phänotyp wird durch die Fusion des darzustellenden Gens an das Gen des *minor coat protein* pIII des Phagens gewährleistet. Es kommt somit zu einer funktionellen Präsentation eines Fusionsproteins zwischen pIII und dem zu selektionierenden Proteins auf der Phagenoberfläche. Die funktionelle Präsentation des zu selektionierenden Proteins auf der Phagenoberfläche ermöglicht es, aus einem *pool* von Proteinen diejenigen zu selektionieren, die die gewünschten Bindungseigenschaften besitzen. Der Phage bindet hierbei durch das präsentierte Fusionsprotein. Diesen Vorgang nennt man *panning*, analog zum ursprünglichen Goldschürfen mittels einer Pfanne (*pan*).

### 1.2.2 Der Vorgang des *pannings*

Im Verlauf der *panning*-Prozedur kommt es durch Bindung des zu selektionierenden Proteins an ein Zielprotein zur Immobilisierung der jeweiligen Phagen. Die Immobilisierung kann allerdings auch durch unspezifische Bindungen der Phagenhüllproteine an das Zielprotein oder an die verwendete Matrix erfolgen. Die nun gebundenen Phagen werden im Folgenden vermehrt, in dem sie abgelöst und zur Infektion von *E.coli* verwendet werden. Die Freisetzung neuer Phagenpartikel wird durch die Superinfektion eines Helfer-Phagens erreicht. Dieser Vermehrungsschritt wird Amplifikation genannt. Nach erfolgter Amplifikation werden die Phagen aufgereinigt und für ein erneutes *panning* verwendet. Es kommt somit sukzessive zu einer Anreicherung von hoch affinen Phagen und zu einer Reduktion der weniger affinen unspezifischen Bindungen durch die Phagenhüllproteine. Nachfolgendes Schema verdeutlicht die angewendete Prozedur.



**Abbildung 1.6 Flussdiagramm der *panning*-Prozedur**

Links dargestellt der *pool* an rekombinanten Phagen, nachfolgend die Inkubation mit dem „Zielprotein“ und die Amplifikation der gebunden Phagen. (Quelle: John Collins, Peter Röttgen, 1997)

### 1.2.3 Anwendungsgebiete und Limitierung des Phagen *displays*

Im Allgemeinen kann diese Methode eingesetzt werden, um jede Protein-Protein-Wechselwirkung auf molekularer Ebene auf die Eigenschaften der notwendigen Strukturelemente zu untersuchen. So z.B. zur Epitopkartierung von Antikörpern, zur Entwicklung von Agonisten und Antagonisten biologischer Reaktanten, zur Herstellung von Enzyminhibitoren, zur Entwicklung von *tags* für gewebespezifische Wirkstoff-Applikation und zur Entwicklung von Gentherapie-Vektoren.

Eine Beschränkung erfährt die Methode des Phagen *displays* in der Größe der DNA des zu präsentierenden Proteins. Diese ist für die Praxis nur selten relevant, da sich die Anwendung zumeist auf die Selektion von Peptiden oder kleineren Proteinen wie *scFv*'s mit einer Größe von ca. 30 kDa beschränkt. Maximal können Proteine von 86 kDa

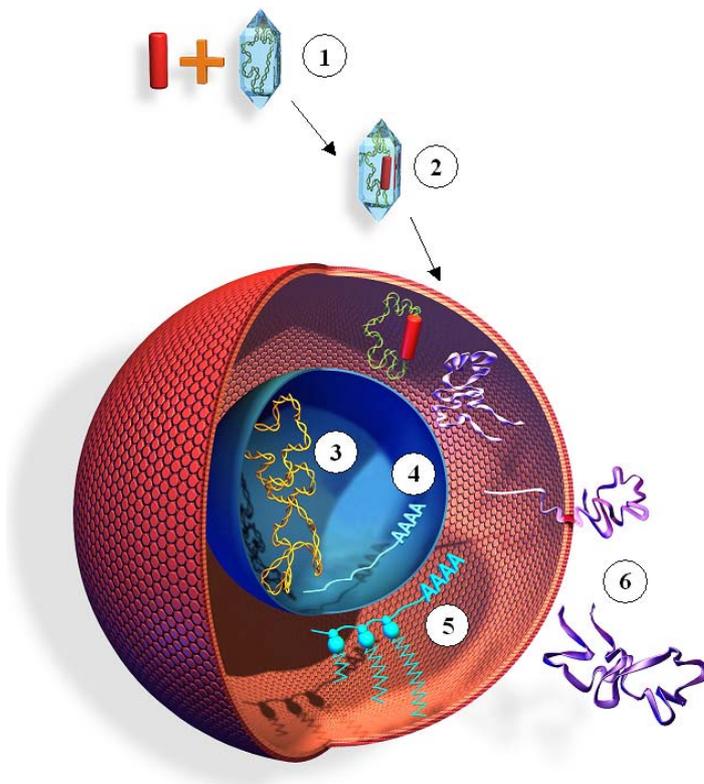
präsentiert, bzw. deren DNA in das Phagen genom integriert werden (Verhaert et al., 1999).

Die hauptsächliche Einschränkung erfolgt durch die Verwendung von Bakterien während des Schrittes der Amplifikation. Das betrifft alle Aspekte, die unterschiedlich zur eukaryonten Proteinexpression sind, vorwiegend hinsichtlich der Proteinfaltung, Assemblierung und fehlender posttranslationaler Modifikationen wie Glykosylierung und Phosphorylierung (McVean et al., 2000). Diese Unterschiede haben letztlich einen negativen Einfluss auf die 3D Struktur und das immunogene Verhalten der zu selektionierenden Proteine. So werden alle Proteine, die ein „fehlerhaftes“ prokaryontes Prozessieren erfahren, oder gar für Bakterien toxisch sind, von der Selektionierung ausgeschlossen (Kranendonk et al., 2000).

Somit könnten molekulare *display* Technologien, die stets im eukaryonten Kontext anwendbar sind, wie z.B. retrovirale *display* Bibliotheken, wesentlich zur Entdeckung und Charakterisierung neuer Wirkstoffe beitragen. Die Verwendung von retroviralen *display* Bibliotheken wurde erstmals 1998 von Christian Buchholz publiziert. Buchholz verwendete EGF, welches mittels eines sieben Aminosäuren umfassenden diversifizierten *linkers* N-terminal an Env von MLV fusioniert wurde. Die Präsentation von EGF auf dem viralen Hüllprotein verhinderte eine Infektion EGF-Rezeptor-reicher Zelllinien. Selektioniert werden konnten Virusvarianten, deren *linker* durch membranständige Metallo-Matrix-Proteasen gespalten werden konnte. Durch die Spaltung des *linkers* und somit dem Verlust von EGF als Blockierungsdomäne wurde der virale Zelleintritt und die Replikation dieser Varianten ermöglicht (Schneider et al., 2003; Hartl et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit der Verwendung retroviraler *display* Bibliotheken bietet das in dieser Arbeit vorgestellte System der retroviralen *scFv display* Bibliothek, welches ebenfalls auf der Verwendung von rekombinanten MLV beruht.

### 1.3 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeit und Aufgabenstellung

Die Produktion therapeutischer Proteine im Rahmen von gentherapeutischen Maßnahmen lässt sich in sechs aufeinanderfolgende Schritte unterteilen (siehe Abbildung 1.7). Der verwendete Vektor muss in der Lage sein 1.) ein therapeutisches Gen aufzunehmen, 2.) Kontakt zur Zielzelle zu vermitteln, 3) den Einlass und den Transport des Gens in den Zellkern zu vermitteln und nach 4) Transkription und 5) Translation des therapeutischen Gens die 6) Lokalisation des therapeutischen Proteins (Cytoplasma, Membran-assoziiert oder Sekretion) zu bestimmen.



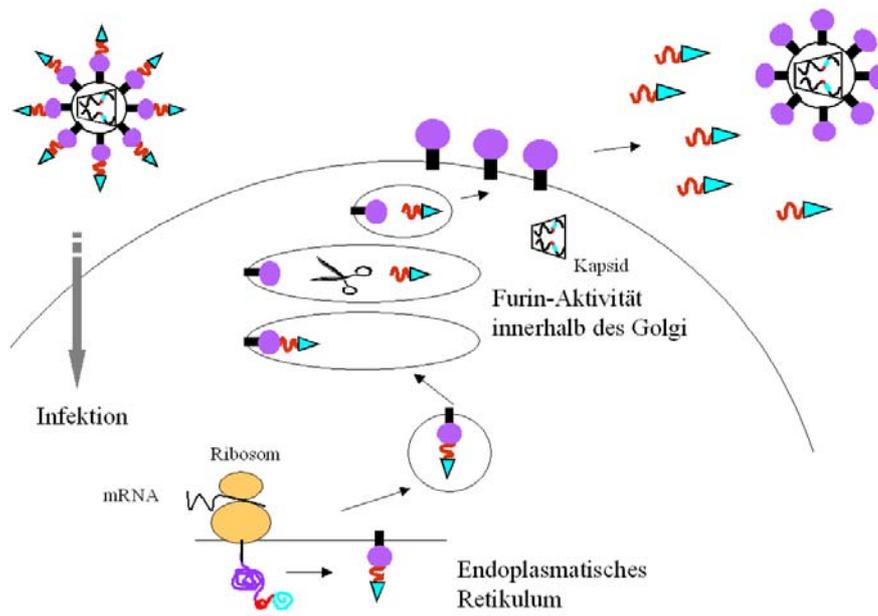
**Abbildung 1.7 Produktion therapeutischer Proteine**

Die Produktion therapeutischer Proteine mittels Vektoren in sechs aufeinander folgenden Schritten:  
 1) Konstruktion eines Vektors mit therapeutischem Gen, 2) Kontakt und Infektion der Zielzelle,  
 3) Transport des therapeutischen Gens in den Zellkern und dessen Integration in das Genom,  
 4) Transkription und 5) Translation des therapeutischen Gens, sowie 6) Lokalisation des Proteins.  
 (Quelle: Transgene S.A. Strasbourg Cedex, Frankreich)

Die bislang verwendeten retroviralen Vektorsysteme basieren zumeist auf der Verwendung von replikationsdefizienten Varianten, was zu Lasten der Effektivität dieser Systeme geht. Trotz der ständig wachsenden Anzahl von therapeutisch

wirksamen Proteinen oder *scFv*'s fehlen effektive Systeme zu deren Produktion, die alle genannten Kriterien erfüllen.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher replikationskompetente Retroviren erzeugt werden, welche therapeutische Gene in die infizierte Zelle übertragen. Die *scFv*'s oder andere therapeutische Proteine werden über eine Furinspaltstelle an das virale Hüllprotein fusioniert. Dadurch wird das therapeutische *scFv* N-terminal der *soluble unit* (SU) des viralen Env-Proteins präsentiert. Erwartet wird zum einen, dass ein entsprechend modifiziertes aMLV gemäß seinem Tropismus weiterhin in der Lage ist, menschliche und murine Zellen zu infizieren. Zum anderen, dass infizierte Zellen die *scFv*'s bzw. therapeutische Proteine freisetzen. Die Abbildung 1.8 verdeutlicht schematisch das erwartete Prozessieren solcher rekombinanten Viren in einer infizierten Zielzelle.



**Abbildung 1.8 Schematische Dargestellung des Prozessierens der rekombinanten viralen Partikel**

Dargestellt ist ein *scFv* (▶) und dessen Verbindung durch einen *linker* (↗) zum Env-Protein, bestehend aus SU (●) und TM (■), von MLV. Der *linker* besteht aus *NheI*-Schnittstelle, RGSHis-tag und Furin-Spaltstelle.

Nach Infektion und der Integration des viralen Genoms kommt es zur Translation viraler mRNA. Noch während der Translation der für Env-kodierenden mRNA wird das *scFv* tragende Env-Protein in das Lumen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums (ER) sezerniert. Die Transmembran-Region (TM) des Env-Proteins ist bereits in der ER-Membran verankert. Nach Abschnürung von Env-tragenden Vesikeln kommt es zu deren Verschmelzung mit dem Golgi-Apparat. Die dort aktive Protease Furin spaltet die mitgeführten *scFv*'s von SU der Env-Proteine ab. Durch die Verschmelzung der Vesikel mit der Zellmembran gelangen die nun löslichen *scFv*'s in das umgebende Medium, während das Env-Protein auf der Zellmembran verbleibt. Gleichzeitig vollzieht sich der als *budden* bezeichnete Prozess, das Abschnüren von viralen Kapsiden zusammen mit der Env-Protein tragenden Zellmembran.

## 1.4 Zielsetzung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit unterteilt sich in zwei Themengebiete.

Zum einen in die Entwicklung von *display* Bibliotheken auf der Basis von Retroviren als Erweiterung zu den herkömmlichen Phagen *display* Bibliotheken. Sowie die Charakterisierung und Demonstration ihrer Anwendbarkeit durch Modellselektionen.

Zum anderen in die Entwicklung neuer Strategien, die eine *in vivo* Produktion von therapeutischen Proteinen erlaubt. Somit sollten die in Kapitel 1.3 angestellten Überlegungen verifiziert werden.

Grundlegend für beide Teilaspekte der vorliegenden Arbeit waren die Arbeiten von Dr. Christian Buchholz, Dr. Martin Engelstädter und Dr. Laura Sanz. Beide letztgenannten selektionierten und charakterisierten Miniantikörper (*scFv*'s) aus Phagen *display* Bibliotheken.

Dr. Martin Engelstädter untersuchte in seiner Arbeit den Miniantikörper 7A5, der eine Spezifität für T- Zellen aufweist, dessen Antigen allerdings noch zu charakterisieren ist (Engelstädter et al., 2001).

Dr. Laura Sanz veröffentlichte kürzlich eine Arbeit hinsichtlich der therapeutischen Wirksamkeit des *scFv*'s L36. Hierbei konnte gezeigt werden, dass L36, ein gegen das extrazelluläre Matrix-Protein Laminin gerichteter Miniantikörper, einen anti-Angiogenese Effekt *in vivo* aufweist (Sanz et al., 2002).

Dr. Christian Buchholz selektionierte in seiner Arbeit eine Furin-Proteasespaltstelle, erstmalig unter Verwendung einer retroviralen *display* Bibliothek (Buchholz et al., 1998).

Beide Miniantikörper und die Sequenz der Furin-Spaltstelle wurden zur Verfügung gestellt und verwendet, um das hier erstmalig vorgestellte System zur rein eukaryontischen Selektion und Produktion therapeutischer Proteine zu etablieren und zu charakterisieren.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien und Methoden der Molekularbiologie

#### 2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, spezifische Nukleotidsequenzen, sei es genomische DNA, Plasmid- oder cDNA, zu amplifizieren (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986; Mullis et al., 1987). Das amplifizierte Fragment kann im Anschluß in weitere molekularbiologische Techniken eingesetzt werden. Eine aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus* stammende DNA-abhängige DNA-Polymerase, die Taq-Polymerase (Perkin Elmer, Vaterstetten) hat ihr Temperaturoptimum bei 72° C. Bei geeigneten Pufferbedingungen, zwei Primern (Starter-Oligonukleotide), Desoxynukleotiden und richtig gewählten Zyklusbedingungen ist es der Taq-Polymerase möglich, das durch die zwei Primer begrenzte Nukleotidfragment zu amplifizieren.

Eine Standard PCR (100 µl) enthält:

1x PCR-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,8; 50 mM KCl;

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01 % Gelatine)

je 1-2 µM (+)-Primer und (-)-Primer

200 µM je Desoxynukleotid

2,5 Einheiten Taq-Polymerase

0,1 µg Plasmid DNA mit der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz

#### **PCR-Bedingungen:**

94° C/ 3 min; 94° C/ 1 min, 55° C/ 1 min, 72° C / 1,5 min, 29 Wiederholungen;

72° C/ 10 min und dann bis 4° C abkühlen.

## 2.1.2 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'3'	Tm laut Hersteller in °C
CF1	ATAAGAAGATTTGCGGCCGCCCTTCCCTCGATAGC GCTAGCCCGTTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC	74,9
CF2	ATAAGAAGATTTGCGGCCGCCCTTCCCTCGATAGC GCTAGCCCGTTTTATTTCAGCTTGGTCCC	74,3
CF3	ATAAGAAGATTTGCGGCCGCCCTTCCCTCGATAGC GCTAGCCCGTTTTATTCCAACCTTGTCCC	73
CF4	ATAAGAAGATTTGCGGCCGCCCTTCCCTCGATAGC GCTAGCCCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC	76,2
CF17	CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCS AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG	78,9
7A5ashis	GCTGCTAGCGTGATGGTGATGGTGATGGCTTCCTCT CCGTTTTATTTCAGCTT	>75
7A5sense	ACTGCCCCGAGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAG	>75
CF21	GCTGCTAGCGTGATGGTGATGGTGATGGCTTCCTCT ACCTAGGACGGTCAGCTT	>75
CF22	AGATTTTCGCGGCCGCACGGCTACCCCTCCGCAACC GGCTGCTAGCGTGATGGTGATG	>75
PCANTABfor	CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC	51
PCANTABrev	CCTTTCTGCTGTTTTGAAATCTAGC	56,3
EASeq1	TATAATTTTGGGAAGGCATCTTG	58
CB6	CCCCTAATCCCCTTAATTCTTC	60
RCRenv- post <i>SfiI</i>	CGTCTCCCGATCTCCATTGGTTACC	61
GMCSF-Furin sense	CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCTCGCCA CCCGCTCACCC	81
GMCSF-Furin antisense	GCTAGATTTTCGCGGCCGCACGGCTACCCCTCCGCA ACCGTTTTTGGCCTGGTTTTTTGC	78

### 2.1.3 Plasmide und Vektoren

Zur Herstellung der retroviralen *scFv display* Bibliothek wurde das Plasmid pMo, welches für das Volllängengenom des ecotropen Moloney Stammes des Maus Leukämie Virus (MLV) kodiert, verwendet.

Die Produktion therapeutisch wirksamer *scFv*'s beruhte auf Modifikationen des Plasmides p4070A, welches für das Volllängengenom des amphotropen MLV's kodiert. Beide Plasmide, pMo und p4070A wurden freundlicher Weise von Dr. Christian Buchholz zur Verfügung gestellt.

Die Plasmide pHen1L36 und pHen17A5 wurden freundlicher Weise von Dr. Laura Sanz und Dr. Martin Engelstädter zur Verfügung gestellt.

#### **pMo $\alpha$ HUVECXa (eMLVlib)**

Die Amplifikation der gegen menschliche Endothelzellen (HUVEC) gerichteten *scFv*'s erfolgte unter Verwendung von degenerierten Primern. Als Matrize diente das hergestellte Phagemid pCANTAB 5E  $\alpha$ HUVEC.

Durch PCR Mutagenese wurden die Faktor Xa Spaltstelle und die Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI* in die Amplifikate eingefügt. Verwendet wurden die Primer CF1-4 in äquimolaren Mengen und Primer CF17.

Die Ligation erfolgte in das entsprechend geöffnete Plasmid pMo (siehe Kapitel 2.1.4). Dieses *SfiI* und *NotI* geöffnete Plasmid entstand durch den Restriktionsverdau von pEMo, wodurch die inserierte Sequenz des *epidermal growth factors* (EGF) ausgeschnitten wurde (vergl. Buchholz et al., 1998).

#### **pL36-Xa-Mo und p7A5-Xa-Mo**

Ebenfalls auf PCR Mutagenese beruhend, wurde die L36 bzw. 7A5 Sequenz mit den degenerierten Primern CF1-4 und CF17 aus ihren Ausgangsplasmiden amplifiziert, in pMo kloniert (vergl. Abbildung 3.1) und sequenziert.

#### **pL36-furin-A und p7A5-furin-A**

Die Amplifikation und Mutagenese der L36/ 7A5 Sequenz erfolgte durch zwei aufeinander folgende PCR's. Die Amplifikation von L36 erfolgte zuerst durch die

Primer CF17 und CF21. 1 µl dieses Reaktionsansatzes wurde in die zweite PCR als Matrize eingesetzt. Sie erfolgte unter Verwendung der Primer CF17 und CF22.

Die Amplifikation von 7A5 geschah unter Verwendung der Primer 7A5sense und 7Aashis, bzw. im zweiten Schritt 7A5sense und CF22.

Erhaltene Fragmente wurden in pGEM-T-easy (Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg) subkloniert und via *SfiI/NotI* in das entsprechend geöffnete Plasmid pA umkloniert (vergl. Abbildung 3.15). Das Plasmid pA entstand durch den Restriktionsendonuklease Verdau von pE-A. pE-A kodiert ebenfalls für das Moloney-MLV, wobei die *env*-kodierenden Sequenzen gegen die des amphotropen Stammes 4070A ausgetauscht wurden. N-terminal der *Env*-Sequenz kodiert pE-A für EGF. Der EGF-kodierende Bereich wurde durch die *SfiI/NotI* Restriktion entfernt.

#### **pGMCSF-furin-E**

Das Plasmid mit der murinen cDNA von GM-CSF wurde von Invitrogen bezogen (pORF-mGM-CSF, cat. No.: porf-mgmcsf; Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Gemäß der in Abbildung 3.15 dargestellten Klonierungsstrategie wurde die GM-CSF-Sequenz mit den Primern GMCSF-Furin sense und GMCSF-Furin antisense amplifiziert und in pGEM-T-easy (Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg) subkloniert. Es erfolgte eine Restriktion des entstandenen Plasmids mit *SfiI* und *NotI* und eine Umklonierung des aufgereinigten Fragments in das entsprechend geöffnete Plasmid pMo.

### **2.1.4 Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von Plasmid-DNA**

Restriktionen, Dephosphorylierungen und Ligationen von Plasmid-DNA oder mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmenten erfolgten mit Enzymen der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers.

Die Ligation der aufgereinigten Restriktionsfragmente mit der restringierten und dephosphorylierten Vektor-DNA erfolgte im molaren Verhältnis 2:1 mit der T4-Ligase

(100 U/Ansatz) und 1,5 µl Ligasepuffer (NEB, Schwalbach) in einem Volumen von 20 µl bei 4° C über Nacht.

Um Religationen zu vermeiden wurden linearisierte Plasmide mittels alkalischer Phosphatase (*calf intestinal alkaline phosphatase*, CIP, NEB, Schwalbach) dephosphoryliert. Das Enzym entfernt die für eine effiziente Ligation nötigen 5'-Phosphatgruppen der DNA. Für die Dephosphorylierung wurden 10 U CIP eingesetzt und 1 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 75° C inaktiviert.

### **2.1.5 TA-Klonierung von PCR Amplifikaten**

Die Klonierung von PCR-Amplifikaten unter der Verwendung der Taq-Polymerase wurde mittels des „TOPO TA cloning-Kit“ (Invitrogen, Groningen) durchgeführt. In den Klonierungsvektor TOPO 2.1 können aufgrund seiner überhängenden Thymidine an den 5'-Enden PCR-Fragmente inseriert werden, da die Taq-Polymerase die PCR-Fragmente an den 3'-Enden mit überhängenden Adenosinresten versieht. Für die Ligation werden 2 µl des PCR-Amplifikats mit 2 µl A.bidest und 1 µl pCR 2.1-TOPO-Klonierungsvektor gemischt, 5 min bei RT inkubiert und bis zur Transformation auf Eis gestellt. Die „One Shot Transformation Reaction“ kann direkt im Anschluß nach den Angaben des Herstellers erfolgen.

### **2.1.6 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen**

Um eine effiziente Transformation von Bakterien zu ermöglichen, wurde der Bakterienstamm TOP10F' mit einer nach Hanahan (1983) modifizierten Methode kompetent gemacht. Nach dem Animpfen von 100 ml LB-Medium mit 500 µl einer Übernachtskultur wurde die Bakteriensuspension bei 37° C bis zu einer Dichte (OD550) von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, bei 6.000 rpm und 4° C pelletiert (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) und in 40 ml TFB1 (30 mM KOAc, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure

eingestellt, danach sterilfiltriert) resuspendiert. Nach einer Inkubationzeit von 15 Minuten auf Eis und einer Zentrifugation bei 6.000 Upm bei 4°C resuspendierte man das Bakterienpellet in 4 ml TFB2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin, pH 6,5 mit KOH-Lösung eingestellt, danach sterilfiltriert). Die Bakteriensuspension wurde dann in Aliquots à 100 µl auf Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde eine Transformation von 1 ng zirkulärer Plasmid-DNA durchgeführt. Die Transformationseffizienz sollte mindestens  $1 \times 10^6$  Transformanden/µg DNA betragen.

Zur Transformation wurden 100 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1-2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Temperaturschock (45 s 42°C; 2 min Eis) wurden die Bakterien mit 500 µl SOC-Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein) versetzt und entweder bei 37°C für eine Stunde oder bei 25°C für 4 Stunden (zur Klonierung großer Plasmide über 12 kbp) in einem Bakterienschüttler kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agaroseplatten, die mit dem jeweiligen Antibiotikum supplementiert waren, ausgestrichen und entweder bei 37°C über Nacht oder bei Raumtemperatur 2- 3 Tage inkubiert.

### **2.1.7 Plasmid-DNA Präparation mittels QIAGEN-Säulen**

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterien erfolgte mit den Plasmid-Kits der Firma Qiagen (Hilden). Zur Präparation geringer Mengen Plasmid-DNA wurden die Bakterien einer 5 ml LB-Amp Übernachtskultur zunächst für 10 Minuten bei 3.000 Upm in einer Zentrifuge (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) pelletiert. Anschließend wurde das Sediment mit vom Hersteller beigelegten Puffern lysiert, pelletiert und die Plasmid-DNA aus dem Überstand über eine Anionenaustauschersäule isoliert. Zur Präparation einer großen Anzahl unterschiedlicher Klone wurde das QIAprep-8-Kit verwendet und zur Präparation von DNA für eine spätere Sequenzierung das QIAprep-Spin-Kit.

Große Mengen an Plasmid-DNA (Maxi-Präparation) wurden aus 300 ml Übernachtskulturen gewonnen. Die Bakterienzellen wurden für 15 Minuten bei 5.000 Upm in einem JA14-Rotor (Beckman, München) pelletiert und mit Hilfe der dem

Präparationskit beigefügten Puffer lysiert. Die anschließende Isolierung und Reinigung der DNA erfolgte mit tip-500-Säulen nach den Angaben des Herstellers. Die erhaltene Menge an DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

### **2.1.8 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen**

Die Präparation genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte mit Hilfe des DNeasy-Tissue-Kits der Firma QIAGEN (Hilden). Hierzu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen verwendet, die in 200 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM  $\text{Na}^2\text{HPO}^4$ , 1,4 mM  $\text{KH}^2\text{PO}^4$ ) resuspendiert worden waren. Die Isolierung der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die DNA in 200  $\mu\text{l}$  Aqua bidest gelöst und die Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Pharmacia-UV-Spektrometer (Gene Quant II, RNA/DNA-Calculator, Pharmacia Biotech), welches die Messung kleiner Volumina erlaubte.

### **2.1.9 Isolierung viraler RNA**

Zur Präparation viraler RNA wurden Zellkulturüberstände infizierter Zelllinien geerntet und steril filtriert. Anschließend erfolgte eine Aufkonzentration der Viren durch Ultrazentrifugation in Aliquots zu je 11ml in SW41-Rotor (Fa. Beckmann) für 1h, 30000 rpm, bei 4°C. Kleine Probenvolumina wurden 1h in Eppendorf-*tubes* bei 13000 rpm, 4°C, unter Verwendung einer Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf) aufkonzentriert.

Die Präparation der viralen RNA erfolgte dann unter Verwendung des *viral RNA preparation kit* (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

### **2.1.10 Reverse Transkription und RT-PCR**

Die reverse Transkription viraler RNA in cDNA erfolgte unter Verwendung der reversen Transkriptase *Superscript II<sup>TM</sup>* (Gibco BRL) nach Angaben des Herstellers. Zur Vermeidung von Degradation der RNA wurde den Ansätzen ein Ribonuclease-Inhibitor (RNAsin; Fa. Promega) nach Angaben des Herstellers hinzugefügt.

Zur reversen Transkription der RNA des ecotropen MLV wurde der Primer RCRenvpast*Sfi* verwendet. RNA des amphotropen MLVs wurde durch den Primer EASeq1 in cDNA transkribiert.

### **RT-PCR**

Die Amplifikation der hergestellten cDNA diente zur Kontrolle der Integration der *scFv*-Sequenzen in das jeweilige Virusgenom. Demnach wurden Primer verwendet, die diese Sequenzen flankieren.

Zur Amplifikation der *scFv*-Sequenzen aus dem ecotropen Kontext wurden der Primer RCRenvpast*Sfi* aus der reversen Transkription und der Primer CB6 verwendet. Analog dazu die Primer EASeq1 und CB6 zur Amplifikation aus dem amphotropen Kontext.

Es erfolgte eine Standard-PCR mit folgenden Zyklen:

4min 95°C; 1min 95°C; 1min 50°C; 1min 72°C; 10min 72°C; ∞ 4°C

34 Wiederholungen von Schritt 2 bis 4

### **2.1.11 Agarose-Gelelektrophorese**

(nach Maniatis et al., 1982)

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Länge der zu trennenden Fragmente wurden 1-3%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden 1-3 g Agarose (Gibco/BRL, Eggenstein) in 100 ml 1xTAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) gekocht, auf ca. 60°C abgekühlt und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Nach Erstarren des Gels wurde es mit 1xTAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol FF, 30% Glycerol in Aqua bidest) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und 1-2 Stunden bei 80-120 Volt aufgetrennt. Die verwendete Spannung richtete sich nach der Gelkonzentration. Als DNA-Größenstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter (Gibco/BRL, Eggenstein), die Hae III restringierte fX174 DNA (Pharmacia, Freiburg) und die 100 bp DNA-Leiter (NEB, Schwalbach) verwendet. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten anschließend auf einem UV-Transilluminator (302 nm) detektiert werden.

**Die Fragmentlängen der Größenstandards in bp:**

1 kb DNA-Leiter: 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506/517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216

ΦX174 DNA-Hae III: 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353

100 bp DNA-Leiter: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1517

**2.1.12 Elution von DNA aus Agarosegelen**

Zur weiteren Klonierung wurden PCR-Amplifikate und Restriktionsansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mittels des QIAEX-II<sup>TM</sup>-Gelextraktions-Kits nach Angaben des Herstellers aus der Gelmatrix extrahiert. Das Prinzip dieser Reinigungsmethode beruht auf der Adsorption von DNA an die QIAEX-Glaskügelchen-Emulsion. Alternativ wurde das JETsorb Gel Extraction Kit/300 der Firma Genomed (Bad Oeynhausen) verwendet, welches auf dem selben Prinzip beruht.

**2.1.13 Polyacrylamidgele und Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Es wurden Polyacrylamid-Flachbettgele (18x16 cm) oder Mini-Polyacrylamid-Flachbettgele (8,5x8 cm) verwendet. Die Gele bestehen aus einem Sammelgel (Acrylamidkonzentration: 5%) und aus einem Trenngel mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen, je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine.

**Probenaufbereitung**

Für den Nachweis des *scFv*-tragenden MLV Hüllproteins bzw. des löslichen *scFv*'s wurden Proben zellfreier Überstände aus einer infizierten, konfluenten Zellkultur genommen. Betreffende Zelllinien wurden zuvor, nach Erreichen der Konfluenz, bis zu fünf Tage in serumfreiem Zellkulturmedium gehalten. Die Proben wurden anschließend in 2x-Probenpuffer aufgenommen.

### 2x-Probenpuffer

100 mM Tris/HCl, pH 6,8; 200 mM Dithiothreitol (DTT); 4% SDS;  
0,2% Bromphenolblau; 20% Glycerin; 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol

### Sammelgel

(alle Angaben in ml für 18x16 cm Gel, Höfer-Gelkammer, Amersham Pharmacia biotech)

Prozent Acrylamid	5
<b>30% Acrylamid/ 0,8% Bis</b>	1,67
<b>1M Tris pH6,8</b>	1,25
<b>10% SDS</b>	0,1
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7,03
<b>20% APS</b>	0,05
<b>TEMED</b>	0,01

### Trenngele

(alle Angaben in ml für 18x16 cm Gel, Höfer Gelkammer, Amersham Pharmacia biotech)

Prozent Acrylamid	8	9	10	11	12	20
<b>30% Acrylamid/ 0,8% Bis</b>	8	9	10	11	12	20
<b>1M Tris pH8</b>	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2
<b>10% SDS</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>H<sub>2</sub>O</b>	10,7	9,7	8,7	7,7	6,7	0,7
<b>20% APS</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>TEMED</b>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

Die Gele wurden durch Polymerisation von Monomeren (Acrylamid) und aus einem Quervernetzer (N,N'-Methylenbisacrylamid) hergestellt. Die Reaktion wird von

Ammoniumpersulfat (APS) katalysiert, N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED) dient dabei als Starter. Die fertige Trenngellösung wurde zügig zwischen zwei mit Klammern zusammengehaltene und seitlich abgedichtete Glasplatten pipettiert. Die Lösung wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol dekantiert und das noch flüssige Sammelgel als oberste Schicht aufgetragen. Die Probenaschen wurden durch das Einschieben eines Kunststoffkamms in das noch flüssige Sammelgel ausgespart.

Nach dem Einspannen der Flachbettgele in Minigelkammern (Mini-Protean, BioRad), oder Hoefer-Gelkammern (Hoefer SE 600 series, Amersham Pharmacia biotech) wurden die beiden Pufferreservoirs mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Das Gel leitet den Strom von der oberen in die untere Kammer. Mit Hilfe einer Hamilton-Mikroliterspritze erfolgte das Beladen der Probenaschen. Es wurde ein Gleichstrom angelegt, anhängig von Anzahl, Größe der Gele und gewünschtem Laufverhalten zwischen 2 und 125 mA. Als Spannungsquelle diente ein Standard Power Pack P25 (Biometra).

### **Elektrophoresepuffer**

0,1M Glycin; 0,1M Tris/HCl pH 8,9; 0,1% SDS

Um das Molekulargewicht der Proteinbänder bestimmen zu können, wurden zusätzlich zu den Proben Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen. Es handelt sich hierbei um Gemische aus Proteinen mit bekannten Molekularmassen:

**RPN 800 Full range Rainbow** (Amersham Pharmacia biotech):

250/ 160/ 107/ 77/ 52/ 35/ 30/ 25/ 15/ 10 [kDa]

**BenchMark™ Prestained** (Invitrogen)

172,6/ 111,4/ 79,6/ 61,3/ 49,0/ 36,4/ 24,7/ 19,2/ 13,1/ 9,3 [kDa]

### **2.1.13.1 Comassie-Färbung von SDS-Gelen**

Zur unspezifischen Detektion von Proteinen in PAA-Gelen wurden die Gele für ca. 30 min in Coomassielösung inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung entfärbt (Wanne auf Wanckler). Die Entfärbung wird unter mehrmaligem Badwechsel durchgeführt, bis die angefärbten Proteinbanden sichtbar werden.

#### **Coomassie Färbelösung**

22,7% Methanol (v/v); 4,6% Essigsäure (v/v); 0,1% Coomassie-Blue (Fa. Sigma)

#### **Coomassie Entfärbelösung**

20% Methanol; 7,5% Essigsäure

### **2.1.14 Proteinnachweis mittels Western-Blotting**

Die im SDS-Gel durch die Elektrophorese aufgetrennten Proteine können nach der Methode von Towbin et al. (1979) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden. Man hat dann die Möglichkeit ein spezifisches Protein durch eine Antikörperreaktion zu identifizieren. Diese Methode des Proteinnachweises wird Western-Blotting genannt.

#### **Verwendete Puffer:**

##### **Transfer Puffer**

48 mM Tris; 39 mM Glycin; 1.3 mM SDS; 20 % Methanol

##### **Waschpuffer**

TBS-T (*Tris-buffered saline*: 150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,4); 0,1% Tween20

##### **Blockpuffer**

10% Pferde-Serum (GIBCO BRL) in TBS-T

##### **Inkubationspuffer**

5% Pferde-Serum (GIBCO BRL) in TBS-T; Antikörper in entsprechender Verdünnung

Die Nitrozellulosemembran (Hybond™ ECL™ Amersham pharmacia) und die Filterpapiere (Fa. Whatman 3) wurden mit Transferpuffer getränkt. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde auf die Nitrozellulosemembran gelegt. Auf beide Seiten wurden jeweils drei Lagen des Filterpapiers aufgelegt. Dieser Stapel wurde dann in eine Transferkammer (Biometra Semi-dry und Trans-Blot SO, Fa. Bio-Rad) gelegt. Nach dem Anlegen einer Stromstärke von 120 mA/Gel für 45-60 Minuten wanderten die Proteine in Richtung Anode aus dem Gel heraus. Sie werden von der Membran gebunden.

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulose für 60 Minuten mit dem Blockpuffer inkubiert. Hierbei werden unspezifische Proteinbindungsstellen abgesättigt. Die Membran wurde dann dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, um überschüssige Proteine zu entfernen.

Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper, 1:2000 in Inkubationspuffer verdünnt, für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C jeweils unter Schütteln. Ungebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimalige Waschschrte für mind. 10 Minuten in TBS-T entfernt.

Mit dem Sekundärantikörper, an dem das Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert ist, wird anschließend für eine Stunde inkubiert (1:10000 in Inkubationspuffer verdünnt).

#### **Verwendete Antikörper:**

mouse RGS-His Antibody #34650 (Qiagen, Hilden).

goat anti mouse HRP conjugate #A-2554 (Sigma, Deisenhofen).

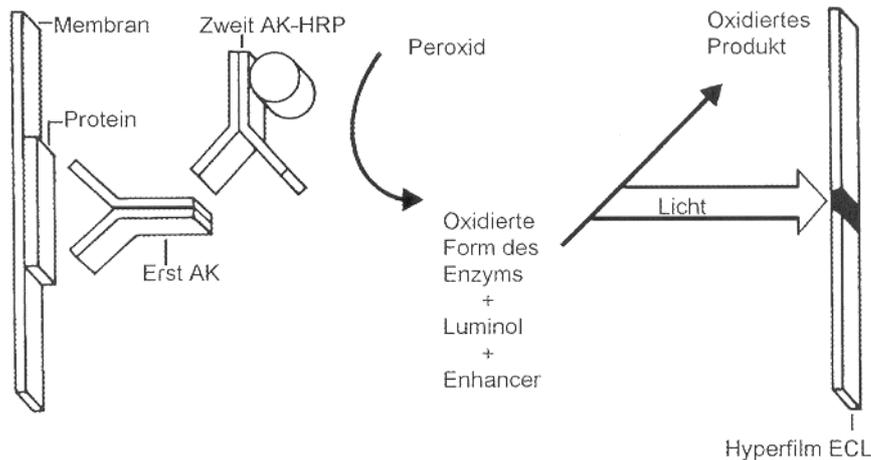
#### **2.1.14.1 Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Detektionssystem**

Das ECL-System (Pierce biotechnology, Rockford IL) ist eine Licht emittierende nicht-radioaktive Methode, um immobilisierte Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern zu detektieren.

Der eingesetzte Zweitantikörper, der spezifisch an den Erstantikörper bindet, ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Das zugegebene Luminol wird durch HRP unter Mitwirkung von Wasserstoffperoxid oxidiert und geht dabei in einen energetisch angeregten Zustand über. Dabei wird Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm emittiert.

Wird ein Röntgenfilm (ECL-Hyperfilm Fa. Amersham) diesem Licht ausgesetzt, zeigt sich eine Schwärzung des Films an dieser Stelle.

### Immunodetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz



**Abbildung 2.1 Immunodetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz**

AK= Antikörper; HRP= *Horseradish peroxidase*;  
Modifiziert nach "ECL Western blotting protocols", Amersham Life Signs

Auf die feuchte Nitrozellulose werden 3 ml ECL-Lösung (2) und 3 ml ECL- Lösung (1) gegeben (ECL-Reagenzienkit, Pierce biotechnology, Rockford IL). Nach einer Minute Inkubationszeit wird die Nitrozellulose in Cellophanfolie eingeschlagen und zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Autoradiographiekassette (Kodak x-omatic, Fa. Kodak) gelegt. Die Expositionsdauer reicht von wenigen Sekunden bis zu 30 Minuten und ist von der Signalstärke abhängig. Die Entwicklungszeit des Films beträgt 90 Sekunden in Kodak D19 Entwicklerlösung. Nach kurzem Wässern wird der Film fixiert (3 Minuten in Kodak-Unifix Fixierer).

Zur Dokumentation werden die Blots mit einem Flachbettscanner (Scan Jet 3c, Fa. Hewlett Packard) mit einer Auflösung von 600 dpi eingelesen.

### **2.1.15    Aufreinigung von Proteinen mit His-tag**

Die Aufreinigung eukaryontisch produzierter *scFv*'s erfolgte direkt aus dem Zellkulturüberstand entsprechend infizierter HT1080 unter Verwendung des His-tags des produzierten *scFv*'s.

Hierzu wurden 10 ml Zellkulturüberstand mit 500 µl Superflow Ni-NTA (Qiagen, Hilden) versetzt und unter Rotation eine Stunde bei 4°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 1500 rpm (Beckmann), der Überstand wurde dekantiert. Nach Resuspension des Ni-NTA Pellets in 25 ml Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol) wurde erneut zentrifugiert und dekantiert. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt und das Pellet anschließend in 2 ml Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol) resuspendiert. Das Eluat wurde auf seinen Reinheitsgrad mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung untersucht. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte photometrisch mittels Biorad Protein Assay nach Angaben des Herstellers (Biorad, München).

## 2.2 Methoden der Zellbiologie und Virologie

### 2.2.1 Zellen, Zelllinien und Medien

Folgende Zelllinien und primäre Zellen wurden verwendet. Angegeben ist die Art der Zellen und ihre Quelle, zumeist *American Type Culture Collection* (Rockville, Md., USA).

NIH 3T3	kontakthihibierte embryonale Mäuse-Fibroblasten (ATCC: CRL-1658)
CDC-HMEC	humane Endothelzelllinie (Dr E. Ades, Center for Disease Control, Atlanta, GA)
HT1080	humane Fibrosarkomzelllinie (ATCC: CCL-121)
293T	humane Nierenepithelzelllinie (ATCC: CRL-11268)
MDA-MB468	humane Brustkarzinomzelllinie (ATCC: HTB-132)
MDA-MB231	humane Brustkarzinomzelllinie (ATCC: HTB-26)
A431	humane Hautkarzinomzelllinie (ATCC: CRL-2592)
HUVEC	primäre humane Endothelzellen der Nabelschnur (ATCC: CRL-1730)
LLC	<i>Lewis lung carcinoma</i> , murin (ATCC: CRL-1642)
A3.01	humane Leukämie-T-Zelllinie (NIH-AIDS Research and Reference Reagent-Program: 166)

Adhärente Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagles Medium ("*low glucose*" DMEM von GIBCO/BRL, Eggenstein) mit 10 % Komplement-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS; Biochrom KG, Berlin), 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin) und Antibiotika (0,1 mg/ml Nystatin, 100 *Einheiten*/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin; Biochrom KG, Berlin) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre in einem Zellinkubator (Cytoperm, Fa. Heraeus, Hanau) kultiviert. Supplementiertes Medium wird mitunter Verpackungszell-Medium (VZ) genannt. Zum Waschen der Zellen wurde PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) verwendet. Zur Zellpassage wurden die Zellen mit einer

0,25%igen Trypsinlösung in PBS (PBST) abgelöst, 1:10 verdünnt und mit frischem Medium neu ausgesät. Folgende adhärenente Zelllinien wurden kultiviert:

Die Suspensionszelllinie A3.01 wurde in RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Eggenstein) mit 10 % FKS, L-Glutamin und Antibiotika kultiviert.

Die primären Endothelzellen (HUVEC) wurden in dem Basalmedium MCDB 131 (GIBCO/BRL, Eggenstein) kultiviert. Supplementiert wurde mit 10 ng/ml mEGF (BD, Heidelberg, # 354001), 1 µg/ml Hydrocortison (Sigma, Aldrich, #H0888), 10mM Glutamin, Antibiotika und 10-15% FKS. Alternativ wurden HUVEC in *Endothelial Cell Growth Medium* der Firma Promocell, Heidelberg kultiviert.

## **2.2.2 Einfrieren und Lagerung von Zellen**

Adhärenente Zellen wurden mit PBST vom Kulturgefäßboden abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (1.300 rpm, 4 °C, 10 min, Heraeus-Minifuge, Hanau) und  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 800 µl 4°C-gekühltem Medium 1 (DMEM bzw. RPMI, 20% FKS) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt und mit 800 µl des bei 4°C gekühlten Medium 2 (DMEM bzw. RPMI, 20% FKS, 20% DMSO, Merck, Darmstadt) überschichtet. Anschließend wurden die Zellen auf -80 °C und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

## **2.2.3 Auftauen von Zellen**

Die in den Einfrierröhrchen befindlichen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37° C zügig aufgetaut und sofort in 20 ml Medium überführt. Zur Entfernung des zytotoxischen DMSO wurden die Zellen für 10 Minuten bei 1.300 rpm (Minifuge T, Heraeus Hanau) pelletiert, anschließend resuspendiert und in Kultur genommen. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

### **2.2.4 Transfektion mittels Lipofektamin™**

Das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Zur stabilen und transienten Transfektion wurde die DNA mit Lipidvesikeln komplexiert, welche anschließend in das Zytoplasma aufgenommen werden (Lipofektion). Hierzu wurde das Transfektionsreagenz Lipofektamin™ in Kombination mit Lipofektamin PLUS™ (GIBCO BRL, Eggenstein) verwendet.

Mittels diese Methode wurden Virusstocks, durch die Transfektion der Zelllinie 293T, mit allen hergestellten Plasmiden (vergl. Kapitel 2.1.3) erstellt.

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Pro Transfektionsansatz wurden 2-4 µg Plasmid-DNA mit 6 µl Lipofektamin PLUS™ in 100 µl OptiMEM (GIBCO BRL, Eggenstein) für 15 min bei RT vorinkubiert. In einem parallelen Ansatz wurde 5 µl Lipofektamin™ in 100 µl OptiMEM ebenfalls für 15 min bei RT präinkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze zusammengegeben und nochmals für 15 min inkubiert, sodass die kationischen Lipide des Lipofektamins mit der DNA komplexierten. In dieser Zeit wurden die Zellen mit 2 ml serumfreien Medium überschichtet und gewaschen. Der Transfektionsansatz wurde danach in 800 µl OptiMEM aufgenommen und zu den Zellen gegeben. Das DNA-Liposomengemisch wurde 4 h bei 37°C im Zellinkubator inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurde frisches Zellkulturmedium zugegeben.

Die Expression des viralen Gens p30 wurde 48 h nach Transfektion mittels IPA (In-situ-Immun-Peroxidase-Assay) überprüft, bzw. die generierten Viren nach Filtration (0,45 µm-Spritzenfilter, Sartorius, Göttingen) zur Entfernung von Zelldebris zur Transduktion eingesetzt.

### **2.2.5 Transduktion von Zelllinien**

Für die Transduktion bzw. Infektion von adhärennten Zelllinien wurden am Vortag  $1 \times 10^5$  Zellen in einer 6-Loch Platte (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Das Kulturmedium der zu transduzierenden Zellen wurde entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und

anschließend mit Virus-haltigem Überstand inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 4-5 Stunden bei 37° C erfolgte ein Mediumwechsel.

### **2.2.6 Immunperoxidase-Test (IPA)**

Um die Expression von viralen Proteinen in infizierten oder transfizierten Zellen nachzuweisen, wurde ein Immunperoxidase-Test durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden am Vortag in eine 96- oder 48-Loch-Platte überführt. Adhärenz wachsende Zellen hafteten bis zum darauffolgenden Tag an der Kunststoffoberfläche der Platte. Fixierung und Aufschluß der Zellen erfolgte durch eine 45 minütige Behandlung mit Methanol bei -20° C. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Blockierungspuffer (2 % Milchpulver in PBS) für eine Stunde bei RT blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem spezifischen Antiserum in einer zuvor getesteten Verdünnung in 1% MP in PBS für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Auf zwei weiteren Waschschritten mit PBS folgte die 1-stündige Inkubation bei 37° C des mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers, der gegen den Fc-Teil der spezifischen Immunglobuline in den zuvor verwendeten Antiserum gerichtet ist, eingesetzt in der jeweils ausgetesteten optimalen Verdünnung in 1% MP in PBS. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit der Substratlösung (4 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol in 1 ml Dimethylformamid gelöst, 19 ml 20 mM NaOAc-Puffer, pH 5,0 und 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 45µm-filtriert) kommt es zur enzymatischen Umsetzung des Chromogens und damit zur Färbung der transfizierten oder infizierten Zellen. Diese konnten lichtmikroskopisch anhand ihrer Rotfärbung von den nicht-transfizierten oder -infizierten Zellen unterschieden werden.

3-Amino-9-ethylcarbazol, Dimethylformamid und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen.

α-MLVp30-CA Serum: isoliertes Gesamt-IgG aus mit MLV Gag-CA inoculierter Ziege, hergestellt am PEI (1:500 in PBS/ 1% MP).

Als Sekundärantikörper wurde *immune HRP labeld anti goat #P0449* (Dako, Dänemark) 1:1000 in PBS/ 1%MP verwendet.

### 2.2.7 Test auf Aktivität viraler Reverser Transkriptase

Als Marker für die Präsenz von Viruspartikeln diene der Nachweis von Reverser Transkriptase-Aktivität (RT) im Kulturmedium infizierter Zellen.

Der Test detektiert die auf dem *pol*-Gen kodierte Reverse Transkriptase (RT) im lysierten Überstand einer Zellkultur. Das Testsystem beruht auf einem sog. Sandwich-ELISA: Die RT transkribiert im Test enthaltene immobilisierte Oligonukleotide. Die dNTPs enthalten einen gewissen Anteil BrdUTP (Bromo-deoxyuridin-triphosphat), ein markiertes Nukleotid, das in den transkribierten Strang eingebaut wird. Die markierten Nukleotide werden von einem Antikörper erkannt, der mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Dieses Enzym setzt ein Substrat zu einem löslichen Farbstoff um, der bei 405 nm an einem ELISA-Reader (SLT Spectra, Crailsheim) detektiert werden kann. Die Menge an umgesetztem Farbstoff korreliert mit der Menge eingebauter markierter Nukleotide, die wiederum mit der Menge RT im Überstand korreliert. An Hand einer Standardreihe kann dann eine bestimmte Absorption einer RT Menge zugeordnet werden. Hier wurde ein RT-Test der Firma Cavid (Uppsala, Schweden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Ermittelte Werte können in Korrelation zu der Anzahl an Viruspartikeln gesetzt werden (Schupbach J, et al. 1994) und dienen zur Normierung vorgenommener Verdünnungsreihen (vergl. Kapitel 3.1.2.3).

### 2.2.8 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbant-Assay (ELISA)

Dieser enzymgekoppelte Immunadsorptionstest wird als qualitative und quantitative Methode zum Nachweis spezifischer Antikörper eingesetzt. Die Methode beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung, die mittels eines Enzym-gekoppelten Sekundär-Antikörpers, der gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist, nachgewiesen wird. In vorliegender Arbeit war der Enzym-gekoppelte Sekundär-Antikörper gegen das verwendete His-tag des *scFv*'s L36 gerichtet.

Zuerst wurde eine 96-Loch-Platte (Immuno<sup>TM</sup>Platten Maxi Sorp<sup>TM</sup>Surface, BD, Heidelberg) wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, mit 100 µl Laminin (10µg/ml) beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden unspezifische

Bindungsstellen mit 200 µl MPBS (PBS, 4% Milchpulver #T145.1, Roth, Karlsruhe) für 2h bei RT abgesättigt.

Es folgte die Inkubation von 100 µl der Probe pro *well* für eine Stunde bei RT.

Als Probe wurde das eukaryontisch hergestelltes, Furin-gespaltene L36 in Form unkonzentrierter Zellkulturüberstände infizierter HT1080 verwendet. Als Kontrolle diente das bakteriell exprimierte rL36, welches ein *myc-tag* beinhaltet.

Der Nachweis der Bindung des bakteriell exprimierten rL36 erfolgte über den Antikörper 9E10 (einem Maus-anti-myc Antikörper, Sanz et al., 2001). Der Nachweis des eukaryontisch hergestellten L36 erfolgte unter Verwendung eines gegen dessen *His-tag* gerichteten Antikörpers (RGS-His Antibody #34650, Qiagen, Hilden). Von beiden Antikörpern wurden 100 µl in einer Konzentration von 10 µg/ml in PBS, 1% MP, 0,05% Tween 20 eingesetzt. Inkubiert wurde erneut 1h bei RT.

Die Detektion der erfolgte durch Inkubation für 1h bei RT mit einem Ziege-anti-Maus, HRP konjugierten Antikörper (#A-2554 Sigma, Deisenhofen), 1:1000 in PBS, 1% MP.

Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Substratlösung (5 ml PBS, pH 6,0; 5 mg OPD, Sigma, 7,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in einem Volumen von 50 µl pro Loch zugegeben. Die Farbreaktion wurde mit 25 µl 2.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Die Intensität der Farbreaktion, die sich proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper verhält, wurde photometrisch bei 490 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im ELISA Reader (Spektra, SLT) bestimmt.

### **2.2.8.1 GM-CSF ELISA**

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest zur Konzentrationsbestimmung des *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) aus der Maus wurde von R&D systems bezogen (mouse GM-CSF immunoassay kit, Cat. No.:MGM00). Seine Anwendung erfolgte gemäß der Herstellerangaben.

## 2.2.9 Analytische Durchflußzytometrie

### (FACS, „Fluorescence Activated Cell Sorting“)

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellpopulationen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Zellen. Mit Hilfe eines Argon-Lasers werden die Zellen bei 488 nm angeregt, worauf die in Abhängigkeit des jeweils verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs emittierten Signale bei unterschiedlichen Wellenlängen eine qualitative wie auch quantitative Aussage auf die Expression des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proteins erlauben. Diese Technik wurde hier verwendet, um die Anbindung eukaryontisch produzierten 7A5 an das Antigen der T-Zelllinie A301 nachzuweisen.

Die Anfärbung der Zellen wurde in Polystyren-Röhrchen (Falcon, BD, Heidelberg) durchgeführt. Je  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in 100  $\mu$ l FACS-Puffer (FACS-Puffer mit 1% FCS, 0,1% NaN<sub>3</sub>, Merck Darmstadt) resuspendiert und mit 100  $\mu$ l Zellkulturüberstand 7A5-Xa-Mo infizierter HT1080 Zellen inkubiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 4° C im Dunkeln, wurden die Proben zweimal mit 500  $\mu$ l Wasch-Puffer gewaschen (1200 rpm, 10 min, 4°C, Minifuge T, Heraeus, Hanau). Nach Inkubation der Proben mit einem His-Antikörper (RGS-His Antibody #34650; Qiagen, Hilden) wurde erneut gewaschen. Die Detektion der Komplexe erfolgte durch Inkubation mit einem PE markierten Antikörper (mouse IgG1 kappa PE, Klon x40, BD Heidelberg), zweimaligem Waschen und Fixierung der Proben durch Zugabe von 200  $\mu$ l 1%iger Paraformaldehydlösung (Sigma, Deisenhofen) in PBS. Die Analyse der Zellen erfolgte an einem FACS Scan (FACStar plus, Becton Dickinson, Heidelberg), wobei das Einmessen von mindestens 5000 Zellen erforderlich war. Die Auswertung der Messreihen erfolgte mit der Lysis II Software (Becton Dickinson, Heidelberg).

### 2.2.10 Verfahren zur Dekontamination

Um infektiöse Bestandteile von produzierten *scFv*'s abzutrennen bzw. den gesamten Zellkulturüberstand infizierter HT1080 zu dekontaminieren wurden mehrere Verfahren angewendet.

1) Filtrierung

Die Filtrierung der Zellkulturüberstände erfolgte unter Verwendung von Filter mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 50 kDa nach Angaben des Herstellers (Millipore, Bedford MA).

2) UV-Bestrahlung

Die UV-Bestrahlung fand unter Zellkulturhütten mit einer nicht genau definierbaren Strahlungs-dosis statt. Überstände wurden in Zellkulturschalen ohne Deckel und mit einem möglichst niedrigen Flüssigkeitsniveau für eine Stunde dem UV-Licht ausgesetzt, während dessen war die Lüftung ausgeschaltet.

3) Caesium-Bestrahlung

Steril filtrierte (45 µm Mikrofilter, Sartorius, Göttingen) Zellkulturüberstände von infizierten HT1080 wurden mit 30 Gy (Gray) bestrahlt.

## 2.3 Methoden der Proteinbiochemie

### 2.3.1 *ScFv* Phagen *display* Bibliothek

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *recombinant phage antibody system* (RPAS) der Firma Amersham/ Pharmacia verwendet.

Dieses System wurde entworfen, um Antikörper der Maus zu klonieren, zu exprimieren und funktionelle Antikörper zu detektieren. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe Kapitel 1.2.1), werden hierbei Bakteriophagen verwendet. Die Antigen-erkennenden-Regionen der Antikörper werden als Fusions-Protein exprimiert und auf der Bakteriophagenoberfläche präsentiert. Werden die Antikörpergene wie vorgesehen in den Phagemid Vektor pCANTAB 5 E kloniert, können darüber hinaus lösliche rekombinante Antikörper für den Gebrauch als immunologische Reagenzien produziert werden. Die Technologie wurde gemeinsam mit Cambridge Antibody Technology Ltd., UK entwickelt. Das System wird in einem flexiblen, vier Module umfassenden Format vertrieben und besteht aus *Mouse ScFv Modul*, *Expression Module*, *Detection Module* und *Purification Module*.

Eine Übersicht über das gesamte System, sowie detaillierte Protokolle zu jedem Modul finden sich auf der homepage der Firma Amersham Pharmacia biotech (siehe <http://www5.amershambiosciences.com>).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das *Mouse ScFv Module* und das *Expression Module* verwendet. Nachfolgend ist ein *flowchart* über die vollzogenen Arbeiten dargestellt.

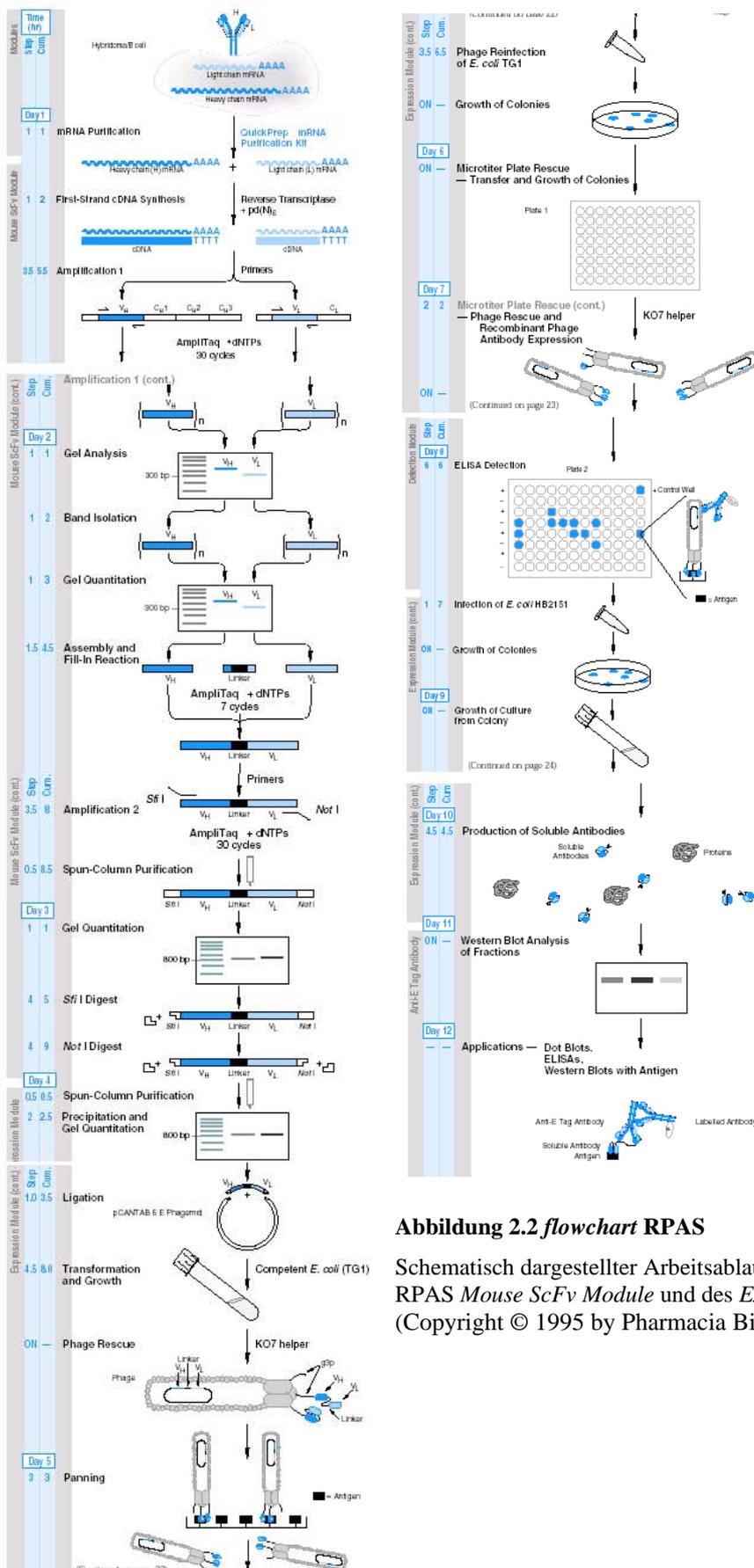


Abbildung 2.2 flowchart RPAS

Schematisch dargestellter Arbeitsablauf innerhalb des RPAS *Mouse ScFv Module* und des *Expression Module* (Copyright © 1995 by Pharmacia Biotech Inc.).

Nachfolgend werden Materialien und Methoden beschrieben, die darüber hinaus zur Herstellung der *scFv* Phagen *display* Bibliothek verwendet wurden.

### **2.3.1.2 Immunisierung von Mäusen**

Balb/c-Mäuse wurden mit der apikalen Membran von  $1 \times 10^7$  Zellen primären humanen Endothelzellen (HUVEC) intraperitoneal immunisiert. Die Präparation sowie die Immunisierung der Mäuse wurde von Peter Friedl durchgeführt (<http://www.gwdg.de/~haugust/VB/Friedl.htm>). Nach vier Wochen erfolgten 3 „booster“-Immunisierungen im Abstand von jeweils drei Wochen. Nach der letzten Immunisierung wurden die Versuchstiere euthanasiert und die Milzen entnommen.

### **2.3.1.3 Präparation von RNA aus Maus-Milzen**

Zur Präparation von gesamt-RNA aus den Milzen immunisierter Mäuse wurde das *Atlas<sup>TM</sup> Pure Total RNA Labeling System* der Firma Clontech (Catalog #: K1038-1) verwendet. Entsprechendes Protokoll findet sich unter <http://www.clontech.com/index.shtml>.

### **2.3.1.4 Aufreinigung von mRNA**

Die Aufreinigung von mRNA (PolyA<sup>+</sup>-RNA) aus gesamt RNA wurde das Dynabeads® mRNA *Purification Kit* (Dynal, Prod. No. 610.06) verwendet. Entsprechendes Protokoll findet sich unter <http://www.dynal.no>.

## **2.3.2 Herstellung beschichteter Zellkulturplatten zur Selektion**

Zur Selektion der Phagen *display* oder der retroviralen *display* Bibliothek wurden 12- bzw. 24-Lochplatten (BD Falcon, Heidelberg), die nicht zellkulturbehandelt waren, mit Laminin (#354232, BD Bioscience, Bedford, MA) oder VEGFR (R&D Systems, #321-FL, *Recombinant Human VEGF R1 (Flt-1)/Fc Chimera*) beschichtet. Hierzu wurden je 500 bzw. 250 µl des gelösten Proteins (10 µg/ml) pro Vertiefung pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Vor Beginn der Selektion wurden die Platten 3x mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen 1-2 Stunden durch Inkubation mit 3% Milchpulver in PBS abgesättigt.

### **2.3.3 Panning der retroviralen *scFv display* Bibliothek**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine *panning*-Prozedur entwickelt, die in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt ist.

Nach Herstellung von Zellkulturüberständen gemäß der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Prozedur wurden sie durch Ultrazentrifugation bei 30000 rpm für 1h bei 4°C aufkonzentriert. Entstandenes Pellet wurde in 500µl DMEM aufgenommen und zur Selektion auf VEGFR-beschichteten Zellkulturplatten eingesetzt.

Dies erfolgte mittels einer vierstündigen Inkubation der Zellkulturüberstände (500µl) auf den beschichteten (vergl. Kapitel 2.3.2) und abgesättigten Platten (*24-well*) bei 4°C unter langsamer Bewegung (5 rpm) durch einen Schüttler. Das Absättigen der Bindungsstellen erfolgte durch 2-stündige Inkubation mit PBS, 3%MP (#T145.1, Roth, Karlsruhe) bei 4°C (1ml pro *well*).

Danach wurde jedes *well* mit 1 ml PBS (15-minütiger Inkubation bei 4°C unter maximaler Bewegung (50 rpm) durch einen Schüttler gewaschen.

Anschließend wurde die gewaschen Platten mit  $5 \times 10^4$  3T3-Zellen/  $\text{cm}^2$  besät und für 24 bzw. 48 Stunden expandiert.

## **2.4 Elektronische Datenverarbeitung (EDV)**

Die elektronische Datenverarbeitung erfolgte durch PC's mit MS Windows NT oder 2000 als Betriebssystemen und MS Office 2000 pro.

Die Verarbeitung der im Labor erhobenen Daten geschah durch folgende Programme:

- ClustalX 1.81
- BioEdit 5.0.9.1
- Clone Manager 5.0

Desweiteren wurden folgende links und *online tools* aus dem www verwendet:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<http://us.expasy.org/BioHunt/>

<http://us.expasy.org/tools/>

<http://topaze.jouy.inra.fr/cgi-bin/CloneIt/CloneIt>

<http://micro.nwfsc.noaa.gov/protocols/>

<http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html>

## 3 Ergebnisse

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen einen neuen Ansatz hinsichtlich der Selektion und der Produktion von therapeutisch wirksamen Proteinen. Hierbei wurde sich in erster Linie auf die Verwendung von Miniantikörpern (*scFv*'s) konzentriert.

Innerhalb des ersten Teils werde ich ein neues, vorteilhaftes Verfahren hinsichtlich der Selektion von *scFv*'s vorstellen, um im zweiten Teil deren mögliche Anwendung in therapeutischer Hinsicht darzustellen.

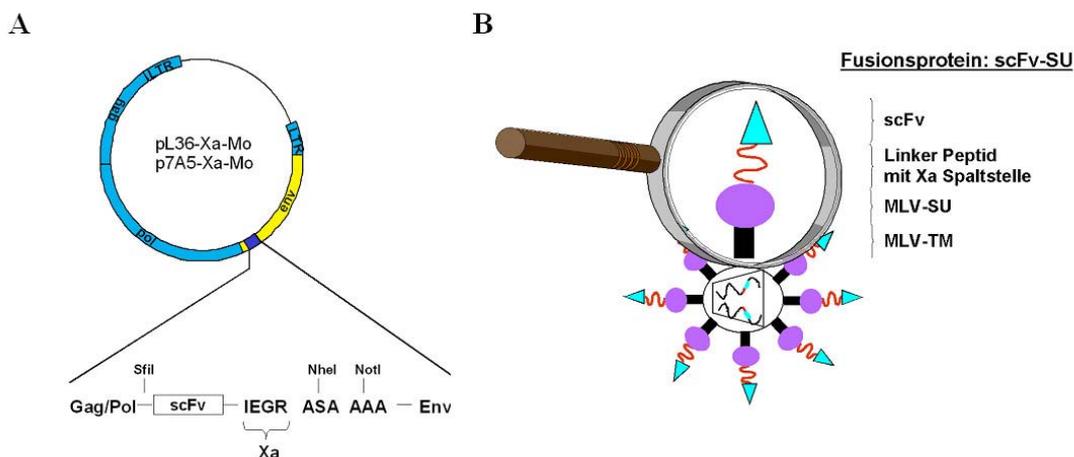
### 3.1 Etablierung einer retroviralen *scFv display* Bibliothek

Die Herstellung von Phagen *display* Bibliotheken ist nach ihrer Erstbeschreibung (Parmley, Smith et al., 1988) zu einem gebräuchlichen Verfahren geworden, um *scFv*'s oder sonstige Peptide aufgrund ihrer Eigenschaften zu selektionieren. Im Hinblick auf eine Verwendung für therapeutische Zwecke hat dieses System allerdings Nachteile durch die Verwendung von Bakterien. Prokaryonten unterscheiden sich von Eukaryonten u.a. in dem Verlauf der Proteinbiosynthese. Dazu gehören unterschiedliche Codon-Nutzung, fehlende posttranslationale Modifikationen, das Fehlen von prokaryontisch spezifischen Chaperonen und das Vorhandensein von *scFv* degradierenden Proteasen. All dies kann die 3D-Faltung und somit die Funktion der zu selektionierenden Proteine negativ beeinflussen (McVean et al., 2000). Als Resultat dieser Unterschiede werden zum einen Proteine aus dem Selektionsprozess ausgeschlossen, welche im Patienten funktionell sein könnten (vergl. Kapitel 1.2.3). Zum anderen müssen Polypeptide, welche im prokaryonten System selektioniert wurden, auf Ihre Tauglichkeit im eukaryonten System getestet werden. Im Hinblick auf die Suche nach neuen therapeutisch wirksamen Proteinen in der Tumor-, oder HIV Therapie, könnten gerade jene Proteine die gewünschten Eigenschaften besitzen, die bisher aufgrund der unterschiedlichen Proteinexpression nicht selektioniert werden konnten.

Die Alternative basiert auf der Verwendung des Moloney Maus Leukemia Virus (MoMLV). Eine Präsentation von *scFv*'s auf dem viralen Hüllprotein gewährleistet eine Selektion und Amplifikation im eukaryonten Kontext.

### 3.1.1 Klonierungen von L36-Xa-Mo und 7A5-Xa-Mo

Allen biologischen *display* Bibliotheken liegt die Kopplung von Genotyp und Phänotyp zugrunde. Analog zu den bisher verwendeten Phagen *display* Bibliotheken sollen *scFv*'s auf der Oberfläche von MLV präsentiert werden. Schematisch ist diese Überlegung in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 3.1** Klonierungsstrategie und schematischer Aufbau des rekombinanten MLV

- A) Unten gezeigt ist die durch PCR-Mutagenese veränderte *scFv*-Sequenz. Eingefügt wurden die *SfiI*-Restriktionsschnittstelle und das *linker*- Peptid, bestehend aus Faktor Xa Spaltstelle und den Restriktionsschnittstellen *NheI* und *NotI*. Die resultierenden Plasmide wurden pL36-Xa-Mo und p7A5-Xa-Mo genannt.
- B) Vergrößert dargestellt sind die Bestandteile des viralen Hüllproteins (Env) TM (*transmembrane*) und SU (*soluble unit*), sowie die N-terminale Modifikation durch Einführung des *linker*- Peptids (↯) und des zu präsentierenden *scFv*'s (▶).

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, soll das virale Hüllprotein mit seinen Bestandteilen TM und SU derart modifiziert werden, dass *scFv*'s N-terminal von SU auf der Virusoberfläche präsentiert werden.

Zur Etablierung dieses Systems wurden die bereits erwähnten *scFv*'s 7A5 und L36 verwendet (vergl. Kapitel 1.4 ). Der Miniantikörper 7A5 besitzt eine Spezifität für T-

Zellen. Sein demnach T-Zell-spezifisches Antigen wurde bisher allerdings noch nicht charakterisiert (Engelstadter et al., 2001). Der therapeutisch wirksame Miniantikörper L36 richtet sich gegen das extrazelluläre Matrix-Protein Laminin. Seine anti-Angiogenese Wirkung und die damit verbundene anti-tumorale Wirkung *in vivo* konnte kürzlich gezeigt werden (Sanz et al., 2002). Das Plasmid pEMo, welches für das Volllängengenom des ecotropen Stamms des Moloney MLV und EGF kodiert, wurde als Ausgangsplasmid für die Klonierungen verwendet (Buchholz et al., 1998).

Die kodierende Sequenz der *scFv*'s 7A5 und L36 wurde mittels PCR aus ihren Ausgangsplasmiden amplifiziert. Durch die Verwendung der *Primer* CF 1-4 und CF 17- wurden die Modifikationen gemäß der Klonierungsstrategie eingefügt (vergl. Kapitel 2.1.2). So wurden an den 5'-Enden der Sequenzen eine *SfiI*- Restriktionsschnittstelle, sowie an deren 3'-Enden die Faktor Xa Proteasespaltstelle, gefolgt von einer analytischen *NheI*-Restriktionsschnittstelle und einer *NotI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden aufgereinigt und in einen TA-Vektor subkloniert (vergl. Kapitel 2.1.5). Die Präparation des Zielplasmids pEMo erfolgte durch einen Restriktionsendonuklease-Verdau mit *SfiI* und *NotI*, wodurch die EGF codierende Sequenz deletiert wurde. Anschließend erfolgte die Umklonierung der *scFv*-Sequenzen unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI*. Die resultierenden Plasmide wurden aufgrund der Modifikationen am ecotropen MLV als pL36-Xa-Mo und p7A5-Xa-Mo bezeichnet und sequenziert. Die Sequenzierungen wurden mit den *Primern* CB6 und RCReuv-postSfiI durchgeführt und zeigten einen durchgängigen Leserahmen innerhalb der *scFv* kodierenden Sequenz sowie das Vorhandensein der gewünschten Modifikationen (Daten siehe Anhang).

### **3.1.2 Etablierung des Selektionsverfahrens mittels definierter *scFv* tragender MLV**

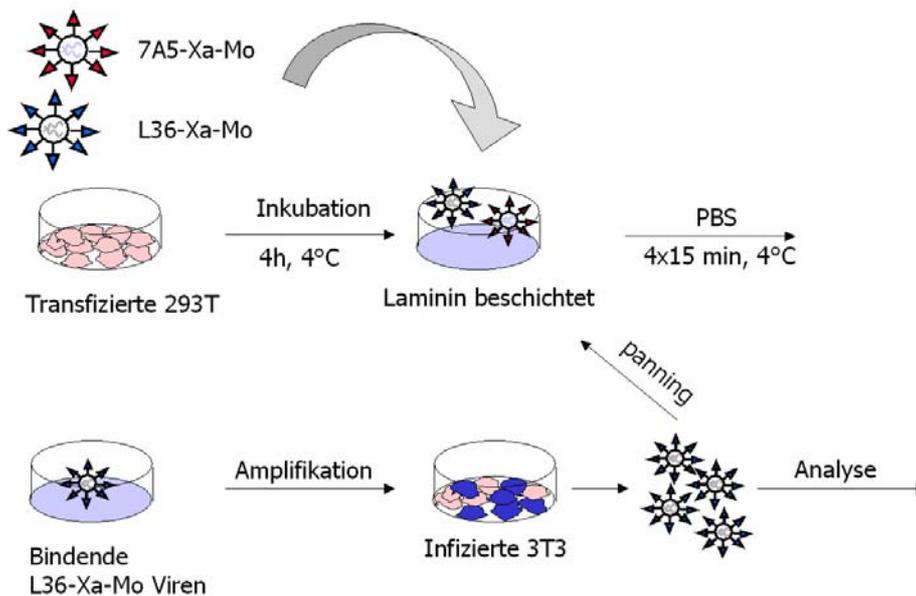
Im folgenden Kapitel wurden die Grundvoraussetzungen für die Etablierung einer retroviralen *scFv display* Bibliothek untersucht bzw. geschaffen. Dies geschah unter Verwendung der hergestellten Plasmide pL36-Xa-Mo und p7A5-Xa-Mo bzw. der durch sie kodierten Viren L36-Xa-Mo und 7A5-Xa-Mo. Eine Grundvoraussetzung zur Selektion bindender Viren ist die korrekte und funktionelle Präsentation der *scFv*'s auf

der Virushülle. Desweiteren ist das Vorhandensein von unspezifischen Bindungen bzw. deren Blockierung, sowie günstige Verfahren zur Amplifikation und Detektion von gebundenen Viren relevant.

### 3.1.2.1 Geplante Vorgehensweise

Im Laufe der Vorversuche konnte eine *panning*-Prozedur etabliert werden, die für die Erhebung der hier vorgestellten Daten verwendet wurde.

In der nun folgender Abbildung ist diese Prozedur schematisch dargestellt, im Detail ist sie in Material und Methoden (siehe Kapitel 2.3.3) beschrieben.



**Abbildung 3.2 Flussdiagramm des *pannings* einer retroviralen *scFv display* Bibliothek**

Dargestellt ist der schematische Ablauf der Selektion einer retroviralen *scFv display* Bibliothek am Beispiel von 7A5/ L36-Xa-Mo Viren. Nach Transfektion der Plasmide in eine geeignete Zelllinie (hier 293T) werden die geernteten Zellkulturüberstände auf Laminin-beschichteten Zellkulturplatten inkubiert. Nach mehrfachen Waschschriffe erfolgt die Übersichtung der gebundenen Viren mit einer infizierbaren Zelllinie (hier 3T3). Die Analyse erfolgt durch Präparation viraler RNA und Sequenzierung.

Oben stehende Abbildung 3.2 zeigt den schematischen Verlauf eines *pannings* einer retroviralen *scFv display* Bibliothek am Beispiel von bindenden/ nicht-bindenden L36/ 7A5-Xa Viren. Der Zellkulturüberstand entsprechend transfizierter 293T-Zellen

kann zwei Tage nach Transfektion geerntet und ohne weitere Aufbereitung in die Prozedur des *pannings* eingesetzt werden. Danach erfolgt die Amplifikation der gebundenen Viren durch eine Überschichtung mit der murinen Fibroblasten-Zelllinie 3T3. In ihnen können ecotrope MLV replizieren, was eine Anreicherung der Laminin-bindenden L36-Xa-Mo Viren gewährleistet. Die Analyse der gebundenen Viren erfolgt nach einer oder mehreren Runden des *pannings* durch die Präparation viraler RNA, oder genomischer 3T3-DNA und ggf. durch einen Infektionsnachweis mittels *Immune Peroxidase Assays (IPA)*.

### 3.1.2.2 Bindung von L36-Xa-Mo und 7A5-Xa-Mo an Laminin

Die korrekte und funktionelle Präsentation der *scFv*'s L36 und 7A5 wurde an hergestellten L36 und 7A5-Xa-Mo Viren überprüft.

Zu diesem Zweck wurde eine Zellkulturplatte über Nacht mit Laminin beschichtet. Es folgte eine Inkubation mit dem Zellkulturüberstand der entsprechend pL36-Xa-Mo und p7A5-Xa-Mo transfizierten 293T-Zellen und -gemäß des etablierten Protokolls- nach zahlreichen Waschschrinen eine Überschichtung mit der murinen Fibroblasten Zelllinie 3T3. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Kulturen fixiert und ein *IPA* durchgeführt, um infizierte Zellen nachzuweisen.

Folgende Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse des *IPA*'s.



**Abbildung 3.3 Immune Peroxidase Assay**

Dargestellt sind die Ergebnisse des *IPA* auf 3T3 Zellen. L36 bzw. 7A5-Xa-Mo Viren wurden auf Laminin beschichteten Zellkulturplatten inkubiert und nach Waschschrinen mit 3T3-Zellen überschichtet. Deutlich wird, dass es keine Infektion durch 7A5-Xa-Mo und durch die Inkubation mit unbehandeltem Zellkulturüberstand (VZ) gibt. Hingegen liegt eine nahezu 100%ig infizierte Kultur nach Inkubation mit L36-Xa-Mo vor.

Wie in Abbildung 3.3 ersichtlich, kam es nur dort zur Infektion von 3T3-Zellen, wo zuvor mit Viren inkubiert wurde, die das *scFv* gegen Laminin tragen, also durch L36-Xa-Mo Viren. Im anderen Fall wurden die nicht bindenden 7A5-Xa-Mo Viren durch Waschrunde entfernt und es kam somit zu keiner nachweisbaren Infektion der überschichteten 3T3-Zellen. Inkubation mit unbehandeltem Zellkulturmedium (VZ) führte ebenso zu keiner detektierbaren Infektion der 3T3-Zellen.

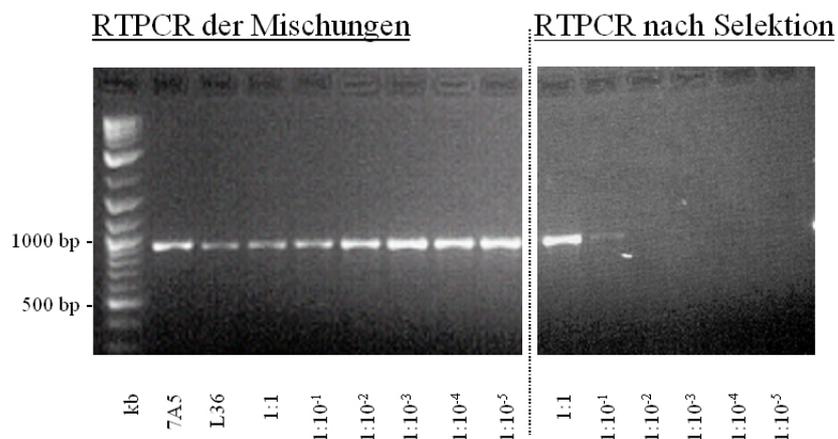
Festzustellen ist demnach, dass es zu einer funktionellen Präsentation beider *scFv*'s kommt. In dem Fall von L36 erfolgt die Anbindung an das Antigen Laminin und ermöglicht später die Infektion von 3T3-Zellen. Nicht so im Fall des nicht-bindenden 7A5. Desweiteren zeigt sich, dass eine Infektion von 3T3-Zellen durch L36-Xa-Mo Viren erfolgt. Die Präsenz des *scFv*'s L36 auf der Virusoberfläche verhindert demnach nicht die Infektion und Antigen-gebundenes Virus bleibt weiterhin infektiös.

### 3.1.2.3 Simulation einer Bibliothek mittels definierter *scFv* tragender MLV

Nach Etablierung der *panning*-Prozedur und den Versuchen zur Virusbindung sollte im nächsten Schritt ermittelt werden, welche Mindestmenge an L36-Xa-Mo Virus erforderlich ist, um es nach Bindung und Infektion wieder reisolieren zu können. Um dabei die Bedingungen bei einem *panning* Verfahren zu simulieren wurden, Mischungen beider Virus-Populationen hergestellt. Das Laminin-bindende L36-Xa-Mo Virus wurde hierbei exponentiell ausverdünnt. Nach der *panning*-Prozedur kann durch die Isolierung viralen Genoms zwischen 7A5- und L36-Xa-Mo Viren diskriminiert und bestimmt werden, bis zu welcher Verdünnungsstufe die bindenden L36-Xa-Mo Viren noch nachweisbar sind. Zuerst wurde die Aktivität der viralen reversen Transkriptase in dem Zellkulturüberstand der transfizierten 293T-Zellen durch RT-Assay ermittelt. Diese Werte (944 mU/ml für 7A5-Xa-Mo und 2360 mU/ml für L36-Xa-Mo) dienen im Weiteren zur Normierung der unterschiedlichen Mischungsverhältnisse. Eingesetzt wurden für die 1:1 Mischung 5mU von 7A5-Xa-Mo, respektive L36-Xa-Mo. Die 5mU von 7A5-Xa-Mo wurden konstant gehalten, während der L36-Xa-Mo Anteil in Schritten um den Faktor 10 verringert wurde. Als höchste Verdünnungsstufe wurde 1:10<sup>5</sup> gewählt, das entspricht einer Verwendung von 5mU 7A5-Xa-Mo und 50 nU L36-Xa-Mo. Die hergestellten Mischungen wurden gemäß des Protokolls auf Laminin beschichteten Platten inkubiert, gewaschen und zur Amplifikation gebundener Viren

mit 3T3-Zellen überschichtet. Zwei Tage nach Überschichtung erfolgte die Präparation viraler RNA aus den betreffenden Zellkulturüberständen (vergl. Abbildung 3.2). Die Analyse erfolgte durch die reverse Transkription der viralen RNA und anschließender Amplifikation der *scFv*-Sequenzen mittels der *Primer* RCRenvpastSfiI und CB6 (siehe Kapitel 2.1.1; 2.1.9; 2.1.10). Die gewählten Primer flankieren die Insertionsstelle der *scFv*-Sequenzen, sodass eine Diskriminierung zwischen Wildtyp und *scFv*-tragendem Virus möglich ist.

Folgende Abbildung 3.4 zeigt die Auftrennung der PCR-Amplifikate nach Gelelektrophorese.



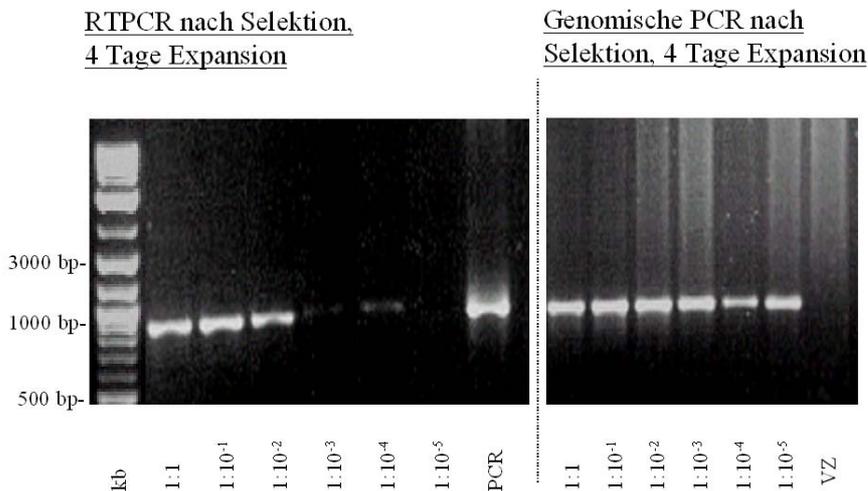
**Abbildung 3.4 Gelelektrophorese nach RT-PCR**

Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate nach Präparation viraler RNA aus Zellkulturmedium. Links die angefertigten Mischungen von 7A5/ L36-Xa Viren vor Selektion, rechts zwei Tage nach Selektion und der Überschichtung mit 3T3-Zellen.

In Abbildung 3.4 links dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate nach Präparation viraler RNA und reverser Transkription der 7A5/ L36-Xa-Mo Mischungen vor Selektion. Deutlich sichtbar die 1 kb große Bande der amplifizierten *scFv*-Sequenz. Die in Abbildung 3.4 rechts dargestellten Signale konnten nach der Selektion und Amplifikation beobachtet werden. Hier zeigte sich ein Vorhandensein von viraler RNA mit *scFv*-Sequenz bis zu einem Mischungsverhältnis von 1:10<sup>-1</sup> 7A5 zu L36.

Durch Expansion der 3T3-Zellen für weitere zwei Tage konnten die Signale, wie in nachfolgender Abbildung 3.5 ersichtlich, verstärkt werden. Zusätzlich wurde

genomische DNA der expandierten Zellen präpariert und als Matrize zur Amplifikation der *scFv*-Sequenzen mittels PCR verwendet.

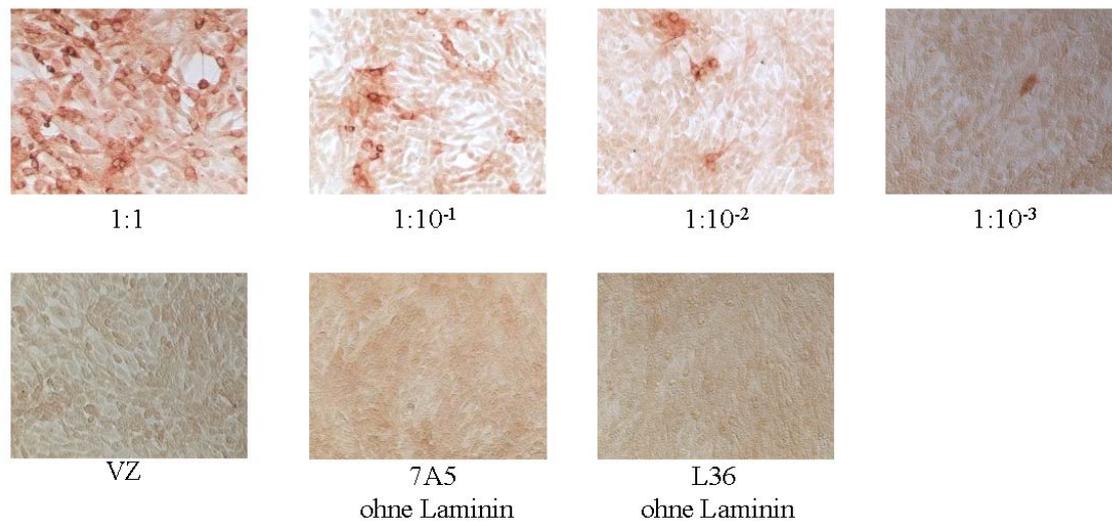


**Abbildung 3.5 RT-PCR und genomische PCR nach Expansion der 3T3-Zellen**

Beschriftet sind links die Mischungsverhältnisse zwischen 7A5/ L36-Xa-Mo, sowie die Positivkontrolle der PCR mit p7A5-Xa-Mo als Matrize (PCR). Rechts die Signale der unterschiedlichen Mischungsverhältnisse nach Expansion und Präparation genomischer DNA von 3T3-Zellen, sowie das Ergebnis der Präparation des Zellkulturüberstandes uninfizierter 3T3-Zellen (VZ).

Wie in Abbildung 3.5 zu sehen, kommt es durch eine Expansion der zur Überschichtung verwendeten 3T3-Zellen nach Selektion zu einer Erhöhung der Signalintensität. Unter Verwendung viraler cDNA als Matrize erhält man nach PCR jetzt Signale von *scFv* tragenden Viren bis zu einem Mischungsverhältnis von  $1:10^{-4}$  7A5 zu L36-Xa-Mo (Abbildung 3.5, links). Bei Verwendung von genomischer DNA infizierter 3T3-Zellen als Matrize sogar bis zu einem Verhältnis von  $1:10^{-5}$  (Abbildung 3.5, rechts).

In Korrelation zu diesen Befunden stehen die Ergebnisse der nachfolgenden *IPA*-Anfärbungen der infizierten 3T3-Zellen.



**Abbildung 3.6 IPA-Assay von 3T3 nach Selektion von 7A5/ L36-Xa-Mo Mischungen**

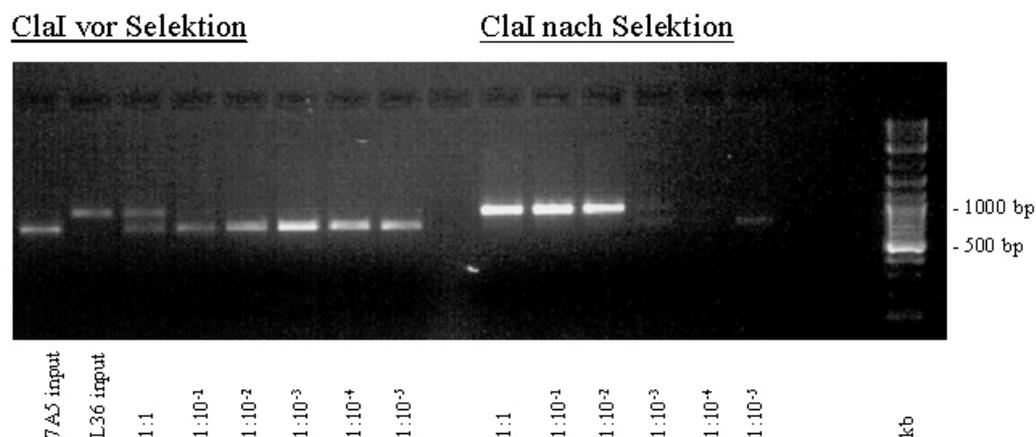
*IPA*-Assay von 3T3-Zellen nach Selektion der Viren durch Anbindung an Laminin und der Expansion der überschichteten 3T3-Zellen für vier Tage. Deutlich wird eine Reduktion der infizierten 3T3-Zellen mit Abnahme der L36-Xa-Mo Viren innerhalb der Mischungen. Ohne detektierbare Infektion sind die unbehandelten 3T3-Zellen (VZ) bzw. diejenigen Kulturen, die mit 7A5/ L36-Xa-Mo haltigen Überständen „infiziert“ wurden, nachdem auf Laminin-unbeschichteten Platten selektioniert wurde.

Eine wichtige Erkenntnis hinsichtlich der Funktionsweise des Systems lässt sich aus den in Abbildung 3.6 (unten) dargestellten Kontrollen gewinnen. Gezeigt wurde, dass es durch eine Inkubation bzw. Selektion von 7A5- respektive L36-Xa-Mo Viren auf Laminin-unbeschichteten Zellkulturplatten zu keinerlei Infektion der überschichteten 3T3-Zellen kommt. Beobachtete Infektionen begründen sich demnach auf eine selektive Anbindung von L36-Xa-Mo Viren an das Antigen Laminin. Wie weiterhin ersichtlich, verringert sich die Infektiosität der selektionierten Mischungen mit Abnahme der L36-Xa-Mo Konzentration. Das Signal infizierter Zellen ist bei  $1:10^{-3}$  7A5- zu L36-Xa-Mo Viren noch zu detektieren. Dies ergab den ersten Hinweis darauf, dass es sich bei den amplifizierten *scFv* Sequenzen um L36 tragende Viren handeln muß. Da die RTPCR sensitiver als ein *IPA* ist, konnten mit dieser Nachweismethode Signale bis zu einer Verdünnung von  $1:10^{-5}$  detektiert werden (vergl. Abbildung 3.5).

Bisher erfolgte der Nachweis der funktionellen Präsentation der *scFv*'s, insbesondere von L36 und die durch seine Antigenbindung vermittelte Infektion. Es konnte gezeigt werden, dass MLV Sequenzen mit *scFv* nach einer *panning* Prozedur nachweisbar sind und das sie durch das *panning* und durch Expansion der 3T3-Zellen angereichert werden können. Im Folgenden wurde sich auf die Analyse, also auf die Unterscheidung

der in Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 dargestellten Fragmente konzentriert, um die spezifische Anreicherung von L36-Xa-Mo Viren zu zeigen. So wurden die Fragmente vor der Selektion (Abbildung 3.4, links), als auch nach Selektion und Expansion der infizierten 3T3-Zellen (Abbildung 3.5, rechts) einer Restriktionsendonuklease-Spaltung unterzogen. Diese wurde so gewählt, dass anhand der zu erwartenden Resultate eine Unterscheidung von 7A5- bzw. L36-Sequenzen möglich ist. Die Restriktion erfolgte deswegen zum einen mit *ClaI*, zum anderen mit *XhoI*. Amplifizierte 7A5-Sequenzen enthalten eine *ClaI*-Restriktionsschnittstelle, welche nach Spaltung zu Fragmenten von 203 bp bzw. 712 bp führt. Amplifizierte L36 Sequenzen weisen eine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle auf, welche eine Spaltung in Fragmente der Größe 411 bp und 486 bp ermöglicht.

Die Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8 zeigen die Ergebnisse der Restriktionen nach Gelelektrophorese.



**Abbildung 3.7 Gelelektrophorese nach Restriktionsendonuklease-Spaltung der amplifizierten *scFv* Sequenzen durch *ClaI***

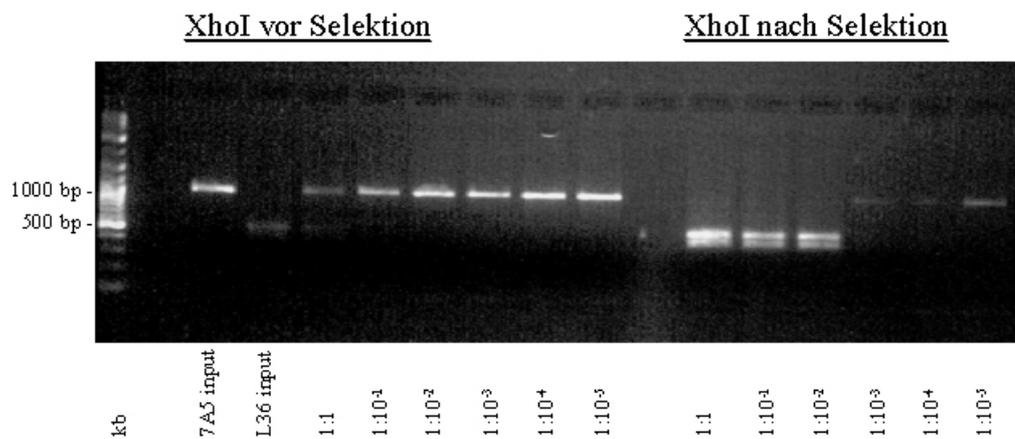
Vor der Selektion (links) ist das 712 bp-Fragment der 7A5-Sequenz nach *ClaI*-Restriktion ersichtlich (7A5 input), das 203 bp-Fragment wurde nicht dargestellt. Desweiteren ist das ungeschnittene 897 bp große L36-Amplifikat (L36 input) und die Mischungen mit deutlichen 7A5 spezifischen Signalen zu sehen.

Rechts die *ClaI* restringierten *scFv*-Fragmente nach Selektion. Erkennbar sind L36-Banden gemäß der L36 „input“ Bande bis zu einem Mischungsverhältnis von  $1:10^{-3}$ . Danach sind schwache Signale von beiden *scFv*-Fragmenten bzw. von 7A5-Fragmenten zu erkennen.

Die Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis der Restriktionsendonuklease-Spaltung der amplifizierten *scFv* Sequenzen durch *ClaI*. Das 7A5 spezifische 712 bp Fragment (7A5 input) kann in allen angefertigten Mischung detektiert werden. Das Signal der 897 bp

großen L36-Bande ist bis zu einem Mischungsverhältnis von 1:1 nachweisbar (Abbildung 3.7, links). Nach der Selektion auf Laminin beschichteten Platten zeigen sich ausschließlich L36 spezifische Signale bis zu einem Mischungsverhältnis von  $1:10^{-2}$ . Die L36 spezifische Fragmente sind neben leichten 7A5-Signalen noch bei einem Mischungsverhältnis von  $1:10^{-3}$  und  $1:10^{-4}$  erkennbar (Abbildung 3.7, rechts). Es zeigt sich demnach eine Anreicherung von L36 spezifischen Amplifikaten durch die Prozedur des *pannings*.

Analog zu diesen Ergebnissen wurden dieselben Amplifikate einer *XhoI*-Restriktion unterzogen. Die erhaltenen Resultate sind in Abbildung 3.8 dargestellt.



**Abbildung 3.8 Gelelektrophorese nach Restriktionsendonuklease-Spaltung der amplifizierten *scFv* Sequenzen durch *XhoI***

Links dargestellt ist das ungeschnittene 7A5-Fragment (7A5 input), in den angefertigten Mischungen deutlich im Überschuss, sowie die 411 und 489 bp großen Fragmente des restringierten L36-Amplifikats (L36 input). Rechts sind die prominenten Banden der L36-Fragmente nach der *panning* Prozedur bis zu einem Mischungsverhältnis von  $1:10^{-2}$  7A5/ L36-Xa-Mo Viren erkennbar. Danach folgen 7A5 spezifische Signale.

In Abbildung 3.8 zeigt die Resultate nach Restriktionsendonuklease-Spaltung der amplifizierten *scFv* Sequenzen durch *XhoI*. Links dargestellt die Fragmente vor der Selektion. Deutlich zu sehen ist das ungeschnittene 7A5-Fragment in der Kontrolle (7A5 input) und in den Spuren der angefertigten Mischungen. Rechts dargestellt sind die Resultate nach Selektion. Sie zeigen die 411 und 489 bp großen Fragmente des restringierten L36-Amplifikats gemäß der Kontrolle (L36 input) bis zu einem Mischungsverhältnis von  $1:10^{-2}$  7A5/ L36-Xa-Mo Viren.

Zusammen zeigen die Ergebnisse aus Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8 die Anreicherung von L36 spezifischen Sequenzen nach nur einer Selektionsrunde. Der Nachweis bindender L36-Xa-Mo Viren gelang bis zu einem  $10^4$ -fachen Überschuss an nicht-bindenden 7A5-Xa-Mo Viren. Ein ähnliches Verhältnis wird bei Anwendung des konventionellen Phagen *displays* beobachtet. Somit ist ein mögliches Verfahren zum *panning* retroviraler *scFv display* Bibliotheken etabliert.

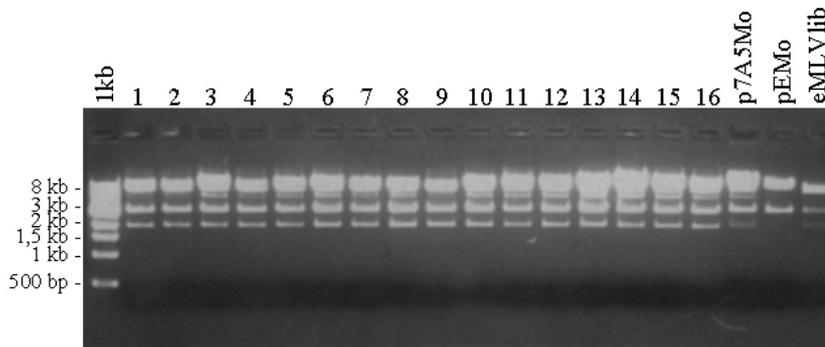
### 3.1.3 Klonierung einer retroviralen $\alpha$ HUVEC *scFv display* Bibliothek

In den vorangegangenen Kapiteln konnte durch das *panning* auf Laminin beschichteten Platten erfolgreich eine Anreicherung von MLV-Partikeln demonstriert werden, die das Laminin-bindene *scFv* L36 präsentieren. Um nachfolgend zu prüfen, ob sich dieses System zur Anwendung einer retroviralen *scFv display* Bibliothek verwenden lassen kann, wurde eine  $\alpha$ HUVEC *scFv display* Bibliothek unter Verwendung von MoMLV etabliert. Sie wird im weiteren Verlauf als eMLVlib bezeichnet.

Als Ausgangsmaterial dienten Milzen von Mäusen, die mit der apikalen Membran von  $1 \times 10^7$  Zellen primärer humaner Endothelzellen (HUVEC) intraperitoneal immunisiert wurden. Es folgte die Extraktion der Milz-RNA, die Aufreinigung von mRNA und die reverse Transkription in cDNA. Sie wurde als Matrize zur Amplifikation der variablen Regionen  $V_H$  und  $V_L$  der Immunglobulin-Gene mittels PCR verwendet. Nach der Fusion beider Amplifikate wurden die nun als *scFv* bezeichneten Sequenzen in den Phagemidvektor pCANTAB5E kloniert (siehe Kapitel 2.3.1). Die so hergestellte Phagenbibliothek wies eine Diversität von  $2 \times 10^5$  unterschiedlichen Klonen auf.

Die Klonierung der retroviralen  $\alpha$ HUVEC *scFv display* Bibliothek erfolgte unter der Verwendung der *scFv*-Sequenzen in pCANTAB5E. Die Herstellung erfolgte gemäß der in Abbildung 3.1 dargestellten Klonierungsstrategie (siehe auch Kapitel 2.1.3). Die verwendeten und durch PCR-Mutagenese modifizierten *scFv*-Sequenzen beinhalten eine analytische *NheI*-Restriktionsschnittstelle, sodass die erfolgreiche Rekombination durch eine *NheI*-Restriktion überprüft werden kann. Die Plasmid-DNA einzelner Klone wurde präpariert und die Klonierung der modifizierten *scFv*-Sequenzen durch eine

*NheI*-Restriktionsendonuklease-Spaltung überprüft. Nachfolgende Abbildung 3.9 zeigt das Ergebnis nach Gelelektrophorese.



**Abbildung 3.9 *NheI*-Restriktion von eMLVlib Klonen**

Abgebildet ist das Ergebnis der Restriktion nach Gelelektrophorese von sechzehn einzelnen eMLVlib-Klonen durch *NheI* (Spur 1-16), sowie die *NheI*-Restriktion des gleichen Plasmids mit definiertem *scFv* 7A5 (p7A5Mo), des Ausgangsplasmids ohne *scFv* (pEMo) und der Präparation der gesamten Bibliothek (eMLVlib).

Rekombinante Plasmide mit *scFv*-Sequenz enthalten zwei *NheI*-Schnittstellen, was zu drei Fragmenten (Spuren 1-16, p7A5Mo und eMLVlib) der Größe 6465, 3176 und 2000 bp führt. Das Ausgangsplasmid verfügt über nur eine *NheI*-Restriktionsschnittstelle, resultierend in zwei Fragmenten der Größe 8474 und 3176 in der Spur pEMo.

In Abbildung 3.9 ersichtlich ist das Vorhandensein von drei Fragmenten der Größe 6465, 3176 und 2000 bp in den Spuren 1-16, p7A5Mo und eMLVlib. In diesen Fällen wurde durch die Insertion der *scFv*-Sequenz eine weitere *NheI*-Schnittstelle dem Ausgangsplasmid hinzugefügt (vergl. Abbildung 3.1). Im Gegensatz dazu steht das Resultat der Restriktion des Ausgangsplasmids pEMo, welches über nur eine *NheI*-Schnittstelle verfügt und somit erwartungsgemäß nach Restriktion zu Fragmenten der Größe 8474 und 3176 bp führt.

Die hergestellte retrovirale  $\alpha$ HUVEC *scFv display* Bibliothek besteht aus  $1 \times 10^6$  Klonen. Da alle der untersuchten sechzehn Einzelklone rekombinant sind, also *scFv*-Sequenzen enthalten, kann davon ausgegangen werden, dass auch alle Klone der Bibliothek rekombinant sind. Jeder der  $2 \times 10^5$  *scFv*-Sequenzen aus der Phagenbibliothek ist demnach fünf Mal in der retroviralen Bibliothek vorhanden. Die Diversität der erhaltenen Klone wurde im Folgenden durch Sequenzierung untersucht.

### 3.1.4 Überprüfung der Diversität anhand Sequenzvergleich

Die Überprüfung der Diversität der retroviralen  $\alpha$ HUVEC *scFv display* Bibliothek (eMLVlib) erfolgte durch Bestimmung der Klon-Anzahl nach Transformation und durch eine Sequenzierung von neun der sechzehn Einzelklone unter Verwendung des *Primers* RCEnv-postSfiI (vergl. Kapitel 2.1.2).

Die erhaltenen Sequenzen wurden translatiert und durch CLUSTAL X (1.8) gegeneinander abgeglichen. Nachfolgende Abbildung 3.10 zeigt das Resultat der Abgleichung.

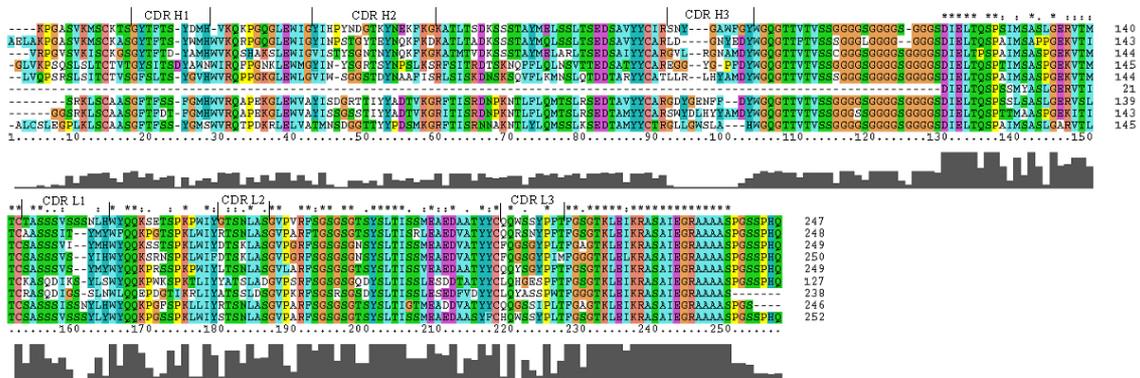


Abbildung 3.10 Diversität der eMLVlib anhand Sequenzvergleich

Sequenziert wurden neun der sechzehn Klone (vergl. Abbildung 3.9) unter Verwendung des *Primers* RCEnv-postSfiI. Die Sequenzen wurden translatiert und die Aminosäuresequenzen durch CLUSTAL X (1.8) miteinander abgeglichen.

Das Balkendiagramm am unteren Ende der Grafik veranschaulicht den Grad der Übereinstimmung, der erwartungsgemäß an den Stellen der vorgenommenen PCR-Mutagenese am höchsten ist.

Ausgewiesen sind die Stellen der Antigenbindung der schweren Kette (CDRH 1-3) und der leichten Kette (CDRL 1-3).

Wie in Abbildung 3.10 ersichtlich, sind die sequenzierten Klone in weiten Bereichen ihrer Aminosäuresequenz unterschiedlich. Verdeutlicht wird dies durch das Balkendiagramm am unteren Ende der Grafik. Je höher die Balken, desto höher die Übereinstimmung der neun Klone untereinander. Hohe Übereinstimmung der Sequenzen finden sich erwartungsgemäß in den Bereichen der PCR-Mutagenese. In den Bereichen der Antigen bindenden Stellen (CDR's) zeigen sich -ebenfalls erwartungsgemäß- große Unterschiede zwischen den Sequenzen hinsichtlich ihrer Aminosäureabfolge und ihrer Länge. Bei einer Sequenzierung brach die Sequenzier-Reaktion vorzeitig ab, es stehen in diesem Fall nur die Daten der leichten Kette zur

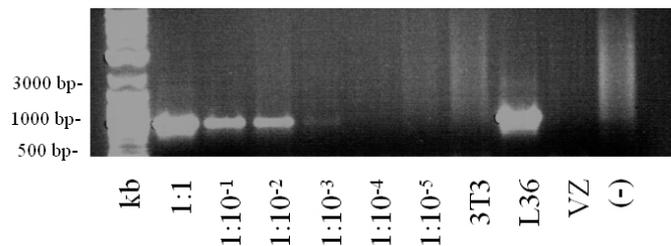
Verfügung. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Sequenzen aller untersuchten neun Klone unterschiedlich sind. Da die Analyse der Sequenzdaten den publizierten Aufbau der variablen Region muriner Antikörper (Duebel und Kontermann, 2001) widerspiegelt, kann darüber hinaus von funktionellen *scFv*'s gesprochen werden.

Die hergestellte retrovirale  $\alpha$ HUVEC *scFv display* Bibliothek besteht nach Auszählung und Hochrechnung der erhaltenen Kolonien aus  $1 \times 10^6$  Klonen. Da die Diversität der zur Klonierung verwendeten *scFv* Phagen *display* Bibliothek  $2 \times 10^5$  cfu beträgt, kann davon ausgegangen werden, dass jede  $\alpha$ HUVEC-*scFv*-Sequenz durch die retrovirale Bibliothek hinreichend repräsentiert ist. Es sollte somit möglich sein, ein oder mehrere *scFv*-Moleküle gegen ein definiertes Antigen selektionieren zu können.

### **3.1.5 Amplifikation eines definierten *scFv*'s aus der retroviralen $\alpha$ HUVEC Bibliothek**

Dass es möglich ist, zwei definierte *scFv*-tragende Retrovirus-Populationen zu mischen und nur diejenige mit bindenden Eigenschaften zu amplifizieren, konnte bereits gezeigt werden (vergl. Kapitel 3.1.2.3). Nachfolgend sollte diese Versuchsanordnung wiederholt werden, allerdings indem bindende *scFv*-tragende Retroviren mit dem *pool* der retroviralen  $\alpha$ HUVEC Bibliothek (eMLVlib) gemischt werden.

Zu diesem Zweck wurden eMLVlib-Viren mit L36-Xa-Mo Viren gemischt. Hierbei wurde erneut auf die RT-Werte beider Populationen normiert. Gemischt wurden 10 mU eMLVlib- mit 10 mU L36-Xa-Mo Viren. In weiteren Mischungen wurde der Anteil an L36-Xa-Mo Viren exponential verringert (vergl. Kapitel 3.1.2.3). In der niedrigsten Verdünnungsstufe ( $1:10^{-5}$ ) wurden demnach 10 mU eMLVlib- mit 100 nU L36-Xa-Mo Viren gemischt. Diese Mischungen wurden auf Laminin beschichteten Zellkulturplatten *gepannt* und anschließend mit 3T3-Zellen überschichtet. 30 Stunden später wurde die genomische DNA der 3T3-Zellen präpariert und die *scFv*-Sequenzen mittels geeigneter *Primer* amplifiziert (siehe Kapitel 2.1.1).



**Abbildung 3.11 Auftrennung von *scFv*-Fragmenten der eMLVlib/ L36-Xa-Mo Mischungen**

Dargestellt sind die gelelektrophoretisch aufgetrennten *scFv*-Amplifikate nach *panning* von eMLVlib/ L36-Xa-Mo Mischungen auf Laminin beschichteten Platten in einem Agarosegel. *ScFv*-spezifische Signale sind bis zu einem Mischungsverhältnis von  $1:10^{-3}$  und nach *panning* von L36-Xa-Mo (L36) zu beobachten. Keine Signale zeigen sich in den Spuren uninfizierter 3T3-Zellen (3T3), unter Verwendung unbehandelten Zellkulturmediums (VZ) sowie nach *panning* von L36-Xa-Mo auf Laminin unbeschichteten Zellkulturplatten (-).

In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse des *pannings* der eMLVlib/ L36-Xa-Mo Mischungen zusammengefaßt. Sichtbar sind *scFv*-spezifische Signale bis zu einem Mischungsverhältnis von  $1:10^{-3}$  eMLVlib zu L36-Xa-Mo Viren. Das *panning* von unverdünnten L36-Xa-Mo Viren auf Laminin beschichteten Platten führte erwartungsgemäß zu einem sehr starken Signal (L36). Hingegen ist kein *scFv*-spezifisches Signal nach *panning* von L36-Xa-Mo auf unbeschichteten Platten zu detektieren (-). Gleichfalls ohne Signal sind uninfizierte 3T3-Zellen (3T3) und unbehandeltes Zellkulturmedium (VZ).

Die Fragmente in Spur  $1:10^{-3}$  wurden subkloniert und sieben Klone zur Identifizierung sequenziert. Alle sieben Klone waren identisch und zeigten die L36-Xa Sequenz.

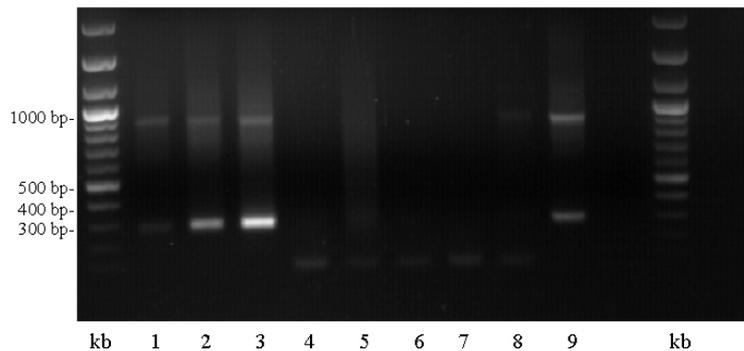
Die Amplifikation eines bindenden *scFv*'s, in diesem Fall L36, aus dem Hintergrund der retroviralen *scFv display* Bibliothek ist demnach möglich.

### 3.1.6 ***Panning* der retroviralen $\alpha$ HUVEC Bibliothek gegen *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR)**

Endotheliale Zellen exprimieren drei verschiedene *vascular endothelial growth factor*-Rezeptoren, die alle zu der Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen zählen. Namentlich sind das VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) und VEGFR-3 (Flt-4), deren Expression hauptsächlich auf endotheliale Zellen beschränkt ist. Eine Ausnahme stellt VEGFR-1 dar, dieser Rezeptor findet sich auch auf Monozyten, Trophoblasten und Mesangiumzellen (Neufeld et al., 1999).

Die hergestellte retrovirale  $\alpha$ HUVEC Bibliothek sollte demnach auch *scFv*'s gegen VEGFR-1 beinhalten. Um ihre Anwendbarkeit zu demonstrieren wurde die Bibliothek im Folgenden auf rekombinantem VEGFR-1 selektioniert.

Verfahren wurde nach der in Kapitel 2.3.3 beschriebenen und in Abbildung 3.2 schematisch dargestellten *panning*-Prozedur. Nach dem *panning* erfolgte die Überschichtung mit 3T3-Zellen, um gebundene Viren zu amplifizieren. Zur Erhöhung der Sensitivität wurde 48 Stunden nach der Überschichtung eine 2. *panning* Prozedur mit diesen Zellkulturüberständen durchgeführt. Die Zellkulturüberstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die virale RNA präpariert. Im Anschluß erfolgte die reverse Transkription und die Amplifikation der cDNA mit *Primern*, die die *scFv*-Sequenz flankieren (siehe Kapitel 2.1.1; 2.1.9; 2.1.10). Die Abbildung 3.12 zeigt die jeweiligen Reaktionsansätze nach gelelektrophoretischer Auftrennung.



**Abbildung 3.12 Panning der aHUVeC scFv display Bibliothek gegen vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)**

Dargestellt sind die erhaltenen Resultate nach *panning* der Bibliothek auf VEGFR-beschichteten Platten. Geerntet wurde der Zellkulturüberstand überschichteter 3T3-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Es folgte die Präparation viraler RNA, deren reverser Transkription und Amplifikation mittels geeigneter Primer.

**Spuren 1-3: *panning* der Bibliothek auf VEGFR-beschichteten Platten**

- 1) 1. *panning* 24h nach Überschichtung
- 2) 1. *panning* 48h nach Überschichtung
- 3) 2. *panning* 48h nach Überschichtung

**Spuren 4-7 (Kontrolle): 1. *panning* des Wildtyp-Virus (pMo)**

- 4) VEGFR beschichtete Platten, 24h nach Überschichtung
- 5) VEGFR beschichtete Platten, 48h nach Überschichtung
- 6) Unbeschichtete Platten, 24h nach Überschichtung
- 7) Unbeschichtete Platten, 48h nach Überschichtung

**Spuren 8 und 9 (Kontrolle) : 1. *panning* der Bibliothek auf unbeschichteten Platten**

- 8) 1. *panning* 24h nach Überschichtung
- 9) 1. *panning* 48h nach Überschichtung

Wie in obenstehender Abbildung dargestellt ergab die *panning*-Prozedur folgendes Bild, welches durch Sequenzierung der Fragmente bestätigt bzw. ermittelt werden konnte.

- 1) Eine Anreicherung *scFv*-spezifischer Sequenzen nach dem 1. *panning*, im Laufe der Expansion und durch das nachgeschaltete 2. *panning*, erkenntlich durch die zunehmende Intensität der 1 kb großen Bande in den Spuren 1-3.
- 2) Eine Erhöhung der Intensität einer ~300 bp großen Bande, ebenfalls in den Spuren 1-3. Nach Sequenzierung dieser Bande zeigte sich, dass es sich hierbei um eine Anreicherung von Viren handelt, die EGF auf ihrer Oberfläche tragen. Offensichtlich hat das zur Herstellung der Bibliothek verwendete Konstrukt pEMo eine Anreicherung im Verlauf des *pannings* erfahren (siehe Kapitel

2.1.3). Dieser Befund wird an entsprechender Stelle diskutiert werden (siehe Kapitel 4.1.2).

- 3) Dieselbe *panning*-Prozedur mit Zellkulturüberständen Wildtyp MoMLV transfizierter 293T-Zellen läßt keine Banden in der Größe von *scFv*- und EGF-Sequenz erkennen. Sichtbar sind Banden der Größe ~ 150 bp, was der zu erwartenden Größe bei der Amplifikation der Wildtyp-MoMLV-Sequenz mit den verwendeten *Primern* entspricht. Diese Beobachtung ist unabhängig von dem Ausführen der *panning*-Prozedur auf VEGFR-beschichteten (Spuren 4 und 5) oder unbeschichteten Platten (Spuren 6 und 7).
- 4) Die Spuren 8 und 9 der Abbildung 3.12 zeigen die Resultate nach *panning* der Bibliothek auf unbeschichteten Platten. Die Signale in Spur 8 sind im direkten Vergleich zu Spur 1 marginal. Signale von *scFv*'s (1 kb-Bande) und der 300-bp-EGF-Bande konnten erst nach 48-stündiger Expansion der zur Amplifikation verwendeten 3T3-Zellen detektiert werden (Spur 9).

### 3.1.7 Sequenzieller Abgleich VEGFR-bindender *scFv*-Viren

Die 1kb große Bande in Spur 3 (*scFv*-Sequenzen nach dem 2. *panning* und 48-stündiger Expansion von 3T3-Zellen) wurde aufgereinigt, in einen TA-Vektor subkloniert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden translatiert und gegeneinander abgeglichen. Nachfolgende Abbildung zeigt diese Abgleichung.

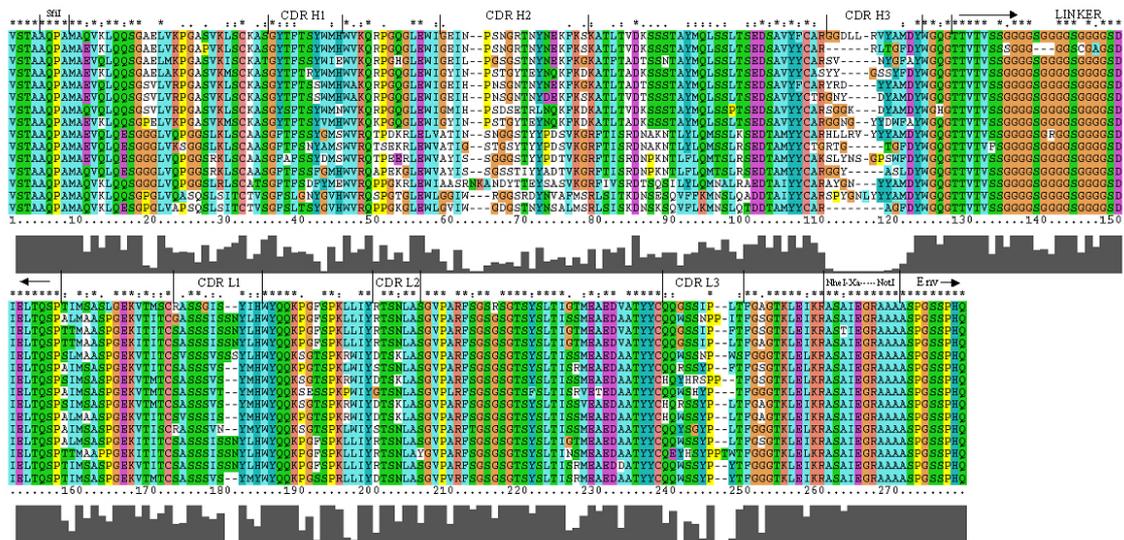


Abbildung 3.13 Sequenzieller Abgleich VEGFR-bindender *scFv*-Viren

Ausgewiesen sind die Regionen der Antigen-bindenden Stellen (*complementarity determining regions*, CDR) der schweren Kette (CDR H1-3) und der leichten Kette (CDR L1-3), sowie die Regionen des GS-linkers, der Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI*, des *scFv*-linkers bestehend aus *NheI*-Restriktionsschnittstelle und der Faktor Xa-Spaltstelle und das N-terminale Ende des Env-Proteins.

Der in der Abbildung 3.13 dargestellte sequenzielle Abgleich der 1kb-Bande nach zwei *panning*-Prozeduren ergab ein einheitliches Bild. Nachgewiesen werden konnten anschließend rekombinante, *scFv*-tragende Viruspartikel. Erwartungsgemäß zeigt sich in den durch PCR-Mutagenese veränderten Bereichen eine Homologie der Sequenzen von annähernd 100%. Deutlich zu sehen in den ausgewiesenen Bereichen der Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI* und des *scFv*-linkers bestehend aus *NheI*-Restriktionsschnittstelle und der Faktor Xa-Spaltstelle. Auffallend sind die Bereiche der Antigen-bindenden Abschnitte (*complementarity determining regions*, CDR's) mit relativ geringer Homologie und unterschiedlicher Länge. Die Regionen N-terminal der jeweiligen CDR's weisen wiederum eine sehr hohe, aber natürlich auftretende

Homologie auf. Anhand dieser Regionen wurden die Positionen der CDR's bestimmt (Antibodies - Structure and Sequence, 2000).

Durch das Abgleichen der Sequenzen zeigt sich, dass keine zu 100% identischen Sequenzen auftreten. Es ist somit keine klonale Expansion einer einheitlichen Viruspopulation zu diesem Zeitpunkt zu beobachten.

Dennoch kann an dieser Stelle von einer Anreicherung von Viren gesprochen werden, die alle ein strukturell funktionelles *scFv* auf ihrer Oberfläche tragen.

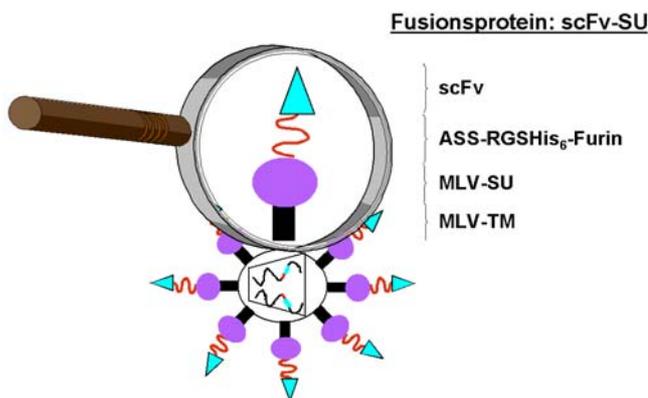
Im folgenden Teil meiner Arbeit wird ein neues System zur Produktion von *scFv*'s und anderer therapeutischer Proteine vorgestellt.

## 3.2 Produktion therapeutischer Proteine durch Replikationskompetente Retroviren

Im ersten Teil meiner Arbeit wurde ein neuartiges System zur Selektion von *scFv*'s vorgestellt. Die etablierte und hier vorgestellte Methode der retroviralen *scFv display* Bibliothek ermöglicht eine Selektion und Amplifikation von *scFv*'s mit gewünschten Bindungseigenschaften im eukaryonten Kontext. Der nun folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der Produktion derart selektionierter Proteine und deren möglicher therapeutischen Anwendung.

Da die bislang in gentherapeutischen Ansätzen verwendeten nicht-replikationskompetenten retroviralen Vektoren enorme Defizite hinsichtlich des effektiven Gentransfers aufweisen, wurde hier replikationskompetentes, amphotropes MLV (Stamm 4070A) verwendet. Ziel hierbei war nunmehr nicht die Präsentation der jeweiligen Proteine auf der Virusoberfläche, sondern deren effiziente Sezernierung durch infizierte Zielzellen.

Zur Etablierung des Systems wurden wiederum die bereits beschriebenen *scFv*'s 7A5 und L36 verwendet. Nachstehende Abbildung verdeutlicht die Konzeption.



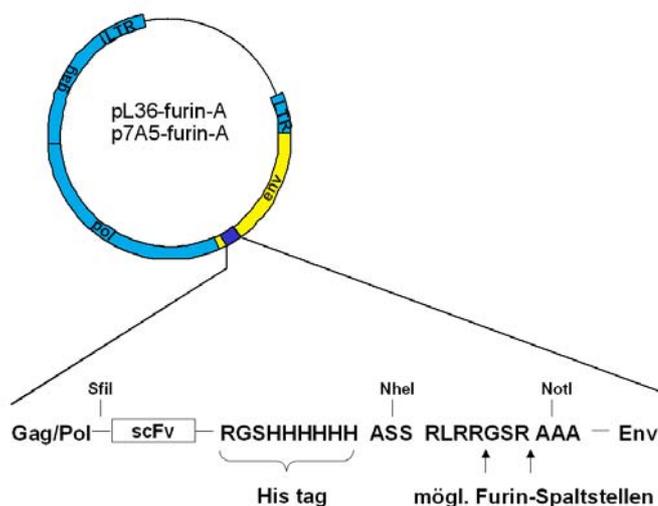
**Abbildung 3.14 Schematischer Aufbau L36/ 7A5-Furin-A Viren**

Dargestellt ist das jeweilige *scFv* (►) und dessen Verbindung zu SU des viralen Env-Proteins (v). Diese Verbindung (*linker*) besteht aus einer analytischen *NheI*-Schnittstelle (ASS), einem RGSHis-tag und einer Furin-Spaltstelle.

Der Unterschied zu dem bereits beschriebenen System der retroviralen *scFv display* Bibliothek besteht in erster Linie in der Modifikation des amphotropen MLV-Hüllproteins (4070A), sowie in der Verwendung einer Furin-Proteasespaltstelle, die bereits zuvor charakterisiert wurde (Buchholz et al., 1998). Selektioniert wurde diese Proteasespaltstelle in der humanen Fibrosarcom-Zelllinie HT1080, die auch in dieser Arbeit zur Etablierung des Systems verwendet wurden.

Die Sequenz der Furin-Proteasespaltstelle stellt u.a. die Kopplung zwischen viralem SU und dem jeweiligen *scFv* dar. Da es sich hierbei um eine im Golgi-Apparat aktive Protease handelt, wurde angenommen, dass es während des Prozessierens der viralen Hüllproteine zu einer proteolytischen Spaltung zwischen SU und *scFv* kommt, was die Freisetzung von löslichen *scFv*'s zur Folge hätte (vergl. Abbildung 1.8). Um eine Detektion der löslichen *scFv*'s zu ermöglichen wurde N-terminal der Spaltstelle das RGSHis-*tag* integriert.

### 3.2.1 Klonierung von pL36-furin-A und p7A5-furin-A



**Abbildung 3.15 Klonierungsstrategie**

Schematisierte Darstellung der Klonierung modifizierter *scFv*-Sequenzen und der resultierenden Plasmide pL36-furin-A und p7A5-furin-A.

Wie in Abbildung 3.15 schematisiert, erfolgte die Insertion des zusätzlichen Leserahmens in das für das Env-Protein kodierende Gen des amphotropen MLV (aMLV). Die Insertionsstelle wurde so gewählt, dass die entsprechenden *scFv*'s N-

terminal von SU, also „auf“ dem Env-Protein des Virus präsentiert werden. Desweiteren dargestellt ist die Aminosäuresequenz der Furin-Proteasespaltstelle, der analytischen *NheI*-Restriktionsschnittstelle und des His-tags, welche in ihrer Gesamtheit die Kopplung von SU und *scFv* darstellen.

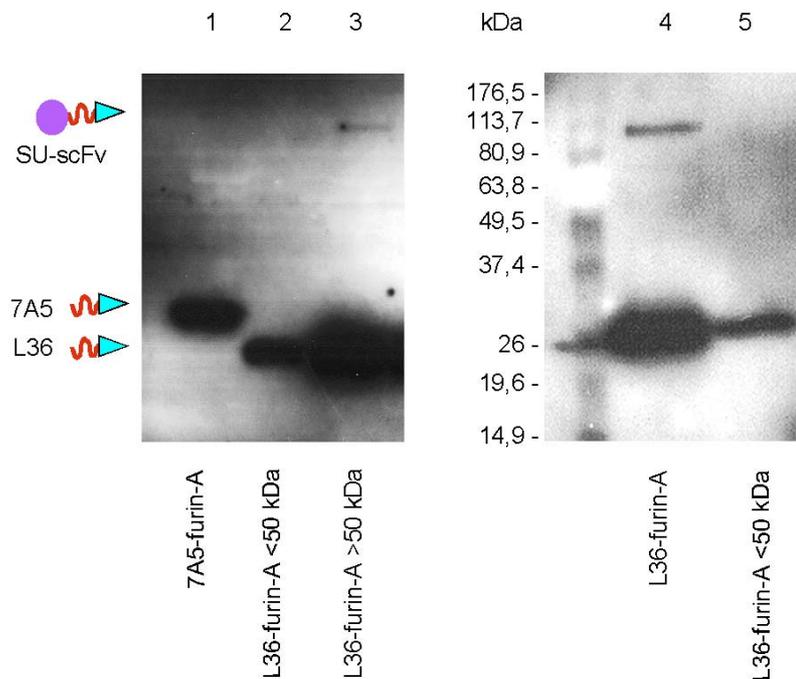
Zur Klonierung dieser Plasmide wurde die Sequenz der Miniantikörper 7A5 und L36 mittels PCR aus ihren Ausgangsplasmiden amplifiziert und gleichzeitig durch entsprechende *Primer* an ihren Enden modifiziert. So wurde an den 5'-Enden der Sequenzen eine *SfiI*-Restriktionsschnittstelle, sowie an deren 3'-Enden ein His-tag, gefolgt von einer analytischen *NheI*-Restriktionsschnittstelle, die Sequenz der Furin-Proteasespaltstelle und eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Danach erfolgte eine Aufreinigung und eine Restriktionsendonuklease-Spaltung der Fragmente mit *SfiI* und *NotI*. Das Ziel-Plasmid pE-A kodiert das Volllängengenom des Moloney MLV, wobei das Hüllprotein gegen das des amphotropen Stammes 4070A ausgetauscht wurde und N-terminal EGF präsentiert. Durch die *SfiI/ NotI* Restriktion wurde die EGF-kodierende Sequenz entfernt. Die erhaltenen *scFv*-Fragmente wurden nun via *SfiI/ NotI* in das entsprechend geöffnete Ziel-Plasmid pE-A kloniert (siehe Kapitel 2.1.3). Die resultierenden Plasmide wurden als pL36-furin-A und p7A5-furin-A bezeichnet und sequenziert.

### 3.2.2 Expressionskontrolle der Konstrukte

Nach erfolgter Klonierung von pL36 respektive p7A5-furin-A ging es im nächsten Schritt darum, sie funktionell zu kontrollieren. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf der Frage, ob die verwendete Furin-Spaltstelle funktioniert und es zu einer Sekretion der *scFv*'s kommt.

Hierzu wurde die humane Nierenepithel-Zelllinie 293T mit den Plasmiden pL36/ p7A5-furin-A transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurde der Zellkulturüberstand geerntet, aliquotiert gelagert und für anschließende Infektionen von HT1080 Zellen verwendet. Nach Infektion von HT1080 und deren Wachstum zu einem konfluenten Zellrasen wurden die Kulturen mindestens drei Tage in serumfreiem Zellkulturmedium gehalten. Dieser Zellkulturüberstand wurde unverdünnt zur Analyse

mittels SDS-PAGE und anschließendem Westernblot verwendet. Zur Detektion wurde ein  $\alpha$ His Antikörper verwendet.



**Abbildung 3.16 Detektion von sekretiertem 7A5 und L36**

HT1080-Zellen wurden mit L36-Furin-A (Spuren 2-5) und 7A5-Furin-A (Spur 1) infiziert. 30 Stunden nach Infektion wurde für mindestens 72 Stunden in serumfreiem Zellkulturmedium inkubiert. Nach Ernte des Zellkulturüberstandes wurden 20  $\mu$ l in einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die *scFv*-spezifischen Signale wurden mit dem  $\alpha$ His-Antikörper (Qiagen, Hilden) und dem ECL-Detektionssystem (Pierce biotechnology, Rockford IL) erzeugt.

Am linken Rand der Abbildung 3.16 schematisch verdeutlicht sind die Signale der durch Furin vom viralen SU abgespaltenen *scFv*'s, sowie die ungespaltenen 7A5- bzw. L36-SU Fusionsproteine. Entsprechend ihrem apparenten Molekulargewichts von 29 kDa für gespaltenes 7A5 und 28,3 kDa für das gespaltene L36 erhält man Signale in unterschiedlicher Höhe (vergl. Spuren 1 und 2 der Abbildung 3.16). Das ungespaltene SU-*scFv* Fusionsprotein hat eine Masse von ca. 100 kDa.

Deutlich wird, dass die Signale der gespaltenen *scFv*'s intensiver sind als die Signale der ungespaltenen SU-*scFv* Fusionsproteine. Letztere werden nur bei längerer Belichtungsdauer sichtbar, was sich in einem höheren Hintergrund des in Abbildung 3.16 dargestellten Blots niederschlägt. Folglich liegt der Großteil der *scFv*'s in

abgespaltener Form vor, was auf eine effiziente Spaltung der SU-*scFv* Fusionsproteine durch Furin schließen läßt. In vergleichbarer Menge müßte demnach auch das virale SU nach Spaltung vorliegen, welches in diesem Ansatz durch die Verwendung des  $\alpha$ His Antikörpers nicht detektierbar ist.

Somit konnte sowohl die Expression der rekombinanten Viren L36-furin-A und 7A5-furin-A, als auch die proteolytische Spaltung sowie die Sekretion der jeweiligen *scFv*'s nachgewiesen werden.

### **Verfahren zur Dekontamination**

Für derartig produzierte *scFv*'s ist ein breites Spektrum der Anwendung denkbar, die es z.T. erforderlich machen könnten, die Viruspartikel abzutrennen.

Aufgrund der gegebenen Größenunterschiede im Molekulargewicht zwischen den viralen Partikeln, löslichem SU, SU-*scFv* Fusionsproteinen und den abgespaltenen *scFv*'s ist eine Filtrierung der Zellkulturüberstände möglich. Der hier gewählte Filter erlaubte eine Trennung der Proteine bei 50kDa (siehe Kapitel 2.2.10). Die Ergebnisse der Filtrierung sind ebenfalls in Abbildung 3.16 dargestellt. Die Spuren 4 und 5 zeigen die Resultate besonders deutlich. Nach Filtrierung läßt sich das SU-*scFv* Fusionsprotein in Linie 5 im Vergleich zu Linie 3 nicht mehr detektieren. Gleichzeitig bedingt das angewendete Verfahren der Filtrierung einen Verlust in der Quantität des produzierten *scFv*'s L36, deutlich durch dessen verminderter Signalintensität in Linie 5. Die in Linie 5 aufgetragene filtrierte Fraktion wurde darüber hinaus zur erneuten Infektion von HT1080-Zellen verwendet. Mittels eines Immune-Peroxidase-Assay (IPA) konnte keinerlei Infektion der HT1080-Zellen nachgewiesen werden. Es ist demnach durch einfache Filtrierung möglich, virale Bestandteile von produzierten *scFv*'s zu trennen.

Neben der Filtrierung wurden radioaktive Bestrahlung durch Caesium und UV-Inaktivierung der Proben vorgenommen (siehe Kapitel 2.2.10). Die bestrahlten Überstände wurden anschliessend durch IPA auf Infektiösität untersucht. Während nach hochdosierter Caesiumbestrahlung eine starke Verminderung der Infektiösität beobachtet werden konnte, waren UV-bestrahlte Überstände frei von nachweisbarer Infektiösität.

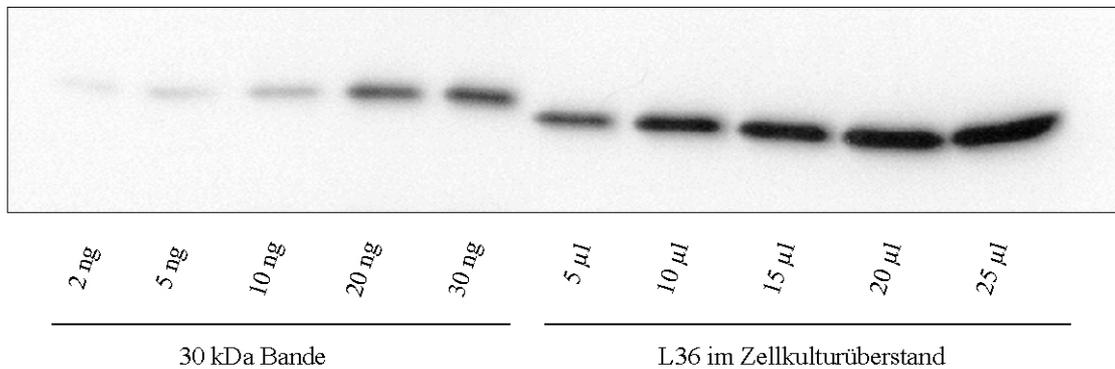
Ein weiteres Verfahren zur Dekontamination eröffnet sich durch die Verwendung des His-tags der sezernierten *scFv*'s. So wurde im Folgenden zuerst die sezernierte Menge an L36 im Zellkulturüberstand pL36-furin-A infizierter HT1080-Zellen per Western Blot ermittelt und anschließend erfolgte dessen Aufreinigung unter Verwendung des His-tags.

### **3.2.3 Quantifizierung der produzierten L36-Menge**

Nach Kontrolle der Expression der Konstrukte und der Produktion von löslichen *scFv*'s wurde nun die Effektivität des Systems untersucht. Von besonderem Interesse war hierbei die Quantifizierung des sezernierten *scFv*'s.

Hierzu wurden, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, der Zellkulturüberstand pL36-furin-A-transfizierter 293T-Zellen zur Infektion von HT1080-Zellen verwendet. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte eine viertägige Inkubation in serumfreiem Medium. Das Medium wurde geerntet, in unterschiedlichen Verdünnungen in einem SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot analysiert. Die Detektion des produzierten L36 erfolgte erneut durch die Verwendung des  $\alpha$ His-Antikörpers. Als Maßstab zur anschließenden Quantifizierung wurde eine mit His-tag versehene Proteinleiter verwendet (Qiagen, Hilden), von der definierte Mengen auf das SDS-Gel geladen wurden.

Die Abbildung 3.17 zeigt den resultierenden Western Blot. Dargestellt ist ein Ausschnitt im Bereich von 30 kDa.



**Abbildung 3.17 Quantitative Western Blot Analyse**

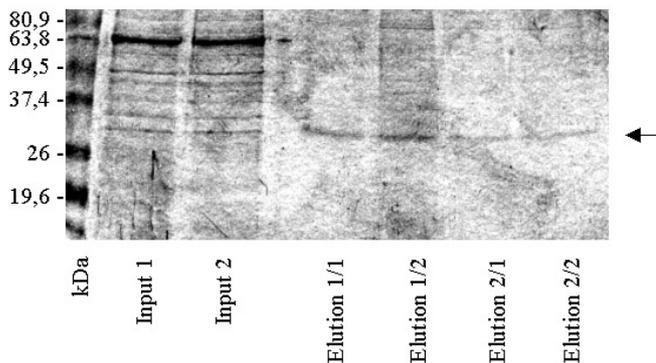
Dargestellt ist die quantitative Western Blot Analyse von sezerniertem L36 im Zellkulturüberstand infizierter HT1080-Zellen. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der Signalstärken definierter Mengen einer His-tag markierten Proteinleiter (links) und verschiedener Probenvolumina (rechts). Gezeigt ist ein Ausschnitt des Blots im Bereich von 30 kDa. Die Detektion erfolgte durch einen  $\alpha$ His-Antikörper (Qiagen, Hilden) und anschließender ECL.

Wie in Abbildung 3.17 ersichtlich, erscheint das gespaltene *scFv* L36 mit seinem apparenten Molekulargewicht von 28,3 kDa unterhalb der 30 kDa Bande der Proteinleiter. Anhand der Signalstärken der definierten Mengen an Proteinleiter konnte nun die Konzentration von L36 im Zellkulturüberstand der HT1080-Zellen densitometrisch gemessen werden. Die so ermittelte Konzentration beträgt 6  $\mu$ g L36/ ml Zellkulturüberstand infizierter HT1080-Zellen.

### 3.2.4 Aufreinigung von L36 mittels His-tag

Wie bereits erwähnt, kann der integrierte His-tag mit seiner Affinität zu  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen zur Dekontamination bzw. zur Aufreinigung der sezernierten *scFv*'s verwendet werden. Zu diesem Zweck wurden 10 ml der im vorangegangenen Kapitel quantifizierten Zellkulturüberstände L36-furin-A infizierter HT1080-Zellen mit Nickel-Agarose inkubiert. Die erhaltenen Eluate wurden nach der Prozedur durch SDS-PAGE aufgetrennt und die enthaltenen Proteine durch Comassie-Färbung detektiert (siehe Kapitel 2.1.15).

Nachfolgende Abbildung stellt die Ergebnisse dieser Aufreinigung dar.



**Abbildung 3.18 SDS Gel nach Aufreinigung mittels His-tag**

Abgebildet ist ein Comassie gefärbtes SDS Gel nach Gelelektrophorese. Zu sehen sind Proben des Zellkulturüberstandes L36-furin-A infizierter HT1080-Zellen (input 1+2) und Proben nach dessen Aufreinigung durch Nickel-Agarose (Elution). Erkennlich ist eine ~30 kDa große Bande in allen Fraktionen der Elution (Pfeil), die ihrer Größe nach mit sezernierten L36 korrespondieren (Größe der Proteinleiter-Banden in kDa).

Abbildung 3.18 stellt die Ergebnisse hinsichtlich der Aufreinigung von sezerniertem L36 mittels Nickel-Agarose dar. Aufgetragen wurden zwei Chargen unbehandelten Zellkulturüberstandes L36-furin-A infizierter HT1080-Zellen (input), sowie Proben zweier aufeinander folgender Elutionen nach Inkubation mit Nickel-Agarose (Elution). Es zeigen sich diskrete Banden, die aufgrund ihrer Größe mit sezernierten L36 korrespondieren. Die Intensität dieser Banden befindet sich nahe des Detektionslimits durch eine Comassie-Färbung. Die Proteinbestimmung nach Bradford ergab eine Konzentration aller Eluate von 0,5 µg/ml. Insgesamt konnten demnach 4 µg der zur Aufreinigung eingesetzten gesamt-Proteinmenge von 60 µg, also etwa 7% zurückgewonnen werden. Zugleich ist dieses Verfahren, aus Gründen die diskutiert werden, nicht zur Dekontamination der Zellkulturüberstände geeignet. Allerdings konnte deutlich gemacht werden, dass eine Aufreinigung unter Verwendung des His-tags prinzipiell möglich ist, aber mit quantitativen Verlusten verbunden ist.

### **3.2.5 Tropismus der rekombinanten Viren und scFv-Produktion in unterschiedlichen Zelllinien**

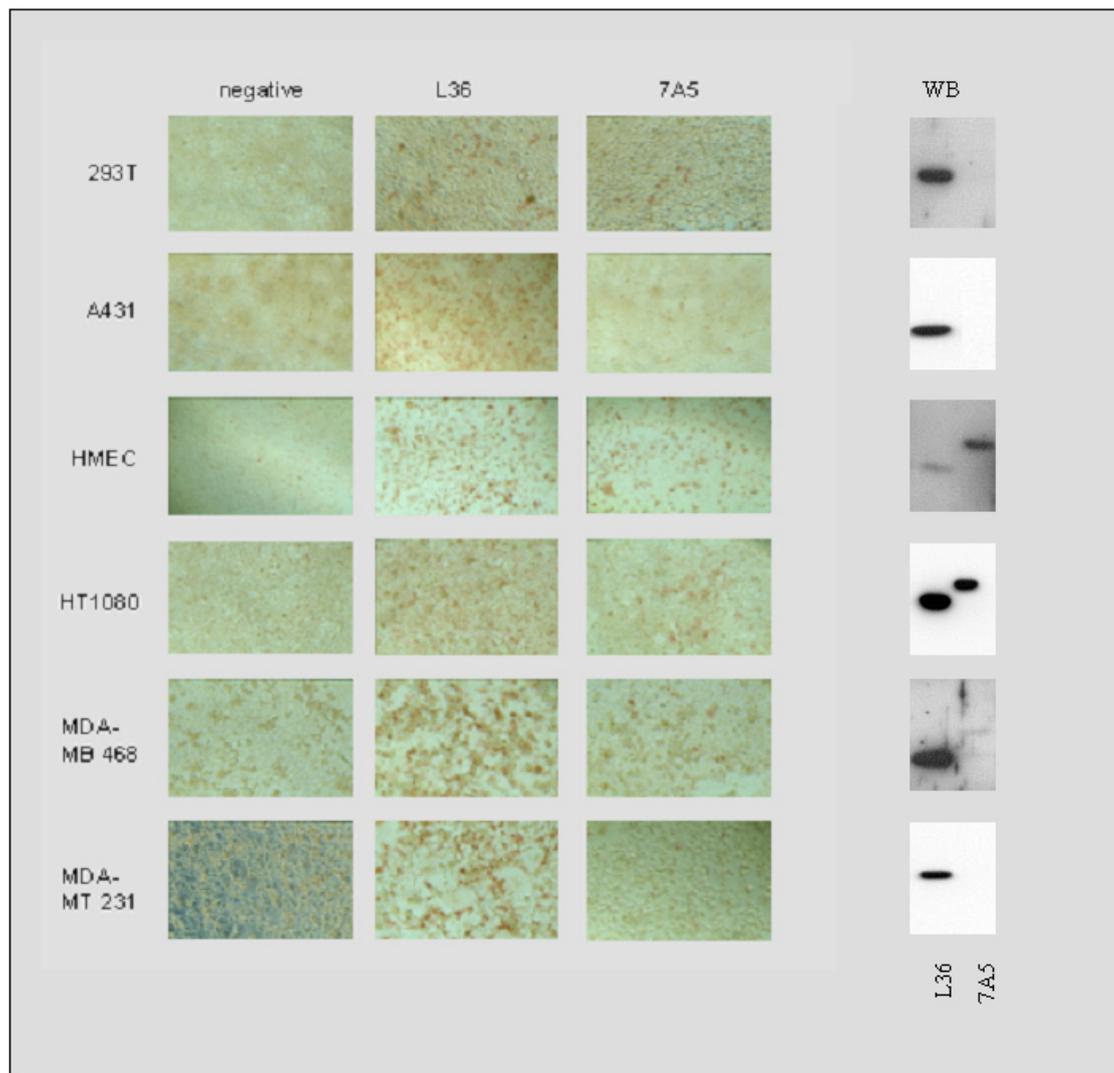
Wie bereits gezeigt, konnte die humane Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 erfolgreich durch die von der Zelllinie 293T produzierten rekombinanten Viren L36/ 7A5-furin-A infiziert werden (vergl. Abbildung 3.16). Im Weiteren konnte die Expression und

Sezernierung der entsprechenden *scFv*'s, sowie deren Dekontamination und Aufreinigung demonstriert werden (vergl. Abbildung 3.16).

Weitere Zelltypen sollten auf ihre Infizierbarkeit untersucht werden, um den Tropismus der rekombinanten Viren und die Funktion der Spaltstelle zu überprüfen. Hierzu wurde der Zellkulturüberstand transfizierter 293T-Zellen zur Infektion folgender humanen Zelllinien verwendet: HT1080 (Fibrosarkom), A431 (epidermales Vulvakarzinom), CDC-HMEC (Endothel), MDA-MB468 und 231 (Brustkarzinom), sowie die zur Transfektion verwendeten 293T (Nierenkarzinom).

Zwei Tage nach erfolgter Infektion wurden die infizierten Zellen aufgeteilt. Der eine Teil wurde einem IPA unterzogen. Hierzu wurden die Zellen fixiert und die infizierten Zellen mittels eines gegen das virale p30 gerichteten Antikörpers detektiert (vergl. Kapitel 2.2.6). Der andere Teil wurde zuerst expandiert und später in serumfreiem Medium inkubiert. Proben des serumfreien Mediums wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Detektion der gespaltenen *scFv*'s erfolgte erneut mittels  $\alpha$ His-Antikörper (vergl. Kapitel 2.1.14).

Folgende Abbildung 3.19 zeigt die Zusammenstellung der Ergebnisse des IPA und der korrespondierenden Western Blot-Daten.



**Abbildung 3.19 Infektionsstudie der rekombinanten Viren L36/ 7A5-furin-A**

Dargestellt sind *Immune Peroxidase Assays* (IPA) von verschiedenen Zelllinien, die durch die rekombinanten Viren L36/ 7A5-furin-A infiziert wurden (links). Die infizierten Zellen sind rot gefärbt und sezernieren die jeweiligen *scFv*'s in das umgebende Medium. Rechts dargestellt sind die korrespondierenden Western Blot Resultate der jeweiligen Zellkulturüberstände. Sie zeigen die Signale der sezernierten *scFv*'s.

Die rote Färbung der Zellen im IPA der Abbildung 3.19 zeigt, dass die rekombinanten L36/ 7A5-furin-A Viren auch nach Modifikation in der Lage sind, eine Reihe von humanen Zellen zu infizieren. Der Tropismus des Wildtyps scheint demnach nicht durch die *scFv*'s beeinflusst. Allerdings ist die Infektionsrate unterschiedlich. Auffällig ist eine durchgehend niedrigere Infektionsrate bei allen durch 7A5-furin-A infizierten Zelllinien im Vergleich zu L36-furin-A.

Die Ergebnisse der korrespondierenden Western Blot Analyse zeigen einen ähnlichen Unterschied auf der Ebene der produzierten *scFv*'s. Zu sehen sind Signale unterschiedlicher Höhe, gemäß des apparenten Molekulargewichts von 28 kDa für L36 und 29 kDa für 7A5. L36 konnte in unterschiedlichen Konzentrationen im Zellkulturüberstand jeder untersuchten Zelllinie nachgewiesen werden. Die Signalstärken beider sezernierten *scFv*'s im Western Blot sind bei der zur Etablierung verwendeten Zelllinie HT1080 am höchsten und mit nahezu gleicher Intensität. Im Zellkulturüberstand aller anderen Zelllinien sind die Signale von 7A5 durchweg schwächer und liegen bei MDA-MB231, 293T und A431 nahe oder sogar unter der Nachweisgrenze. Diese Befunde werden an entsprechender Stelle diskutiert (siehe Kapitel 4.2).

Es bleibt festzustellen, dass es zu einer Infektion aller verwendeten Zellen und zur Produktion der *scFv*'s kommt, allerdings mit unterschiedlichen Infektionsraten bzw. in unterschiedlichen Konzentrationen.

### **3.2.6 Kontrolle der Antigenerkennung der therapeutischen Proteine**

Es konnte gezeigt werden, dass das etablierte System zur Produktion von löslichen *scFv*'s in einem rein eukaryonten Kontext verwendet werden kann. Im Folgenden wurde das Augenmerk auf die biologische Aktivität von 7A5 und L36 gerichtet, die auf diese Art und Weise produziert wurden.

Bedingt durch die unterschiedlichen Antigene der *scFv*'s wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt.

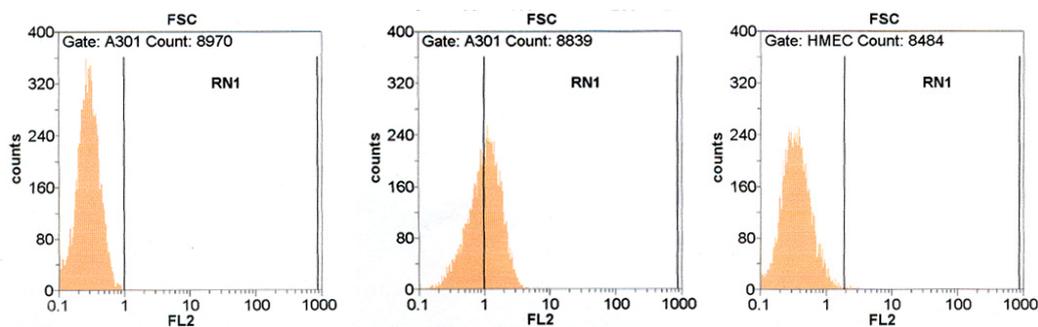
Die biologische Aktivität des produzierten 7A5 wurde mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) untersucht. Hierbei sollte das T-Zell spezifische 7A5-Antigen auf der Oberfläche der T-Zelllinie A301 durch das produzierte 7A5 nachgewiesen werden. Der Nachweis des Antigen-Antikörper Komplexes erfolgte wiederum durch den  $\alpha$ His-Antikörper, die Detektion durch einen Phycoerythrin (PE) gekoppelten tertiären Antikörper (vergl. Kapitel 2.2.9).

Der Nachweis der biologischen Aktivität von L36 sollte durch einen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) erfolgen. Hierzu wurden, wie in Kapitel 2.2.8

beschrieben, Zellkultur- oder ELISA-Platten mit Laminin beschichtet. Die Bindung von L36, oder seines als Kontrolle eingesetzten bakteriell exprimierten Pendant, wurde wiederum unter Verwendung des entsprechenden  $\alpha$ His-Antikörpers nachgewiesen. Die Detektion erfolgte durch einen *Horseradish peroxidase* (HRP) konjugierten Ziege anti-Maus Antikörper (Sigma, Deisenhofen).

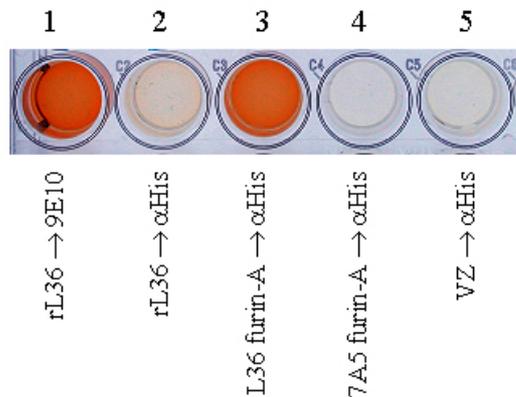
In beiden Versuchsreihen wurde der serumfreie Zellkultur-Überstand entsprechend infizierter HT1080-Zellen verwendet.

Nachfolgende Abbildung 3.20 und Abbildung 3.21 zeigen die erzielten Ergebnisse dieser Versuchsreihen.



**Abbildung 3.20 FACS-Analyse 7A5-Antigen tragender T-Zelllinie A301**

FACS-Analyse der 7A5-Antigen tragenden T-Zelllinie A301 (vergl. Kapitel 2.2.9). Links dargestellt ist die Isotypkontrolle. In der Mitte die Fluoreszenzverschiebung nach Anfärbung durch serumfreien Zellkultur-Überstand von 7A5-furin-A infizierten HT1080-Zellen. Rechts zu sehen ist, dass es zu keiner Fluoreszenzverschiebung von 7A5-Antigen negativen HMEC-Zellen nach Inkubation mit serumfreiem Zellkultur-Überstand von 7A5-furin-A infizierten HT1080-Zellen kommt.



**Abbildung 3.21 ELISA mit L36-furin-A infizierter HT1080-Zellkulturüberstände**

Dargestellt ist ein ELISA auf einer mit Laminin beschichteten Zellkulturplatte (vergl. Kapitel 2.2.8). Der Nachweis der Bindung erfolgt durch Substratumsatz und resultiert in einer Rotfärbung. Als eine Kontrolle wurde bakteriell exprimiertes, mit einem *myc-tag* versehenes rL36 verwendet.

Nachgewiesen werden konnte diese Bindung durch einen  $\alpha$ myc-Antikörper 9E10 (1). Der üblicher Weise verwendete  $\alpha$ His-Antikörper (Qiagen, Hilden) kann diese Bindung erwartungsgemäß nicht nachweisen (2). Hingegen kann die Bindung von HT1080-Zellen produzierten L36 mit seinem *his-tag* sehr gut durch den  $\alpha$ His-Antikörper nachgewiesen werden (3). Zu keiner detektierbaren Bindung kommt es bei Verwendung von 7A5-furin-A Viren (4) oder unbehandeltem Zellkulturmedium (5).

In Abbildung 3.20 dargestellt, zeigt sich im Vergleich zur Isotypkontrolle (links) eine deutliche Fluoreszenzverschiebung durch die Inkubation der T-Zelllinie A301 mit dem Zellkulturüberstand der 7A5-furin-A infizierten HT1080-Zellen (mitte). Die Fluoreszenzverschiebung der gesamten Population zeigt, dass alle Zellen das 7A5-Antigen tragen, welches durch das hier produzierte 7A5 *scFv* nachgewiesen werden konnte. Ohne Fluoreszenzverschiebung hingegen die 7A5-Antigen negative Endothelzelllinie HMEC (rechts). Die 7A5-furin-A infizierten HT1080-Zellen produzieren somit ein funktionelles 7A5 *scvF*, das sein Antigen erkennt.

Wie in Abbildung 3.21 zu sehen, konnte dieses Ergebnis gleichermaßen in Hinblick auf die Produktion von L36 erzielt werden (vergl. Kapitel 2.2.8). Als Kontrolle diente bakteriell exprimiertes und mit einem *myc-tag* versehenem rL36 (Sanz et al., 2001). Durch die Verwendung des  $\alpha$ myc-Antikörpers 9E10 konnte die Bindung von rL36 an sein Antigen Laminin nachgewiesen werden (Spur 1). Der Nachweis dieser Bindung gelang erwartungsgemäß nicht unter Verwendung des  $\alpha$ His-Antikörpers (Spur 2). Hingegen konnte die Bindung von HT1080-Zellen produziertem L36 durch den  $\alpha$ His-Antikörper sehr gut nachgewiesen werden (Spur 3). Keine Bindung konnte wiederum

nach Inkubation durch HT1080-Zellen produziertes 7A5 (Spur 4), sowie nach Inkubation mit unbehandeltem Zellkulturmedium (Spur 5) nachgewiesen werden.

Nach erfolgreichem Nachweis der Produktion von funktionellen *scvF*'s L36 und 7A5 durch entsprechend infizierte HT1080-Zellen wurde im Folgenden untersucht, wie hoch die genomische Stabilität der hergestellten L36/ 7A5-furin-A Viren im Laufe mehrerer Replikationszyklen ist.

### 3.2.7 Stabilität der L36/ 7A5-furin-A Viren

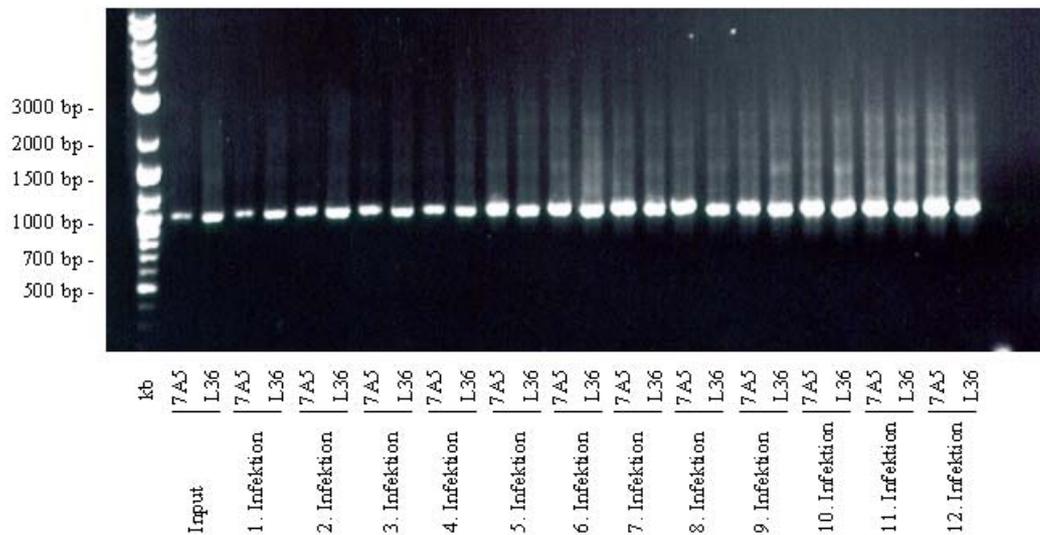
In Hinblick auf therapeutische Ansätze ist die Stabilität der rekombinanten L36/ 7A5-furin-A Viren im Laufe mehrerer Infektionszyklen von hoher Bedeutung. In der Vergangenheit konnte beobachtet werden, dass Veränderung des Genoms von Retroviren oder gar die Integration eines zusätzlichen Leserahmens zu einem selektiven Nachteil dieser Varianten führt. Demnach ergeben sich Vorteile für „Mutanten“, die diese Veränderungen durch Deletion rückgängig oder wirkungslos machen können. Das Auftreten von Mutationen und Deletionen ist aufgrund des schnellen Replikationszyklus von Retroviren sehr wahrscheinlich und führt meist schon nach wenigen Infektionszyklen zu einem Verlust der erwünschten rekombinanten Varianten.

Deshalb wurde untersucht, ob die vorgenommenen Modifikationen Einfluss auf die Stabilität bzw. Replikationsfähigkeit der MLV abgeleiteten Vektoren haben.

Hierzu erfolgte erneut eine Infektion von HT1080-Zellen mit den Zellkulturüberständen pL36/ p7A5-furin-A transfizierter 293T-Zellen. Zwei Tage nach Infektion wurde der HT1080-Zellkulturüberstand zur Infektion frischer HT1080-Zellen verwendet. Diese Infektion wurde durch Passagierung der HT1080 Zellkulturüberstände, wie im Kapitel 2.2.5 detailliert beschrieben, elf Mal wiederholt.

Proben des Zellkulturmediums jeder Passagierung, sowie des ursprünglichen 293T-Überstandes wurden genommen und virale RNA präpariert. Nach reverser Transkription erfolgte eine PCR mit *Primern*, die die inserierte *scFv*-Sequenz flankieren.

Nachstehende Abbildung 3.22 zeigt die Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel mittels Gelelektrophorese.



**Abbildung 3.22 Kontrolle der Virusstabilität von 7A5/ L36-furin-A**

Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Präparation viraler RNA, reverser Transkription und Amplifikation mittels *scFv*-Sequenz flankierender *Primer*. Links die 2-log kb Leiter, gefolgt von den Proben des Zellkulturüberstandes transfizierter 293T-Zellen (input). Gekennzeichnet ist die Anzahl der Infektionen während der Passagierung 7A5 respektive L36-furin-A infizierter HT1080-Zellen.

Wie in Abbildung 3.22 erkennbar, weisen alle Proben eine ca. 1kb große Bande auf. Mit steigender Infektionswiederholung kommt es zu einer Zunahme der Signalintensität. Deutlich wird, dass es während der zwölf vorgenommenen Infektionen zu keiner Deletion des zusätzlichen *scFv*-Leserahmens kommt.

Ergänzend wurde mit allen Proben ein *immune Peroxidase Assay* (IPA) auf HT1080-Zellen durchgeführt. Die hier nicht dargestellten Ergebnisse zeigen zu fast 100% infizierte Zellkulturen über den gesamten Zeitraum der Passagierung. Somit hat die vorgenommene Modifikation an dem Wildtypvirus für einen Zeitraum von zwölf Infektionszyklen weder Einfluss auf dessen Replikationskompetenz, noch wurde der zusätzliche Leserahmen deletiert.

### 3.2.8 Produktion anderer therapeutischer Proteine

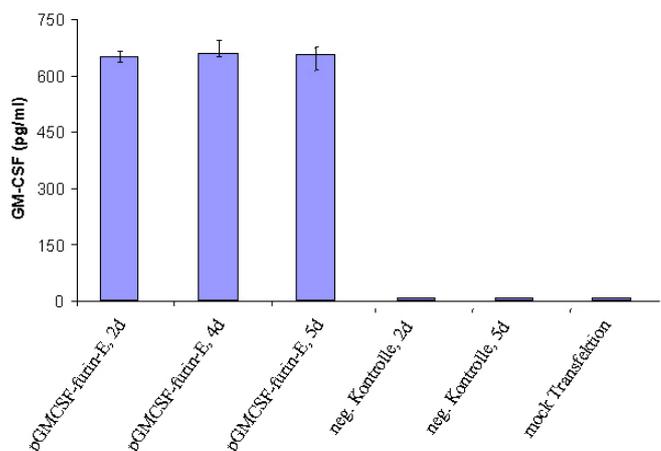
Der Frage, ob das hier vorgestellte System auch zur Produktion anderer therapeutischer Proteine verwendet werden kann, wurde im Folgenden nachgegangen. Hierzu wurde das Gen des Zytokins *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) aus der Maus wie bereits beschrieben modifiziert und kloniert (vergl. Abbildung 3.15). Aus

Gründen biologischer Sicherheit und für spätere Untersuchungen am Tiermodell wurde in diesem Fall erneut der ecotrope MLV Stamm (eMLV), der nur murine Zellen infizieren kann, verwendet.

Nach Amplifikation und Modifikation des GM-CSF-Gens durch PCR mittels geeigneter *Primer*, erfolgte die Ligation in das entsprechend geöffnete Plasmid pMo (vergl. Kapitel 2.1.3). Auf das Einfügen eines *His-tags* wurde in diesem Fall verzichtet, da durch kommerziell erhältliche *ELISA-kits* die Konzentration von GM-CSF in Zellkulturmedien bestimmt werden kann (vergl. Kapitel 2.2.8.1). Das resultierende Plasmid pGMCSF-furin-E wurde sequenziert.

In diesem Fall wurde die murine Zelllinie *Lewis lung carcinoma* (LLC) mit dem Plasmid pGMCSF-furin-E transfiziert.

Die Konzentration des Zytokins GM-CSF im Zellkulturüberstand von pGMCSF-furin-E transfizierter LLC-Zellen wurde mittels GM-CSF-ELISA bestimmt.



**Abbildung 3.23 GM-CSF ELISA**

Grafische Darstellung der GM-CSF Konzentration im Zellkulturmedium entsprechend transfizierter LLC-Zellen. Gezeigt ist die Konzentration zwei Tage, vier Tage und fünf Tage nach Transfektion (pGMCSF-furin-E 2d, 4d, 5d). Erwartungsgemäß konnte kein GM-CSF im Zellkulturüberstand nicht-transfizierter LLC-Zellen an Tag 2 und Tag 5 (neg. Kontrolle 2d und 5d), sowie im Zellkulturüberstand von LLC-Zellen, die durch ein Fremdplasmid transfiziert wurden (mock), festgestellt werden.

Wie in Abbildung 3.23 gezeigt, konnte eine gleichbleibende GM-CSF Konzentration von ~650 pg/ml im Zellkulturüberstand der mit pGMCSF-furin-E transfizierten LLC-Zellen an Tag 2, 4 und 5 nachgewiesen werden.

Proben des Zellkulturüberstandes von nicht-transfizierten LLCs wurden am Tag 2 und Tag 5 nach Transfektion genommen und zeigten keine detektierbare Konzentration an GM-CSF. Ebenso konnte kein GM-CSF im Zellkulturüberstand von LLC-Zellen nachgewiesen werden, die durch ein Fremdplasmid transfiziert wurden.

Die hier erreichten GM-CSF Konzentrationen sind niedriger als bei der beschriebenen *scFv*-Produktion. Sie liegen aber über der physiologisch wirksamen Konzentration von GM-CSF und innerhalb der Konzentration, die in therapeutischen Ansätzen verwendet wird (Burgess, 1990; Metcalf, 1990).

Abschließend konnte also gezeigt werden, dass das hier etablierte und vorgestellte System sich nicht nur zur Produktion von Miniantikörpern eignet, sondern auch zur Produktion von Zytokinen im therapeutischen Maßstab verwendet werden kann.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit unterteilt sich in zwei Themengebiete mit unterschiedlicher Zielsetzung. Im ersten Teil wurde ein neues System zur Selektion von Miniantikörpern (*scFv*'s) etabliert, dessen Anwendung auch hinsichtlich der Entwicklung neuer *cell-targeting* Vektoren von Bedeutung sein wird. Im zweiten Teil wurde ein neues Verfahren vorgestellt, welches die Expression von *scFv*'s und anderen therapeutisch wirksamer Proteine erlaubt. Hierbei steht die eigentliche gentherapeutische Anwendung im Vordergrund.

Beide Systeme basieren auf unterschiedlichen Modifikationen verschiedener Stämme des Maus Leukämie Virus (MLV).

### 4.1 Etablierung einer retroviralen *scFv display* Bibliothek

Die Herstellung von herkömmlichen Phagen *display* Bibliotheken ist seit über einem Jahrzehnt Teil einer anerkannten Methode, um Peptide oder Antikörperfragmente mit hoher Diversität auf der Oberfläche von Bakteriophagen zu präsentieren (Smith 1985; McCafferty et al., 1990). Diese Technologie wurde u.a. dazu benutzt, kurze Peptidliganden zum *mapping* von Antikörperepitopen zu isolieren, Proteasespaltstellen zu identifizieren (O'Neil et al., 1995; Matthews et al., 1993), sowie Antikörperfragmente (*scFv*'s) zu gewinnen, die spezifisch für Tumor-assoziierte Antigene sind (Kupsch et al., 1999, Mao et al. 1999). Eine Limitierung bzgl. der Gewinnung therapeutisch wirksamer Moleküle erfährt diese Methode allerdings durch die Verwendung von *E.coli* als Wirt. Verursacht wird dies durch die unterschiedliche Kodon-Nutzung von *E.coli* und die fehlende posttranslationale Modifikationen im Unterschied zu Eukaryonten (McVean et al., 2000). Diese Unterschiede wirken sich negativ auf die 3D Struktur und das immunogene Verhalten der zu selektionierenden *scFv*'s aus und können zu deren Ausschluß von der Selektion führen. Andere Einschränkungen erfährt dieses System durch natürliche Vorgänge innerhalb des Lebenszyklus eines Phagens. So müssen heterologe Proteine, die auf der Phagenoberfläche präsentiert werden sollen, die Doppel-Lipid Schicht der inneren

Membran der Bakterien durchqueren (Marvin et al., 1998). Kann das zu selektionierende Protein aufgrund seiner Eigenschaften die Membran nicht passieren, wird es nicht in die Phagenhülle eingebaut. Dieser Umstand erklärt, warum noch nie Transmembran-Proteine durch Phagen *display* selektioniert werden konnten (Rhyner et al., 2002).

Diese Nachteile treten bei dem hier vorgestellten System der retroviralen *scFv-display* Bibliothek nicht auf. Anstelle von Phagen werden Moloney Maus Leukämie Viren (MoMLV) verwendet und eukaryote murine Zellen (3T3) ersetzen *E.coli*.

Das Prinzip beruht auf der Herstellung chimärer Moloney SU Env-Proteine, im vorgestellten Fall mit *scFv*'s. Verwendete *scFv*'s wurden im Rahmen eines konventionellen Phagen *displays* aus den Milzen immunisierter Mäuse gewonnen. Die Immunisierung erfolgte mit der apikalen Membran von *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) in der Arbeitsgruppe von P. Friedl in Darmstadt (<http://www.gwdg.de/~haugust/VB/Friedl.htm>).

Die Herstellung der Phagen Bibliothek erfolgte im Rahmen dieser Arbeit.

Die chimären retroviralen Env-Proteine wurden durch eine Fusion der *scFv*'s mittels eines *linker*-Peptids an die Position +1 der viralen SU's erzeugt (vergl. Abbildung 3.1). Der *linker* besteht aus den Aminosäuren der Faktor Xa-Spaltstelle (IEGR), der analytischen *NheI*- (ASA) sowie der zur Klonierung verwendeten *NotI*-Restriktionsschnittstelle (AAA). Durch den *linker* werden sterische Hindernisse beider Proteine minimiert, was sowohl eine korrekte Antigen-Erkennung der präsentierten *scFv*'s begünstigt, als auch die Infektion unter Verwendung des natürlichen Rezeptors zulässt (Ager et al., 1996). Allerdings ist nicht gänzlich auszuschließen, dass bei der Präsentation von Molekülen einer Bibliothek Antigen-erkennende *scFv*'s auftreten können, die eine Infektion behindern könnten. Diese Binder würden aufgrund dieser Eigenschaft aus dem Selektionsprozess ausgeschlossen. Dieser Möglichkeit wurde durch die Verwendung der Faktor Xa-Spaltstelle innerhalb der *linker*-Sequenz Rechnung getragen. Sie ermöglicht eine proteolytische Abspaltung der präsentierten *scFv*'s von SU durch Faktor Xa Inkubation und eine anschließend ungehinderte Infektion und Amplifikation der gebundenen Viren.

Um erste Erkenntnisse zu erzielen, wurden die bereits charakterisierten *scFv*'s L36 und 7A5 in der beschriebenen Art und Weise kloniert (vergl. Kapitel 3.1.1). L36 ist ein

gegen das extrazelluläre Matrix-Protein Laminin gerichteter Miniantikörper, der einen anti-Angiogenese Effekt *in vivo* aufweist (Sanz et al., 2002). Das *scFv* 7A5 weist eine Spezifität für T- Zellen auf, das Antigen ist derzeit noch nicht charakterisiert (Engelstadter et al., 2001).

Die erzeugten Konstrukte wurden p7A5 respektive pL36-Xa-Mo genannt und die resultierenden Viren 7A5/ L36-Xa-Mo auf ihre Eigenschaften hin untersucht.

Zuerst galt es die funktionelle Präsentation beider *scFv*'s auf der Virusoberfläche zu überprüfen. Dazu wurde eine *panning*-Prozedur entwickelt, die eine Selektion der Viren erlaubt, die durch Bindung ihres präsentierten *scFv*'s an ein gewünschtes Antigen (hier Laminin) immobilisiert werden (siehe Abbildung 3.2). Im vorliegenden Fall gelang der Nachweis, dass Laminin-bindende L36-Xa-Mo Viren während der *panning*-Prozedur immobilisiert werden und später die murine Zelllinie 3T3 infizieren können. Hingegen konnten nicht-bindende 7A5-Xa-Mo Viren nicht infizieren, weil sie aus dem Selektionsprozess durch mehrmaliges Waschen entfernt wurden. Diese Ergebnisse werden durch die Infektionsstudie in Abbildung 3.3 sehr eindeutig belegt. An dieser Stelle zeigte sich, dass eine funktionelle Selektion von bindenden *scFv*'s durch ihre Präsentation an MLV möglich ist.

#### **4.1.1 Simulation einer retroviralen Bibliothek mittels definierter *scFv*'s**

Eines der Hauptcharakteristika jeder molekularbiologischen Bibliothek ist das Vorhandensein einer relativ kleinen Anzahl von gewünschten Molekülen in einer ungleich größeren Menge an unerwünschten Molekülen. Praktisch anwendbar ist eine Bibliothek nur dann, wenn es durch den Selektionsprozess möglich ist, diese geringe Anzahl von gewünschten Molekülen auszulesen.

Es wurde eine Bibliothek simuliert, indem unterschiedliche Mengen an bindenden L36-Xa-Mo Viren in einem Überschuß an nicht-bindenden 7A5-Xa-Mo Viren „versteckt“ wurden (siehe Kapitel 3.1.2.3). Für die Herstellung der Mischungen wurde sich auf die RT-Aktivität beider Virus-Typen im Zellkulturüberstand der Zelllinie HT1080 bezogen, da hierdurch auf die virale Aktivität normiert werden kann. Gleichzeitig kann durch die RT-Aktivität auf die Partikelanzahl geschlossen werden

(Pyra et al., 1994). In dieser Publikation wurde die Korrelation zwischen RT-Aktivität und vorhandener Partikel von MLV bestimmt. Sie liegt bei 3-11 Partikeln pro  $1 \times 10^9$  U RT-Aktivität. Gemischt wurden 5mU 7A5-Xa-Mo mit 5mU L36-Xa-Mo, was einem Einsetzen von  $2,5 \times 10^7$  Partikeln pro Viruspopulation entspricht. In weiteren Verdünnungen wurde der Gehalt an L36-Xa-Mo-Viren dekadisch logarithmisch verringert. Die niedrigste Verdünnungsstufe enthielt 50 nU L36-Xa-Mo in 5mU 7A5-Xa-Mo.

Nach einer Selektionsrunde konnten *scFv*-spezifische Signale von ursprünglich  $2,5 \times 10^6$  eingesetzten L36-Xa-Mo-Partikeln nachgewiesen werden (vergl. Abbildung 3.4, rechts, Spur  $10^{-1}$ ). Das Detektionslimit dieses Signals konnte durch eine weitere Selektionsrunde, durch die Expansion infizierter 3T3-Zellen und die Präparation genomischer DNA der 3T3-Zellen um weitere vier log-Stufen gesenkt werden (siehe Abbildung 3.5, rechts). Hier gelang der Nachweis bis zu einer Verwendung von 50 nU L36-Xa-Mo, was einer Partikelanzahl von ca. 250 L36 in  $2,5 \times 10^7$  7A5-Xa-Mo-Viren entspricht (Pyra et al., 1994). Das System ist demnach äußerst sensitiv.

L36 tragende Partikel wurden durch Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) identifiziert. Der Nachweis von L36-spezifischen Partikeln gelang durch die Restriktionsendonuklease-Spaltung durch *Clal* und *XhoI* der in Abbildung 3.5 rechts dargestellten PCR-Fragmente. Einwandfrei nachgewiesen werden konnte ein L36 spezifisches Signal in der Verdünnung  $1:10^{-3}$ , bei  $1:10^{-4}$  waren noch leichte L36 spezifische Signale zu erkennen (vergl. Abbildung 3.7, Abbildung 3.8). Dies bedeutet einen erfolgreichen Nachweis von ca. 2500 L36 tragenden Viren in einem *pool* von  $2,5 \times 10^7$  7A5 tragenden Viren nach nur einer *panning* Prozedur. Durch eine nachgeschaltete zweite *panning* Prozedur sollte dieses Detektionslimit weiter gesenkt werden können.

Bereits ohne Anreicherung kann ein Titer von MLV von bis zu  $1 \times 10^8$  viraler Partikel pro ml im Zellkulturüberstand infizierter Zellen erreicht werden (Verma et al., 1997). Durch eine Aufkonzentration der rekombinanten Viruspartikel via Ultrazentrifugationen könnten unter diesen Umständen sogar mindestens  $1 \times 10^9$  Partikel für eine Selektion eingesetzt werden. Diese Erkenntnis ließ den Schluß zu, dass die  $\alpha$ -HUVEC Bibliothek mit ihrer Diversität von  $2 \times 10^6$  unterschiedlichen *scFv*'s gut im retroviralen Kontext darstellbar und selektionierbar ist. Jedes individuelle *scFv* sollte rechnerisch ca.  $1 \times 10^3$

Mal im retroviralen Kontext vertreten und durch zwei *panning*-Prozeduren detektierbar sein.

#### **4.1.2 *Panning* der retroviralen $\alpha$ HUVEC Bibliothek gegen *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR)**

Das *panning* der retroviralen  $\alpha$ HUVEC Bibliothek wurde gegen *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR-1/ Flt-1) durchgeführt. VEGFR ist auf allen Endothelzellen vorhanden (Tomanek et al., 2002). Es kann also davon ausgegangen werden, dass *scFv*'s gegen VEGFR in der  $\alpha$ HUVEC Bibliothek vorhanden sind. Die nach ein- und zweifacher *panning*-Prozedur erzielten Ergebnisse zeigen das Vorhandensein von *scFv*-tragenden Partikeln (1 kb große Bande), sowie EGF-tragenden MLV-Partikeln (300 bp große Bande). Erklärbar ist dieser Befund durch die Vorgehensweise bei der Klonierung der  $\alpha$ HUVEC Bibliothek (vergl. Kapitel 2.1.3). Als Ausgangsplamid diente pEMo, das für EGF-präsentierendes MoMLV kodiert. Klonierungstechnisch lassen sich geringe Mengen an ungeschnittenem Ausgangsplamid in der Bibliothek nicht ausschließen. Nach Transfektion entstehen also geringe Mengen EGF präsentierender Viren, die mit in die Selektion eingesetzt wurden. Ein Zustand der unproblematisch ist, solange es zu keiner Bindung von EGF an das eingesetzte Antigen kommt. Deutlich zeigen das die Ergebnisse des *pannings* gegen Laminin, wo keine EGF-präsentierenden MLV-Varianten selektioniert wurden (vergl. Kapitel 3.1.2.3). Dieser Befund ist demnach nur durch eine Bindung von EGF an VEGFR zu deuten. Gestützt wird diese Vermutung durch die sichtbare Erhöhung der Signalintensität der EGF-Bande in den Spuren 1-3 (siehe Abbildung 3.12). Hierbei handelt es sich um eine Anreicherung EGF-präsentierender Partikel, ein Vorgang der nur durch eine Bindung dieser Partikel erklärt werden kann. In der Literatur ist zwar bekannt, dass sich die Signalkaskaden von EGF und VEGF gegenseitig beeinflussen können (Ravindranath et al., 2001), eine Bindung von EGF an VEGFR-1/ Flt-1 ist allerdings bislang nicht beschrieben worden.

Hinsichtlich der *scFv*-präsentierenden Varianten ließen sich ähnliche Beobachtungen machen. Auch hier nahm die Intensität der 1-kb großen Signale im Laufe der Expansion, bzw durch die nachgeschaltete 2. *panning* Prozedur zu. Vermutlich erfolgte

auch hier eine Anreicherung von *scFv*-präsentierenden Varianten durch ihre Bindung an VEGFR.

Die in Abbildung 3.13 dargestellten Sequenzen der VEGFR-bindenden *scFv*'s zeigen ein einheitliches Bild. Jeder sequenzierte Klon beinhaltet ein funktionelles *scFv* mit durchgängigem Leserahmen, welches den publizierten Aufbau widerspiegelt (Antibodies - Structure and Sequence, 2000). Deutlich unterschiedlich sind die Bereiche der *human complementarity-determining region* (CDR), die die Antigenbindung vermitteln (Wu & Kabat, 1970). Aufgrund der Unterschiede innerhalb der CDR's kann geschlossen werden, dass jedes *scFv* an ein anderes Epitop von VEGFR bindet. Ob es sich bei den selektierten Varianten tatsächlich um VEGFR-bindende MLV Partikel handelt, kann an dieser Stelle nicht belegt werden. Hierzu müssten die einzelnen bindenden Varianten rekonstruiert und ihre Bindungsaffinität an VEGFR z.B. mittels ELISA geprüft werden. Eine Anreicherung von funktionellen *scFv*'s ist allerdings ein guter Hinweis auf die Spezifität des Systems.

## **4.2 Produktion therapeutischer Proteine durch Replikationskompetente Vektoren**

Als eine logische Konsequenz hinsichtlich gentherapeutischer Ansätze müssen *scFv*'s, die durch ein strikt eukaryontes System selektiert wurden, ebenfalls durch ein eukaryontes System produziert werden. Aus diesem Grunde wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues und effizientes Verfahren hierzu entwickelt.

Auch hier stellte MLV die Basis des Systems dar. Im Hinblick auf mögliche humane Anwendungen wurde das human-infektiöse amphotrope MLV verwendet. Grundlegend für dieses System sind wiederum N-terminale Modifikationen des viralen Env-Proteins (vergl. Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15). Anstelle der zuvor beschriebenen Faktor Xa-Spaltstelle wurde nun eine Furin-Spaltstelle verwendet. Das Spaltnotiv dieser Protease wurde im Rahmen einer anderen Arbeit auf Basis von MLV entdeckt. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Proteasen und ihrer Spaltstellen der humanen Fibroblasten-Zelllinie HT1080, die einen selektiven retroviralen Gentransfer ermöglichen sollten (Buchholz et al., 1998).

Furin gehört zu der Familie der Subtilisin-ähnlichen Proprotein Konvertasen (SPCs), ist demnach endoproteolytisch im Golgi-Netzwerk aktiv und maßgeblich an sekretorischen Prozessen beteiligt (Steiner, 1998). Gemäß des in Abbildung 1.8 schematisch dargestellten Verlaufs des viralen Prozessierens, treffen die viralen Hüllproteine und die Furin-Protease im Golgi-Apparat aufeinander. Dort kommt es zur Abspaltung der *scFv*'s von SU und zur Freisetzung löslicher *scFv*'s. Detektiert wurden die abgespaltenen *scFv*'s mittels eines His-tags, welches C-terminal von der Furin-Spaltstelle integriert wurde. Zur Etablierung des Systems wurden wiederum die bereits verwendeten *scFv*'s L36 und 7A5 benutzt. Die Klonierung erfolgte gemäß der in Abbildung 3.15 dargestellten Strategie mittels PCR-Mutagenese.

Nach erfolgreicher Klonierung und Sequenzierung der Plasmide pL36 bzw. p7A5-furin-A wurde deren Expression durch eine Westernblot-Analyse kontrolliert. Mehrere Erkenntnisse lassen sich aus diesen Ergebnissen ziehen:

- 1) Die erstellten Konstrukte werden erfolgreich von 293T exprimiert.
- 2) L36 bzw. 7A5-furin-A-Viren können HT1080 infizieren und in ihnen replizieren.
- 3) Es erfolgt eine proteolytische Abspaltung der *scFv*'s vom viralen SU durch Furin, an der verwendeten Spaltstelle.
- 4) Die Spaltung ist überaus effizient (>90%), verdeutlicht durch die weit höheren Signalstärken der *scFv*'s verglichen mit dem ungespaltenen SU-*scFv*-Fusionsprotein.

Erstmals konnte hier gezeigt werden, dass rekombinantes MLV unter Verwendung einer endogenen Protease zur Produktion und Sezernierung von *scFv*'s verwendet werden kann.

Für die *in vitro* Verwendungen von eukaryontisch produzierten *scFv*'s, z.B. als therapeutisch wirksames Protein, müssen Verfahren der Virusinaktivierung zur Verfügung stehen. Hierbei geht es in erster Line um die Abtrennung von Viruspartikeln und den produzierten *scFv*'s. Eine Abtrennung unter Verwendung des His-tags und Nickel-Agarose scheint ungenügend (vergl. Abbildung 3.18), da das His-tag auch bei ungespaltenen SU-*scFv*-Fusionsproteinen zugänglich ist. Das zeigen die Signale in der Westernblot-Analyse (vergl. Abbildung 3.16). Deswegen kann das angewendete Verfahren zur Aufreinigung His-getagter Proteine nach Optimierung zwar zur

Konzentration der produzierten Proteine, nicht aber zur „Dekontamination“ angewendet werden.

Als effektivste Methode hat sich neben der UV-Bestrahlung die schlichte Filtrierung der Zellkulturüberstände durch Filter mit molekularer Ausschlußgrenze erwiesen. Beide Methoden, sowohl die Filtrierung als auch die UV-Inaktivierung, führten zu virusfreien Zellkulturüberständen, in denen keine Infektion von 3T3-Zellen durch IPA mehr nachzuweisen war.

Eines der wichtigsten Kriterien eines eukaryonten Expressionssystems ist die Expressionsrate bzw. die erzielbare Menge an rekombinantem Protein. Deshalb wurde eine Quantifizierung des sezernierten *scFv*'s L36 vorgenommen. Sie erfolgte durch eine Westernblot-Analyse von serumfreiem Zellkulturüberstand L36-furin-A infizierten HT1080-Zellen. Als Referenz dienten bekannte Mengen eines Proteins gleicher Größe, welches ebenfalls den verwendeten *His-tag* besitzt. Die Ergebnisse zeigen 6 µg gespaltenes L36 pro Milliliter Zellkulturüberstand. Bereits etablierte Systeme zur rekombinanten Proteinexpression in Eukaryonten, z.B. auf der Basis von Baculovirus, erzielen zumeist Herstellungsmengen zwischen 1 und maximal 30 µg/ml (Biological Process Technology Institute). Das hier vorgestellte System kann also hinsichtlich dieser Parameter mit bereits etablierten Methoden konkurrieren.

Allerdings kann es nicht mit gleichbleibender Effizienz in unterschiedlichen Zelllinien eingesetzt werden. Das zeigen Untersuchungen, die hinsichtlich des Tropismus der L36 bzw. 7A5-furin-A Viren durchgeführt wurden. Hierzu wurden verschiedene humane Zelllinien mit gleichen infektiösen Einheiten (I.U.) von L36/ 7A5-furin-A Viren infiziert. Infizierte Zellen wurden durch IPA detektiert und die Überstände der infizierten Zelllinien durch Westernblot-Analysen auf das Vorhandensein der zu produzierenden *scFv*'s untersucht.

Die in Abbildung 3.19 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Präsentation von 7A5 und L36 den bekannten Tropismus des amphotropen MLV nicht verändern. Der natürliche Rezeptor Ram 1 wird also weiterhin von den rekombinanten Env-Varianten verwendet. Offensichtlich wurde bei der Infektionsstudie, dass alle verwendeten Zelllinien durch 7A5-furin-A Viren schlechter infiziert wurden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass 7A5 die Infektiosität der Partikel beeinflusst. Ähnliche Beobachtungen konnten hinsichtlich der Konzentration der sezernierten *scFv*'s gemacht

werden. Die korrespondierenden Westernblot-Daten zeigen zum Großteil eine niedrigere Konzentration von 7A5 im Zellkulturüberstand der verwendeten Zelllinien. Die verminderte Infektiösität von 7A5-furin-A Viren könnte verantwortlich sein für die durchweg geringe Menge an sezerniertem 7A5. Die Differenz in den Signalstärken der Westernblots ist allerdings zu unterschiedlich, um sie alleine durch die geringere Infektiösität von 7A5-furin-A Viren erklären zu können. Denn auch die 7A5-furin-A infizierte HT1080 Population weist einen geringeren Infektionsgrad als die L36-furin-A infizierten HT1080 auf, während die Konzentration der produzierten *scFv*'s identisch ist. Zusammen mit der Detektion allgemein schwächerer Signale im Überstand von z.B. MDA-MT 231 und allgemein starker Signale im Überstand von HT1080 lassen diese Beobachtungen auf eine unterschiedliche Furin-Aktivität der Zellen schließen. Hierdurch kann allerdings nicht die Varianz der Signalstärken innerhalb einer Zelllinie erklärt werden. Ein Einfluß des *scFv*'s 7A5 auf den Vorgang der Infektion und vielleicht sogar auf die Zugänglichkeit der Furin-Proteasespaltstelle kann nach den vorliegenden Ergebnissen also nicht ausgeschlossen werden.

Die HMEC-Kultur weist als einzige Zelllinie eine höhere Konzentration von 7A5 als von L36 im Überstand auf. Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass Endothelzellen große Mengen an Laminin bilden (Sorokin et al., 1994; Ekblom et al., 1998; Miosge, 2001). Es ist also denkbar, dass sekretiertes L36 durch sein exprimiertes Antigen Laminin gebunden wird und nur noch vermindert im Zellkulturüberstand detektiert werden kann. Diese Erklärung wird vor allem durch Experimente gestützt, in denen die biologische Aktivität beider *scFv*'s untersucht wurde. Im Falle von L36 wurde sie durch einen ELISA nachgewiesen. Hier konnte gezeigt werden, dass das eukaryontisch hergestellte Pendant sein Antigen Laminin erkennt (vergl. Abbildung 3.21). Die nachgewiesene biologische Aktivität von L36 und die bekannte Expression von Laminin durch Endothelzellen (HMEC) könnten gemeinsam die niedrige Konzentration von löslichem L36 im Zellkulturüberstand von HMEC-Zellen erklären.

Die biologische Aktivität des hergestellten 7A5 konnte durch FACS-Analyse erfolgreich gezeigt werden. Wie in Abbildung 3.20 dargestellt, erkennt das sezernierte 7A5 sein T-Zell-spezifisches Antigen. Die Ergebnisse zusammengenommen zeigen, dass die Produktion von funktionellen *scFv*'s durch das hier etablierte System möglich ist. Die

höchsten Konzentrationen beider *scFv*'s werden in der zur Etablierung verwendeten Zelllinie HT1080 erzielt.

Hinsichtlich gentherapeutischer Anwendungen, ob *in vivo* oder *in vitro*, sind Aspekte der Stabilität der verwendeten Konstrukte von großer Bedeutung. Gerade bei der Verwendung von replikationskompetenten MLV ist die Wahrscheinlichkeit von Rückmutationen sehr hoch (Coffin, 1992). Je nach Größe der exogenen Sequenz und nach Ort ihrer Integration in das virale Genom sind schon nach einem bis drei Infektionszyklen partielle oder vollständige Deletionen des zusätzlichen Leserahmens zu beobachten (Lobel et al., 1985; Reik et al., 1985; Stuhlmann et al., 1989). Eine umfangreiche Untersuchung der genomischen Stabilität von rekombinanten MLV wurde durch Logg CR et al. (2001) vorgestellt. In dieser Studie wurden exogene Sequenzen unterschiedlicher Länge (bestehend aus IRES und Reporter gen) am 3'-Ende der *env*-Sequenz inseriert. Die Untersuchungen ergaben Deletionen des 1,15 kb großen *inserts* nach bereits sieben Infektionszyklen. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten L36 bzw. 7A5-furin-A Viren weisen eine weit höhere Stabilität der integrierten Sequenz auf. Durchgeführt wurden Passagierungen auf HT1080-Zellen von 293T-Zellen erzeugten L36/ 7A5-furin-A Viren mit insgesamt 12 Infektionszyklen. Das Vorhandensein der jeweiligen *scFv*-Sequenz mit entsprechender Größe konnte auf Ebene der viralen RNA für den gesamten Zeitraum der Untersuchung nachgewiesen werden (vergl. Abbildung 3.22). Da die Größe der exogenen Sequenz von ca. 1 kb in etwa der von Logg CR et al. (2001) untersuchten Sequenz entspricht, wird die hier erzielte hohe Stabilität der Konstrukte höchstwahrscheinlich durch den anderen Ort ihrer Integration erreicht. Demnach führt die Insertion am 5'-Ende von *env*, in der hier beschriebenen Art und Weise, zu einer fast doppelt so hohen Stabilität wie die Integration am 3'-Ende.

Die hier hergestellten Konstrukte zur Expression und Sezernierung von *scFv*'s sind somit die stabilsten, die bislang beschrieben wurden.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass dieses System auch dazu verwendet werden kann, andere therapeutisch wirksame Proteine zu produzieren. Das konnte für das Zytokin *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), produziert durch die murine Zelllinie *Lewis lung carcinoma* (LLC), gezeigt werden (vergl. Kapitel 3.2.8). GM-CSF ist ein Reifungs- und Wachstumsfaktor für myeloide Vorläuferzellen und wird wegen seiner zentralen Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems in gentherapeutischen Ansätzen verwendet (Hubel et al., 2002). Die Expression des Zytokins ist auf epitheliale Zellen beschränkt (Robertson et al., 2001).

Das GM-CSF Gen aus der Maus wurde in der beschriebenen Art und Weise kloniert (vergl. Abbildung 3.15). Aus Gründen der biologischen Sicherheit und hinsichtlich weiterer Erkenntnisse durch Versuche am Tiermodell der Maus, wurde das ecotrope MoMLV modifiziert. Die durch Transfektion von 293T-Zellen hergestellten GMCSF-Furin-E Viren wurden zur Infektion muriner LLC-Zellen verwendet. Durch ELISA erhobene Daten zeigten eine gleichbleibende Konzentration von ca. 650 pg/ml GM-CSF im Zellkulturüberstand der infizierten LLC-Zellen (siehe Kapitel 3.2.8). Die gleichbleibend niedrige Konzentration des Zytokins könnte durch die kurze Halbwertszeit von Zytokinen erklärt werden.

## 5 Zusammenfassung

Der derzeitige Stand der Gentherapie bedarf der Entwicklung neuer Systeme zur Selektion bislang unbekannter Proteine und zur Verbesserung der Gentransfereffizienz viraler Vektorsysteme. Bisher verwendete Systeme wie Phagen *display* bergen erhebliche Nachteile, die alle auf die Verwendung von Prokaryonten zurückzuführen sind. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit ein System entwickelt, welches eine Selektion und Produktion von Proteinen im stets eukaryonten Kontext ermöglicht. Dazu wurde ein replikationskompetenter retroviraler Vektor entwickelt durch den eine erhebliche Steigerung der Gentransfereffizienz möglich ist. Beide Teilaspekte meiner Arbeit beruhen auf Modifikationen unterschiedlicher Stämme des Maus Leukämie Virus (MLV).

Zur Selektion von Proteinen im eukaryonten Kontext wurde erstmalig eine retrovirale *display* Bibliothek etabliert, wobei ecotropes MLV variable Antikörper-Fragmente (*scFv*'s) auf der Oberfläche präsentiert. Eine Modellselektion mit dem Antigen Laminin, simuliert durch das Mischen von zwei erstellten Virusvarianten (7A5-Xa-Mo/L36-Xa-Mo) in unterschiedlichen Konzentrationen, konnte die Selektion der Lamininbindenden Variante L36-Xa-Mo aus einem Überschuß von  $10^4$  nicht bindender 7A5-Xa-Mo zeigen. Die Anreicherung der bindenden L36-Xa-Mo Variante konnte ebenfalls aus dem Kontext einer erstellten retroviralen  $\alpha$ HUVEC Bibliothek erzielt werden. Die Anwendbarkeit des Systems wurde durch diese Modellselektionen sowie durch die Selektion der  $\alpha$ HUVEC Bibliothek auf VEGFR-1 als Antigen demonstriert.

Derart selektierte Proteine konnten im nächsten Schritt, unter Verwendung einer Furinspaltstelle im Hüllprotein des amphotropen MLV, in verschiedenen Zelllinien produziert werden. Gezeigt werden konnte eine effiziente Produktion und Sezernierung der verwendeten *scFv*'s bis zu einer Konzentration von  $6\mu\text{g/ml}$  im Zellkulturüberstand, wobei der Tropismus des amphotropen MLVs nicht beeinflusst wurde. Die biologische Aktivität derart hergestellter Proteine, konnte mittels FACS und ELISA nachgewiesen werden. Eine Abtrennung von den viralen Bestandteilen kann durch Filtration mit molekularer Ausschlußgrenze erzielt werden. Besonders hervorzuheben ist die genomische Stabilität derart modifizierter Viren. Trotz des zusätzlichen Leserahmens

war das auf die beschriebene Weise modifizierte MLV über 12 Infektionszyklen genetisch stabil und gewährleistete so erstmalig eine stetige Produktion der gewünschten Proteine. Die erfolgreiche Anwendung dieses Vektorsystems zur Tumorthherapie erwies sich bereits in weiterführenden Arbeiten.

## 6 Literaturverzeichnis

AALTO-SETÄLÄ K & VUORIO E (1997)

Gene therapy of single-gene disorders: preface to the special section.

Ann Med 29:549–551.

AGER S, NILSON BH, MORLING FJ, PENG KW, COSSET FL, RUSSELL SJ (1996)

Retroviral *display* of antibody fragments; interdomain spacing strongly influences vector infectivity.

Hum. Gene Therapy 7:2157-2164

ANTIBODIES - STRUCTURE AND SEQUENCE (2000)

<http://www.rubic.rdg.ac.uk/~andrew/bioinf.org/abs/>

APPARAILLY F, VERWAERDE C, JACQUET C, AURIAULT C, SANY J & JORGENSEN C (1998)

Adenovirus mediated transfer of viral IL-10 gene inhibits murine collagen-induced arthritis.

J Immunol 160:5213–5220.

BATTINI JL, HEARD JM, DANOS O (1992)

Receptor choice determinants in the envelope glycoproteins of amphotropic, xenotropic, and polytropic murine leukemia viruses.

J Virol. Mar;66(3):1468-75.

BENEDICT CA, TUN RYM, RUBINSTEIN DB, GUILLAUME T, CANNON PM, ANDERSON WF (1999)

Targeting retroviral vectors to CD34-expressing cells: binding to CD34 does not catalyse virus-cell fusion. Hum.

Gene Therapy 10:545-557

BIOLOGICAL PROCESS TECHNOLOGY INSTITUTE

<http://www.cbs.umn.edu/bpti/RPEL.html>

BLAESE ET AL.(1995)

T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years.  
Science 270:475-480

BLAESE RM & ANDERSON WF (1990)

The ADA human gene therapy clinical protocol.  
Hum Gene Ther 1:327–362.

BRUETT L, CLEMENTS JE (2001)

Functional murine leukemia virus vectors pseudotyped with the visna virus envelope  
show expanded visna virus cell tropism.  
J Virol. 75:11464-73.

BUCHHOLZ CJ, PENG KW, MORLING FJ, ZHANG J, COSSET FL, RUSSELL SJ  
(1998)

In vivo selection of protease cleavage sites from retrovirus *display* libraries.  
Nat Biotechnol. 16:951-4.

BURGESS AW (1990)

In: Peptide Growth Factors and Their Receptors I  
(Sporn, M. B. & Roberts, A. B., Hrsg.)  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 723-745.

CHANG AG & WU GY (1994)

Gene therapy: applications to the treatment of gastrointestinal and liver diseases.  
Gastroenterology 106:1076–1084.

CICHUTEK K (2000)

DNA vaccines: development, standardization and regulation.

Intervirology.;43(4-6):331-8. Review.

COFFIN JM (1992)

Genetic diversity and evolution of retroviruses.

Curr Top Microbiol Immunol.176:143-64.

COSSET FL, MORLING F, TAKEUCHI Y, WEISS RA, COLLINS MK, RUSELL S  
(1995b)

Retroviral Retargeting by Envelopes Expressing an N-terminal Binding Domain. J.

Virology. 69 (10): 6314-632

CRYSTAL RG (1995a)

The gene as the drug.

Nat Med 1:15–17.

CRYSTAL RG (1995b)

Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success.

Science 270:404–410.

CURIEL DT, PILEWSKI JM & ALBELDA SM (1996)

Gene therapy approaches for inherited and acquired lung diseases.

Am J Respir Cell Mol Biol 14:1&dash;18.

CZAUDEANA F, FISCHER N, BOLLER K, KURTH R, TONJES RR (2000)

Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells.

J Virol. 74(9):4028-38.

DUBENSKY TW, CAMPBELL BA & VILLARREAL LP (1984)

Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver and spleen of mice. Proc Natl Acad Sci USA 81:7529–7533.

DUEBEL S, KONTERMANN R (2001)

Antibody Engineering Lab Manual

Springer-Verlag, Heidelberg

<http://www.rubic.rdg.ac.uk/~andrew/bioinf.org/abs/index2.html>

EKBLOM M, FALK M, SALMIVIRTA K, DURBEEJ M, EKBLOM P (1998)

Laminin isoforms and epithelial development.

Ann N Y Acad Sci. 857:194-211.

ENGELSTADTER M, BOBKOVA M, BAIER M, STITZ J, HOLTKAMP N, CHU TH, KURTH R, DORNBURG R, BUCHHOLZ CJ, CICHUTEK K (2000)

Targeting human T cells by retroviral vectors *displaying* antibody domains selected from a phage *display* library.

Hum Gene Ther. 11:293-303.

ENGELSTADTER M, BUCHHOLZ CJ, BOBKOVA M, STEIDL S, MERGET-MILLITZER H, WILLEMSSEN RA, STITZ J, CICHUTEK K (2001)

Targeted gene transfer to lymphocytes using murine leukaemia virus vectors pseudotyped with spleen necrosis virus envelope proteins.

Gene Ther. 8:1202-6.

FELGNER PL, GADEK TR, HOLM M, ROMAN R, CHAN HW, WENZ M, NORTHROP JP, RINGOLD GM & DANIELSEN M (1987)

Lipofection: A highly efficient, lipid mediated DNA&dash;transfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA 84:7413–7417.

FIELDING AK, MAURICE M, MORLING FJ, COSSET FL, RUSSELL SJ (1998)  
Inverse targeting of retroviral vectors: selective gene transfer in a mixed population of hematopoietic and nonhematopoietic cells.

Blood 91: 1802-1809

FISCHER A (2000)

Gene therapy of severe combined immunodeficiency.

J Gene Med. 2:297-300.

FISHER KJ, JOOSS K, ALSTON J, YANG Y, HAECKER SE, HIGH K, PATHAK R, RAPER SE & WILSON JM (1997)

Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy.

Nat Med 3:306–312.

FLOTTE TR & CARTER BJ (1995)

Adeno-associated virus vectors for gene therapy.

Gene Ther 2:357–362.

GARTEN W, HALLENBERGER S, ORTMANN D, SCHAFER W, VEY M, ANGLIKER H, SHAW E, KLENK HD (1994)

Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones.

Biochimie 76:217-25. Review.

GELDERBLOM HR (1991)

Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function.

AIDS. 5:617-37.

GRAHAM FL & VAN DER EB AJ (1973)

A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.

Virology 52:456–467.

GRAHAM FL, VAN DER EB AJ (1973)

Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5.

Virology 54:536-9

GUNZBURG WH, FLEUCHAUS A, SALLER R, SALMONS B (1996)

Retroviral vector targeting for gene therapy.

Cytokines Mol Ther. 2:177-84.

HAN X, KASAHARA N, KAN, YW (1995)

Ligand-directed retroviral targeting of human breast cancer cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751

HANAHAN D (1983)

Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.

J Mol Biol. Jun 5;166(4):557-80.

HARTL I, SCHNEIDER RM, SUN Y, MEDVEDOVSKA J, CHADWICK MP,  
RUSSELL SJ, CICHUTEK K, BUCHHOLZ CJ (2005)

Library-based selection of retroviruses selectively spreading through matrix metalloprotease-positive cells.

Gene Ther. Jun;12(11):918-26.

HOGAN SP, FOSTER PS, TAN X & RAMSAY AJ (1998)

Mucosal IL-12 gene delivery inhibits allergic airways disease and restores local antiviral immunity.

Eur J Immunol 28:413-423.

HONG Y, YU SS, KIM JM, LEE K, NA YS, WHITLEY CB, SUGIMOTO Y, KIM S  
(2003)

Construction of a high efficiency retroviral vector for gene therapy of Hunter's syndrome.

J Gene Med. 5:18-29.

<http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PetrenkoSmithChemReviews.PDF>

[http://www.pei.de/downloads/retroviral\\_vectors.pdf](http://www.pei.de/downloads/retroviral_vectors.pdf)

HUBEL K, DALE DC, LILES WC (2002)

Therapeutic use of cytokines to modulate phagocyte function for the treatment of infectious diseases: current status of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma.

J Infect Dis. 185:1490-501.

HUMAN GENE MARKER/THERAPY CLINICAL PROTOCOLS (1999)

Hum Gene Ther 10:3067–3123.

HUMAN GENOME PROJECT INFORMATION

[http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/faq/genenumber.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/genenumber.shtml)

IMAI E & ISAKA Y (1998)

Strategies of gene transfer for the kidney.

Kidney Int 53:264–272.

JOHN COLLINS, PETER RÖTTGEN (1997)

Evolutives Phage-*Display*, eine Methode als Grundlage eines neuen Unternehmens

©GBF Braunschweig, Design by BIOBASE GmbH

[http://bib.gbf.de/ergebnisbericht/1997/deutsch/sektion\\_b/b-collins.html](http://bib.gbf.de/ergebnisbericht/1997/deutsch/sektion_b/b-collins.html)

JORGENSEN C, DEMOLY P, NOEL D, MATHIEU M, PIECHACZYK M, GOUGAT C, BOUSQUET J & SANY J (1997)

Gene transfer to human rheumatoid synovial tissue engrafted in SCID mice.

J Rheumatol 24:2076–2079.

KAISER J (2003)

Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial.

Science 299(5606):495.

KARAVANAS G, MARIN M, BACHRACH E, PAPAVALASSILIOU AG, PIECHACZYK M (2002)

The insertion of an anti-MHC I ScFv into the N-terminus of an ecotropic MLV glycoprotein does not alter its fusogenic potential on murine cells.

Virus Res. 83:57-69.

KASAHARA N, DOZY AM, KAN YW (1994)

Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions.

Science 266:1373-6

KAVANAUGH, M. P., MILLER, D. G., ZHANG, W., LAW, W., KOZAK, S. L., KABAT, D., MILLER, A. D. (1994)

Cell-surface receptor for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters.

Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7071-7075

KENNEDY PGE (1997)

Potential use of herpes simplex virus (HSV) vectors for gene therapy of neurological disorders.

Brain 120: 1245–1259.

KIM JW, CLOSS EI, ALBRITTON LM, CUNNINGHAM JM (1991)

Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor.

Nature 352:725-728

KOEBERL DD, ALEXANDER IE, HALBERT CL, RUSSELL DW & MILLER AD (1997)

Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors.

Proc Natl Acad Sci USA 94:1426–1431.

KORNBERG A (1988)

DNA replication.

J Biol Chem. 263:1-4.

KRANENDONK M, LAIRES A, RUEFF J, ESTABROOK WR, VERMEULEN NP (2000)

Heterologous expression of xenobiotic mammalian-metabolizing enzymes in mutagenicity tester bacteria: an update and practical considerations.

Crit Rev Toxicol. 30:287-306.

KUPSCH JM, TIDMAN NH, KANG NV, TRUMAN H, HAMILTON S, PATEL N, NEWTON BISHOP JA, LEIGH IM, CROWE JS (1999)

Isolation of human tumor-specific antibodies by selection of an antibody phage library on melanoma cells.

Clin. Cancer Res. 5(4):925-931

- LAITINEN M, MÄKINEN K, MANNINEN H, MATSI P, KOSSILA M, AGRAWAL RS, PAKKANEN T, LUOMA JS, VIITA H, HARTIKAINEN J, ALHAVA E, LAAKSO M & YLÄ-HERTTUALA S (1998)  
Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischemia.  
Hum Gene Ther 9:1481–1486.
- LEIB-MÖSCH C, BRACK-WERNER R, SALMONS B ET AL. (1990)  
The significance of retroviruses in oncology  
Onkologie 13, 405-414
- LEVATTE MA, CASSAM AK, DEKABAN GA & WEAVER LC (1998)  
Analysis of a multi-mutant herpes simplex virus type I for gene transfer into sympathetic preganglionic neurons and a comparison to adenovirus vectors.  
Neuroscience 86:1321–1336.
- LOBEL LI, PATEL M, KING W, NGUYEN-HUU MC, GOFF SP (1985)  
Construction and recovery of viable retroviral genomes carrying a bacterial suppressor transfer RNA gene.  
Science. 228:329-32.
- LOGG CR, LOGG A, TAI CK, CANNON PM, KASAHARA N (2001)  
Genomic stability of murine leukemia viruses containing insertions at the Env-3' untranslated region boundary.  
J Virol. 75:6989-98.
- MANIATIS, T., SAMBROOK, J. AND FRITSCH, E.F. (1982)  
Molecular Cloning - A Laboratory Manual.  
Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 76-85.

MAO S, GAO C, LO CH, WIRSCHING P, WONG CH, JANDA KD (1999)  
Phage-*display* library selection of high-affinity human single-chain antibodies to tumor-associated carbohydrate antigens sialyl Lewisx and Lewisx.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96:6953-6958

MARIN M, NOEL D, VALSESIA-WITTMAN S, BROCKLY F, ETIENNE-JULAN M, RUSSELL S, COSSET FL, PIECHACZYK M (1996)  
Targeted infection of human cells via major histocompatibility complex class I molecules by Moloney murine leukemia virus-derived viruses *displaying* single-chain antibody fragment-envelope fusion proteins.  
J Virol. 70:2957-62.

MARKOWITZ, D., GOFF, S. UND BANK, A (1988b)  
Construction of a safe and efficient retrovirus packaging cell line.  
Adv Exp Med Biol 241, 35-40.

MARTIN F, NEIL S, KUPSCH J, MAURICE M, COSSET F, COLLINS M (1999)  
Retrovirus targeting by tropism restriction to melanoma cells.  
J Virol. 73:6923-9.

MARVIN DA (1998)  
Filamentous phage structure, infection and assembly.  
Curr Opin Struct Biol. 8:150-8.

MATTHEWS DJ, WELLS JA (1993)  
Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage *display*.  
Science 260:1113-1117

MCCAFFERTY J, GRIFFITHS AD, WINTER G, CHISWELL DJ (1990)  
Phage antibodies: filamentous phage *displaying* antibody variable domains.  
Nature 348: 552-554

MCVEAN GA, HURST GD (2000)

Evolutionary lability of context-dependent codon bias in bacteria.

J Mol Evol. 50:264-75.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2001

<http://memorias.ioc.fiocruz.br/92sup2/3464sas.html>

METCALF D (1990)

The colony stimulating factors. Discovery, development, and clinical applications.

Cancer. 65:2185-95.

MILLER AD (1996)

Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer.

Proc Natl Acad Sci U S A. 93:11407-13.

MILLER, D. G., EDWARDS, R. H., MILLER, A. D. (1994)

Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus.

Proc. Natl. Acad. Sci. **91**: 78-82

MILLS DR, PETERSON RL, SPIEGELMAN S (1967)

An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule.

Proc Natl Acad Sci U S A 58:217-24

MIOSGE N (2001)

The ultrastructural composition of basement membranes in vivo.

Histol Histopathol. 16:1239-48.

MIYOSHI H, TAKAHASHI M, GAGE FH & VERMA IM (1997)

Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector.

Proc Natl Acad Sci USA 94: 10319–10323.

MORGAN RA & ANDERSON WF (1993)

Human gene therapy.

Ann Rev Biochem 62:191–217.

MOULLIER P, FERRY N, HEARD JM (1997)

Principles and stakes of gene therapy

Rev Prat. Jan 15;47(2):174-81. French.

MULLIS, H. B. AND FALOONA, F. A. (1987)

Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction.

Meth. Enzymol. **155**: 335-360

MULLIS, K. B., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R. K., HORN, G. T.,  
EHRlich, H. A. (1986)

Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction.

Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. **51**: 263-273

NALDINI L (1998)

Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells.

Curr Opin Biotechnol 9:457–463.

NEUFELD G, COHEN T, GENGRINOVITCH S, POLTORAK Z (1999)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.

FASEB J. 13:9-22. Review.

OLDFIELD EH, RAM Z, CULVER KW, BLAESE RM, DEVROOM HL &  
ANDERSON WF (1993)

Gene therapy for the treatment of brain tumors using intratumor transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir.

Hum Gene Ther 4:39–69.

O'NEIL KT, HOESS RH (1995)

Phage *display*: protein engineering by directed evolution.

Curr. Opin. Struct. Biol. 5(4):443-449

ONO M (1989)

Detection and elimination of endogenous retroviruses and retrovirus-like particles in continuous cell lines.

Dev Biol Stand.;70:69-81.

OTAKE K, ENNIST DL, HARROD K & TRAPNELL BC (1998)

Nonspecific inflammation inhibits adenovirus- mediated pulmonary gene transfer and expression independent of specific acquired immune responses.

Hum Gene Ther 9:2207–2222.

PARMLEY SF, SMITH GP (1988)

Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes.

Gene. 73:305-18.

PHARMAZEUTISCHE NACHRICHTEN, 17.01.2003)

<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/online.htm>

PYRA H, BONI J, SCHUPBACH J (1994)

Ultrasensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement.

Proc Natl Acad Sci U S A 91:1544-8

RAPER SE, YUDKOFF M, CHIRMULE N, GAO GP, NUNES F, HASKAL ZJ, FURTH EE, PROPERT KJ, ROBINSON MB, MAGOSIN S, SIMOES H, SPEICHER L, HUGHES J, TAZELAAR J, WIVEL NA, WILSON JM, BATSHAW ML (2002)  
A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency.  
Hum Gene Ther. 13:163-75.

RAVINDRANATH N, WION D, BRACHET P, DJAKIEW D (2001)  
Epidermal growth factor modulates the expression of vascular endothelial growth factor in the human prostate.  
J Androl. 22:432-43.

REIK W, WEIHER H, JAENISCH R (1985)  
Replication-competent Moloney murine leukemia virus carrying a bacterial suppressor tRNA gene: selective cloning of proviral and flanking host sequences.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 82:1141-5.

#### RETROVIRAL VECTORS

Rhyner C, Kodzius R, Cramer R (2002)  
Direct selection of cDNAs from filamentous phage surface *display* libraries: potential and limitations.  
Curr Pharm Biotechnol. 3:13-21.

ROBBINS PD, TAHARA H, GHIVIZZANI SC (1998)  
Viral vectors for gene therapy.  
Trends Biotechnol. 16:35-40.

ROBERTSON SA, SJOBLOM C, JASPER MJ, NORMAN RJ, SEAMARK RF (2001)  
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos.  
Biol Reprod. 64:1206-15.

ROSENBERG SA, ANDERSON WF, BLAESE M, HWU P, YANNELLI JR, YANG JC, TOPALIAN SL, SCHWARTZENTRUBER DJ, WEBER JS, ETTINGHAUSEN SE, PARKINSON DN & WHITE DE (1993)

The development of gene therapy for the treatment of cancer.

Ann Surg 218:455–463.

RUSSELL SJ, HAWKINS RE, WINTER G (1993)

Retroviral vectors *displaying* functional antibody fragments.

Nucleic Acid Res. 21:1081-1985

SAIKI, R. K., SCHARF, S. J., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., EHRlich, H. A., AND ARNHEIM, N. (1985)

Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science **230**:1350-1354

SANZ L, KRISTENSEN P, BLANCO B, FACTEAU S, RUSSELL SJ, WINTER G, ALVAREZ-VALLINA L (2002)

Single-chain antibody-based gene therapy: inhibition of tumor growth by in situ production of phage-derived human antibody fragments blocking functionally active sites of cell-associated matrices.

Gene Ther. 9:1049-53.

SCHNEIDER RM, MEDVEDOVSKA Y, HARTL I, VOELKER B, CHADWICK MP, RUSSELL SJ, CICHUTEK K, BUCHHOLZ CJ (2003)

Directed evolution of retroviruses activatable by tumour-associated matrix metalloproteases.

Gene Ther. Aug;10(16):1370-80.

SCHNIERLE BS, STITZ J, BOSCH V, NOCKEN F, MERGET-MILLITZER H, ENGELSTADTER M, KURTH R, GRONER B, CICHUTEK K (1997)

Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 94:8640-5.

SCOTT JK, SMITH GP (1990)

Searching for peptide ligands with an epitope library. Science. 249:386-90.

SMITH GP (1985)

Filamentous fusion phage: novel expression vectors that *display* cloned antigens on the virion surface. Science. 228:1315-7.

SMOTHERS JF, HENIKOFF S, CARTER P (2002)

Tech.Sight. Phage *display*. Affinity selection from biological libraries. Science. Oct 18;298(5593):621-2.

SOBOL RE & SCANLON KJ (1995)

Cancer gene therapy clinical trials. Cancer Gene Ther 2:5-6.

SOROKIN L, GIRG W, GOPFERT T, HALLMANN R, DEUTZMANN R (1994)

Expression of novel 400-kDa laminin chains by mouse and bovine endothelial cells. Eur J Biochem. 223:603-10.

STEINER DF (1998)

The proprotein convertases. Curr Opin Chem Biol. 2:31-9.

STITZ J, BUCHHOLZ CJ, ENGELSTADTER M, UCKERT W, BLOEMER U,  
SCHMITT I, CICHUTEK K (2000)

Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape  
leukemia virus and murine leukemia virus 10A1  
Virology. Jul 20;273(1):16-20.

STUHLMANN H, JAENISCH R, MULLIGAN RC (1989)

Transfer of a mutant dihydrofolate reductase gene into pre- and postimplantation mouse  
embryos by a replication-competent retrovirus vector.  
J Virol. Nov;63(11):4857-65.

SWANSTROM R & WILLS JW (1997)

Synthesis, Assembly and Processing of Viral Proteins

In: Restroviruses.

Coffin, J.M., Hughes, S.H. & Varmus, H.e: (Hrsg.) 263-334  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York,

TOMANEK RJ, HOLIFIELD JS, REITER RS, SANDRA A, LIN JJ (2002)

Role of VEGF family members and receptors in coronary vessel formation.  
Dev Dyn. 225:233-40.

TURSZ T, LE CESNE A, BALDEYROU P, GAUTIER E, OPOLON P, SCHATZ C,  
PAVIRANI A, COURTNEY M, LAMY D, RAGOT T, SAULNIER P, ANDREMONT  
A, MONIER R, PERRICAUDET M & LE CHEVALIER T (1996)

Phase I study of a recombinant adenovirus-mediated gene transfer in lung cancer  
patients.

J Natl Cancer I 88:1857–1863.

VAN ZEIJL, M., JOHANN, S. V., CLOSS, E., CUNNINGHAM, J., EDDY, R.,  
SHOWS, T. B., O'HARA, B. (1994)

A human amphotropic retrovirus receptor is the second member of the gibbon ape  
leukemia virus receptor family.

Proc. Natl. Acad. Sci. **91**:1168-1172

VERHAERT RM, VAN DUIN J, QUAX WJ (1999)

Processing and functional *display* of the 86 kDa heterodimeric penicillin G acylase on  
the surface of phage fd.

Biochem J. 342:415-22.

VERMA IM, SOMIA N (1997)

Gene therapy -- promises, problems and prospects.

Nature. 389:239-42.

VOGT VM (1997)

Retroviral Virions and Genomes

In: Retroviruses

Coffin, J.M., Hughes, S.H. & Varmus, H.e: (Hrsg.) 27-69

Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York,

WANG H, KAVANAUGH MP, NORTH RA, KABAT D (1991)

Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter.

Nature 352:729-731

WASHINGTON POST

Monday, January 31, 2000; Page A1

"Gene Test Deaths Not Reported Promptly"

By Deborah Nelson and Rick Weiss

WATSON JD & CRICK FHC (1953)

Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid.

Nature 171:964–969.

WILSON JM (1996)

Adenoviruses as gene-delivery vehicles.

N Engl J Med 334:1185–1187.

WILSON JM, JEFFERSON DM, CHOWDHURY JR, NOVIKOFF PM, JOHNSTON DE & MULLIGAN RC (1988)

Retrovirus-mediated transduction of adult hepatocytes.

Proc Natl Acad Sci USA 85:3014–3018.

WIVEL NA & WALTERS L (1993)

Germ-line gene modification and disease prevention: some medical and ethical perspectives.

Science 262:533–538.

WOLFF JA & LEDERBERG J (1994)

An early history of gene transfer and therapy.

Hum Gene Ther 5:469–480.

WU TT, KABAT EA (1970)

An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity.

J Exp Med. Aug 1;132(2):211-50

YANG Y, NUNES FA, BERENCSI K, FURTH EE, GÖNCZÖL E & WILSON JM (1994)

Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy.

Proc Natl Acad Sci USA 91:4407–4411.

ZABNER J, ZEIHNER BG, FRIEDMAN E & WELSH MJ (1996)

Adenovirus-mediated gene transfer to ciliated airway epithelia requires prolonged incubation time.

J Virol 70:6994–7003.

ZHAO Y, ZHU L, LEE S, LING L, CHANG E, SOONG NW, DOUER D,  
ANDERSON WF (1999)

Identification of the block in targeted retroviral-mediated gene transfer.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4005-4010

ZSENGELLER ZK, WERT SE, HULL WM, HU X, YEI S, TRAPNELL BC &  
WHITSETT JA (1995)

Persistence of replication-deficient adenovirus-mediated gene transfer in lungs of immune-deficient (nu/nu) mice.

Hum Gene Ther 6:457–467.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

φ	Psi-Verpackungssignal
αHUVEC	“gegen” HUVEC, bezeichnet die Gesamtheit der gegen die Membran-assoziierten Proteine von HUVEC-Zellen gerichteten <i>scFv</i> 's
AA	Aminosäure ( <i>amino acid</i> )
Abb.	Abbildung
ADA	Adenosin-Desaminase
ada	Adenosin-Desaminase-Gen
aMLV	amphotropes MLV (Stamm 4070A)
aMLV	amphotropes murines Leukämie Virus
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i> (internationale Zellbank)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CDR	<i>complementarity determining regions</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälber Darm ( <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> )
CMV	Cytomegalie Virus
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxy Ribonukleosid Triphosphat
ECL	erhöhte Chemolumineszenz ( <i>enhanced chemoluminescence</i> )
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )

EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
eMLV	ecotropes MLV= <i>Moloney mouse leukemia virus</i>
eMLV	ecotropes murines Leukämie Virus
Env	Hüllproteine TM und SU, Genprodukte des env-Gens
env	retrovirales Strukturgen, welches für die Hüllproteine ( <i>envelope proteins</i> ) kodiert enzymatischer Aktivität kodiert
FG	Fachgruppe am Paul-Ehrlich-Institut
FKS	fetales Kälberserum
Gag	Genprodukte des gag-Gens
gag	retrovirales Strukturgen, welches für die gruppenspezifischen
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
gp	Glykoprotein (glycoprotein)
h	Stunde
http	<i>hyper text transfer protocol</i>
i.E.	infektiöse Einheit
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
lacZ	bakterielles Gen, welches für die $\beta$ -Galaktosidase kodiert
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LTR	<i>long terminal repeat</i>
mEGF	Epidermaler Wachstumsfaktor aus der Maus ( <i>murine epidermal growth factor</i> )
MoMLV	<i>Moloney mouse leukemia virus</i> = eMLV
MP	Milchpulver
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
OD	optische Dichte
pA	Polyadenylierungssignal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
pol	retrovirales Gen, welches für die viralen Proteine mit
Primer	Oligonukleotid
	Proteine ( <i>group-specific antigen</i> ) des Viruskapsids und des
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI	Kulturmedium aus dem <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ”
RSV	Rous Sarkom-Virus
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
s.	siehe
scFv	einzelkettiges Proteinfragment der variablen Regionen eines Antikörpers ( <i>single chain fragment of variability</i> )
SCID	schwere kombinierte Immunschwäche ( <i>severe combined immunodeficiency</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SNV	Milznekrose virus ( <i>spleen necrosis virus</i> )
SPC	Subtilisin-ähnlichen Proprotein Konvertasen
SU	Oberflächenhüllprotein ( <i>surface protein</i> )
SV40	simianes Virus 40
TM	Transmembranhüllprotein
upm	Umdrehung pro Minute
vergl.	vergleiche
V <sub>H</sub>	Variable Region der schweren ( <i>heavy</i> ) Kette eines Antikörpers Viruskerns kodiert
V <sub>L</sub>	Variable Region der leichten ( <i>light</i> ) Kette eines Antikörpers
VZ	Verpackungszell-Medium (siehe Kapitel 2.2.1)
wt	Wildtyp ( <i>wild type</i> )
www	<i>world wide web</i>

## 8 Anhang

Nachfolgende Dateien enthalten die gesamte Sequenz der verwendeten Plasmide und sind mit Sci Ed Central for Win 95, Clone Manager 5 zu öffnen.

### **p7A5-Xa-Mo**



P7a5xamo.cm5

### **pL36-Xa-Mo**



Pl36xamo.cm5

### **p7A5-furin-A**



p7A5furinA.cm5

### **pL36-furin-A**



pL36furinA.cm5

## 9 Danksagung

Herrn PD Dr. Christian Buchholz danke ich für die Bereitstellung dieser interessanten Thematik, für seine exzellente wissenschaftliche Anleitung und Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit, seinem besonderem Enthusiasmus und seinem Glauben an diese Arbeit, die in seinem Fachgebiet am Paul-Ehrlich-Institut entstand.

Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz vom Institut für Humangenetik der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main danke ich für die fachübergreifende Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Klaus Cichuteck danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Abteilung Medizinische Biotechnologie am Paul Ehrlich-Institut, besonders für seine analytisch harten und zugleich menschlich fairen Urteile.

Mein herzlichsten Dank an all meine „Mitstreiter“, Kollegen und Freunde! Ohne Euch wär's nicht nur trüb gewesen, es hätte auch nie dieses Ende gefunden! Danke für Unterstützung, für Trost, für Inspiration, für Diskussion, für Ablenkung, oder einfach nur dafür, diese Zeit mit Euch verbringen zu dürfen an:

Dr. Richard Schneider , Dr. Jeanette Neumann, Dr. Irene Hartl, Gundula Braun, Renate Wenig, Dr. Nelson Francisco Santiago Vispo, Dr. Daphne Nikles, Dr. Martin Engelstädter, Dr. Jörn Stitz, Dr. Renate König, Dr. Christoph Merten, Dr. Yuansheng Sun, Julia Medvedovska, Dr. Marcus Niebert, Dr. Uli Tschulena, Bernhard Völker, Matthias Hamdorf, Dr. Egbert Flory, Dr. M. Schweitzer, Renate Wenig und den Kolleginnen und Kollegen der benachbarten Arbeitsgruppen.

Innigsten Dank an meine Freundin Dany Wittmann, die es vollbracht hat mich lebenswert zu motivieren und mich in jeglicher Hinsicht bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, Monika Finger. Ohne sie und ihre immerwährende, verlässliche Unterstützung wären meine Person, mein Studium und meine Doktorarbeit nie gewesen.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Carsten Finger  
Wohnort: Waldstraße 168  
63071 Offenbach  
  
Geburtsdatum: 21.03.1972  
Geburtsort: Frankfurt/ Main  
Familienstand: geschieden

### derzeitige Tätigkeit

---

seit Mai 2005 wiss. Aussendienst der Grünenthal GmbH  
seit Juli 2003 über die Fa. Pharmexx im wiss. Aussendienst von  
GlaxoSmithKline tätig.

### Hochschulausbildung

---

Juli 1999-Juni. 2003 Promotion am Paul Ehrlich Institut, Bundesamt für Sera  
und Impfstoffe, Abt. Medizinische Biotechnologie unter  
Leitung von Prof. Dr. Klaus Cichuteck.  
Thema „Entwicklung retroviraler *scFv display*  
Bibliotheken und Expression therapeutischer Proteine  
durch replikationskompetente retrovirale Vektoren“  
  
Juni 1999 Erhalt des Diploms

Ab Mai 1998                      Diplomarbeit im Institut für Anthropologie und Humangenetik, Abteilung Humangenetik der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt unter Leitung von Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz.  
Thema "Molekulare Charakterisierung Colibystin-ähnlicher Moleküle in Maus-Muskelzellen".

April 1998                      Biologie Diplomprüfung  
Hauptfächer: Humangenetik  
   Anthropologie  
Nebenfächer: Mikrobiologie  
   Pharmakologie

Sept./ Okt. 1994                Biologie-Vordiplomsprüfung

Ab WS 1992                      Studium der Biologie an der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität,  
Frankfurt/ Main

### **Zivildienst**

---

Aug. 1991 – Okt. '92            Altenbetreuung in der Dreikönigs -Gemeinde in Frankfurt, Sachsenhausen.

### **Schulausbildung**

---

1982 – 1991                      Schiller Schule, Gymnasium,  
Frankfurt/ Sachsenhausen

1978 – 1982                      Grunelius Grundschule, Frankfurt/ Oberrad

## 11 Publikationen

FINGER C, SUN Y, SANZ L, ALVAREZ-VALLINA L, BUCHHOLZ CJ, CICHUTEK K.

Replicating retroviral vectors mediating continuous production and secretion of therapeutic gene products from cancer cells.

Cancer Gene Ther. 2005 May;12(5):464-74.

SUN Y, FINGER C, ALVAREZ-VALLINA L, CICHUTEK K, BUCHHOLZ CJ.

Chronic gene delivery of interferon-inducible protein 10 through replication-competent retrovirus vectors suppresses tumor growth.

Cancer Gene Ther. 2005 Nov;12(11):900-12.

URBAN JH, SCHNEIDER RM, COMPTE M, FINGER C, CICHUTEK K, ALVAREZ-VALLINA L, BUCHHOLZ CJ.

Selection of functional human antibodies from retroviral display libraries.

Nucleic Acids Res. 2005 Feb 24;33(4):e35.

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den.....

.....

(Carsten Finger)

## Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

### **Entwicklung retroviraler *scFv display* Bibliotheken und Expression therapeutischer Proteine durch replikationskompetente retrovirale Vektoren**

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den.....

.....

(Carsten Finger)



© 1984

